

FPVΩI



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA

2026

ZBORNÍK
RECENZOVANÝCH
PRÍSPEVKOV



1 0 1
1 1 1 1
1 1 1 0 1
1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1
1 1 1 0 1 0 1
1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 0 1
1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY**

Edícia Prírodovedec č. 923

Študentská vedecká konferencia 2026

Zborník recenzovaných príspevkov z 10. ročníka konferencie konanej 8. apríla 2026 na Fakulte prírodných vied UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40.

Organizátori konferencie:

Fakulta prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici

Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave

Fakulta prírodných vied a informatiky Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre

Editori:

Mgr. Martin Chotár

Mgr. Mária Pappová

Rukopis neprešiel jazykovou korektúrou. Za jazykovú úpravu príspevkov zodpovedajú autori.

Vydavateľ: Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, 2026

Vydanie: prvé

ISBN: 978-80-558-2395-9

EAN: 9788055823959

Študentská vedecká konferencia 2026 – zborník recenzovaných príspevkov © 2026 by Editors:
M. Chotár, M. Pappová is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International.

Vydané s podporou:

KEGA 027UKF-4/2026

KEGA 009UCM-4/2024

KEGA 013UCM-4/2025

Vedeckí garanti

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

Organizačný výbor FPV UCM v Trnave

Mgr. Marián Hostovecký, PhD.
doc. Ing. Jana Jurinová, PhD.
RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.
doc. Ing. Andrea Purdešová, PhD.
Mgr. Martin Valica, PhD.
Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.

Organizačný výbor FPV UKF v Nitre

Mgr. Martin Chotár
Mgr. Michal Fojtík
Mgr. Karin Koóšová
Ing. Michal Levický, PhD.
Mgr. Barbora Loncová, PhD.
prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
Mgr. Mária Pappová
RNDr. Gabriela Repaská, PhD.

Mgr. Matúš Valko
PaedDr. Lukáš Wittlinger
PaedDr. Katarína Zverková

Organizačný výbor FPV UMB v Banskej Bystrici

Mgr. Lenka Balážovičová, PhD.
Mgr. Juraj Butek, PhD.
prof. RNDr. Vladimír Janiš, CSc.
doc. Ing. Radoslava Kanianska, CSc.
RNDr. Miroslav Melicherčík, PhD.
doc. RNDr. Zuzana Melichová, PhD.
Mgr. Michaela Mihoková, PhD.
Ing. Slavka Račáková, PhD.
doc. PaedDr. Miriam Spodniaková Pfefferová, PhD.
doc. PaedDr. Ján Stebila, PhD.
RNDr. Martina Škodová, PhD.
Ing. Jarmila Škrinárová, PhD.
doc. Ing. Juraj Švajda, PhD.
doc. RNDr. Ingrid Turisová, PhD.
prof. Ing. Peter Urban, PhD.

Recenzenti

Mgr. Lenka Balážovičová, PhD.
Ing. Tatiana Bencová, PhD.
RNDr. Zuzana Bielková, PhD.
PaedDr. Ivana Boboňová, PhD.
Mgr. Michaela Bruteničová, PhD.
Mgr. Juraj Butek, PhD.
Mgr. Adam Dudáš, PhD., univ. doc.
Mgr. Zuzana Fabová, PhD.
doc. Mgr. Renáta Gašparová, PhD.
RNDr. Zuzana Gerši, PhD.
Mgr. Richard Hančinský, PhD.
Ing. Marek Haššo, PhD.
prof. RNDr. Juraj Hreško, CSc.
Mgr. Imrich Jakab, PhD.
doc. RNDr. Stanislav Jeleň, CSc.
doc. Ing. Jana Jurinová, PhD.
doc. PaedDr. Jozef Kapusta, PhD.
doc. RNDr. Jarmila Kmeťová, PhD., MBA,
univ. prof.
Ing. Marcela Korenková, PhD., univ. doc.
Ing. Jaroslava Košařová, PhD., MBA
doc. RNDr. Veronika Kováčová, PhD.
Ing. Zuzana Kramplová, PhD.
doc. RNDr. Alfred Krogmann, PhD.
prof. RNDr. Zuzana Krumpálová, PhD.
doc. PaedDr. Martin Magdin, Ph.D.
doc. RNDr. Miroslav Medveď, PhD., univ. prof.
RNDr. Miroslav Melicherčík, PhD., univ. doc.
PaedDr. Viera Michaličková, PhD.

Mgr. Michaela Mihoková, PhD.
RNDr. Šárka Mindová, PhD.
Ing. Regína Mišovičová, PhD.
doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.
doc. RNDr. Martin Morovič, PhD.
RNDr. Magdaléna Nemčíková, PhD.
doc. JUDr. Ing. Daniel Novák, CSc.
Ing. Lucia Ondrigová, PhD.
RNDr. Daša Oremusová, PhD.
Mgr. Janka Pecuchová, PhD.
Mgr. Zuzana Pucherová, PhD.
RNDr. Gabriela Repaská, PhD.
doc. PaedDr. Lucia Rumanová, PhD.
RNDr. Ján Skalka, PhD., univ. doc.
doc. Ing. Jozef Sokol, CSc.
doc. PaedDr. Miriam Spodniaková Pfefferová,
PhD.
Ing. Peter Střelec, PhD.
doc. PaedDr. Ján Štubňa, PhD.
prof. RNDr. Ján Titiš, PhD.
doc. Ing. Ján Tomaškin, PhD.
doc. Ing. Ľudovít Trajtel', PhD.
Ing. Katarína Trnková, PhD.
Mgr. Filip Tulis, PhD.
Mgr. Jozef Vlasáč, PhD.
RNDr. Michaela Žoncová, PhD.
Mgr. Gabriel Zubriczký, PhD.

Predslov

Milé študentky, milí študenti, vážené kolegyně a kolegovia,

dostáva sa vám do rúk zborník príspevkov z 10. ročníka Študentskej vedeckej konferencie (ŠVK), ktorú aj v tomto roku spoločne pripravili Fakulta prírodných vied UMB v Banskej Bystrici, Fakulta prírodných vied UCM v Trnave a Fakulta prírodných vied a informatiky UKF v Nitre.

Toto vedecké podujatie sa už stalo pevnou súčasťou akademického roka a ponúka študentom bakalárskeho, magisterského i doktorandského štúdia cennú príležitosť prezentovať výsledky svojho výskumu, získať skúsenosti s odborným vystupovaním a publikovaním, nadviazať nové kontakty či inšpiráciu do ďalšieho štúdia. Každý príspevok, ktorý študenti pripravia a odprezentujú, predstavuje krok k profesionálnemu vedeckému rastu.

V roku 2026 sa ŠVK konala 8. apríla na pôde Fakulty prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici, Tajovského 40. Príspevky boli rozdelené do tematických sekcií podľa odborov a odborné komisie ocenili tie najlepšie vystúpenia v každej sekcií.

Zborník, ktorý práve držíte v rukách, je výsledkom úsilia nielen študentov, ale aj ich školiteľov, recenzentov a garantov jednotlivých sekcií. Mnohé príspevky prešli prvýkrát procesom recenzného konania – dôležitého kroku na ceste k vedeckému publikovaniu.

Veľká vďaka patrí všetkým, ktorí sa podieľali na organizácii konferencie, vytvorili jej odbornú i priateľskú atmosféru a podporili študentov na ich akademickej ceste. Oceneným srdečne blahoželáme a všetkým účastníkom ďakujeme za aktívny prístup. Veríme, že skúsenosti získané na ŠVK budú pre vás motiváciou aj do ďalších rokov.

Tešíme sa na stretnutie opäť o rok!

S úctou,

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

Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.
prodekanka pre medzinárodné vzťahy a doktorandské štúdium, FPV UCM v Trnave

prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
prodekan pre vedu a výskum, FPVal UKF v Nitre

Ocenené príspevky

Sekcia Biológia, ekológia a environmentalistika

Lenka Ilavská – Molekulárny podklad pre meiotické delenie *Euglena gracilis* a *Euglena longa* (UCM)

Frederika Greschnerová – Vplyv rôznych typov kompostov na dynamiku obsahu chlorofylu u vybraného hybridu paradajky jedlej (*Solanum lycopersicum* L.) (UMB)

Michal Melich – Vyhodnotenie vplyvu kadmia na mladé rastliny slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) pri hydroponickej kultivácii (UKF)

Sekcia Biotechnológie

Petra Madejová – Antifungálna aktivita vybraných esenciálnych olejov na *Candida albicans* (UKF)

Janka Kureková – Celulolytická aktivita baktérií izolovaných z drevných húb (UMB)

Anita Murínová – Efekt fluorochinolónového chemoterapeutika sarafloxacín hydrochloridu na bičíkovca *Euglena gracilis* (UCM)

Sekcia Geografia, regionálny rozvoj a geológia

Xénia Zajaková – Spotrebiteľské správanie pri nákupoch potravín: príklad z Myjavskej kopaničiarskej oblasti (UKF)

Marek Ratkovský – Geológia a mineralizácia hydrotermálne-žilného ložiska polymetalických rúd Jasenie--Soviansko (Tatrikum, Západné Karpaty) (UMB)

Filip Antalík – Distribúcia chemických prvkov vo výplni amygdaloidných dutín permských bázických vulkanitov hronika na lokalite Malužiná--Svidovo v Nízkych Tatrách (UMB)

Sekcia Chémia

Jakub Urbanovič – Iminobenzofuranóny: pokus o prípravu nových analógov známych fotoprepínačov (UMB)

Natália Málíková – Návrh a príprava hemi-a ftalokyanínov s obsahom tiofénu pre využitie vo fotodynamickej terapii (UCM)

Vanesa Šušuková – Jednojadrové hexakoordinované komplexy Fe(III) so Schiffovými bázami obsahujúcimi tetrahydrofuránový kruh (UCM)

Sekcia Informatika a matematika

Elvíra Suchánková – Deterministická heuristická inferencie cizích kľúčů v polostrukturovaných datech (UKF)

Martin Vajs – Zovšeobecnenia vybraných reálnych integrálov metódami komplexnej analýzy (UMB)

Marcela Medlenová – Iterácie relačných modifikátorov (UMB)

Sekcia Odborová didaktika

Lucia Krellová – Tvorba a pedagogické overenie metodické príručky pre učiteľov ekonomiky v prvom ročníku SŠ (UKF)

Janka Motešická – Inteligentný skleník s BBC micro:bit (UKF)

Marek Skupeň – Tvorba výučbových aktivít z chémie s využitím medzipredmetových vzťahov (UMB)

Sekcia PhD I. (biológia, ekológia)

Daniela Vnuková – Vplyv MCP-1 na vybrané funkcie granulóznych buniek (UKF)

Silvia Bartóková – Jazero Vinderel ako archív vegetačných zmien v pohorí Maramureš (Východné Karpaty, Rumunsko) (UMB)

Alexandra Hlavatá – Multimodálne fenotypovanie genotypu pšenice: analýza rastových a fyziologických charakteristík v podmienkach aplikácie zinku, mykorízy a vodného deficitu (UCM)

Sekcia PhD II. (chémia, biológia)

Vladimíra Krempaská – Pôdne baktérie izolované z gudrónových odkalísk ako potenciálny nástroj

bioremediácie

(UMB)

Pavol Hlubina – Využitie dostupných digitálnych zobrazovacích zariadení na nedeštruktívne hodnotenie chlorofylov a rastu biomasy v rastlinách

(UCM)

Ľubomíra Jurečková – Adaptácia salicylátovej metódy na stanovenie koncentrácie amónnych iónov v rámci fermentačnej produkcie poly-3-hydroxybutyrátu baktériami druhu *Cupriavidus necator*

(UCM)

Sekcia PhD III. (informatika, geografia)

Dominik Hrinko – Návrh siete distribuovaných sond pre detekciu prieniku pomocou SSH Honeypotov

(UCM)

Martin Chotár – Hodnotenie zložitosti zdrojového textu pomocou veľkých jazykových modelov

(UKF)

Tomáš Hrdý – Priestorový vývoj biotopu svišťa v Ďumbierskych Tatrách na príklade masívu Prašivej

(UMB)

V Banskej Bystrici, 8. apríla 2026

Obsah

SEKCIA: BIOLÓGIA, EKOLÓGIA A ENVIRONMENTALISTIKA	13
Vplyv rastových regulátorov na tvorbu a rast kalusovej biomasy <i>Tagetes patula</i> L.	14
<i>Mária Cingelová, Ján Kraic, Šarlota Kaňuková</i>	
Hodnotenie prevalencie húb rodu <i>Lophodermium</i> na <i>Pinus sylvestris</i> vo vzťahu k vybraným environmentálnym faktorom stanovišťa	20
<i>Zdenko Farkaš, Janka Schlarmannová, Emília Ondrušková, Katarína Adamčíková</i>	
Genomická analýza extracelulárnej DNA z kondezátov vydechovaného vzduchu	25
<i>Tomáš Forgáč, Monika Kubáňová</i>	
Vplyv rôznych typov kompostov na dynamiku obsahu chlorofylu u vybraného hybridu paradajky jedlej (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	30
<i>Frederika Greschnerová, Janka Ševčíková</i>	
Molekulárny podklad pre meiotické delenie <i>Euglena gracilis</i> a <i>Euglena longa</i>	35
<i>Lenka Ilavská, Vanessa Gelanová, Dominika Vešelényiová</i>	
Vplyv vitamínu K2 na génovú expresiu osteogénnych markerov v primárnej kultúre osteoblastov potkana	42
<i>Jessica Krčmárová, Vladimíra Mondočková</i>	
Vyhodnotenie vplyvu kadmia na mladé rastliny slnečnice ročnej (<i>Helianthus annuus</i> L.) pri hydroponickej kultivácii	48
<i>Michal Melich</i>	
Vývin <i>Phyllium letiranti</i>, Cumming, Teemsa, 2018 v podmienkach chovu insektária	56
<i>Adriana Mikulová, Vladimír Langraf</i>	
SEKCIA: BIOTECHNOLÓGIE	63
Vplyv extrahovadiel na antibakteriálnu aktivitu extraktov šalvie (<i>Salvia officinalis</i> L.) a mäty (<i>Mentha x piperita</i> L.)	64
<i>Kristína Chudá</i>	
Inhibičný účinok vybraných esenciálnych olejov na <i>Candida glabrata</i>	70
<i>Petra Janitorová, Libuša Lengyelová</i>	
Biosorpcia Li z vodných roztokov pomocou chemicky modifikovanej biomasy zelených rias	77
<i>Romana Kormúthová, Šimon Ján Rezbárik, Vanda Adamcová, Martin Valica</i>	
Celulolytická aktivita baktérií izolovaných z drevných húb	85
<i>Janka Kureková, Terézia Beck</i>	
Antibakteriálna a antibiofilmová aktivita laktobacilov voči biofilm tvoriacim patogénom	93
<i>Michaela Lajčinová, Lucia Bocánová, Gabriela Bukovská</i>	
Antifungálna aktivita vybraných esenciálnych olejov na <i>Candida albicans</i>.	101
<i>Petra Madejová, Libuša Lengyelová</i>	
Vplyv vybraných kultivačných faktorov na rast koreňových kultúr <i>Datura stramonium</i> L. a produkciu tropánových alkaloidov	109
<i>Sofia Mikulášková, Šarlota Kaňuková</i>	
Efekt fluorochinolónového chemoterapeutika sarafloxacín hydrochloridu na bičikovca <i>Euglena gracilis</i> 115	
<i>Anita Murínová, Vanessa Gelanová, Dominika Vešelényiová, Juraj Krajčovič</i>	
SEKCIA: CHÉMIA	121
Využitie termochemickej konverzie na zhodnotenie trusu exotických zvierat	122
<i>Simona Ďurišová, Vladimír Frišták</i>	
Štúdium derivátov chinolínu ako látok s potenciálnym antimikrobiálnym účinkom	129
<i>Adriana Humajová, Mária Maliarová, Tibor Maliar</i>	
Štúdium syntézy a vlastností komplexov železa s vybranými aminokyselinami	136
<i>Patrik Krajčo</i>	
Syntéza štruktúrnych analógov Donepezilu kondenzačnými reakciami N-benzylpiperidónu	142
<i>Viktória Kvietková, Zita Tokárová</i>	

Návrh a príprava hemi-a ftalokyanínov s obsahom tiofénu pre využitie vo fotodynamickej terapii	147
<i>Natália Málíková, Zita Tokárová</i>	
Syntéza a charakterizácia nových solubilizovaných N-heterocyklov s potenciálnym využitím vo fotodynamickej terapii	152
<i>Alex Ondruška, Dušan Bortňák</i>	
Sorpčná separácia Li z nízkoobsahových roztokov pomocou prírodných materiálov	157
<i>Viktória Pócssová, Lenka Vavrinčová, Vanda Adamcová, Martin Valica</i>	
Syntéza jednojadrových Co(II) a Cu(II) komplexov s použitím asymetrických acetylacetonátov	165
<i>Jerguš Rosík, Cyril Rajnák, Franz Renz</i>	
Usporiadanie 1,3-diiminoizoindolových stavebných jednotiek v štruktúre nesymetrických ftalokyanínov	173
<i>Samuel Skalický, Zita Tokárová</i>	
Jednojadrové hexakoordinované komplexy Fe(III) so Schiffovými bázami obsahujúcimi tetrahydrofuranový kruh	178
<i>Vanessa Šušuková, Cyril Rajnák, Erika Samolňová, Ján Moncol, Franz Renz</i>	
Iminobenzofuranóny: pokus o prípravu nových analógov známych fotoprepínačov	186
<i>Jakub Urbanovič</i>	
SEKCIA: INFORMATIKA A MATEMATIKA	193
Funkcionálne postupnosti v špeciálnych triedach funkcií	194
<i>Zuzana Čabaníková</i>	
Prediktívny model hodinového rizika dopravnej nehodovosti	207
<i>Miriama Javorská, Jarmila Škrinárová</i>	
Diniho derivované čísla	213
<i>Zuzana Kocúrová</i>	
OSINT ako nástroj detegovania hrozieb	220
<i>Jakub Kubaliak</i>	
Iterácie relačných modifikátorov	225
<i>Marcela Medlenová</i>	
Architektúra a možnosti federácie digitálnych dvojčiat v koncepte Smart City	231
<i>Marek Mráz</i>	
Vývoj softvérovej aplikácie s integráciou generatívnej umelej inteligencie	237
<i>Martin Schmidt, Vladimír Siládi</i>	
Využitie veľkých jazykových modelov pri spracovaní dát v prostredí univerzitnej jedálne	245
<i>Mikhail Shishov, Mária Pappová</i>	
Deterministická heuristická inferencie cizích kľúčů v polostrukturovaných datech	250
<i>Elvira Suchánková, Martin Drlík</i>	
Spracovanie modelu kocky PaperCube v softvéri GeoGebra	257
<i>Zoran Trnka</i>	
Zovšeobecnenia vybraných reálnych integrálov metódami komplexnej analýzy	263
<i>Martin Vajs</i>	
Efektívne spôsoby znižovania halucinácií v generatívnej umelej inteligencii	271
<i>Serhii Vielkin</i>	
SEKCIA: GEOGRAFIA A REGIONÁLNY ROZVOJ A GEOLÓGIA	277
Distribúcia chemických prvkov vo výplni amygdaloidných dutín permských bázických vulkanitov hronika na lokalite Malužiná – Svidovo v Nízkych Tatrách (Západné Karpaty)	278
<i>Filip Antalík, Štefan Ferenc</i>	
Krajina ako zdroj poznania: TOP 10 lokalít mikroregiónu Púchov	286
<i>Martin Bakoš, Hilda Kramáreková</i>	
Edukácia geografie v Maroku	294
<i>Boris Brath, Miroslava Trembošová</i>	
Dokumentácia krasových javov v kontexte geohazardov v lokalite Šmýkanec	302
<i>Ján Laco, Matej Masný</i>	
Monitoring drevinovej vegetácie s využitím GIS technológií na príklade Mestského parku na Tajovského	

ulici v Banskej Bystrici	310
<i>Egor Markov, Tomáš Šuvada</i>	
Supergénne minerály U–Mo mineralizácie na vybraných lokalitách Spišsko-gemerského rudohoria 316	
<i>Martina Pavlikovská, Štefan Ferenc</i>	
Geológia a mineralizácia hydrotermálne-žilného ložiska polymetalických rúd Jasenie – Soviansko (Tatrikum, Západné Karpaty, Stredné Slovensko)	322
<i>Marek Ratkovský, Štefan Ferenc</i>	
Zaujímavosti územia MAS Bebrava	328
<i>Ľuboš Sokol, Hilda Kramáreková</i>	
Nemšová - V zrkadle skla a zelene	338
<i>Patricia Štefánková, Hilda Kramáreková</i>	
Spotrebiteľské správanie pri nákupoch potravín: príklad z Myjavskej kopaničiarskej oblasti	345
<i>Xénia Zajaková, Miroslava Trembošová</i>	
SEKCIA: ODBOROVÁ DIDAKTIKA	351
Školský model bezdrôtového prenosu energie vhodný pre bádateľsky orientované vyučovanie fyziky 352	
<i>Ľuboš Bariak, Martin Hruška</i>	
Aktivity z chémie podporujúce chápanie trojrozmernosti molekúl	359
<i>Natália Franeková, Marek Skoršepa</i>	
Múzeum TANAP-u ako priestor pre bádateľsky orientované vyučovanie	367
<i>Natália Galliková Ramona Babosová</i>	
Praktické využitie laserového gravírovania pri tvorbe vzoriek materiálov	372
<i>Jakub Gonda, Petra Kvasnová</i>	
Gamifikácia ako prostriedok podpory motivácie a angažovanosti žiakov vo vyučovaní programovania 378	
<i>Miriám Hrdá, Gabriela Lovászová</i>	
Tvorba a pedagogické overenie metodickej príručky pre učiteľov ekonomiky v prvom ročníku SŠ386 <i>Lucia Krellová, Jarmila Hudáková</i>	
Didaktická analýza pracovného zošita Hravá geografia 8 v kontexte zmien vo vzdelávaní	391
<i>Patrik Ľupták, Martina Škodová</i>	
Inteligentný skleník s BBC micro:bit	399
<i>Janka Motešická, Martin Cápaj</i>	
Hydraulický zdvihák	407
<i>Matúš Pavlús, Petra Kvasnová</i>	
Tvorba výučbových aktivít z chémie s využitím medzipredmetových vzťahov	410
<i>Marek Skupeň, Marek Skoršepa</i>	
Postoje učiteľov odborných ekonomických predmetov ku kontinuálnemu vzdelávaniu a ich vplyv na profesijný rozvoj	419
<i>Patrik Staňo, Jarmila Hudáková</i>	
Možnosti didaktickej implementácie histórie prírodných vied do vyučovania chémie	427
<i>Ester Švienta, Marek Skoršepa</i>	
Odlievanie kovov do sépiovej kosti ako učebná pomôcka v technickom vzdelávaní	434
<i>Terézia Vojčeková, Kvasnová Petra</i>	
Finančná gramotnosť žiakov slovenských stredných škôl	440
<i>Katarína Zrebená, Marta Urbaníková</i>	
SEKCIA: PHD I.	446
Jazero Vinderel ako archív vegetačných zmien v pohorí Maramureš (Východné Karpaty, Rumunsko) 447	
<i>Silvia Bartóková, Ladislav Hamerlík</i>	
2D simulácia 100 ročného prietoku na rieke Žitava	455
<i>Adam Čaplák, Henrich Grežo</i>	
Vírus obyčajnej mozaiky fazule (BCMV) ako významný patogén strukovín	460

Tatiana Dobiašová, Adam Achs, Miroslav Glasa

Vplyv eugenolu na redoxnú rovnováhu a mieru dozrievania prasacích oocytov kultivovaných in vitro
466

Patrik Fecko

Proteolytický systém u *Euglena gracilis*: Unikátne kalpaíny s WWE doménou..... 472

Vanessa Gelanová, Dominika Vešelényiová

Multimodálne fenotypovanie genotypu pšenice: analýza rastových a fyziologických charakteristík v podmienkach aplikácie zinku, mykorízy a vodného deficitu 477

Alexandra Hlavatá, Matušiková Ildikó, Hauptvogel Pavol

Genomický skrining druhu *Aeshna cyanea* s využitím RAPD markerov 482

Zuzana Hrivňak Lehká, Vladimír Langraf, Zuzana Schubertová, Katarína Ražná

Štúdium neviničových izolátov HSVd na pochopenie širšieho hostiteľského okruhu v rámci Slovenska
489

Jana Kemenczeiová, Sabína Petrášová, Peter Alaxin, Miroslav Glasa

Effect of FLI medium (FGF2, LIF and IGF1) on mitochondrial gene expression of porcine oocytes derived from small follicles 497

Anna Ševčíková

Založenie a charakterizácia línie kmeňových buniek sidy obojpohlavnej..... 503

Simona Slobodová, Šarlota Kaňuková, Ján Kraic

Fyziologická odpoveď borovice čiernej na kmene *Dothistroma pini* v podmienkach in vitro..... 509

Lucia Sporinová, Beáta Piršelová, Libuša Lengyelová, Emília Ondrušková

Vplyv MCP-1 na vybrané funkcie granulóznych buniek 515

Daniela Vnuková, Barbora Loncová

SEKCIA: PHD II...... 524

Príprava inovatívneho sorbentu na báze biouhlia funkcionalizovaného 2-(hydroxymetyl)-12-crown-4 éterom pre selektívnu sorpciu lítia..... 525

Kristína Beliančinová, Madhav Prabhakar Chavhan, Vladimír Frišták

Potlačenie hyperhydricity a chlorózy *Sida rhombifolia* L. v podmienkach in vitro..... 531

Juraj Habdák, Ján Kraic

Využitie dostupných digitálnych zobrazovacích zariadení na nedeštruktívne hodnotenie chlorofylov a rastu biomasy v rastlinách 535

Pavol Hlubina, Ľubica Uváčková

Nutričné a senzorické vlastnosti domácich kysnutých žemlí s prídavkom bôbu obyčajného (*Vicia faba* L.) 541

Daniel Jánoška, Michaela Havrlentová

Adaptácia salicylátovej metódy na stanovenie koncentrácie amónnych iónov v rámci fermentačnej produkcie poly-3-hydroxybutyrátu baktériami druhu *Cupriavidus necator* 549

Ľubomíra Jurečková, Daniela Chmelová, Miroslav Ondrejovič

Syntéza a štúdium medzimolekulových interakcií heterometalických Ni(II)-4f(III) komplexov 556

Dominika Kendrová, Cyril Rajnák, Erika Samolová, Franz Renz

Aplikácia kolorimetrickej metódy stanovenia kyseliny fytovej mikrotitračnými platničkami v kontexte rôznych typov rastlinných experimentov 564

Viktória Košíková, Peter Nemeček

Pôdne baktérie izolované z gudrónových odkalísk ako potenciálny nástroj bioremediácie 571

Vladimíra Krempaská, Viktória Chlpeková, Elena Kupcová, Michaela Murgašová

Vplyv kadmiového stresu na profil izoforiem β -1,3-glukanáz u dvoch odrôd *Glycine max* 577

Daniela Motičáková, Patrik Mészáros

Potenciál baktérií izolovaných z kompostov produkovať kyselinu 3-indol octovú 584

Michaela Murgašová, Vladimíra Krempaská, Matej Vesteg

Literárny prehľad metód stanovenia N-nitrozamínov vo vode..... 591

Matúš Pitoňák, Andrea Purdešová

Analýza štruktúrnych a magnetických vlastností pentakoordinovaných komplexov medi 597

Ráchel Rusová, Miriama Malček Šimunková, Ján Moncol, Franz Renz, Cyril Rajnák

The impact of tobacco consumption on exhaled volatile organic compounds 605

Daniil Vainberg, Dominika Vešelényiová

Optimalizácia produkcie kalusu hybridnej levandule prostredníctvom strojového učenia	610
<i>Lea Veničáková, Seyid Amjad Ali, Šarlota Kaňuková</i>	
SEKCIA: PHD III.....	616
Porovnanie výkonnosti lokálne nasadených MQTT sprostredkovateľov	617
<i>Nicolas Búčik, Marek Šimon</i>	
Hodnotenie zložitosti zdrojového textu pomocou veľkých jazykových modelov	622
<i>Martin Chotár, Matúš Kleštinec, Dáša Munková</i>	
Fyzicko-geografické determinanty lokalizácie historických vodných nádrží – klauz na Slovensku (Západné Karpaty): priestorová analýza pomocou GIS	629
<i>Jakub Cimbala, Pavel Hronček</i>	
Multimodálna analýza VR tréningových simulácií pre Industry 5.0: Interdisciplinárny prístup k fyziologickým, behaviorálnym a technologickým aspektom	637
<i>Denis Ďuriač</i>	
Vplyv stratégie rozdelenia dát na detekciu anomálií v sieťovej prevádzke	643
<i>Oto Gróf, Ladislav Huraj</i>	
Mobilný most medzi desktopovým programovacím agentom a iPhone klientom.....	648
<i>Peter Hafner, Michal Čerňanský</i>	
Priestorový vývoj biotopu svišťa v Ďumbierskych Tatrách na príklade masívu Prašivej	656
<i>Tomáš Hrdý, Pavel Hronček, Peter Urban</i>	
Návrh siete distribuovaných sond pre detekciu prieniku pomocou SSH Honeypotov	661
<i>Dominik Hrinkino, Ladislav Huraj</i>	
Výučba miestnej krajiny s využitím geolokačnej hry	666
<i>Renáta Klimanová, Miroslava Trembošová</i>	
Prvočíselná hra v procese tvorby riešenia v rámci konštrukčného výskumu.....	671
<i>Tomáš Kling</i>	
NÁVRH METODIKY PRE HODNOTENIE BEZPEČNOSTI ZASTÁVOK VEREJNEJ OSOBNEJ DOPRAVY	677
<i>Matúš Kubica, Lubomír Černický</i>	
Integrácia Proximal Policy Optimization do rámca Stable-Retro pre učenie agentov.....	683
<i>Martin Kubovčík</i>	
Využitie štruktúrneho modelovania na analýzu dopadu COVID-19 na udržateľné spotrebiteľské správanie	688
<i>Jakub Marták, Kristína Medeková</i>	

SEKCIA

BIOLOGIA, EKOLÓGIA A ENVIROMENTALISTIKA



1 0 1
1 1 1 1
1 1 1 0 1
1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1
1 1 1 0 1 0 1
1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 0 1
1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1

Vplyv rastových regulátorov na tvorbu a rast kalusovej biomasy *Tagetes patula* L.

The effect of growth regulators on callus formation and biomass production of French marigold (*Tagetes patula* L.)

Mária Cingelová¹ – Ján Kraic^{1,2} – Šarlota Kaňuková^{1,2}

¹Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

²Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

¹cingelova2@ucm.sk, ^{1,2}sarlota.kanukova@ucm.sk, ^{1,2}jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt

Aksamietnica rozložitá (*Tagetes patula* L.) je významným zdrojom karotenoidov a tiofénov, ktorých obsah v rastlinnom pletive ovplyvňujú podmienky prostredia. Produkcia homogénnej biomasy v *in vitro* podmienkach preto predstavuje vhodný prístup na získavanie stabilného materiálu pre následnú produkciu sekundárnych metabolitov. Cieľom práce bolo zhodnotiť účinok rôznych koncentrácií rastových regulátorov IAA a TDZ na tvorbu kalusu a prírastok biomasy z listových, stonkových a koreňových explantátov *T. patula*. Explantáty boli kultivované na MS médiu počas 12 týždňov a hodnotila sa čerstvá hmotnosť vytvoreného kalusu. Najvyšší prírastok biomasy bol zaznamenaný u listových explantátov pri 1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ (13,61 ± 0,93 g), zatiaľ čo stonkové a koreňové explantáty dosiahli maximum pri 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ (8,68 ± 3,83 g; 6,79 ± 1,2 g). Získané výsledky predstavujú východiskový materiál pre ďalšie využitie kalusových kultúr *T. patula* v podmienkach *in vitro*.

Kľúčové slová: *Tagetes* sp., aksamietnica, kalogenéza, kalus, *in vitro* kultivácia

Abstract

French marigold (*Tagetes patula* L.) is a significant source of carotenoids and thiophenes, the content of which in plant tissue is influenced by environmental conditions. The production of homogeneous biomass under *in vitro* conditions therefore represents a suitable approach for obtaining stable material for subsequent production of secondary metabolites. The aim of the study was to evaluate the effect of different concentrations of growth regulators IAA and TDZ on callus formation and biomass increase from leaf, stem, and root explants of *T. patula*. Explants were cultured on MS medium for 12 weeks, and the fresh weight of the formed callus was evaluated. The highest biomass increase was recorded in leaf explants at 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L TDZ (13.61 ± 0.4 g), while stem and root explants reached their maximum at 7 mg/L IAA + 0.5

mg/L TDZ (8.68 ± 3.83 g and 6.79 ± 1.2 g). The obtained results provide baseline material for further utilization of *T. patula* callus cultures under *in vitro* conditions.

Key words: *Tagetes* sp., marigold, callogenesis, callus, *in vitro* cultivation

Úvod

Rod *Tagetes* L. (Asteraceae), známy ako aksamietnica, zahŕňa vyše 50 druhov pôvodom najmä z oblastí Strednej a Južnej Ameriky [1], ktoré sa v súčasnosti pestujú v rôznych klimatických pásmach po celom svete [2]. Okrem estetického významu v okrasnom záhradníctve sú tieto druhy cenené aj pre svoju chemickú rozmanitosť a schopnosť produkovať široké spektrum sekundárnych metabolitov s bežnými biologickými účinkami [3]. Medzi najvýznamnejšie zlúčeniny patria karotenoidy, z ktorých luteín a zeaxantín zohrávajú dôležitú úlohu v nutričnom a potravinárskom priemysle [4][5] a tiofény s preukázanými antimikrobiálnymi, insekticídnyimi a fototoxickými účinkami [6]. Tieto látky podmieňujú ich široké využitie pri výrobe výživových doplnkov, v dermatológii, agronómii, ako aj pri vývoji ekologických pesticídov [7][8].

Obsah sekundárnych metabolitov v rastlinách *Tagetes* je však mimoriadne variabilný. Významné rozdiely vznikajú v závislosti od podmienok pestovania, ako je zloženie pôdy, dostupnosť vody, intenzita svetla, teplota či sezónnosť zberu [9] [10] [11]. Táto environmentálne podmienená variabilita predstavuje zásadný problém pri priemyselnej produkcii, kde sa vyžaduje stabilný, kvalitný a reprodukovateľný rastlinný materiál. Z toho dôvodu stúpa záujem o alternatívne stratégie, ktoré by umožnili stabilnú produkciu metabolitov bez závislosti od klimatických či geografických faktorov.

Jednou z alternatív k tradičnému pestovaniu je *in vitro* kultivácia rastlinných pletív a buniek, ktorá umožňuje produkciu homogénneho materiálu s reprodukovateľným metabolickým profilom v kontrolovaných podmienkach [12] [13] [14]. Kľúčovým

východiskovým krokom je indukcia kalogenézy, tvorba neorganizovaného kalusového pletiva, ktoré slúži ako základ pre bunkové suspenzné kultúry, štúdium biosyntetických dráh aj pre regeneráciu rastlín [15].

Výskumy realizované najmä na *Tagetes erecta* L. preukázali, že indukcia kalusu závisí od vhodnej kombinácie auxínov a cytokinínov, ako aj typu explantátu [16] [17]. Najčastejšie používané auxíny (2,4-D, NAA, IAA) v kombinácii s cytokinínmi BAP alebo KIN podporujú tvorbu neorganizovaného parenchymatického pletiva [12] [17], pričom thidiazuron (TDZ) sa v druhoch čeľade Asteraceae často spája so zvýšenou kalogenézou [18]. Pre *Tagetes patula* L. však stále chýbajú systematické údaje o účinku kombinácií rôznych rastových regulátorov pri rôznych typoch explantátov, čo obmedzuje porovnanie rýchlosti a množstva kalusovej biomasy [19] [20] [21].

Cieľom tejto práce bolo preto zhodnotiť vplyv rôznych koncentrácií IAA a TDZ na indukciu kalusu a tvorbu kalusovej biomasy z listových, stonkových a koreňových explantátov *Tagetes patula* L.

Materiál a metódy

1.1 Príprava rastlinného materiálu

Semená aksamietnice rozložitej (*Tagetes patula* L.) získané od spoločnosti ZELSEED s.r.o. (Horná Potôň, Slovensko) boli povrchovo sterilizované v 96% (v/v) etanole počas 30 s. a následne v 4,7 % (v/v) roztoku chlórnanu sodného (Tatrachema, v.d., Slovenská republika) s prípravkom jednej kvapky Tween 20 počas 15 min. za kontinuálneho miešania na orbitálnej trepačke. Sterilizované semená sa následne trikrát prepláchlí sterilnou destilovanou vodou a boli prenesené na MS médium (Murashige a Skoog) [22] (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holandsko) s polovičným obsahom všetkých zložiek, vrátane vitamínov, sacharózou (3 %; w/v) a agarom (0,8 %;w/v), pH 5,7 - 5,8. Kultivácia prebiehala v kultivačnej miestnosti pri kontrolovanej teplote 23 ± 2°C a fotoperióde 16h svetlo/8 h tma, počas 4 týždňov.

1.2 Indukcia kalogenézy

Listové, stonkové a koreňové explantáty boli odobrané z rastlín asepticky kultivovaných na ½ MS médiu. Explantáty boli kultivované na MS médiu s agarom, s rôznymi koncentraciami rastových regulátorov IAA a TDZ uvedených v Tabuľke 1. Kultivácia prebiehala v tme, pri teplote 23°C±2°C, počas 12 týždňov. Kalusy boli pasážované po 3, 6 a 9 týždňoch na čerstvé médium s rovnakým zložením rastových regulátorov. V rovnakých časových

intervaloch sa kalusy odvážili a zaznamenala sa ich čerstvá hmotnosť. Po ukončení 12 týždňovej kultivácie boli všetky namerané údaje podrobené štatistickej analýze.

Tab. 1 Kombinácie rôznych koncentrácií rastových regulátorov (RR) v MS médiu na indukciu kalogenézy.

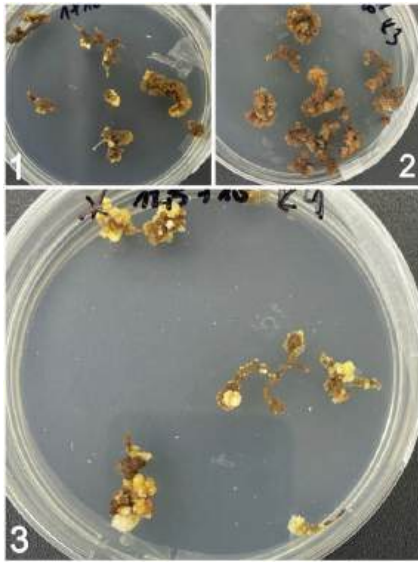
RR	Koncentrácia (mg/L)								
IAA	1	1	1	7	7	7	12,5	12,5	12,5
TDZ	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	10
			0			0			

1.3 Vyhodnotenie kalogenézy

Indukcia a rast kalusu boli sledované v štyroch biologických opakovaniach, pričom v každom z nich bolo päť explantátov z listov, resp. stoniek, koreň. Hodnotenými parametrami boli percento tvorby kalusu, morfológické parametre ako farba, štruktúra a čerstvá hmotnosť kalusu. Výsledné údaje boli spracované v programe Microsoft Excel pre Microsoft 365 MSO verzia 2304 a štatisticky vyhodnotené pomocou analýzy rozptylu (one-way ANOVA) a následného testu najmenšieho významného rozdielu (LSD) pomocou softvéru Statgraphics verzia 19.2.01 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA). Významné rozdiely medzi priemerami boli testované pomocou LSD testu na 5 % hladine významnosti ($p < 0,05$).

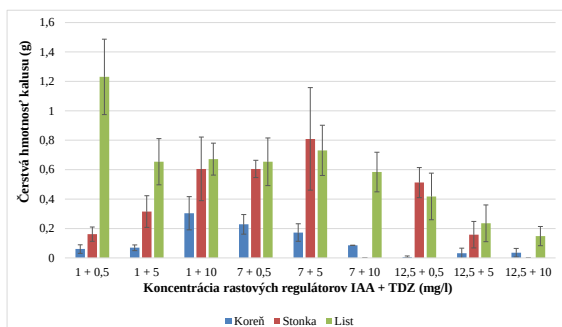
2 Výsledky a diskusia

Indukcia kalogenézy u *Tagetes patula* L. bola úspešná pri väčšine kombinácií rastových regulátorov a pri všetkých troch typoch explantátov. Frekvencia tvorby kalusu sa pohybovala od 0 do 100 % v závislosti od typu explantátu a použitých koncentrácií IAA a TDZ. Najvyššiu tvorbu kalusu (80-100 %) dosiahli listové explantáty, zatiaľ čo koreňové explantáty reagovali najslabšie najmä pri vyšších koncentráciách TDZ (obr. 1).



Obr. 1 Kalusy iniciované z koreňových explantátov po 12 týždňoch kultivácie (1- kombinácia 1 mg/L IAA + 10 mg/L TDZ; 2- kombinácia 7 mg/L IAA + 10 mg/L TDZ; 3- 12,5 mg/L IAA + 10 mg/L TDZ).

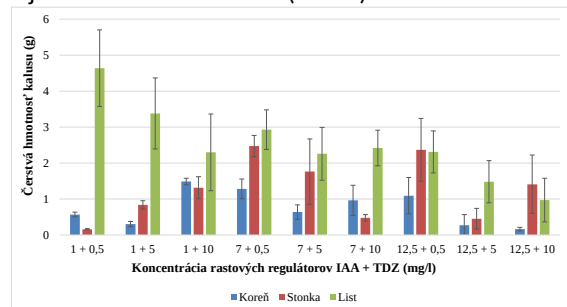
Počas prvých troch týždňov kultivácie boli zaznamenané signifikantné rozdiely v tvorbe kalusovej biomasy medzi jednotlivými typmi explantátov aj medzi rôznymi kombináciami rastových regulátorov použitých na indukciu kalusu ($p < 0,05$). Najvyššiu čerstvú hmotnosť dosiahli listové explantáty na médiu s 1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ ($1,23 \pm 0,26$ g), čo predstavovalo najvýraznejší rast spomedzi všetkých variantov. Stonkové explantáty mali maximálnu hmotnosť približne $0,81 \pm 0,35$ g pri kombinácii 7 mg/L IAA + 5 mg/L TDZ, zatiaľ čo hmotnosť čerstvej biomasy z koreňov sa pohybovala od 0,007 g do 0,3 g. Pri najvyššej koncentrácii TDZ (10 mg/L) bol pozorovaný zreteľný inhibičný účinok, predovšetkým pri stonkových a koreňových explantátoch.



Graf 1 Vplyv rastových regulátorov na čerstvú hmotnosť biomasy kalusov (g) indukovaných z koreňa, stonky a listu po 3 týždňoch kultivácie.

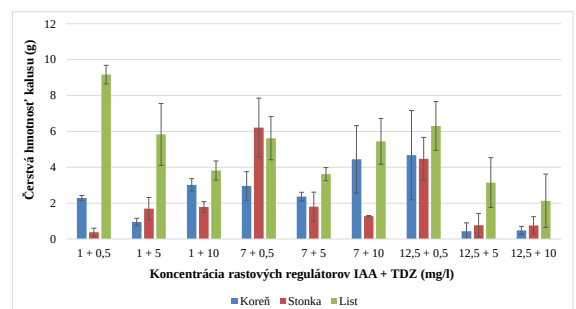
Počas šiestich týždňov kultivácie sa zaznamenali taktiež signifikantné rozdiely v tvorbe kalusovej biomasy medzi jednotlivými typmi explantátov aj kombináciami koncentrácií IAA a TDZ použitých na

indukciu kalusu. Listové explantáty dosiahli najvyššiu čerstvú hmotnosť biomasy na médiu s najnižšou koncentraciou s 1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ, $4,64 \pm 1,06$ g, čo predstavovalo najvýraznejší rast oproti ostatným variantom. Stonkové explantáty dosiahli maximálnu hmotnosť $2,47 \pm 0,29$ g na médiu s 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ. Koreňové explantáty zostali najslabšie s maximálnou hmotnosťou čerstvej biomasy $1,49 \pm 0,09$ g. Vysoká koncentrácia TDZ (10 mg/L) v tomto období pozorovateľne inhibovala tvorbu biomasy, najmä u stoniek a koreňov (Graf 2).



Graf 2 Vplyv rastových regulátorov na čerstvú hmotnosť biomasy kalusov (g) indukovaných z koreňa, stonky a listu po 6 týždňoch kultivácie.

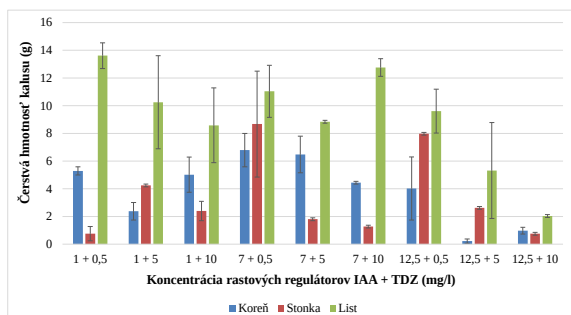
V priebehu deviatich týždňov došlo k výraznému nárastu kalusovej biomasy vo všetkých typoch explantátov. Listové explantáty dosiahli až $9,17 \pm 0,52$ g na médiu s 1 mg/L IAA a 0,5 mg/L TDZ. Stonkové explantáty výrazne pokročili a maximum čerstvej hmotnosti biomasy na médiu s 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ bolo $6,21 \pm 1,64$ g a korene až na $4,68 \pm 2,49$ g pri vyšších dávkach IAA. Inhibičný efekt TDZ (10 mg/L) sa stále prejavoval, no už v menšej miere ako na začiatku (Graf 3).



Graf 3 Vplyv rastových regulátorov na čerstvú hmotnosť biomasy kalusov (g) indukovaných z koreňa, stonky a listu po 9 týždňoch kultivácie.

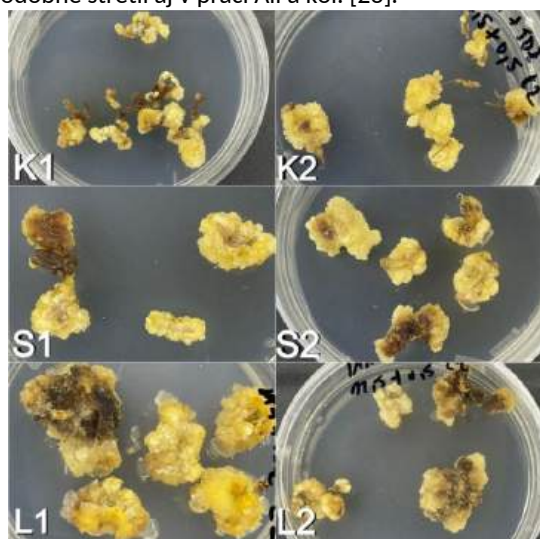
Počas 12. týždňov kultivácie sme zaznamenali najvyššiu mieru tvorby kalusovej biomasy. Pričom listové explantáty na médiu s 1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ prekročili hmotnosť 13,5 g, presnejšie $13,61 \pm 0,93$ g. Taktiež sa zaznamenala vysoká hmotnosť čerstvej biomasy pri listových explantátoch na médiu 7 mg/L IAA + 10 mg/L TDZ ($12,76 \pm 0,64$ g). Stonkové explantáty dosiahli maximum $8,68 \pm 3,83$ g na médiu s 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ a taktiež na médiu s 12,5

mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ ($7,98 \pm 1,2$ g). Koreňové explantáty dosiahli najmenšiu hmotnosť po dvanástich týždňoch kultivácie s maximom $6,79 \pm 1,2$ g na médiu s 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ (Graf 4).

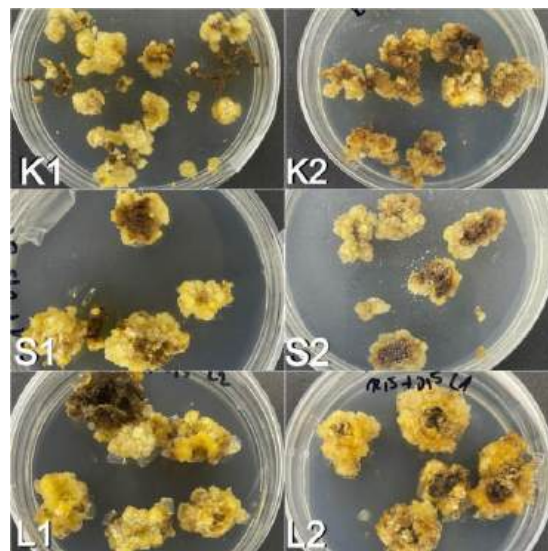


Graf 4 Vplyv rastových regulátorov na čerstvú hmotnosť biomasy kalusov (g) indukovaných z koreňa, stonky a listu po 12 týždňoch kultivácie.

Kalusy *Tagetes patula* L. boli v prvých 3–6 týždňoch prevažne bieložlté až žltohnedé. Po 9.–12. týždňoch sa na najproduktívnejších variantoch (1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ a 12,5 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ) vyvinulo intenzívne žlté až žltozelené sfarbenie s krémovým odtieňom, sprevádzané lokálnym hnednutím (obr. 2 a 3). Žlté až žltozelené pigmenty (hlavne luteín a zeaxantín) sú typické pre rod *Tagetes* a súvisia s akumuláciou karotenoidov v dlhodobej kultivácii, čo pozorovali aj v práci Benítez-García a kol. [12]. Lokálne hnednutie po 9. týždni pravdepodobne vyplýva z oxidácie fenolov pri dlhodobej expozícii TDZ s čím sa podobne stretli aj v práci Ali a kol. [23].



Obr. 2 Kalusy iniciované z explantátov (K-koreň, S-stonka, L-list) po 9 týždňoch kultivácie (1- kombinácia 1 mg/L IAA + 0,5 mg/l TDZ; 2- kombinácia 12,5 mg/L IAA + 0,5 mg/l TDZ).



Obr. 3 Kalusy iniciované z explantátov (K-koreň, S-stonka, L-list) po 12 týždňoch kultivácie (1- kombinácia 1 mg/L IAA + 0,5 mg/l TDZ; 2- kombinácia 12,5 mg/L IAA + 0,5 mg/l TDZ).

Výsledky experimentu u *Tagetes patula* L. potvrdili výraznú závislosť kalogenézy od typu explantátu, kombinácií koncentrácií rastových regulátorov IAA, TDZ a od dĺžky kultivácie. Espinoza a kol. [24] pri indukcii kalusu z listových explantátov *Tagetes erecta* L. dosiahli najvyššiu mieru kalogenézy (87–100 %) práve na médiu s nízkou koncentráciou auxínu 2,4-D 1 mg/l v kombinácii s cytokinínom BAP 2 mg/l, pričom naše optimálne podmienky (1 mg/l IAA + 0,5 mg/l TDZ) sú tiež založené na nízkych koncentráciách rastových regulátorov.

Osman a kol. [19] priamo porovnávali listové, stonkové a koreňové explantáty *T. patula* L. na MS médiu s kombináciami NAA a BAP, pričom kalusová biomasa listových explantátov výrazne prevyšovala stonkové a koreňové explantáty ako aj v našom prípade.

Vyššie koncentrácie TDZ (5–10 mg/L) po 9. týždni často spôsobovali hnednutie a spomalenie rastu, pravdepodobne v dôsledku nadmernej cytokinínovej aktivity a akumulácie fenolických látok, s čím sa stretli aj v štúdií Lin a kol. [25] pri indukcii kalogenézy bambusu-*Bambusa edulis*. Autori uvádzajú, že pri použití vyššej koncentrácie cytokinínu TDZ (9,9 mg/L) sa zvýšilo hnednutie 3 až 4 krát.

Naše výsledky potvrdzujú, že kombinácia 0,5 mg/L TDZ + 1 mg/L IAA pre listové explantáty a 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ pre stonkové a koreňové explantáty predstavuje vyvážený stav pre *Tagetes patula* L., ktorý maximalizuje biomasu bez rizika stresovej odpovede typickej pri vyšších dávkach TDZ.

Záver

Výsledky práce potvrdili, že tvorba kalusu *in vitro*

podmienkach je u *Tagetes patula* L. možná zo všetkých testovaných typov explantátov, pričom jej rozsah výrazne závisel od použitých koncentrácií rastových regulátorov IAA a TDZ. Najvyššia tvorba kalusu aj najväčší prírastok biomasy boli zaznamenané u listových explantátov na médiu 1 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ, zatiaľ čo u stonkových a koreňových explantátov sa najvyššie hodnoty dosiahli pri koncentrácií 7 mg/L IAA + 0,5 mg/L TDZ. Tieto zistenia potvrdzujú vhodnosť kalusových kultúr *T. patula* ako počiatočného materiálu pre optimalizáciu produkčných systémov vzhľadom na biomasu ako aj sekundárnych metabolitov *in vitro* podmienkach.

PodĎakovanie

Práca vznikla s podporou Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra a FPPV-05-2026 projektu podporeného FPV, UCM v Trnave.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] CHITRAKAR, Bimal; ZHANG, Min; BHANDARI, Bhash, (2019). Edible flowers with the common name "marigold": their therapeutic values and processing. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 89, pp. 76-87. DOI 10.1016/j.tifs.2019.05.008.
- [2] SALEHI, Bahare et al., (2018). *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, vol. 23, no. 11, e2847. DOI 10.3390/molecules23112847.
- [3] XU, Li-wei et al., (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, vol. 4, no. 2, pp. 103-117. DOI 10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004
- [4] EGHLEMA, Ghasem et al., (2024). Variability in lutein and zeaxanthin content, fatty acid and phytosterols profiles, and genetic parameters of some *Tagetes* spp. cultivars. *BMC Plant Biology*, vol. 26, no. 1, pp. 198. DOI 10.1186/s12870-025-08061-w.
- [5] ŠIVEL, Miroslav et al., (2014). Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. *Czech Journal Food Science*, vol. 32, no. 6, pp. 521-525. DOI 10.17221/104/2014-CJFS.
- [6] SOWBHAGYA, B. Halagur. et al., (2004). Natural colorant from marigold-chemistry and technology. *Food Reviews International*, vol. 20, no. 1, pp. 33-50. DOI 10.1081/FRI-120028829.
- [7] KANNAN, Keerthana et al., (2024). Biopesticide effect on crops for the bioactive components extracted from *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *Discover Agriculture*, vol. 2, no. 37. DOI 10.1007/s44279-024-00045-y.
- [8] IBRAHIM, Sabrin Ragab Mohamed et al., (2022). Thiophenes—Naturally Occurring Plant Metabolites: Biological Activities and In Silico Evaluation of Their Potential as Cathepsin D Inhibitors. *Plants*, vol. 11, no. 4, pp. 539. DOI 10.3390/plants11040539.
- [9] BESPALHOK, João Carlos Feltran; HATTORI, Kazumitsu, (1998). Friable embryogenic callus and somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold (*Tagetes erecta* L.). *Plant cell reports*, vol. 17, no. 11, pp. 870-875. DOI 10.1007/s002990050500.
- [10] WALIA, Swati et al., (2020). Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya. *Industrial Crops and Products*. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.112449.
- [11] KUMAR, Ajay et al., (2022). Understanding the Effect of Different Abiotic Stresses on Wild Marigold (*Tagetes minuta* L.) and Role of Breeding Strategies for Developing Tolerant Lines. *Frontiers in plant science*, vol. 12, e754457. DOI 10.3389/fpls.2021.754457.
- [12] BENÍTEZ-GARCÍA, Israel et al., (2014). Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 17, no. 3, pp. 107-113. DOI 10.1016/j.ejbt.2014.01.004.
- [13] MOHADDAB, Marouane et al., (2022). Biotechnology and *In Vitro* Culture as an Alternative System for Secondary Metabolite Production. *Molecules*, vol. 27, no. 22. DOI 10.3390/molecules27228093.
- [14] FAZILI, Afaan Mohammad et al., (2022). *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 46, no. 1, e35. DOI 10.1186/s42269-022-00717-z.7.
- [15] SKOOG, Folke; MILLER, Carlos Otto, (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 11, pp. 118-130. PMID 13486467.
- [16] FIBRIANI, Suwinda et al., (2023). Callus Induction of Marigold Plants (*Tagetes Erecta* L) with a Combination of 2,4D and Kinetin. *International Journal of Economic, Technology and Social Sciences*, vol. 4, no. 1, pp. 79-85. e-ISSN 2775-2976.
- [17] HUSSAIN, Athar; LATIF, Maida, (2012). *In vitro* studies in *Tagetes erecta* (marigold) under auxins (IAA, NAA) and cytokinins (BAP, Kinetin) effect for callus formation by different explants. *Biologia*, vol. 58, pp. 41-46. ISSN 0006-3096
- [18] MISRA, Pratibha et al., (2001). Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In Vitro*

- Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 37, pp. 466-470. DOI 10.1007/s11627-001-0082-2.
- [19] OSMAN, Hamid et al. (2012). Establishment of calli cultures from different explants of *Tagetes erecta* and *T. Patula*. *Journal of Applied Sciences Research*, vol. 8, no. 7, pp. 3850-3854. ISSN 1819-544X.
- [20] VENKATESAN, D. et al., (2025). Marigold breeding in India: a comprehensive review of genetic advances, techniques and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, vol. 16. DOI 10.3389/fpls.2025.1619375.
- [21] WANTE, Solomon Peter et al., (2017). Callus induction in Marigold-Nemo Mix (*Tagetes patula* L) required for diesel toxicity evaluation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, vol. 15. ISSN: 2155-9821.
- [22] MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke, (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-49. ISSN 1399-3054.
- [23] ALI, Haroon Muhammad et al. (2022). The multipotent thidiazuron: A mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures *in vitro*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 69, no. 6, pp. 2624-2640. DOI 10.1002/bab.2311.
- [24] ESPINOZA, Pablo Emilio Vanegas et al., (2017). Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology*, vol. 34, no. 4, pp. 187-192. DOI 10.5511/plantbiotechnology.17.1120a.
- [25] LIN, Choun-Sea et al., (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 76, pp. 75-82. DOI 10.1023/A:1025848016557.

Hodnotenie prevalencie húb rodu *Lophodermium* na *Pinus sylvestris* vo vzťahu k vybraným environmentálnym faktorom stanovišťa

Evaluation of the prevalence of *Lophodermium* species on *Pinus sylvestris* in relation to selected environmental site conditions

Zdenko Farkaš¹ – Janka Schlarmanová² – Emília Ondrušková³ – Katarína Adamčíková⁴

¹Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

²Katedra zoológie a antropológie, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

^{1,3,4}Ústav ekológie lesa SAV, v.v.i., Akademická 2, 949 01 Nitra

¹ zdenko.farkas@ukf.sk, ²jschlarmanova@ukf.sk, ³ondruskova@ife.sk, ⁴ katarina.adamcikova@ife.sk,

Abstrakt

Príspevok sa zameriava na vyhodnotenie vplyvu vybraných environmentálnych faktorov a metodiky zberu na výskyt húb rodu *Lophodermium* na hostiteľskej drevine *Pinus sylvestris*. V priebehu rokov 2022 – 2026 bolo na 16 lokalitách Slovenska odobratých 181 vzoriek, ktoré boli podrobené vizuálnej analýze prítomnosti reprodukčných orgánov huby tzv. hysterotécií. Výsledky preukázali koreláciu medzi nadmorskou výškou a pozitívnym záznamom prítomnosti huby, kedy prevalencia stúpila z 33,6 % v polohách s nadmorskou výškou do 300 m n. m. na 96,7 % vo vyšších polohách nad 600 m n. m.. Porovnanie biotopov odhalilo výrazný nepomer prevalencie huby medzi lesným (94,7 %) a mestským prostredím (33,9 %). Z hľadiska metodiky sa ako kľúčový determinant ukázal zdroj vzoriek, kde ihlice z opadu vykazovali vyššiu mieru pozitivity (60,5 %) než vzorky odobraté priamo zo stromu (13,8 %). Štúdia naznačuje, že vyššia detekcia húb rodu *Lophodermium* je podmienená synergiou viacerých faktorov.

Kľúčové slová: *Lophodermium*, hysterotécia, *Pinus sylvestris*, nadmorská výška, sypavky

Abstract

This study evaluates the impact of selected environmental factors and sampling methodology on the occurrence of fungi in the genus *Lophodermium* on the host tree species *Pinus sylvestris*. Between 2022 and 2026, 181 samples were collected across 16 sites in Slovakia and visually analyzed for the presence of reproductive organs, known as hysterothecia.

The results demonstrated a correlation between altitude and positive records of the fungus, with prevalence rising from 33.6% in areas up to 300 m a.s.l. to 96.7% at higher elevations above 600 m a.s.l. A comparison of habitats revealed a significant disparity in fungal prevalence between forest (94.7%) and urban environments (33.9%). Regarding methodology, the

source of the samples proved to be a key determinant; needle litter showed a higher positivity rate (60.5%) compared to samples collected directly from the tree (13.8%). The study suggests that the higher detection rate of *Lophodermium* fungi is conditioned by the synergy of multiple factors.

Key Words: *Lophodermium*, hysterothecium, *Pinus sylvestris*, altitude, needle cast

Úvod

Borovice predstavujú na Slovensku druhý najdôležitejší rod ihličnatých drevín pokrývajúcich približne 6,6 % zalesnenej plochy. Sú ohrozované mikroskopickými hubovými patogénmi, ktoré môžu spôsobovať vážne škody. Medzi významných pôvodcov ochorení patria aj druhy húb z rodu *Lophodermium* [1,2,3]. Tieto mikroskopické huby žijú v ihliciach hostiteľa buď ako endofyty bez viditeľných symptómov [4], alebo ako parazity vyvolávajúce ochorenia. Na Slovensku sú hubové choroby borovic čoraz častejšie, pričom ich šíreniu napomáha vlhké prostredie, teplota okolo 27 °C, vietor a zrážky [5,6].

Rod *Lophodermium* celosvetovo infikuje približne 30 druhov borovic, pričom k najnáchylnejším patrí *Pinus sylvestris* a *P. resinosa*. Infekcia sa však bežne vyskytuje aj na ďalších druhoch, ako sú *P. brutia*, *P. densiflora*, *P. mugo*, *P. nigra*, *P. tabuliformis* a mnoho ďalších [7].

V Európe sú najčastejšími hostiteľmi *P. sylvestris*, na ktorých najčastejšie parazitujú druhy *L. seditiosum*, *L. pinastri*, *L. conigenum* a *L. pini-excelsae*, ktoré spôsobujú problémy najmä v lesných škôlkach [7]. Na Slovensku bol výskyt týchto húb potvrdený aj na nových hostiteľských druhoch, ku ktorým patrí *P. aristata*, *P. armandii*, *P. flexilis*, *P. heldreichii*, *P. rigida* a *P. uncinata* [3].

Lophodermium zahŕňa druhy so špecifickým vzťahom k určitým druhom borovic, ale aj také druhy, ktoré majú širšie hostiteľské spektrum. Väčšina druhov sa pritom vyskytuje buď na 5-ihličkových, alebo na 2- až

3-ihličkových boroviciach [5,8].

Za najškodlivejší druh je považovaný *L. seditiosum*, ktorý napáda ihličie už počas vegetačnej sezóny, a to najmä v lokalitách s vysokou vlhkosťou a nižšími teplotami [9,3].

Naproti tomu *L. pinastri* pôsobí menej agresívne a osídľuje primárne odumreté ihlice, zatiaľ čo *L. conigenum* sa sústreďuje na ihličie odumierajúcich vetiev alebo celých stromov [9]. Charakteristickým morfológickým znakom húb rodu *Lophodermium* sú reprodukčné orgány tzv. hysterotécia, sú čierne, lesklé v tvare oválu (cca 0,8 mm). Sú mierne vyvýšené, usporiadané pozdĺžne, v nich sa vyvíjajú vrecká s askospórami, ktoré sa pri dozretí uvoľňujú cez štrbinu [7,10].

1.1 Dôsledky

Výskyt patogénnych druhov spôsobuje vädnutie konárov a rednutie stromov v spodnej časti koruny. V dôsledku poškodenia ihlíc sa znižuje fotosyntetická aktivita stromu, oslabenie sa prejavuje intenzívnejšie počas zimy a suchého obdobia, znižuje sa estetická hodnota stromu. Niektoré druhy z rodu *Lophodermium*, dokážu mladé stromy usmrtiť v priebehu jedného roka [11].

1.2 Záznamy zo Slovenska

Z dlhodobého hľadiska patrili borovice medzi najmenej poškodzované dreviny, ale v roku 2006 bolo na viac ako 32 % stromov zaznamenané poškodenie spôsobené hubovými patogénmi. Na asimilačných orgánoch borovic sa najčastejšie vyskytovali sypavky rodu *Lophodermium*, zatiaľ čo na koreňových nábehoch a kmeňoch sa objavovali huby ako *Heterobasidion annosum* a druhy rodu *Phellinus* [12,13]. Rok 2009 priniesol výrazný pokles výskytu húb na boroviciach v lesných porastoch, čo bolo spôsobené znížením infekčného tlaku zo strany sypaviek *Lophodermium sp.* a *Dothistroma septosporum*. V roku 2010 sa poškodenia na boroviciach zaznamenali na 76,6 % stromov, čo predstavuje nárast o 10,5 % oproti predchádzajúcemu roku. Najviac poškodené boli opäť asimilačné orgány, kde sa objavilo poškodenie na viac ako 52,3 % stromov, čo bolo zapríčinené napadnutím starších ihlíc sypavkami rodu *Lophodermium* [14,15].

Monitoring výskytu a rozšírenia mikroskopických húb na ihliciach *P. nigra* s príznakmi poškodenia bol uskutočnený v Nitre (2013 – 2014). Identifikovaných bolo deväť druhov mikroskopických húb, pričom najvýznamnejšie škody spôsobovali *L. seditiosum* a *C. niveum* [11].

Výsledky výskumu hubových spoločenstiev *P. nigra* a *P. sylvestris* na 67 stanovištiach na Slovensku odhalili prítomnosť 18 druhov húb, z ktorých sa najčastejšie vyskytovali *Sphaeropsis sapinea*, *Lophodermium pinastri*, *Cyclaneusma minus* a *C. niveum*. Na opadnutom ihličí dominovali rody *Lophodermium* a

Cyclaneusma, na konároch dominovali najmä *S. sapinea* a *Zythiostroma pinastri* [16].

V roku 2021 došlo k zvýšenému výskytu sypaviek na boroviciach, vyvolaný *L. pinastri* a *L. seditiosum*. Tento nárast bol zaznamenaný nielen v lesných škôlkach, ale aj v mladých lesných porastoch na viacerých miestach Slovenska, predovšetkým v oblastiach Záhoria, Gemera a Spiša. Zvýšený výskyt týchto húb bol spôsobený predovšetkým klimatickými podmienkami v predchádzajúcom roku, najmä vlhkejším priebehom prvej polovice vegetačného obdobia [5].

Najnovšie výsledky výskumu umožňujú identifikáciu prítomnosti druhov *L. seditiosum* a *L. pinastri* molekulárnymi metódami na základe prítomnosti DNA aj priamo v pletive ihlice pomocou tzv. druhovo špecifických primerov. Týmto molekulárnymi analýzami u 200 vzoriek ihlíc zozbieraných z 19 druhov borovic pochádzajúcich zo 75 lokalít Slovenska sa potvrdilo, že viac ako polovica monitorovaných stromov (59,5 %) bola pozitívna na výskyt buď *L. pinastri*, *L. seditiosum*, alebo na oba druhy zároveň. *L. pinastri* sa vyskytol v 113 vzorkách (56,5 %) zo 48 lokalít, *L. seditiosum* v 63 vzorkách (31,5 %) z 32 lokalít. Prítomnosť oboch druhov na tej istej borovici bola zistená v 57 vzorkách (33,5 %) z 29 lokalít, pričom v niektorých prípadoch sa oba druhy vyskytovali na tej istej borovici. Výsledky monitoringu oboch druhov nepreukázal žiadne významné rozdiely medzi lesnými a mestskými porastmi. *L. pinastri* sa vyskytol v 64,15 % vzoriek z lesov a 62,60 % vzoriek z mestského prostredia, zatiaľ čo *L. seditiosum* bol zistený v 35,85 % vzoriek z lesov a 37,40 % z mestských porastov [3].

Cieľom príspevku je vyhodnotiť výskyt a rozšírenie húb rodu *Lophodermium* a analyzovať vplyv vybraných environmentálnych faktorov a typu stanovišťa na ich výskyt na *P. sylvestris*.

2 Materiál a metódy

Ihlice sme odoberali z hostiteľskej dreviny *P. sylvestris* z rôznych typov porastov v rámci Slovenska (Tab. 1). Ihlice sme zberali buď priamo zo stromu alebo zo zeme pod drevinou. Jedna vzorka predstavuje cca 30-50 ihlíc z toho istého stromu. V laboratóriu sme ihlice vyhodnotili vizuálne pomocou LED laboratórnej lampy s integrovanou kruhovou lupou. Hodnotili sme prítomnosť plodničiek (hysterotécií, Obr. 1 a 2) typických pre rod *Lophodermium*. Vzorka ihlíc, v ktorej sme vizuálne potvrdili prítomnosť hysterotécií, sme označili ako pozitívnu.

Pri každom odbere vzorky sme zaznamenali kľúčové stanovištné charakteristiky potrebné pre následnú analýzu environmentálnych faktorov. Pomocou GPS zariadenia sme určili presne nadmorskú výšku danej lokality. Zároveň sme lokalitu klasifikovali podľa typu prostredia na mestskú (urbánnu) zeleň alebo lesný porast. Všetky získané údaje boli následne spracované v programe Microsoft Excel vo forme databázy.



Obr. 1 Hysterotécie huby rodu *Lophodermium*



Obr. 2 Detailný pohľad na hysterotécie huby rodu *Lophodermium*

Tab. 1 Detailný prehľad hodnotených lokalít *P. sylvestris*

Lokality	Počet odberových miest v rámci lokality	Rok zberu	Počet vzoriek	Zdroj	Prostredie
Bratislava	1	2025	4	zem (2) strom (2)	mestské
Danišovce	2	2022	13	zem (13)	lesné
Detva	2	2026	2	zem (2)	lesné
Hrabušice	4	2022	22	zem (22)	lesné
Kriváň	1	2026	2	zem (1) strom (1)	mestské
Lučenec	2	2025	10	zem (5) strom (5)	mestské
Nitra	3	2025	12	zem (8) strom (4)	mestské
Palárikovo	2	2025	4	zem (2) strom (2)	mestské
Podhorie	1	2025	1	zem (1)	lesné
Poltár	4	2025	25	zem (13) strom (12)	mestské
Rimavská Sobota	3	2026	26	zem (26)	mestské
Spišský Hrhov	2	2022	11	zem (11)	lesné
Šurany	4	2025	4	zem (4)	mestské
Vernár	1	2022	8	zem (8)	lesné
Vieska nad Žitavou	1	2024,2025,2026	20	zem (18) strom (2)	mestské
Zvolen	1	2025	17	zem (16) strom (1)	mestské

3 Výsledky a diskusia

Na 16 lokalitách sme zozbierali 181 vzoriek ihlíc z *P. sylvestris*. Z tohto celkového počtu vzoriek sme potvrdili prítomnosť hysterotécií na 96 vzorkách, čo je 53,0% všetkých vzoriek. Negativita sa vyskytovala u 85 vzorkách, čo predstavuje 47,0%.

3.1 Vplyv nadmorskej výšky na incidenciu húb rodu *Lophodermium*

Hodnotené lokality sme podľa nadmorskej výšky rozdelili do troch výškových stupňov (Tab. 2). Zo získaných hodnôt vyplýva, že nižšie polohy do 300 m n. m. vykazujú pozitívnu prítomnosť patogénu len v približne jednej tretine vzoriek. Zatiaľ čo vo vyšších polohách nad 600 m n. m. bola miera infekcie oveľa vyššia (96,7%, Tab. 2). Analýza potvrdila, že dochádza k exponenciálnemu nárastu pozitivity vzoriek v závislosti od nadmorskej výšky.

Výsledky naznačujú, že nadmorská výška môže byť jedným z rozhodujúcich environmentálnych faktorov, ktorý ovplyvňuje šírenie húb rodu *Lophodermium*. S narastajúcou eleváciou dochádza k zmenám mikroklimy, najmä k nárastu relatívnej vlhkosti vzduchu a poklesu priemerných teplôt, čo vytvára optimálne

podmienky pre infekčný proces.

Tento trend naznačuje, že existujú hranice nadmorskej výšky v ktorých sa hubám darí oveľa lepšie.

Tab. 2 Výsledky hodnotenia prítomnosti húb rodu *Lophodermium* v stanovených výškových stupňoch na *Pinus sylvestris*

Výškový stupeň (m. n. m.)	Počet vzoriek			Prevalencia (%)
	Celkom (n)	Pozitívne	Negatívne	
0 – 300	122	41	81	33,6
300 – 600	29	26	3	89,7
600 – 900	30	29	1	96,7

3.2 Porovnanie mestského a lesného prostredia

Celkom sme vyhodnotili 124 vzoriek ihlíc pochádzajúcich z mestského a 57 z lesného prostredia. Miera pozitivity v lesnom prostredí predstavuje 94,7%, čo je takmer trojnásobok v porovnaní s mestským prostredím (33,9%, Tab. 3).

Tab. 3 Porovnanie miery pozitivity vzoriek medzi urbánnym a lesným biotopom

Typ prostredia	Počet vzoriek			Prevalencia (%)
	Celkom (n)	Pozitívne	Negatívne	
mestské	124	42	82	33,9
lesné	57	54	3	94,7

Zistený nepomer medzi mestským a lesným prostredím je pravdepodobne podmienený synergiou nasledujúcich faktorov:

- **Korelácia s nadmorskou výškou:** Prevažná väčšina mestských lokalít (122 zo 124 vzoriek) sa nachádzala v nízkych polohách do 300 m n. m., kde kumulatívny efekt nízkej nadmorskej výšky a mestského biotopu vytvára bariéru pre šírenie húb.

- **Ekologická stabilita:** Lesné porasty v polohách nad 300 m. n. m. poskytujú stabilnejšiu mikroklimu s vyššou retenciou vlhkosti, čo potvrdzuje lineárny nárast výskytu patogénu. V kategórii 600 – 900 m n. m. v lesnom prostredí dosiahla pozitivita svoje maximum, pričom len jeden záznam bol negatívny.

3.3 Vplyv zdroja ihlíc na prítomnosť húb z rodu *Lophodermium*

Vysokú mieru pozitívnych vzoriek (prítomnosť hysterotécii), 60,5 % bolo zaznamenaných u vzoriek ihlíc pochádzajúcich zo zeme (opad), pričom nízka pozitívna detekcia bola na ihličí zozbieraných zo stromu (13,8 %, Tab. 4).

Tab 4. Vplyv zdroja ihlíc na početnosť pozitívnych náleзов hysterotécii na *Pinus sylvestris*

Zdroj ihlíc	Počet vzoriek			Prevalencia (%)
	Celkom (n)	Pozitívne	Negatívne	
zem	152	92	60	60,5
strom	29	4	25	13,8

Tieto výrazné rozdiely sú výsledkom infekčného cyklu druhov *Lophodermium*, u ktorých k masívnej tvorbe fruktifikačných orgánov (hysterotécii) dochádza práve na už odumretom a opadnutom ihličí. *Pinus sylvestris* si zachováva zelené ihličie 2 až 4 roky. V ich poslednom lete ihličie odumrie a opadne na zem, kde sa následne môžu vytvárať plodničky huby *Lophodermium* [10].

Okrem environmentálnych faktorov sa ako významný determinant úspešnosti detekcie ukázal aj samotný zdroj biologického materiálu.

Nízka detekcia na ihličí zo stromu (13,8 %) môže byť spôsobená začiatočným štádiom infekcie v čase

odberu, kedy sú ešte hysterotécia nevyvinuté, alebo vyššou obranyschopnosťou hostiteľa.

Záver

Predbežné výsledky hodnotenia prítomnosti húb *Lophodermium* na *P. sylvestris* a analýzy vzťahov k vybraným environmentálnym faktorom naznačujú, že ich výskyt možno pripísať synergií viacerých faktorov a to nadmorskej výške, typu prostredia aj zdroju ihlíc. Tieto prvotné výsledky získané deskriptívnym vyhodnotením v budúcom výskume potvrdíme štatistickými metódami a morfológickú identifikáciu húb rozšírime determináciou druhov *Lophodermium* molekulárnymi metódami, čím získame detailnejšie údaje o diverzite a ekológii týchto druhov húb.

Poďakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 2/0034/25.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MORAVČÍK, M. et al. 2020. *Report on the forest sector of the Slovak Republic 2019: green report (abridged version)*. Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic and National Forest Centre: Bratislava, Slovakia; p. 63.
- [2] SARVAŠ, M. et al. 2010. *Basic characteristics of forest trees - ecological demands, morphology, forest seed production and nursery, gene management basic*. Zvolen, Slovakia: National Forest Center. p. 82.
- [3] ONDRUŠKOVÁ, E. – ADAMČÍKOVÁ, K. et al. 2023. Checking the balance between pathogenic and mutualistic pine needle fungi of the genus *Lophodermium* in forested and urban areas of Slovakia. In *SCANDINAVIAN JOURNAL OF FOREST RESEARCH* [online], vol. 38, no. 1 - 2, pp. 39 – 48 [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02827581.2023.2191004>>.
- [4] FRASZ, L. S. 2011. The development and comparison of quantitative PCR assays and enzyme-linked immunosorbent assays as rapid detection methods for specific foliar endophytes. In *Thesis (Master of Science in Biology with a Specialization in Chemical and Environmental Toxicology)*. Carleton University, Ottawa.
- [5] LEONTOVYČ, R. – KUNCA, A. 2021. Sypavky na boroviciach. In *APOL*. [online], vol. 2, no. 1, pp. 52 – 56 [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <https://www.los.sk/pdf/apol_zbor21_1.pdf>.
- [6] AHANGER, F. A. et al. 2016. Effect of Weather Parameters on Blue Pine (*Pinus wallichiana* J.) Needle Blight and Ascospore Release of *Lophodermium pinastri* in India. In *Journal of Agricultural Technology* [online], vol. 12, no. 4, pp. 721 – 729 [cit. 2025-02-20]. ISSN 1686-9141. Dostupné na: <<http://www.ijat-aatsea.com>>.

[7] LAZAREV, V. et al. 2007. The Most Frequent Lophodermium spp. on Scots Pine and Austrian Pine and Their Role in the Appearance of Other Fungi on the Needles. In *Acta Silv. Lign. Hung.*, Spec. Edition. pp. 53 – 59 [cit. 2025-02-20]. Institute of Lowland Forestry and Environment, Novi Sad, Serbia.

[8] KOUKOL, O. – PUSZ, W. – MINTER, D. 2015. A new species of Lophodermium on needles of mountain pine (*Pinus mugo*) from the Giant Mountains in Poland. In *Mycological Progress*. [online], vol. 14, no. 23 [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11557-015-1038-y>>.

[9] GOHEEN, E. M. – WILLHITE, E. A. 2006. Field Guide to Common Diseases and Insect Pests of Oregon and Washington Conifers. In *Pest Management Handbooks* [online], vol. 2, no. 1, pp. 52 – 56 [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/pine-pinus-spp-lophodermium-needle-cast>>.

[10] MINTER, W. D. 1981. Lophodermium on pines. In *Mycological Papers* [online], no. 147 [cit. 2025-02-20]. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. Dostupné na: <https://forestpathology.org/pdfs/minter1981_LophodermiumOnPines.pdf>.

[11] IVANOVÁ, H. 2015. Fungi associated with a decline of *Pinus nigra* in urban greenery. In *Acta fytotechnica et Zootechnica*. [online], vol. 18, no. 2, pp. 36 – 43 [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <https://www.researchgate.net/publication/280830037_IVANOVA_H_2015_Fungi_associated_with_a_decline_of_Pinus_nigra_in_urban_greenery_Acta_Fytotechnica_et_Zootechnica_18_2_36-43>.

[12] LEONTOVYČ, R. et al. 2012. *MONITORING VÝSKYTU ŠKODLIVÝCH ČINITELŮV NA SLOVENSKU V ROKU 2012*. [online], [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <https://www.los.sk/asfeu/leontovycA_2013.pdf>.

[13] LEONTOVYČ, R. 2007. Monitorovanie výskytu škodlivých činiteľov. In *MONITORING LESOV SLOVENSKA FOREST FOCUS, ČMS LESY 2006*. ISBN 978-80-8093-024-0. [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://web.nlcsk.org/wp-content/uploads/2021/05/69.pdf>>.

[14] LEONTOVYČ, R. 2010. Výskyt škodlivých činiteľov. In *MONITORING LESOV SLOVENSKA ČMS LESY, PROJEKT FUTMON 2009*. ISBN 978-80-8093-115-5. [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://web.nlcsk.org/wp-content/uploads/2021/05/1867.pdf>>.

[15] LEONTOVYČ, R. 2011. Výskyt škodlivých činiteľov a prejavov poškodenia. In *MONITORING LESOV SLOVENSKA PROJEKT FUTMON, ČMS LESY 2010*. ISBN 978-80-8093-42-1. [cit. 2025-02-20]. Dostupné na: <<https://web.nlcsk.org/wp-content/uploads/2021/05/2524.pdf>>.

[16] PASTIRČÁKOVÁ, K. – PASTIRČÁK, M. 2015. The

most important fungi on needles and twigs of pine trees in Slovakia. In *XVII CONGRESS OF EUROPEAN MYCOLOGISTS*. Fungal pathogenesis and disease control. Poster nr. 21.

Genomická analýza extracelulárnej DNA z kondenzátov vydychovaného vzduchu

Genomic analysis of extracellular DNA from exhaled breath condensate

Tomáš Forgáč¹ – Monika Kubáňová^{2,3,4} – Ondrej Pös^{3,4}

¹Katedra molekulárnej biológie, PriF UK v Bratislave, Ilkovičova 3278/6, 841 04 Karlova Ves, Bratislava,

²Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

³Vedecký Park Univerzity Komenského, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

⁴Geneton s.r.o., Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

forzac721@gmail.com, forzac15@uniba.sk, kubanova26@uniba.sk, ondrej.pos@uniba.sk

Abstrakt

Analýza kondenzátov vydychovaného vzduchu je neinvazívna metóda na detekciu rôznorodých molekúl. Klinický význam majú prchavé organické zlúčeniny, proteíny, nukleové kyseliny, lipidy a sacharidy. Vzorka vydychnutého vzduchu umožňuje identifikáciu patológií, napríklad rakovina pľúc. Zvýšená koncentrácia vybraných prchavých organických látok a neprchavých látok naznačuje prítomnosť alebo vznik patológie. Na odber vzorky existuje malé množstvo komerčne dostupných prístrojov, na špecifickejšie potreby si laboratória vytvárajú vlastné kondenzátory. Väčšia variabilita je vo výbere metód na analýzu vzorky, výber závisí od typu analyzovanej molekuly a jej povahy. V našej práci budeme sekvenovať DNA izolovanú z kondenzátov vydychovaného vzduchu a taktiež z plazmy a následne budú generované dáta analyzované pomocou bioinformatických nástrojov za účelom identifikácie nádorových signatúr.

Kľúčové slová: rakovina, extracelulárne nukleové kyseliny, EBC, biomarkery,

Abstract

The analysis of exhaled breath condensate is a non-invasive method for the detection of diverse molecules. Volatile organic compounds, proteins, nucleic acids, lipids and sugars are of clinical importance. A sample of exhaled breath condensate allows identification of pathologies, like for example lung cancer. Increased concentrations of select volatile organic compounds and non-volatile compounds indicate an arising or already present pathology. Only a small number of commercially available devices exist for sample acquisition, for more specific use, laboratories create their own condensers. Greater variability is in the choice of methods for sample analysis, the choice depends on the type of analyzed molecule and its properties. In our work, we will sequence DNA isolated from exhaled breath

condensates and from plasma, the generated data will be analyzed with the help of bioinformatic tools to identify tumor signatures.

Key Words: cancer, extracellular nucleic acids, EBC, biomarkers,

Úvod

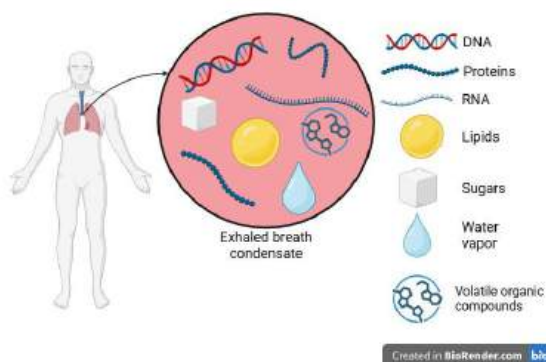
Rakovina pľúc patrí medzi najzávažnejšie onkologické ochorenia a v porovnaní s ostatnými typmi rakoviny vykazuje najvyššiu mieru úmrtnosti [1]. Jedným z hlavných dôvodov je skutočnosť, že ochorenie býva často diagnostikované až v pokročilých štádiách, keďže jeho skoré príznaky sú nešpecifické alebo sa vôbec nemusia prejavíť. Súčasne sú mnohé štandardne používané diagnostické metódy, ako napríklad tkanivová biopsia, invazívne a môžu byť spojené s rizikom komplikácií. Menej invazívne zobrazovacie metódy, napríklad röntgen hrudníka, zas nemusia vždy poskytovať dostatočne presné výsledky. Z týchto dôvodov je vývoj nových, presnejších a zároveň menej invazívnych diagnostických prístupov veľmi dôležitý [2].

Jedným z perspektívnych prístupov je tekutá biopsia, ktorá predstavuje analýzu biologických tekutín, ako sú krv, plazma, moč alebo iné telesné tekutiny. Špecifickým typom tekutej biopsie je aj analýza kondenzátu vydychovaného vzduchu (angl. *exhaled breath condensate*; EBC), často označovaná ako dychová biopsia. Odber tejto vzorky je minimálne invazívny a pre pacienta výrazne komfortnejší v porovnaní s klasickou tkanivovou biopsiou. Tekutá biopsia zároveň umožňuje dynamické sledovanie priebehu ochorenia, potenciálne skoršiu diagnostiku a presnejšie nastavenie liečby. Napriek tomu je jej klinické využitie zatiaľ limitované, najmä kvôli nízkym koncentráciám cirkulujúcej voľnej DNA (angl. *cell-free DNA*; cfDNA) v skorých štádiách ochorenia a možnosti kontaminácie DNA z iných zdrojov. Z tohto dôvodu sa táto technológia stále nachádza prevažne vo fáze

výskumu a zatiaľ nie je široko implementovaná v klinickej praxi [3,4].

Počiatkové štúdie s EBC spočívali v analýze prchavých organických zlúčenín. Najbežnejšie metabolity v EBC predstavujú uhľovodíky (pentán, etán a izoprén), zlúčeniny obsahujúce kyslík (acetón a metanol) a amoniak [5].

Neprchavé organické zlúčeniny zahŕňajú: proteíny, lipidy, sacharidy a nukleové kyseliny. Obrázok 1 znázorňuje kompozíciu EBC.



Obrázok 1: Ilustrácia znázorňujúca zloženie EBC. Obrázok bol vytvorený pomocou BioRender.

Proteíny hrajú dôležitú úlohu pri zápalových procesoch, interleukíny, ako napríklad IL-2 boli detegované vo zvýšenej koncentrácii u astmatických pacientov [6,7]. Proteíny vo zvýšenej koncentrácii sú detekovateľné aj pri rakovine pľúc [8].

Detekcia sacharidov má významnejší vplyv pre pacientov s diabetes mellitus typu 1 a 2. Štandardný spôsob testovania koncentrácie glukózy v krvi je pomocou odberu krvi, odber môže byť bolestivý a prináša riziko infekcie. Z tohto dôvodu sa výskumné tímy obrátili na neinvazívnu alternatívu EBC [9].

Štúdií na prítomnosť lipidov v EBC je nedostatočné množstvo. Sanak a spol. skúmali eikosanoidy a zistili, že fajčiari mali zvýšené koncentrácie špecifických molekúl, ako napríklad 5-HETE [10].

Mutácie v nukleových kyselinách sú popísané detailnejšie v našej práci; zároveň sú aj opísané molekuly RNA. Plazma predstavuje v porovnaní s EBC historicky skôr využívaný zdroj nukleových kyselín na analýzu cfDNA. Analyzovaných bolo 192 vzoriek plazmy a tkaniva fixovaného vo formalíne a zaliate parafínom od pacientov. 136 vzoriek obsahovalo zhubné nádory a 56 obsahovalo nezhubné nádory, Peng a spol. analyzovali tieto vzorky s cieľom porovnania konkordancie medzi plazmou a fixovaným tkanivom. Mutácie boli objavené v génoch: ALK, BRAF, EGFR, HER2, KRAS, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1 a TP53, kde mutácie v TP53 (44%) a EGFR (35%) boli najviac zastúpené. Jeden z hlavných výstupov bol nález veľmi malého množstva mutácií vo vzorkách s nezhubnými nádormi. Konkordanciu medzi plazmou a fixovaným tkanivom autori vyhodnotili ako nízku [11].

Ryan a spol. skúmali 125 vzoriek tkaniva, plazmy a EBC s potvrdenou neopláziou, cieľom bolo porovnanie výsledkov zo sekvenovania novej generácie vzoriek plazmy, EBC a tkaniva. Sústredili sa na 5 onkogénov: EGFR, KRAS, PIK3CA, BRAF a ERBB2. Zoskupením výsledkov autori zistili, že sekvenovanie EBC a plazmy dokáže detegovať rovnaký počet mutácií, sekvenovanie tkaniva malo najnižšiu detekčnú schopnosť. 68/125 vzoriek bolo úspešne sekvenovaných a 57/125 vzoriek nebolo možné sekvenovať vo vzorkách z tkaniva, v plazme bolo objavených 64/125 mutácií, žiadne mutácie neboli detegované v 34/125 vzorkách a 27/125 vzoriek malo nízke koncentrácie cfDNA, EBC dokázalo identifikovať 62/125 mutácií, v 37/125 vzorkách neboli mutácie a 26/125 vzoriek malo nízke koncentrácie cfDNA [12].

Štúdie ohľadom RNA sa sústreďujú na analýzu molekúl mikro RNA (angl. *micro RNA*; miRNA). Pérez-Sánchez a spol. potvrdili klinický význam miRNA, 21 pacientov s potvrdenou rakovinou pľúc a 21 kontrolných vzoriek podstúpilo analýzu. 9 miRNA molekúl bolo značne nad-exprimovaných a 3 miRNA boli pod-exprimované [13].

Na odobratie vzorky EBC existujú rôzne prístroje, ktoré majú odlišné princípy fungovania a kondenzovania vzoriek. Tabuľka 1 porovnáva najčastejšie využívané prístroje na získanie vzorky EBC.

Prístroj	Cena	Prenosnosť	Chladienie	Náročnosť použitia	Špecifické použitie	Počet použítí *
EcoScreen	Vysoká cena	Ťažko prenosné	Elektrické	Odborný personál	Akokoľvek EBC	Viacaj
TuroboDECCS	Stredná cena	Lahko prenosné	Elektrické	Odborný personál	Akokoľvek EBC	Viacaj
RTube	Nízka cena	Veľmi ľahko prenosné	Chladiaci rukáv	Lahké použitie	Akokoľvek EBC	Jedno použitie
Anacon glass condenser	Stredná cena	Ťažko prenosné	Elektrické	Odborný personál	Iba mechanicky ventilovaný pacienti	Viacaj

Tabuľka 1: Tabuľka porovnáva počiatkové finančné náklady, prenosnosť, spôsob kondenzácie, náročnosť použitia a aké je najlepšie použitie 4 vybraných prístrojov na zber vzorky EBC. * = Zariadenia, ktoré nie sú na jedno použitie, sa musia pred odberom novej vzorky vyčistiť [14,15,16].

EBC má potenciálne využitie aj na diagnózu a monitorovanie iných ochorení dýchacích ciest ako rakovina pľúc. Chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP), astma a cystická fibróza sú relatívne časté ochorenia. Diagnóza týchto ochorení býva invazívna a náročná, postupom času narastala potreba na vytvorenie menej invazívnych metód.

Nemalobunkový karcinóm pľúc (angl. *non-small cell lung carcinoma*; NSCLC) a malobunkový karcinóm pľúc (angl. *small cell lung carcinoma*; SCLC) obsahujú rôzne mutácie. V NSCLC boli amplifikované gény ako napríklad EGFR, CCNE1, KRAS, MDM2 a MET [17]. Pri SCLC boli mutácie najčastejšie prítomné v génoch TP53, RB1, RGS7 a COL22A1 [18].

Rakovina pľúc má rôznorodé mechanizmy

rezistencie na liečbu, cieľená terapia bola vyvinutá aby rezistenciu obišla a sústredila sa na iné mechanizmy. EBC dokáže identifikovať mutácie spôsobujúce rezistenciu a tým pádom umožní precízne nastavenie liečby. Inhibitory tyrozínových kináz (angl. *tyrosine kinase inhibitors*; TKIs) sú cieľené farmaceutiká, ktoré dokážu inhibovať metabolické dráhy v nádorových bunkách. Mutácia T790M v géne EGFR vytvára rezistenciu na prvú a druhú generáciu TKIs. Detekcia mutácie T790M v géne EGFR z EBC má potenciál zefektívniť liečbu, môže napríklad pomôcť vybrať správne liečivo [19].

1. Dizajn projektu

Naša práca s EBC nadväzuje na prácu Mgr. M. Kubáňovej, pomocou vyrobeného kondenzátora v laboratóriu boli schopní izolovať cfDNA z EBC a identifikovať varianty počtu kópií (angl. *copy number variants*; CNVs) sekvenovaním novej generácie.

Z výsledkov Mgr. M. Kubáňovej [20] sme optimalizovali protokoly na izoláciu DNA. Namiesto vlastnoručne vyrobeného prístroja na zber EBC, budeme používať komerčne dostupný RTube. Z vyizolovanej DNA z plazmy a EBC pripravíme sekvenačné knižnice. Vygenerované sekvenačné dáta budú analyzované in silico pomocou bioinformatických nástrojov na detekciu a vyhodnocovanie variantov.

Prístup ku dôležitým anamnestickým údajom pacientov sme zjednodušili digitalizovaním pomocou databázy REDCap vo forme individuálnych dotazníkov, čo nám uľahčí spracovanie relevantných údajov.

Štúdia bola schválená etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine (JLF UK) pod číslom EK 57/2025.

1.1 Praktická časť

Vzorky pochádzajú z univerzitnej nemocnice, oddelenia hrudnej chirurgie JLF UK v Martine. 50 vzoriek EBC a 50 vzoriek plazmy bude odobratých od pacientov s potvrdenou diagnózou rakoviny pľúc, bude odobratých aj 50 kontrolných vzoriek. Spracovanie a uskladnenie EBC a plazmy sprostredkúva Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed), patriace k JLF UK v Martine, EBC sa bude ukladať pri teplote -80°C a plazma pri teplote -50°C až -60°C .

Po extrakcii vzoriek spracujeme anamnestické dotazníky pacientov do elektronickej databázy REDCap.

Extrakcia DNA bude prebiehať na Vedeckom Parku Univerzity Komenského (VP UK). Príprava sekvenačných knižníc a následné sekvenovanie novej generácie bude taktiež prebiehať na VP UK. Sekvenovať budeme pomocou prístroja NextSeq 2000 od firmy Illumina (Kalifornia, USA), sekvenovanie prebieha s nízkym pokrytím (~1x pokrytie genómu).

Dáta zo sekvenovania budú spracované bioinformatikmi na VP UK. Vzniká tu potreba vyvinúť Machine Learning prediktor a natrénovať ho na vzorkách EBC. Po dostatočnom tréningu, by mal prediktor z hodnotených atribútov vygenerovať skóre, ktoré umožní klasifikovať vzorky ako zdravé alebo nádorové.

2 Predbežné výsledky a diskusia

Diplomová práca Mgr. M. Kubáňovej [5] predstavovala podklad nášho projektu. V jej práci s názvom: Analýza DNA vo vzduchu a výskum jej potenciálu pre biomedicínske aplikácie sa venovali analýze CNVs. Súbor vzoriek predstavoval 10 fajčiarov a 10 nefajčiarov, pohlavia boli rovnako zastúpené (10 mužov a 10 žien). Sekvenovaním a mapovaním na referenčný genóm sa podarilo detegovať väčšie množstvo CNVs u fajčiarov v porovnaní s nefajčiarmi. Výsledky práce umožnili pokračovanie nášho projektu. Získané výstupy umožnili zefektívniť protokoly použité v našich pracovných postupoch a posunúť výskum na úroveň klinických vzoriek od pacientov s potvrdenou rakovinou.

Projekt je vo fáze zberu vzoriek od pacientov, odobraté vzorky sú aktuálne uskladnené v biobanke BioMed. Príprava sekvenačných knižníc a analýza vzoriek bude prebiehať v najbližších mesiacoch. Očakávali sme, že odber vzoriek prebehne rýchlejšie, ale ako sa ukázalo, proces je pomalší. Po nadobudnutí dostatočného množstva vzoriek prebehne izolácia cfDNA z plazmy a EBC za použitia jednotného protokolu následne vykonáme sekvenačnú analýzu.

Záver

Analýza kondenzátov vydychovaného vzduchu môže v budúcnosti nahradiť bežné invazívne diagnostické metódy. EBC analýza dokáže sprostredkovať relevantné informácie ohľadom patológie. Mnohé analyty, ako napríklad prchavé organické zlúčeniny alebo neprchavé organické zlúčeniny sú predmetom výskumu, z ktorých môžu byť identifikované spoľahlivé biomarkery pre ochorenia. Tekutá biopsia vrátane dychovej biopsie môže v budúcnosti predstavovať výhodnejšiu alternatívu ku štandardným metódam diagnostiky, tým pádom sa môžu klinické postupy zjednodušiť a zefektívniť.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-23-0520 (INHALE)

Venujem poďakovanie môjmu školiteľovi Dr. Ondrejovi Pösovi za odborný prístup a Mgr. Monike Kubáňovej za spoluprácu v laboratóriu a výstupy, ktoré vytvorili podklad pre našu prácu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73 (3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] de Koning, H. J., van der Aalst, C. M., de Jong, P. A., Scholten, E. T., Nackaerts, K., Heuvelmans, M. A., Lammers, J.-W. J., Weenink, C., Yousaf-Khan, U., Horeweg, N., van't Westeinde, S., Prokop, M., Mali, W. P., Mohamed Hoesein, F. A. A., van Ooijen, P. M. A., Aerts, J. G. J. V., den Bakker, M. A., Thunnissen, E., Verschakelen, J., ... Oudkerk, M. (2020). Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *The New England Journal of Medicine*, 382(6), 503-513. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911793>
- [3] Li, W., Liu, J.-B., Hou, L.-K., Yu, F., Zhang, J., Wu, W., Tang, X.-M., Sun, F., Lu, H.-M., Deng, J., Bai, J., Li, J., Wu, C.-Y., Lin, Q.-L., Lv, Z.-W., Wang, G.-R., Jiang, G.-X., Ma, Y.-S., & Fu, D. (2022). Liquid biopsy in lung cancer: Significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Molecular Cancer*, 21(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12943022-01505-z>
- [4] Di Capua, D., Bracjen-Clarke, D., Ronan, K., Baird, A.-M., & Finn, S. (2021). The Liquid Biopsy for Lung Cancer: State of the Art, Limitations and Future Developments. *Cancers*, 13(16), 3923. <https://doi.org/10.3390/cancers1316923>
- [5] Pereira, J., Porto-Figueira, P., Cavaco, C., Taunk, K., Rapole, S., Dhankne, R., Nagarajaram, H., & Câmara, J.S. (2015). Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: An overview. *Metabolites*, 5(1), 3-55. <https://doi.org/10.3390/metabo5010003>
- [6] Boonpiyathad, S., Pornsuriyasak, P., Buranapraditkun, S., & Klaewonsongkram, J. (2013). Interleukin-2 levels in exhaled breath condensates, asthma severity, and asthma control in nonallergic asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*, 34(5), e35-41. <https://doi.org/10.2500/aap.2013.34.3680>
- [7] Lan, R. Y., Selmi, C., & Gerswin, M. E. (2008). The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *Journal of Autoimmunity*, 31(1), 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.03.002>
- [8] Chen, J., Chen, J., Lv, X., Yang, Q., & Yao, S. (2019). Epidermal Growth Factor in Exhaled Breath Condensate as Diagnostic Method for Non-Small Cell Lung Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18, 1533033819872271.
- [9] Behera, B., Joshi, R., Anil Vishnu, G.K., Bhalerao, S., & Pandya, H.J. (2019). Electronic nose: A non-invasive technology for breath analysis of diabetes and lung cancer patients. *Journal of Breath Research*, 13(2), 024001. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aafc77>
- [10] Sanak, R.J., Gielicz, A., Nagraba, K., Kaszuba, M., Kumik, J., & Szceklik, A. (2010). Targeted eicosanoids lipidomics of exhaled breath condensate in healthy subjects. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(21), 1796-1800. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.012>
- [11] Peng, M., Xie, Y., Li, X., Qian, Y., Tu, X., Yao, X., Cheng, F., Xu, F., Kong, D., He, B., Liu, C., Cao, F., Yang, H., Yu, F., Xu, C., & Tian, G. (2019). Resectable lung lesions malignancy assessment and cancer detection by ultra-deep sequencing of targeted gene mutations in plasma cell-free DNA. *Journal of Medical Genetics*, 56(10), 647-653. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105825>
- [12] Ryan, D. J., Toomey, S., Smyth, R., Madden, S. F., Workman, J., Cummins, R., Sheehan, K., Fay, J., Naidoo, J., Breathnach, O. S., Morris, P. G., Grogan, L., O'Brien, M. E., Sulaiman, I., Hennessy, B. T., & Morgan, R. K. (2022). Exhaled Breath Condensate (EBC) analysis of circulating tumor dna (ctDNA) using a lung cancer specific UltraSEEK oncogene panel. *Lung Cancer*, 168, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.04.03>
- [13] Pérez-Sánchez, C., Barbarroja, N., Pantaleão, L. C., López-Sánchez, L.M., Ozanne, S.E., Jurado-Gámez, B., Aranda, E., Lopez-Pradera, C., & Rodríguez-Ariza, A. (2021). Clinical Utility of microRNAs in Exhaled Breath Condensate as Biomarkers for Lung Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(2), 111. <https://doi.org/10.3390/jpm11020111>
- [14] Konstantinidi, E. M., Lappas, A. S., Tzortzi, A. S., & Behrakis, P. K. (2015). Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 435160. <https://doi.org/10.1155/2015/435160>
- [15] Qu, Y., Wang, H., Liu, H., Yin, Z., & Yang, X. (2025). Smart Wearable Devices for Exhaled Breath Condensate Harvesting and Health Monitoring. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 39(20), e71102. <https://doi.org/10.1096/fj.2025011736R>
- [16] Soyer, O. U., Dizdar, E. A., Keskin, O., Lilly, C., & Kalayci, O. (2006). Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy*, 61(8), 1016-1018. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01064.x>
- [17] Collisson, E., Taylor, B., Campbell, J., Brooks, A., Berger, A., Chmielecki, J., Getz, G., Hammerman, P., Hernandez, B., Sougnez, C., Cherniack, A., Rosenberg, M., Meyerson, M., Gabriel, S., Cibulskis, K., Kim, J., Stewart, C., Lichtenstein, L., Lander, E., & Hayes, N. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014 551 7511 543 50

- 10.1038/nature13385. *Nature*, 511, 543-550.
<https://doi.org/10.1038/nature13385>
- [18] George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K.-S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., ... Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53.
<https://doi.org/10.1038/nature14664>
- [19] Smyth, R. J., Toomey, S. M., Sartori, A., O'Hanrahan, E., Cuffe, S. D., Breathnach, O. S., Morgan, R. K., & Hennessy, B.T. (2018). Brief Report in the Detection of the EGFR T790M Mutation in Exhaled Breath Condensate from Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 13(8), 1213-1216.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.04.033>
- [20] KUBÁŇOVÁ, M. (2023). *Analýza DNA vo vzduchu a výskum jej potenciálu pre biomedicínske aplikácie*. Diplomová práca. Bratislava: PríFUK v Bratislave, 72 s.

Vplyv rôznych typov kompostov na dynamiku obsahu chlorofylu u vybraného hybridu paradajky jedlej (*Solanum lycopersicum* L.)

Impact of various compost on chlorophyll content dynamics in a selected hybrid of common tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

Frederika Greschnerová¹ – Janka Ševčíková²

¹ Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB, Tajovského 40,
974 01 Banská Bystrica

² Katedra techniky a technológií, FPV UMB, Tajovského 40,
974 01 Banská Bystrica

¹ fgreschnerova@student.umb.sk, ² janka.sevcikova@umb.sk

Abstrakt

Vedecká práca sa zaoberá porovnaním vplyvu rôznych typov kompostov na fyziologický stav paradajky jedlej (*Solanum lycopersicum* L.). Hlavným cieľom experimentu bolo vyhodnotiť dynamiku obsahu chlorofylu v listoch odrody F1 Harzfeuer v závislosti od aplikácie bokashi kompostu a domáceho rastlinného kompostu v porovnaní s kontrolným variantom pôdneho substrátu bez hnojenia. Metodicky sa práca opiera o pravidelné neinvazívne merania pomocou chlorofylmetra CCM-200plus v priebehu vegetačného obdobia v roku 2025. Z výsledkov vyplýva, že kontrolný variant síce vykazoval v úvode vegetácie (26.06.) vyššiu koncentráciu chlorofylu (34,7 CCI), no v priebehu sezóny nastal prudký pokles hodnôt. Na konci sledovaného obdobia (23.09.) dosiahol úroveň 3,8 CCI, čo signalizovalo predčasné starnutie listov. Naopak, aplikácia bokashi kompostu zabezpečila najvyššiu mieru stability obsahu chlorofylu. Hoci bola hodnota 26.06. nižšia (21,68 CCI), záverečné meranie (10,75 CCI) potvrdilo výrazne lepšiu vitalitu a dlhšiu životnosť rastlín. Získané výsledky potvrdzujú význam využívania fermentovaných organických substrátov v udržateľnej rastlinnej produkcii.

Kľúčové slová: paradajka jedlá, chlorofyl, bokashi kompost, organické hnojenie

Abstract

The scientific paper compares the impact of different composts types on the physiological state of the common tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The primary objective of the experiment was to evaluate the dynamics of chlorophyll content in the leaves of the F1 Harzfeuer cultivar, depending on the application of

bokashi compost and homemade plant-based compost, as compared to a control variant of unfertilized soil substrate. Methodologically, the study relies on regular non-invasive measurements using the CCM-200plus chlorophyll meter during the growing season in 2025. The results indicate that while the control variant exhibited a higher chlorophyll concentration (34,7 CCI) at the beginning of the vegetation period (26.06.2025), a sharp decline in values occurred during the season. By the end of the monitored period (23.09.2025), it reached a level of 3.8 CCI, signaling premature leaf senescence. In contrast, the application of bokashi compost ensured the highest degree of stability in chlorophyll content. Although the value on 26.06.2025 was lower (21.68 CCI), the final measurement on 23.09.2025 (10.75 CCI) confirmed significantly better vitality and longer plant longevity. The obtained results demonstrate the importance of using fermented organic substrates in sustainable plant production systems.

Key Words: tomato, chlorophyll, bokashi compost, organic fertilization,

Úvod

Rastúca produkcia odpadu predstavuje jeden z kľúčových environmentálnych problémov súčasnosti. Tradičný lineárny model hospodárstva založený na princípe „vyrobiť – použiť – vyhodiť“ vedie k nadmernému zaťaženiu prírodných zdrojov a k zvyšovaniu objemu odpadu ukladaného na skládky. V reakcii na tieto výzvy sa do popredia dostáva koncept obehového hospodárstva, ktorého cieľom je minimalizácia vzniku odpadu a jeho opätovné využitie v materiálových cykloch [1].

Významnú zložku komunálneho odpadu tvorí biologicky rozložiteľný odpad (BRKO), definovaný ako materiál schopný rozkladu pôsobením mikroorganizmov [2]. Táto kategória zahŕňa najmä kuchynský a záhradný odpad. Jeho skládkovanie predstavuje environmentálne riziko, keďže počas anaeróbného rozkladu vzniká metán – významný skleníkový plyn [3]. Z uvedeného dôvodu legislatíva Európskej únie aj Slovenskej republiky podporuje oddelený zber a biologické spracovanie biologicky rozložiteľného odpadu [4, 5].

Kompostovanie patrí medzi najefektívnejšie metódy zhodnocovania biologicky rozložiteľného odpadu. Predstavuje riadený aeróbnny proces, pri ktorom dochádza k biologickej premene organických materiálov na stabilizovaný humusovitý produkt – kompost [6, 7]. Tento proces je založený na aktivite mikroorganizmov, ktoré rozkladajú organickú hmotu za súčasného uvoľňovania tepla, oxidu uhličitého a vody [8]. Výsledný kompost je významným zdrojom organickej hmoty a živín, pričom jeho aplikácia do pôdy zlepšuje fyzikálne, chemické aj biologické vlastnosti pôdneho prostredia [9, 10].

Okrem konvenčného aeróbného kompostovania sa v praxi využívajú aj alternatívne biologické postupy, akými sú vermikompostovanie založené na aktivite dážďoviek [11] alebo technológia Bokashi využívajúca anaeróbnu fermentáciu organického materiálu pomocou efektívnych mikroorganizmov. Jednotlivé typy kompostov sa môžu líšiť chemickým zložením, dostupnosťou živín a rýchlosťou ich uvoľňovania, čo môže mať rozdielny vplyv na rast a fyziologický stav rastlín [12].

Z pohľadu rastlinnej produkcie je kvalita pôdy a dostupnosť živín determinujúcim faktorom rastu, vývoja a produkčného potenciálu pestovaných plodín. Paradajka jedlá (*Solanum lycopersicum* L.) patrí medzi najvýznamnejšie druhy zeleniny pestované v miernom pásme aj celosvetovo [13]. Vyznačuje sa relatívne rýchlym rastom, vysokou nutričnou hodnotou plodov a citlivosťou na výživové podmienky [14]. Z fyziologického hľadiska je jej rast úzko spätý s dostatočnou dostupnosťou dusíka, ktorý je kľúčovým prvkom pri syntéze chlorofylu a zabezpečení fotosyntetickej aktivity rastlín [13].

Obsah chlorofylu v listoch predstavuje významný indikátor fyziologického a výživového stavu rastlín, keďže jeho koncentrácia úzko súvisí s dostupnosťou dusíka a intenzitou fotosyntézy [15, 16]. Neinvazívne merania obsahu chlorofylu sa preto bežne využívajú na

hodnotenie reakcie rastlín na výživové podmienky a pestovateľské zásahy [15, 17].

V kontexte udržateľného poľnohospodárstva je opodstatnené skúmať vplyv rôznych typov kompostov na rast a fyziologické parametre rastlín, keďže ich zloženie môže významne ovplyvniť dostupnosť živín a rastovú odpoveď rastlín [18, 19]. Experimentálne porovnanie jednotlivých kompostov tak umožňuje posúdiť ich potenciál ako alternatívu ku konvenčnému hnojeniu.

1 Metodika

1.1 Rastlinný materiál a experimentálne usporiadanie

Pokus bol realizovaný na rastlinách paradajky jedlej (*Solanum lycopersicum* L.), odrody F1 Harzfeuer, pričom semená pochádzali od spoločnosti Osiva Moravia. Harzfeuer F1 je skorý kolíkový hybrid vhodný na pestovanie v chránených aj poľných podmienkach, charakteristický stabilnou rodivosťou a dobrou adaptabilitou na pestovateľské podmienky.

Experiment bol realizovaný formou nádobového vegetačného pokusu na troch pestovateľských variantov. Kontrolný variant (vzorka č. 0) bol pestovaný bez aplikácie kompostu a pozostával z pôdy o objeme 10 litrov odobratej na lokalite Vlkanová (okres Banská Bystrica, GPS: 48.6682364N, 19.1465694E) BPEJ 0506005. Túto pôdu možno definovať ako fluvizem nachádzajúcu sa pod trvalým trávnatým porastom (TTP), bez skeletu, stredne ťažkú s objemovou hmotnosťou 1,4 g/cm³. V prvom experimentálnom variante (vzorka č. 1) bol do pôdy aplikovaný bokashi kompost v pomere 1:9 (kompost : pôda) o celkovom objeme 10 litrov pripravený v domácom bokashi kompostéri fermentáciou kuchynských zvyškov, vrátane varených jedál s obsahom mäsa a sezónnych šupiek ovocia a zeleniny. Vzhľadom na jeho fermentačný charakter a zvýšený obsah organických kyselín bol tento materiál aplikovaný v nižšom pomere 1:9, aby sa zabezpečili vhodné podmienky pre rast rastlín. Druhý experimentálny variant (vzorka č. 2) zahŕňal aplikáciu domáceho kompostu v pomere 2:8 (kompost : pôda) o celkovom objeme 10 litrov. Kompost pochádzal z obce Horná Strehová (okres Veľký Krtíš), a jeho zloženie tvorili zelené rastlinné zvyšky, šupky z ovocia a zeleniny, lístie, tráva a vaječné škrupiny. U jednotlivých variantov bolo merané pH výluhu za pomoci pH metra inoLab® pH 7310, pričom pH pôdneho výluhu (variant 0) bolo 7,44, u variantu

bokashiko kompostu bolo 4,87 a u domáceho kompostu 7,26.

Každá vzorka predstavovala samostatnú experimentálnu skupinu, pričom pestovanie prebiehalo v školských priestoroch FPV UMB v Banskej Bystrici (GPS: 48.7419458N, 19.1229633E) v presklenom átriu od mája 2025 (výsadba priesad) do septembra r. 2025. S cieľom minimalizovať vplyv externých faktorov na sledovaný parameter sme sa snažili zabezpečiť jednotné podmienky prostredia predovšetkým svetelný, teplotný a závlahový režim.

1.2 Stanovenie obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu bol stanovený nepriamou, neinvazívnou metódou pomocou prenosného chlorofylmetra CCM-200plus (Opti-Sciences, USA). Tento prístroj umožňuje rýchle a nedestruktívne meranie relatívneho obsahu chlorofylu v listoch na princípe merania absorbančie svetla pri dvoch vlnových dĺžkach pomocou LED zdrojov svetla.

Výsledky sú vyjadrené v bezrozmerných jednotkách CCI (Chlorophyll Content Index), ktoré predstavujú relatívny index obsahu chlorofylu v pletive listu. Hodnota CCI je úmerná koncentrácii chlorofylu a je vhodná na porovnanie medzi variantmi a na sledovanie zmien v čase. Prístroj umožňuje interné ukladanie viac ako 100 000 meraní a následný export dát vo formáte CSV na ďalšie spracovanie [20].

Merania sa uskutočňovali jedenkrát týždenne počas deviatich týždňov vegetačného obdobia. Hodnoty boli zaznamenávané na plne vyvinutých listoch nachádzajúcich sa v strednej až vrchnej časti rastliny.

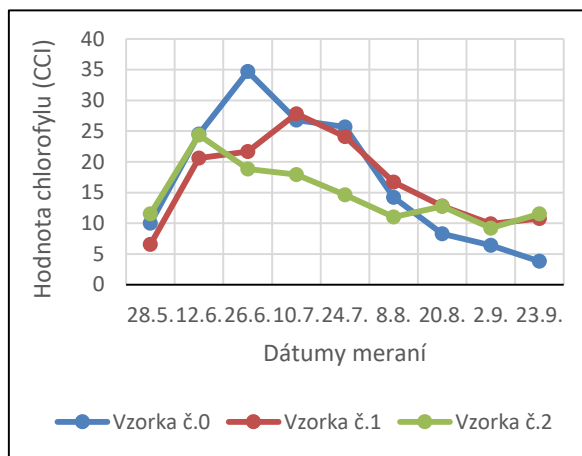
Na každej rastline bolo vykonaných desať po sebe nasledujúcich meraní na tom istom liste, pričom jednotlivé odčítania hodnoty CCI boli realizované na rôznych častiach listovej plochy s cieľom znížiť vplyv lokálnej variability. Z nameraných hodnôt bol vypočítaný aritmetický priemer, ktorý predstavoval výslednú hodnotu obsahu chlorofylu pre danú rastlinu v konkrétnom termíne merania.

Pri získavaní údajov o hodnotách chlorofylu boli zohľadnené aktuálne podmienky prostredia. Merania sa nevykonávali počas priameho dopadu slnečného žiarenia na listovú plochu ani počas zrážok, aby sa minimalizovalo možné ovplyvnenie výsledkov.

2 Výsledky a diskusia

Sledovanie dynamiky obsahu chlorofylu u hybridu F1 Harzfeuer preukázalo diferencovanú odozvu rastlín na aplikované typy kompostov. Namerané hodnoty indexu chlorofylu v priebehu vegetačného obdobia

(máj – september) reflektujú nutričný stav rastlín a ich schopnosť udržať asimilačnú aktivitu v závislosti od dostupnosti živín v pôdnom substráte (Graf 1). Použitie optických metód merania (ako CCM-200plus) predstavuje podľa Uddlinga et al. [17] spoľahlivý spôsob neinvazívneho hodnotenia koncentrácie listového chlorofylu.



Graf 1 Vývoj obsahu chlorofylu počas vegetačného obdobia v r.2025

Zdroj: Autor

Kontrolný variant (vzorka č. 0) vykazoval v počiatočnej fáze najprudší nárast hodnôt s maximom (34,7 CCI) dňa 26.6. Tento progresívny nárast možno pripísať počiatočnej mobilizácii dusíkatých látok v pôde. Od júla však nastal kontinuálny a najstrmší pokles hodnôt chlorofylu. Absencia organického hnojiva viedla k predčasnemu vyčerpaniu pôdnej zásoby živín v období intenzívnej tvorby plodov, čo vyústilo do predčasného starnutia a odumierania listov. Tento trend potvrdzujú aj Chen et al. [16], ktorí uvádzajú, že deficit dusíka vedie k priamej degradácii fotosyntetických pigmentov a zníženiu celkovej fotosyntetickej kapacity rastliny. Podobne Jones [13] zdôrazňuje, že hybridné odrody paradajok majú v štádiu intenzívnej tvorby plodov extrémne vysoké nároky na plynulý prísun živín.

Vzorka č. 1 (Bokashi kompost) sa vyznačovala najvyššou mierou stability obsahu chlorofylu. Hoci bol počiatočný nárast miernejší v porovnaní s kontrolou, tento variant si udržal nadpriemerné a vyrovnané hodnoty počas celého leta. Predpokladá sa, že fermentovaný bokashi substrát s obsahom živočíšnej zložky zabezpečil plynulú mineralizáciu nutričov, čo podporilo vitalitu rastlín aj v čase vysokých nárokov na

výživu počas dozrievania plodov. Tieto zistenia korešpondujú s prácou Olle [12], ktorá vyzdvihuje technológiu Bokashi ako sľubný nástroj na stabilizáciu nutričného stavu plodín v európskej rastlinnej výrobe. Pozitívny vplyv organických hnojív na báze fermentácie na udržanie hladiny chlorofylu popisujú aj Sun et al. [10]. Vizualne porovnanie sledovaných rastlín v záverečnej fáze experimentu (Obr. 1) korešponduje s nameranými hodnotami indexu chlorofylu. Zatiaľ čo rastliny hnojené bokashi kompostom (vľavo) vykazujú sytozelené sfarbenie a vyššiu mieru olistenia, u kontrolného variantu (vpravo) je zreteľná chloróza a urýchlená degradácia asimilačnej plochy.



Obr. 1 Porovnanie vzorky č.0 – bez kompostu (vpravo) a vzorky č.1 – bokashi kompost (vľavo) dňa 23.9.2025
Zdroj: Autor

Vzorka č. 2 (Domáci kompost) vykazovala relatívne nižšie, no stabilné hodnoty chlorofylu. Nižšia intenzita fotosyntetického farbiva v porovnaní so vzorkou č. 1 môže súvisieť s pomalšou mierou uvoľňovania dusíka z rastlinného kompostu, prípadne s jeho dočasnou imobilizáciou pôdnou mikroflórou, čo je jav popísaný Marthurom [9]. Pozoruhodným zistením je mierna vzostupná tendencia v záverečnom meraní (23. 9.),

kedy hodnoty mierne stúpili na 11,53 CCI. Tento jav indikuje dlhodobý, pozvoľný účinok domáceho kompostu na výživu rastlín, čo potvrdzujú aj Nevien et al. [18], podľa ktorých rôzne typy kompostov vykazujú odlišnú dynamiku vplyvu na úrodnosť pôdy v čase.

Záver

Výsledky experimentálneho pestovania kolíkového hybridu F1 Harzfeuer potvrdili významné rozdiely v dynamike výživy a celkovej vitalite rastlín v závislosti od použitého druhu kompostu. Namerané výsledky naznačujú, že aplikácia bokashi kompostu (vzorka č. 1) predstavuje najefektívnejší spôsob zabezpečenia kontinuálnej výživy pre kolíkový hybrid F1 Harzfeuer, čo sa prejavilo jeho stabilnou hladinou počas celého sledovaného obdobia. Domáci rastlinný kompost (vzorka č. 2) preukázal skôr funkciu organickej hmoty na zlepšenie kvality pôdy s neskorším nástupom uvoľňovania živín, zatiaľ čo kontrolné pestovanie bez hnojenia viedlo k rýchlej fyziologickej degradácii rastlín po odrodení prvej vlny plodov. Absencia doplňujúcich živín 0 variante viedla k predčasnému starnutiu pletív, keďže rastlina nebola schopná regenerovať biomasu po energeticky náročnej fáze fruktifikácie. Výsledky poukazujú na fakt, že obidva varianty s pridaním kompostu stabilizovali pôdne prostredie a vytvorili predpoklady pre dlhodobú výživu rastlín v neskorších rastových fázach.

Podakovanie

Uvedená vedecko-výskumná práca bola podporená projektom KEGA 015UMB-4/2025 Komplexný prehľad a inovatívne prístupy k riadeniu komunálnych odpadov: Integrácia vedy, legislatívy a praktických skúseností.

Za poskytnutie Bokashiho kompostéru ďakujeme spoločnosti BioPark Slovakia s.r.o. v Lučenci a za poskytnutie pôdneho substrátu organizácii ZAaRES v Banskej Bystrici.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] KIRCHHERR, Julian; REIKE, Denise a HEKKERT, Marko, (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 127, pp. 221–232. ISSN 0921-3449.
- [2] DÍAZ, Luis F.; DE BERTOLDI, Marco; BIDLINGMAIER, Werner a STENTIFORD, Edward, (2007). *Compost Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 380 s. ISBN 978-0-08-043960-0.
- [3] EURÓPSKA ÚNIA, (1999). *Smernica Rady 1999/31/ES z 26. apríla 1999 o skládkach odpadov*.

- In: Úradný vestník Európskej únie, L 182, s. 1-19. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/?uri=celex%3A31999L0031>
- [4] SLOVENSKO, (2015). *Zákon č. 79/2015 Z. z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov*. Bratislava: NR SR.
- [5] MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR, (2019). *Zelenšie Slovensko - Stratégia environmentálnej politiky Slovenskej republiky do roku 2030*. Bratislava: MŽP SR. Dostupné na: <https://www.minzp.sk/iep/strategicke-materialy/envirostrategia-2030/> [prístup 2026-02-22].
- [6] COOPERBAND, Leslie R., (2002). *The art and science of composting: A resource for farmers and compost producers*. Madison: University of Wisconsin-Madison. Dostupné z: https://www.eawag.ch/fileadmin/Domain1/Abteilungen/sandec/E-Learning/Moocs/Solid_Waste/W3/art_science_composting_Cooperband_2002.pdf [prístup 2026-01-11].
- [7] CORNELL WASTE MANAGEMENT INSTITUTE (CWMI), (2015). *The science of composting: Chapter 1 – Introduction to the composting process*. Ithaca: Cornell University. Dostupné z: <https://cwmi.css.cornell.edu/chapter1.pdf> [prístup 2026-01-11].
- [8] CHEN, Lando; DE HARO MARTI, Mario E.; MOORE, Amber a FALEN, Christine, (2011). *Dairy compost production and use in Idaho*. Moscow, ID: University of Idaho Extension. Dostupné z: <https://objects.lib.uidaho.edu/uiext/uiext25841.pdf> [prístup 2026-01-11].
- [9] MATHUR, S. P., (1998). *Composting processes*. In: *Martin, A. M. Bioconversion of waste materials to industrial products*. Boston, MA: Springer, s. 154–193. ISBN 978-1-4615-5821-7.
- [10] SUN, Wenli; SHAHRAJABIAN, Mohamad Hesam a CHENG, Qi, (2021). Organic waste utilization and urban food waste composting strategies in China – A review. *Notulae Scientiae Biologicae*, vol. 13, no. 2, 10881. ISSN 2067-3264.
- [11] DOHAISH, El Jawaher A. Bin, (2020). Vermicomposting of Organic Waste with *Eisenia fetida* Increases the Content of Exchangeable Nutrients in Soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 23, no. 4, pp. 501–509. ISSN 1028-8880.
- [12] OLLE, Margit, (2021). Review: Bokashi technology as a promising technology for crop production in Europe. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 96, no. 2, pp. 145–152. ISSN 1462-0316.
- [13] JONES, J. Benton, (2007). *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse, and Home Garden*. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press, 424 s. ISBN 978-0-8493-7395-4.
- [14] RAO, A. Venketeshwer a RAO, Leticia G., (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, vol. 55, no. 3, pp. 207–216. ISSN 1043-6618.
- [15] KALAJI, Hazem M.; BAĀBA, Wiesław; GEDIGA, Krzysztof et al., (2018). Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. *Photosynthesis Research*, vol. 136, pp. 329–343. ISSN 1573-5079.
- [16] CHEN, X. et al., (2024). Effects of Nitrogen Deficiency on Photosynthesis and Chlorophyll Content in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 19, 10409. ISSN 1422-0067.
- [17] UDDLING, J.; GELANG-ALFREDSSON, J.; PIKKI, K. a PLEIJEL, H., (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 metrics. *Photosynthesis Research*, vol. 91, no. 1, pp. 37–46. ISSN 1573-5079.
- [18] NEVIEN, M. et al., (2008). Impacts of Different Compost Types Application on Soil Fertility and Plant Growth. *Journal of High Institute of Public Health*, vol. 38, no. 3, pp. 633–648.
- [19] SZŪCSNÉ SZOLOMÁJER, J. et al., (2017). The effect of various composts on vegetable green mass on two soil types. *Acta Agraria Debreceniensis*, no. 72, pp. 179–183. ISSN 1588-8363.
- [20] OPTI-SCIENCES, (2022). *CCM-200plus Chlorophyll Content Meter: Product Brochure*. Hudson, NH, USA: Opti-Sciences, Inc. Dostupné z: https://opti-sciences.com/wp-content/uploads/2022/11/ccm-200plus_brochure.pdf [prístup 2026-02-21].

Molekulárny podklad pre meiotické delenie *Euglena gracilis* a *Euglena longa*

Molecular Determinants of Meiosis in *Euglena gracilis* and *Euglena longa*

Lenka Ilavská¹ – Vanessa Gelanová² – Dominika Vešelényiová³

¹ Ústav biológie a biotechnológie, Oddelenie biológie, FPV UCM v Trnave, Námestie Jozefa Herdu 577/2, 917 01 Trnava

¹ilavska2@ucm.sk, ²gelanova1@ucm.sk, ³dominika.veselenyiova@ucm.sk

Abstrakt

Trieda Euglenida zahŕňa morfológicky a metabolicky diverzné jednobunkové eukaryoty, ktoré kombinujú autotrofný aj heterotrofný spôsob výživy. Hoci je ich rozmnožovanie tradične považované za nepohlavné, molekulárne a cytologické údaje naznačujú možný potenciál sexuálneho cyklu, najmä u rodu *Euglena*. V tejto štúdii sme identifikovali všetkých deväť esenciálnych meiotických génov, so zameraním na *MSH4* a *MSH5*, v genómoch a transkriptómoch druhov *Euglena gracilis* a *Euglena longa* pomocou bioinformatických analýz. Terciárnu štruktúru proteínov sme predikovali pomocou AlphaFold 3, pričom gény *MSH4* a *MSH5* zachovávajú konzervovanú doménovú architektúru typickú pre heterodimér MutSy, ktorý je kľúčový pre stabilizáciu Hollidayových štruktúr počas meiózy. Výsledky podporujú prítomnosť meiotického aparátu triedy Euglenida a poskytujú základ pre štúdium potenciálneho sexuálneho cyklu tohto taxónu.

Kľúčové slová: *Euglena gracilis*, *Euglena longa*, meiotické gény, *MSH4*, *MSH5*

Abstract

The class Euglenida comprises morphologically and metabolically diverse unicellular eukaryotes that exhibit both autotrophic and heterotrophic modes of nutrition. Although their reproduction has traditionally been considered asexual, molecular and cytological evidence indicates a potential for a sexual cycle, particularly within the genus *Euglena*. In this study, we mapped all nine essential meiotic genes, focusing on *MSH4* and *MSH5*, in the genomes and transcriptomes of *Euglena gracilis* and *Euglena longa* using HMM and BLAST analyses. The tertiary structures of the corresponding proteins were predicted with AlphaFold 3, revealing that *MSH4* and *MSH5* maintain the conserved domain architecture characteristic of the

MutSy heterodimer, which is crucial for stabilizing Holliday junctions during meiosis. These findings support the existence of a meiotic apparatus in Euglenida and provide a foundation for exploring the potential sexual cycle in this group.

Key Words: *Euglena gracilis*, *Euglena longa*, meiotic genes, *MSH4*, *MSH5*

Úvod

Trieda Euglenida predstavuje evolučne významnú skupinu jednobunkových eukaryotov, ktoré sa vyznačujú mimoriadnou morfológickou a metabolickou diverzitou. Typickým znakom tejto skupiny je kombinácia autotrofného a heterotrofného spôsobu výživy, vďaka čomu zohrávajú dôležitú úlohu najmä v sladkovodných ekosystémoch [1]. Zároveň je taxón Euglenida predmetom intenzívneho výskumu v oblasti bunkovej biológie, evolúcie a genetiky. Zástupcovia triedy Euglenida sú blízko príbuzní s heterotrofnými bičíkovicami zo skupín Symbiontida, Diplonemida a Kinetoplastida a spolu tieto štyri línie vytvárajú monofyletický kmeň Euglenozoa [2, 3].

Rozmnožovanie zástupcov triedy Euglenida je tradične považované za výlučne nepohlavné a prebieha prostredníctvom uzavretej intranukleárnej mitózy [4]. Tento spôsob reprodukcie sa považuje za dominantný u väčšiny známych druhov. Napriek tomu sa v priebehu posledných desaťročí objavili náznaky, že u niektorých zástupcov rodu *Euglena* môže existovať aj potenciál pohlavného rozmnožovania [5, 6]. U zástupcov rodu *Euglena* sa môže vyskytnúť aj atypické delenie, pri ktorom jedna bunka vytvára tri až dvanásť dcérskych buniek spojených zadnými koncami, čím vznikajú symetrické hviezdovité štruktúry. Takéto delenie bolo pozorované v dlhodobo pestovaných kultúrach *E. gracilis*, ako aj po ošetrovaní kumarínom [7] či chrómom [8]. Meióza predstavuje špecializovaný typ pohlavného bunkového delenia, pričom jej realizácia si vyžaduje súbor esenciálnych génov zabezpečujúcich párovanie

homologických chromozómov, rekombináciu a redukciu počtu chromozómov [9]. Prítomnosť kľúčových génov zapojených do meiózy bola preukázaná najmä u druhu *Euglena gracilis*, ktorý je považovaný za modelový organizmus vďaka dostupnosti genomických údajov a jeho širokému využitiu vo výskume. Hoci u rodu *Euglena* zatiaľ chýbajú priame dôkazy o meióze, pozorovania bunkovej fúzie a tvorby cýst spolu so zdokumentovanou meiózou u príbuzného zástupcu Kinetoplastida *Trypanosoma brucei*, naznačujú, že pohlavné procesy by mohli byť prítomné aj v tejto evolučnej línii [10].

Meióza a sexuálne rozmnožovanie vyžadujú súbor približne 29 génov, vrátane deviatich esenciálnych (*SPO11*, *DMC1*, *MND1*, *REC8*, *MER3*, *MSH4*, *MSH5*, *HOP1* a *HOP2*) [11, 12, 13]. Tieto gény sa nachádzajú vo všetkých hlavných eukaryotických skupinách, dokonca aj u organizmov, kde pohlavné rozmnožovanie nebolo pozorované, čo vyvoláva otázku, či ide o pozostatky spoločného eukaryotického pohlavného predka, alebo či tieto organizmy dokážu za špecifických podmienok uskutočniť nepozorovaný sexuálny cyklus [10, 14, 15, 16]. V našej práci sme sa zaoberali bioinformatickou analýzou dvoch esenciálnych meiotických génov *MSH4* a *MSH5* a ich proteínových produktov. Práve tieto dva gény predstavujú kľúčové komponenty meiotického rekombinačného aparátu. Ich produkty tvoria špecifický heterodimerný komplex MSH4–MSH5, ktorý zohráva zásadnú úlohu pri stabilizácii dvojitych Hollidayových štruktúr počas I. meiotického delenia. Tento komplex zabezpečuje správne spracovanie rekombinačných intermediátov, podporuje tvorbu prekrížení so vzájomnou interferenciou a tým garantuje presnú segregáciu homologických chromozómov. Bez funkčnej aktivity génov *MSH4* a *MSH5* dochádza k narušeniu crossing-overu a zvýšenému riziku chýb v chromozomálnej segregácii [17].

1 Materiál a metódy

1.1 Identifikácia meiotických génov v transkriptómoch *E. gracilis* a *E. longa*

Na začiatku analýzy sme pre každý sledovaný meiotický gén získali čo najširší súbor aminokyselinových sekvencií z databázy UniProt. Tieto sekvencie sme následne zosúladiли pomocou programu MAFFT verzia 7 (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) [18] a na základe výsledného zrovnania sme skonštruovali skryté Markovove modely (HMM) [19, 20]. Použit

parametre zrovnania v programe MAFFT sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1. Parametre použité pri zrovnaní sekvencií, ktoré boli následne použité na tvorbu HMM. Zdroj: [21].

Parameter	Hodnota
Strategy	Auto (FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i, L-INS-i)
Scoring matrix	BLOSUM 62
Gap opening penalty	1,53
Offset value	0

Vytvorené HMM sme následne aplikovali na transkriptómy *E. gracilis* a *E. longa* [22] pomocou nástroja HMMER *hmmsearch*, čím sme identifikovali potenciálne pozitívne sekvencie meiotických génov. Tie sme ďalej analyzovali z hľadiska subcelulárnej lokalizácie (DeepLoc 2.1) [23], homológie (BLAST) [24] a prítomnosti konzervovaných domén (CD-Search; InterPro), pričom sme tieto parametre porovnali s anotovanými sekvenciami z iných organizmov.

1.2 Identifikácia meiotických génov v genómoch *E. gracilis* a *E. longa*

Sekvencie identifikované v transkriptómoch *E. gracilis* a *E. longa* sme následne overovali aj v genómoch týchto organizmov [25]. Lokalizáciu meiotických génov sme realizovali v prostredí Geneious Prime verzia 2025.1.3 [26], ktoré poskytuje integrované nástroje pre komplexnú bioinformatickú analýzu. Transkripty jednotlivých meiotických génov sme v prvom kroku analyzovali pomocou programu BLAST (*tblastn*) proti genómovým databázam *E. gracilis* a *E. longa* s parametrami uvedenými v Tabuľke 2.

Tabuľka 2. Parametre použité pri analýze programom *tblastn* (transkriptómová sekvencia vs. genóm *E. gracilis* a *E. longa*). Zdroj: [21].

Parameter	Hodnota
Matrix	BLOSUM 62
Gap cost (Open extend)	11/1
Max E-value	0,05
Max Target Seqs	30

Týmto postupom sme identifikovali „BLAST hity“ predstavujúce genómové úseky zodpovedajúce použitým *query* transkriptom. Príslušné genómové sekvencie sme následne zosúladiли s nukleotidovou sekvenciou *query* transkriptu pomocou nástroja

Geneious alignment (parametre sú uvedené v tabuľke 3).

Tabuľka 3. Parametre použité pri zrovnaní genómovej a transkriptómovej sekvencie *E. gracilis* programom Geneious alignment. Zdroj: [21].

Parameter	Hodnota
Alignment type	Global alignment with free and gaps
Cost Matrix	65% similarity (5,0/-4,0)
Gap open penalty	12
Gap extension penalty	0

1.3 Predikcia terciárnej štruktúry proteínov pomocou AlphaFold 3

Terciárnu štruktúru meiotických proteínov z *E. gracilis* a *E. longa* sme predikovali pomocou AlphaFold 3 [27]. FASTA sekvencie sme analyzovali v monomérom aj multimérom režime (ak je známa funkcia v komplexe) a na základe hodnôt pLDDT, pTM a ipTM sme vybrali najspoľahlivejší model („model_0“). Ten sme následne importovali do UCSF ChimeraX [28], kde sme manuálne identifikovali a označili konzervované domény.

2 Výsledky a diskusia

In silico sme identifikovali 2 esenciálne meiotické gény (Tabuľka 4) v genómoch a transkriptómoch druhov *E. gracilis* a *E. longa*.

Tabuľka 4. Prehľad vybraných esenciálnych meiotických génov v genómoch a transkriptómoch druhov *E. gracilis* a *E. longa*. Zdroj: [21].

Meiotický gén	Názov génu
<i>MSH4</i>	Homológ proteínu MutS 4
<i>MSH5</i>	Homológ proteínu MutS 5

2.1 Analýza génov a produktov génov *MSH4* a *MSH5*

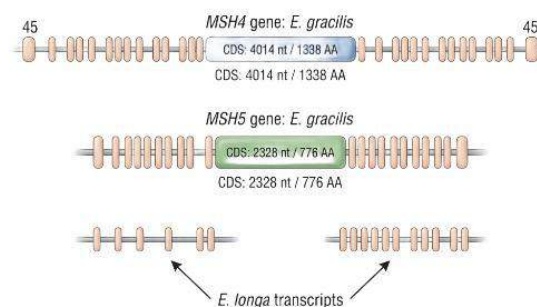
Na identifikáciu konkrétnych transkriptov sme zostavili fylogenetické stromy obsahujúce referenčné sekvencie génov *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5* a *MSH6* z rôznych organizmov, spolu s kandidátnymi sekvenciami získanými HMM analýzou transkriptómov *Euglena gracilis* a *Euglena longa*.

Topológia stromov umožnila presne určiť, ktoré sekvencie zodpovedajú transkriptom *MSH4* a *MSH5*, čo

bolo nevyhnutné vzhľadom na vysokú homológiu členov rodiny MSH.

Keďže genóm *E. gracilis* bol publikovaný len nedávno [29], jeho anotácia je stále veľmi limitovaná a preto bolo potrebné identifikované transkripty mapovať do genómu. Po výbere vhodných transkriptov boli oba gény identifikované aj v genóme *E. gracilis*. U *E. longa* sme získali len čiastočné sekvencie, pravdepodobne v dôsledku neúplného zostavenia a vysokej fragmentácie genómu.

Sekvencia génu *MSH4* u *E. gracilis* obsahovala 45 exónov a dĺžka CDS (Coding DNA Sequence) bola 4014 nt, respektíve 1338 AA. U *E. gracilis* sme pripravili taktiež kompletnú anotáciu génu *MSH5*. Sekvencia génu *MSH5* u *E. gracilis* obsahovala 30 exónov a dĺžka CDS bola 2328 nt, teda 776 AA. V rámci genómov *E. longa* sme identifikovali iba krátke časti sekvencií, ktoré korešpondovali k transkriptom jednotlivých génov, preto sme pre ďalšie analýzy použili transkripty génu *MSH4* a *MSH5*.

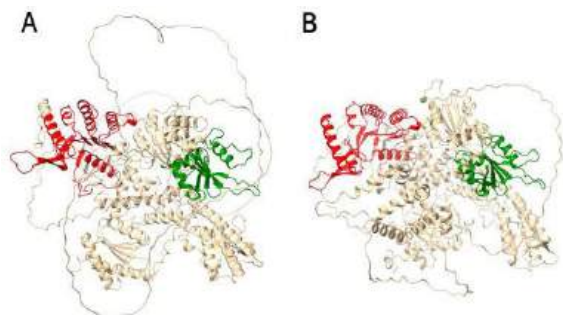


Obrázok 1. Schéma anotovaných génov *MSH4* a *MSH5*.

2.2 Predikcia terciárnej štruktúry proteínu *MSH4*

Predikcie terciárnej štruktúry *MSH4* pomocou AlphaFold3 (Obrázok 1) odhaľujú u oboch druhov konzervovanú dvojdoménovú architektúru, typickú pre MutS podjednotky [17]. V modeli *MSH4* z *E. gracilis* (pTM ≈ 0,74) a *E. longa* (pTM ≈ 0,73) si P-loop NTP-hydrolase doména (červená) (Pfam ID: PF00225) zachováva charakteristickú sendvičovú β-skladbu s Gly-X-Gly-X-Gly motívom, nevyhnutnú pre viazanie a hydrolýzu ATP. Vysoké pLDDT skóre (> 80) v tejto oblasti poukazuje na spoľahlivú predikciu aktívneho jadra ATPázy. Druhá konzervovaná jednotka, MutS-like doména I (zelená) (Pfam ID: PF01624), predstavuje DNA-väzobný modul z β-reťazcov lemovaných helikálnymi slučkami. Jej robustná predikcia (pLDDT 70–85) indikuje zachovanú schopnosť rozpoznávať rozvetvené DNA štruktúry, ako sú Hollidayove štruktúry. Medzi týmito dvoma doménami sa nachádza

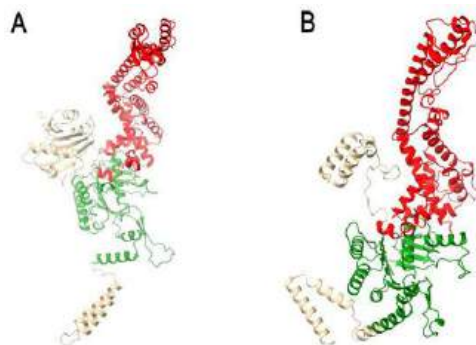
relatívne dlhý, predikčne menej spoľahlivý spojkový úsek ($pLDDT < 50$), čo naznačuje jeho vnútornú neštruktúrovanú (intrinziicky neštruktúrovanú) povahu a dôležitosť pružnosti pri adaptácii tvaru komplexu MutSy k rôznym DNA intermediátom. Celková topológia modelov je veľmi podobná – obe domény sú navzájom orientované v pomerne pevnom uhle, čo pravdepodobne umožňuje koordinované viazanie ATP a DNA.



Obrázok 2. A: Predikcia terciárnej štruktúry *MSH4* z *E. gracilis*. B: Predikcia terciárnej štruktúry *MSH4* z *E. longa*. Červenou farbou je v oboch reťazcoch zvýraznená P-loop NTP-hydrolázy doména a zelenou MutS like doména I. Zdroj: [21].

2.3 Predikcia terciárnej štruktúry proteínu *MSH5*

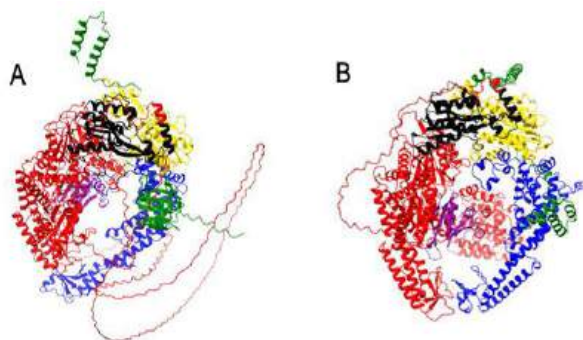
Rovnako ako u *MSH4* bola aj u *MSH5* predikovaná dvojdoménová architektúra, ktorá je typická pre členov rodiny MutSy. Model z *E. gracilis* dosiahol $pTM \approx 0,79$, model z *E. longa* dokonca $pTM \approx 0,84$, čo svedčí o vysokej globálnej spoľahlivosti predikcie. V oboch štruktúrach je MutS domain III (červená) (Pfam ID: PF05192) umiestnená na jednom konci proteínu a tvorí robustné jadro skladajúce sa zo siedmich antiparalelných β -reťazcov lemovaných helikálnymi slučkami. Na opačnom konci sekvencie sa nachádza P-loop NTP-hydroláza (zelená) (Pfam ID: PF00225), nesúca Gly-X-Gly-X-X-Gly motív nevyhnutný pre viazanie a hydrolýzu ATP. Medzi dvoma funkčnými jednotkami sa tiahne relatívne dlhý úsek s nižšími $pLDDT$ hodnotami (< 50), čo indikuje jeho vnútornú neštruktúrovanú povahu a pravdepodobnú úlohu flexibilného „spojkového“ segmentu, ktorý umožňuje dynamickú zmenu vzájomnej orientácie domén podľa typu naviazaného DNA intermediátu.



Obrázok 3. A: Predikcia terciárnej štruktúry *MSH5* z *E. gracilis*. B: Predikcia terciárnej štruktúry *MSH5* z *E. longa*. Červenou farbou je v oboch reťazcoch zvýraznená MutS domain III a zelenou P-loop NTP hydrolázy doména. Zdroj: [21].

2.4 Predikcia terciárnej štruktúry komplexu *MSH4-MSH5*

Predikovali sme taktiež terciárnu štruktúru celého komplexu *MSH4-MSH5* (Obrázok 3). Multimérová predikcia v AlphaFold3 odhalila obdobné topologické princípy u oboch druhov, hoci medzi-podjednotková spoľahlivosť je nízka ($ipTM \approx 0,26$ pre *E. gracilis*; $\approx 0,21$ pre *E. longa*) a celková topológia dosahuje $pTM \approx 0,50$, resp. $\approx 0,49$. Na základe predikcie u *E. gracilis* ($ipTM 0,26$; $pTM 0,50$), MutS-doména I *MSH4* (fialová) a MutS doména III *MSH5* (modrá) interagujú prostredníctvom rozsiahlych konzervovaných β skladieb a helikálnych slučkovitých segmentov, čím vytvárajú hlavnú interakčnú plochu heterodiméru. Na druhej strane sú P-loop NTP-hydrolázové domény (čierna pre *MSH4*, žltá pre *MSH5*) orientované na opačných koncoch komplexu, čo naznačuje možný alosterický mechanizmus: hydrolýza ATP v jednej podjednotke by mohla prepínať afinitu komplexu k DNA. Podobné usporiadanie registrujeme aj u *E. longa* ($ipTM 0,21$; $pTM 0,49$), kde hoci spojovacie segmenty medzi doménami vykazujú nízke $pLDDT (< 50)$ a sú pravdepodobne vnútorné neštruktúrované, základná architektúra – vzájomná poloha MutS-domén a ATPázových modulov – zostáva konzervovaná.



Obrázok 4. A: Predikcia terciárnej štruktúry komplexu MSH4-MSH5 z *E. gracilis*. B: Predikcia terciárnej štruktúry MSH4-MSH5 z *E. longa*. Proteín MSH4 je v oboch komplexoch vyznačený červenou farbou, a jeho konzervované domény sú zvýraznené MutS-doména I (fialová farba) a P-loop NTP-hydrolázová doména (čierna farba). Proteín MSH5 je v oboch komplexoch vyznačený zelenou farbou a jeho konzervované domény sú zvýraznené MutS-doména III (modrá farba) a P-loop NTP-hydrolázová doména (žltá farba). Zdroj: [21].

Záver

V tejto práci sme identifikovali a charakterizovali 2 vybrané kľúčové meiotické gény u druhov *Euglena gracilis* a *Euglena longa*, konkrétne gény *MSH4* a *MSH5* a ich proteínové produkty. Analýza naznačila, že tieto gény zachovávajú konzervovanú doménovú štruktúru a umožňujú tvorbu potenciálne funkčného heterodiméru MutS γ , ktorý je nevyhnutný pre správnu segregáciu chromozómov počas meiózy. Výsledky podporujú hypotézu o prítomnosti meiotického aparátu triedy Euglenida, hoci priame dôkazy sexuálneho cyklu zatiaľ chýbajú. V nadchádzajúcej fáze práce sa plánujeme podrobnejšie venovať bioinformatickej analýze všetkých esenciálnych meiotických génov, pre lepšie porozumenie molekulárných mechanizmov potenciálneho sexuálneho rozmnožovania tohto evolučne významného taxónu.

PodĎakovanie

Ďakujem svojej školiteľke a výskumnému tímu za podporu a spoluprácu pri realizácii tejto práce.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] LEANDER, Brian S.; ESSON, Heather J. a BREGLIA, Susana A., (2007). Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *BioEssays*, roč. 29, č. 10, s. 987–1000. ISSN 0265-9247.

- [2] BURKI, Fabien, (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, roč. 6. ISSN 1943-0264.
- [3] ADL, Sina M.; BASS, David; LANE, Christopher E.; LUKEŠ, Julius; SCHOCH, Conrad L.; SMIRNOV, Alexey; AGATHA, Sabine; BERNEY, Cedric a BROWN, Matthew W., (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, roč. 66, č. 1, s. 4–119. ISSN 1550-7408.
- [4] RAIKOV, Ivan B., (1994). The diversity of forms of mitosis in protozoa: a comparative review. *European Journal of Protistology*, roč. 30. ISSN 0932-4739.
- [5] MOESTRUP, Øjvind a ENEVOLDSEN, Hanne, (2019). On sexual reproduction in euglenoids, a tribute to Berthe Biecheler. *Phycologia*, roč. 58. ISSN 0031-8884.
- [6] VANNINI, Giovanni L.; FASULO, Maria P. a BRUNI, Adriana, (1977). First observations on the cytological changes induced in *Euglena gracilis* by coumarin treatment. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, roč. 84, č. 2, s. 183–187. ISSN 0044-328X.
- [7] FASULO, Maria P.; BASSI, Marco a DONINI, Andrea, (1983). Cytotoxic Effects of Hexavalent Chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and Ultrastructural Studies. *Protoplasma*, roč. 114, s. 35–43. ISSN 0033-183X.
- [8] ROBERT, Tiphaine; VRIELYCK, Nathalie; MÉZARD, Christine; DE MASSY, Bernard a GRELON, Mathilde, (2016). A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, roč. 54, s. 165–176. ISSN 1084-9521.
- [9] PEACOCK, Lori; BAILEY, Michael; CARRINGTON, Mark a GIBSON, Wendy, (2014). Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Current Biology*, roč. 24, č. 2, s. 181–186. ISSN 0960-9822.
- [10] WILKINS, Adam S. a HOLLIDAY, Robin, (2009). The evolution of meiosis from mitosis. *Genetics*, roč. 181. ISSN 0016-6731.
- [11] MALIK, Shehre-Bano; PIGHTLING, Aaron W.; STEFANIAK, Laura M.; SCHURKO, Andrew M. a LOGSDON, John M., Jr., (2007). An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One*, roč. 3, č. 8, s. e2879. ISSN 1932-6203.
- [12] DA SILVA, Vagner S. a MACHADO, Carlos R., (2022). Sex in protists: A new perspective on the

- reproduction mechanisms of trypanosomatids. *Genetics and Molecular Biology*, roč. 45. ISSN 1415-4757.
- [13] CONRAD, Michael D.; GORMAN, Alexander; SCHILLINGER, Julia; FIORI, Patrizia; ARROYO, Ricardo; MALLA, Narayan; DUBEY, Mahendra; GONZALEZ, Javier; BLANK, Steven; SECOR, W. Evan a CARLTON, Jane, (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, roč. 6, č. 3. ISSN 1935-2735.
- [14] VESTEG, Michal a KRAJČOVIČ, Jozef, (2011). The falsifiability of the models for the origin of eukaryotes. *Current Genetics*, roč. 57. ISSN 0172-8083.
- [15] JEDLIČKA, Andrej; BARTH, Ondrej; LIHANOVA BUGAJDOVA, Dominika; BECK, Tomáš; GELANOVA, Veronika; KRAJČOVIČ, Jozef; VEŠELÉNYIOVA, Daniela a VESTEG, Michal, (2025). Typical and atypical cell division versus potential meiosis and sex in euglenids. *European Journal of Protistology*, roč. 100, s. 126164. ISSN 0932-4739.
- [16] RAKSHAMBIKAI, R.; SRINIVASAN, N. a NISHANT, K. T., (2013). Structural insights into *Saccharomyces cerevisiae* Msh4-Msh5 complex function using homology modeling. *PLoS One*, roč. 8, č. 11, s. e78753. ISSN 1932-6203.
- [17] KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, Jakub a YAMADA, Kazunori D., (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, roč. 20, č. 4, s. 1160–1166. ISSN 1467-5463.
- [18] EDDY, Sean R., (2004). What is dynamic programming? *Nature Biotechnology*, roč. 22, s. 909–910. ISSN 1087-0156.
- [19] POTTER, Simon C.; LUCIANI, Alessio; EDDY, Sean R.; PARK, Yong; LOPEZ, Rodrigo a FINN, Robert D., (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, roč. 46, č. W1, s. W200–W204. ISSN 0305-1048.
- [20] CORDOBA, Sara; ONUOHA, Sade; THOMAS, Sam; PIGNATARO, Daniel S.; HOUGH, Richard; GHORASHIAN, Sara; VORA, Ajay; BONNEY, Dan; VEYS, Paul; RAO, Kanchan; LUCCHINI, Giovanna; CHIESA, Raffaella; CHU, John; CLARK, Lucy; FUNG, Matthew M.; SMITH, Keith; PETICONE, Chiara; AL-HAJJ, Mohammad; BALDAN, Valentina; FERRARI, Marco a AMROLIA, Persis J., (2021). CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. *Nature Medicine*, roč. 27, č. 10, s. 1797–1805. ISSN 1078-8956.
- [21] JEDLIČKA, A. (2025). *Meiotické gény a ich expresia v asexuálnych eugleoidných bičíkovcoch*. Dizertačná práca. Trnava: UCM v Trnave, 148s.
- [22] ZÁHONOVÁ, Katarína; PETRŽELKOVÁ, Romana; VALACH, Michal a kol., (2018). Extensive molecular tinkering in the evolution of the membrane attachment mode of the Rheb GTPase. *Scientific Reports*, roč. 8, s. 5239. ISSN 2045-2322.
- [23] ØDUM, Mads T.; TEUFEL, Felix; THUMULURI, Vamsi; ALMAGRO ARMENTEROS, José J.; JOHANSEN, Anders R.; WINTHER, Ole a NIELSEN, Henrik, (2024). DeepLoc 2.1: multi-label membrane protein type prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, roč. 52, č. W1, s. W215–W220. ISSN 0305-1048.
- [24] CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Karen a MADDEN, Thomas L., (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, roč. 10, s. 421. ISSN 1471-2105.
- [25] CHEN, Zhen; DONG, Yan; DUAN, Shuang a kol., (2024). A chromosome-level genome assembly for the paramylon-producing microalga *Euglena gracilis*. *Scientific Data*, roč. 11, s. 780. ISSN 2052-4463.
- [26] KEARSE, Matthew; MOIR, Richard; WILSON, Andrew; STONES-HAVAS, Steven; CHEUNG, Matthew; STURROCK, Shane; BUXTON, Simon; COOPER, Aaron; MARKOWITZ, Sidney; DURAN, Carlos; THIERER, Tobias; ASHTON, Ben; MEINTJES, Pierre a DRUMMOND, Alexei, (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, roč. 28, č. 12, s. 1647–1649. ISSN 1367-4803.
- [27] ABRAMSON, Josh; ADLER, Jonas; DUNGER, Jack; EVANS, Richard; GREEN, Tim; PRITZEL, Alexander; RONNEBERGER, Olaf; WILLMORE, Luke; BALLARD, Andrew J.; BAMBRICK, James; BODENSTEIN, Sebastian W.; EVANS, David A.; HUNG, Chia-Chun; O'NEILL, Michael; REIMAN, Daniel; TUNYASUVUNAKOOL, Kathryn; WU, Zhe; ŽEMGULYTĖ, Agnė; ARVANITI, Eirini; BEATTIE, Charles a JUMPER, John M., (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, roč. 630, č. 8016, s. 493–500. ISSN 0028-0836.

- [28] PETERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; MENG, Elaine C.; COUCH, Gregory S.; CROLL, Tristan I.; MORRIS, John H. a FERRIN, Thomas E., (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, roč. 30, č. 1, s. 70–82. ISSN 0961-8368.
- [29] CHEN, Zhen; DONG, Yan; DUAN, Shuang; HE, Jian; QIN, Hui; BIAN, Chao; CHEN, Zhi; LIU, Chao; ZHENG, Cheng; DU, Min; YAO, Rui; LI, Chen; JIANG, Peng; WANG, Yu; LI, Shuang; XIE, Ning; XU, Yu; SHI, Qiang; HU, Zhen; LEI, Aimin; ZHAO, Li a WANG, Jun, (2024). A chromosome-level genome assembly for the paramylon-producing microalga *Euglena gracilis*. *Scientific Data*, roč. 11, č. 1. ISSN 2052-4463.

Vplyv vitamínu K2 na génovú expresiu osteogénnych markerov v primárnej kultúre osteoblastov potkana

Effect of Vitamin K2 on the Gene Expression of Osteogenic Markers in Primary Rat Osteoblast Culture

Jessica Krčmárová – Vladimíra Mondočková

Katedra botaniky a genetiky, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

jessica.krcmarova@student.ukf.sk, vmondockova@ukf.sk

Abstrakt

Vitamín K2 (menachinón) je biologicky aktívny kofaktor kľúčový pre proces mineralizácie a transkripčnú reguláciu génov spojených s osteoblastickou diferenciáciou. V našej práci sme skúmali účinok vitamínu K2 na bunkovú viabilitu, aktivitu alkalickéj fosfatázy a expresiu kľúčových osteogénnych génov *Alpl* a *Col1a1* v primárnej kultúre potkaních osteoblastov. Bunky boli ošetrené koncentráciami 10, 50 a 100 $\mu\text{mol/l}$ vitamínu K2 po dobu 72 hodín. Analýza viability, spektrofotometrické stanovenie aktivity alkalickéj fosfatázy a metóda real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) nepreukázali štatisticky významné zmeny v sledovaných parametroch oproti kontrole. Absencia signifikantnej modulácie týchto parametrov naznačuje, že aplikované koncentrácie vitamínu K2 v danom časovom intervale neovplyvňujú proliferáciu ani počiatočné štádiá diferenciácie primárnych potkaních osteoblastov. Získané dáta zároveň potvrdzujú biokompatibilitu testovaných dávok a indikujú, že sledovaná látka v danom koncentračnom rozmedzí nepôsobí inhibične na proces maturácie kostnej matrix.

Kľúčové slová: vitamín K2, osteoblasty, bunková viabilita, alkalická fosfatáza, génová expresia

Abstract

Vitamin K2 (menaquinone) is a biologically active cofactor that is essential for the process of mineralization and the transcriptional regulation of genes associated with osteoblastic differentiation. In our study, we investigated the effect of vitamin K2 on cell viability, alkaline phosphatase activity, and the expression of the key osteogenic genes *Alpl* and *Col1a1* in a primary culture of rat osteoblasts. The cells were treated with concentrations of 10, 50, and 100 $\mu\text{mol/l}$ of vitamin K2 for 72 hours. Viability analysis, spectrophotometric determination of alkaline phosphatase activity, and real-time PCR (Polymerase

Chain Reaction) did not reveal statistically significant changes in the monitored parameters compared to the control. The absence of significant modulation of these parameters suggests that the applied concentrations of vitamin K2 do not affect the proliferation or early stages of differentiation of primary rat osteoblasts within the given time interval. The obtained data also confirm the biocompatibility of the tested doses and indicate that the tested substance, within the given concentration range, does not inhibit the bone matrix maturation process.

Key Words: vitamin K2, osteoblasts, cell viability, alkaline phosphatase, gene expression

Úvod

Vitamín K2 (menachinón) predstavuje biologicky aktívny kofaktor zapojený do posttranslačných modifikácií proteínov, ktoré sú kľúčové pre proces mineralizácie a štrukturálnu organizáciu kostného tkaniva. Na rozdiel od vitamínu K1, ktorý primárne ovplyvňuje koagulačnú kaskádu v pečeni, vitamín K2 vykazuje výrazný extrahepatálny účinok, najmä v regulácii osteogenézy a kalcifikácie mäkkých tkanív. Mechanizmus účinku vitamínu K2 je sprostredkovaný dvoma hlavnými dráhami. Prvou je γ -karboxylácia zvyškov kyseliny glutámovej na γ -karboxyglutamát (Gla), čím dochádza k aktivácii K-dependentných proteínov, predovšetkým osteokalcínu a matrixového Gla-proteínu (MGP). Aktívny, karboxylovaný osteokalcín vykazuje vysokú afinitu k hydroxyapatitu, čo umožňuje jeho efektívne zabudovanie do kostnej matrix. Druhá dráha zahŕňa genomický účinok, kde vitamín K2 pôsobí ako ligand pre nukleárny receptor SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor), resp. jeho hľadavčí ortológ PXR (Pregnane x Receptor). Táto interakcia vedie k modulácii expresie génov asociovaných s osteoblastickou diferenciáciou a produkciou extracelulárnej matrix. Táto signalizačná dráha tak priamo ovplyvňuje transkripčný profil osteoblastov [1, 2, 3].

Osteoblasty, diferencujúce sa z mezenchymálnych kmeňových buniek, sú zodpovedné za syntézu organickej kostnej matrix (osteoidu) a následnú riadenú mineralizáciu. Tento proces zahŕňa sekvenciu fáz od proliferácie cez maturáciu matrix až po depozíciu minerálnych solí. Bolo preukázané, že vitamín K2 stimuluje aktivitu alkalickéj fosfatázy (ALP) a zvyšuje akumuláciu kolagénu typu I reťazca $\alpha 1$ (*Col1a1*), čím vytvára optimálne podmienky pre formovanie kostnej hmoty.

Pre detailné skúmanie týchto molekulárnych mechanizmov sa často využívajú primárne bunkové kultúry osteoblastov, najčastejšie izolované z kalvárií potkanov. Tento model umožňuje sledovať dynamiku génovej expresie a formovanie mineralizačných centier v kontrolovanom *in vitro* prostredí, ktoré verne simuluje fyziologické procesy prebiehajúce v organizme. Štúdium vplyvu vitamínu K2 na génovú expresiu v týchto kultúrach poskytuje kľúčové informácie o jeho anabolickom pôsobení a potenciáli pri prevencii a liečbe metabolických ochorení skeletu, ako je osteoporóza [5, 6].

Cieľom tejto práce je zhodnotiť vplyv vitamínu K2 na bunkovú viabilitu, aktivitu alkalickéj fosfatázy a expresiu génov osteogénnych markerov *Alpl* a *Col1a1* v primárnej kultúre osteoblastov potkana.

1 Materiál a metodika

1.1 Bunková kultúra osteoblastov

Primárne potkanie osteoblasty boli získané od spoločnosti Innoprot (Derio, Španielsko). Bunky boli kultivované v rastovom médiu pozostávajúcom z α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Modification) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementovaného 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS; Sigma-Aldrich) a antibiotikami (1 % roztok penicilínu a streptomycínu; Hyclone, Logan, UT, USA). Bunky boli nasadené do 75 cm² kultivačných fliaš a inkubované pri teplote 37 °C v 5 % CO₂. Kultivačné médium bolo vymieňané každé 2 až 3 dni. Po dosiahnutí 85 – 90 % konfluencie boli bunky subkultivované podľa protokolu autorov Taylor et al. (2014) [7]. Experimenty sa uskutočnili počas exponenciálnej fázy rastu v 3. pasáži.

1.2 Aplikácia vitamínu K2

Bunky boli ošetrené rôznymi koncentraciami vitamínu K2 (menachinón-4; Sigma-Aldrich). Vitamín K2 bol rozpustený v dimetylsulfoxide (DMSO) na prípravu zásobného roztoku s koncentráciou 23,39 mM. Zásobný roztok bol následne ďalej riedený kultivačným médiom na dosiahnutie požadovaných koncentrácií (Tabuľka 1). Expozícia buniek vitamínom K2 trvala 72

hodín. Kontrolná skupina (K) predstavovala primárnu bunkovú kultúru bez prídavku vitamínu K2.

Tabuľka 1 – Dávky použité v experimentoch *in vitro*

Skupina	Vitamín	Koncentrácia
K10	K2	10 μ mol/l
K50	K2	50 μ mol/l
K100	K2	100 μ mol/l

1.3 Test viability

Relatívna viabilita buniek v primárnych kultúrach osteoblastov potkana bola stanovená pomocou kolorimetrického testu proliferácie buniek CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA). Test bol vykonaný podľa pokynov výrobcu s použitím 96-jamkových platničiek vhodných pre bunkové kultúry. Bunky boli nasadené v hustote 2,0 x 10⁴ buniek na jamku v 100 μ l kultivačného média. Množstvo formazánu nameraného absorbanciou je priamo úmerné počtu živých buniek v kultúre. Výsledky boli vyjadrené ako percento optickej hustoty (OD) voči kontrolnej skupine.

1.4 Test aktivity alkalickéj fosfatázy (ALP)

Aktivita ALP bola hodnotená v ôsmich opakovaniach na 96-jamkových platniach pri hustote nasadenia 1,0 x 10⁴ buniek/jamku. Na detekciu aktivity ALP bol použitý substrát BCIP®/NBT SIGMAFAST™ (5-bróm-4-chlór-3-indolylfosfát/nitromodrá tetrazóliová soľ), ktorý v ALP-pozitívnych bunkách vytvára modrofialovú zrazeninu. Intenzita zafarbenia bola kvantifikovaná spektrofotometricky pri 405 nm. Výsledky boli vyjadrené ako percento optickej hustoty (OD) relatívne ku kontrolnej skupine.

1.5 Real-time PCR a génová expresia vybraných génov

Primárne osteoblasty potkana boli kultivované v kultivačnej nádobe s objemom 25 cm² a po 24 hodinách ošetrené vitamínom K2 v rôznych koncentraciách rozpustených v kultivačnom médiu. Po 72-hodinovej expozícii vitamínom K2, bola celková RNA izolovaná z buniek pomocou komerčného kitu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa pokynov výrobcu. Koncentrácia RNA v každej vzorke bola kvantifikovaná pomocou fluorometra Quantus Fluorometer (Promega, USA). Na syntézu komplementárnej DNA (cDNA) bolo použitých 1,5 μ g celkovej RNA z každej vzorky. Reverzná transkripcia bola vykonaná pomocou sady RT² First Strand Kit (Qiagen, Nemecko). Reakčná zmes obsahovala príslušné komponenty a bola inkubovaná za štandardných podmienok pre syntézu cDNA. Génová expresia vybraných génov bola kvantifikovaná

prostredníctvom real-time PCR pomocou Custom RT² Profiler PCR Array (Qiagen) v 96-jamkovom formáte podľa pokynov výrobcu. Analyzovanými cieľovými génmi boli osteogénne markery *Alpl* (alkalická fosfatáza) a *Col1a1* (kolagén typu I, alfa 1), ktoré sú rozhodujúcimi indikátormi diferenciacie a maturácie osteoblastov (Tabuľka 2). Normalizácia relatívnej génovej expzie bola uskutočnená pomocou analýzy softvéru GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen). Pôvodne pre normalizáciu bolo testovaných päť kandidátskych referenčných génov, avšak z týchto génov boli identifikované *Ldha* (Lactate dehydrogenase A), *Pgk1* (Phosphoglycerate kinase 1) a *B2m* (Beta-2 microglobulin) ako najstabilnejšie. Ich vhodnosť bola ďalej potvrdená pomocou nástroja RefFinder, ktorý integruje viaceré výpočtové algoritmy na hodnotenie stability referenčných génov. Špecifita PCR amplifikácie bola overená pomocou melting curve analysis na zaistenie prítomnosti špecifických amplikónov a absencie primárnych dimérov či nešpecifických produktov.

Tabuľka 2 – Zoznam analyzovaných génov

Funkčná skupina	Symbol génu	Názov génu	Funkcia
Osteogénne markery	<i>Alpl</i>	Alkalická fosfatáza	Marker skorej diferenciacie osteoblastov
	<i>Col1a1</i>	Kolagén typu I, alfa 1	Hlavná štruktúrna zložka kostnej extracelulárnej matrix

1.6 Štatistická analýza

Dáta boli spracované a analyzované pomocou softvéru SPSS verzia 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Údaje z real-time PCR boli analyzované pomocou softvéru GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen) s použitím metódy $\Delta\Delta C_t$ na výpočet génovej expzie. Normalizované hodnoty génovej expzie boli následne vyhodnotené pomocou jednofaktorovej ANOVA s post-hoc testami. Všetky experimenty boli vykonané v trojitej biologickej replikácii a ôsmimi technickými replikátmi na 96-jamkovej platničke. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p < 0,05$. Všetky výsledky sú uvedené ako priemer a štandardná odchýlka (SD) najmenej troch nezávislých experimentov.

2 Výsledky a diskusia

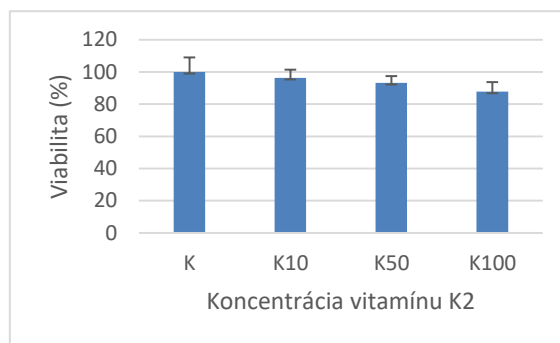
Naše výsledky nepreukázali štatisticky významný vplyv vitamínu K2 na bunkovú viabilitu, aktivitu ALP ani

génovú expresiu kľúčových osteogénnych markerov v primárnej kultúre potkaních osteoblastov.

V rámci stanovenia bunkovej viability (Tabuľka 3, Graf 1) sme mohli pozorovať znížené hodnoty viability, bez významných rozdielov v porovnaní s kontrolnou skupinou, čo potvrdzuje bezpečnosť aplikácie vitamínu K2 v daných dávkach na osteoblastovú kultúru, čo vytvára predpoklady pre objektívne hodnotenie jeho potenciálnych osteogénnych účinkov.

Tabuľka 3 – Hodnotenie bunkovej viability primárnych osteoblastov potkanov

	Priemer v %	Smerodajná odchýlka
K	100,000	9,052
K10	96,328	5,104
K50	93,221	4,210
K100	87,811	5,892

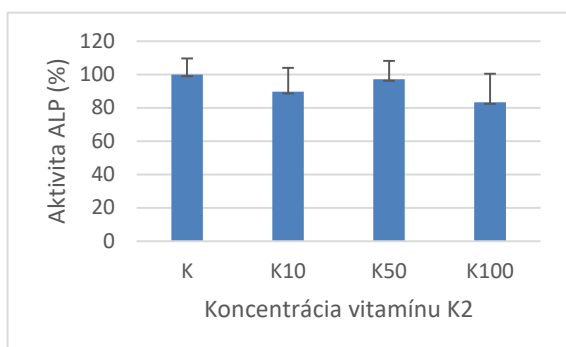


Graf 1 – Grafické znázornenie viability osteoblastov po expozícii vitamínom K2 v percentách

Získané výsledky naznačujú, že testované koncentrácie látky K (10, 50 a 100) neovplyvňujú enzymatickú aktivitu ALP v primárnej kultúre osteoblastov (Tabuľka 4, Graf 2). Hoci bol v skupine K100 zaznamenaný mierny pokles aktivity na 83,42 %, absencia štatistickej významnosti potvrdená Tukeyho HSD (Honestly Significant Difference) testom dovoľuje konštatovať, že osteogénny potenciál buniek zostal zachovaný. Tieto dáta sú dôležité z hľadiska biokompatibility, nakoľko potvrdzujú, že sledované látky v danom rozmedzí nepôsobia inhibične na proces maturácie kostnej matrix.

Tabuľka 4 – Hodnotenie aktivity ALP

	Priemer v %	Smerodajná odchýlka
K	100,000	9,6517
K10	89,630	14,396
K50	97,226	10,964
K100	83,421	17,064

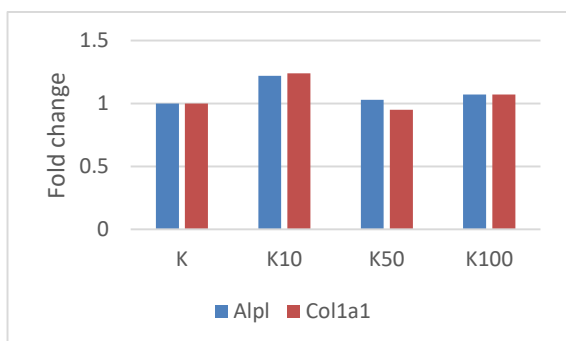


Graf 2 – Grafické znázornenie aktivity ALP v percentách

Analýza génovej expresie pomocou real-time PCR umožnila zhodnotiť zmeny v expresii sledovaných osteogénnych markerov v odpovedi na aplikáciu vitamínu K2. Zamerali sme sa na dva kľúčové gény, na *Alpl* kódujúci alkalickú fosfatázu a *Col1a1* kódujúci kolagén typu I reťazec $\alpha 1$ (Tabuľka 5, Graf 3). Relatívna expresia génu *Alpl* vykazovala v prvej skupine miernu upreguláciu s hodnotou fold change 1,22. Tento nárast však nebol štatisticky významný ($P = 0,337$). Podobne bola pozorovaná vyššia relatívna expresia génu *Col1a1* (fold change 1,24), ktorá však taktiež nedosiahla štatistickú významnosť ($P = 0,085$).

Tabuľka 5 – Fold change skúmaných génov

	Fold change			
	K	K10	K50	K100
<i>Alpl</i>	1	1,22	1,03	1,07
<i>Col1a1</i>	1	1,24	0,95	1,07



Graf 3 – Zmeny v génovej expresii génov *Alpl* a *Col1a1* po expozícii osteoblastov vitamínom K2

V našej práci bol analyzovaný účinok vitamínu K2 (menachinónu) na primárnu kultúru potkaních osteoblastov prostredníctvom analýzy bunkovej viability, enzymatickej aktivity ALP a génovej expresie génov *Alpl* a *Col1a1*. Po 72-hodinovej expozícii buniek

koncentraciami 10, 50 a 100 $\mu\text{mol/l}$ neboli zaznamenané štatisticky významné zmeny v žiadnom zo sledovaných parametrov. Absencia signifikantnej modulácie viability naznačuje, že testované koncentrácie vitamínu K2 nepôsobia na primárne osteoblasty cytotoxicky, čo je v súlade so zisteniami Atkinsa et al., ktorí taktiež nespozorovali negatívny vplyv menachinónu na prežívanie buniek, ale skôr jeho protektívny, antikatabolický účinok. V ich práci boli použité ľudské bunky podobné primárnym osteoblastom [8]. Je však dôležité poznamenať, že zatiaľ čo nami testované vyššie koncentrácie udržali viabilitu na úrovni kontroly, iné štúdie naznačujú odlišnú odpoveď buniek pri nižšom dávkovaní. Konkrétne pri koncentráciách v rozsahu 0,1 až 10 $\mu\text{mol/l}$ bol zaznamenaný stimulačný účinok vitamínu K2, ktorý viedol k signifikantnému zvýšeniu bunkovej viability primárnych bunkových kultúr potkaních osteoblastov [9].

Nesignifikantný efekt na aktivitu ALP a expresiu génu *Alpl* v našom experimentálnom modeli je však v kontraste s výsledkami, ktoré publikovali Wang et al. [5], ktorí v bunkovej línii C3H10T1/2 (mezenchymálna fibroblastom podobná bunková línia embryonálneho pôvodu) preukázali zvýšenie expresie ALP po suplementácii vitamínom K2 (v koncentráciách 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$), čo pripísali inhibícii signálnej dráhy STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1). Rozdiely v biologickej odpovedi môžu byť vysvetlené odlišným diferenciačným potenciálom stabilných bunkových línii v porovnaní s nami použitou primárnou kultúrou osteoblastov.

Účinok vitamínu K2 na osteoblastickú diferenciáciu môže byť sprostredkovaný viacerými signalizačnými dráhami vrátane PKA a interakcie s nukleárnym receptorom PXR [10, 11]. Aktivácia týchto mechanizmov však môže byť závislá od diferenciačného stavu buniek a experimentálnych podmienok, čo môže vysvetľovať absenciu signifikantných zmien v našom modeli.

Stabilná expresia génu pre kolagén typu I reťazec $\alpha 1$ (*Col1a1*) v našich výsledkoch korešponduje s pozorovanou stabilitou aktivity ALP, keďže oba markery sú úzko späté s počiatočnými fázami osteoblastickej maturácie. Hoci Tao et al. [1] vo svojej štúdií demonštrovali schopnosť vitamínu K2 podporovať osteogenézu a potláčať ferroptózu cestou Nrf2/Keap1/CBR1 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ Kelch-like ECH-associated protein 1/ Carbonyl Reductase 1), ich výsledky boli dosiahnuté v prostredí ovplyvnenom zápalovým faktorom PGE2 (prostaglandín E2). To naznačuje, že anabolický potenciál vitamínu K2 sa môže výraznejšie prejavíť

v podmienkach indukovaného stresu alebo patologického stavu, zatiaľ čo pri bazálnej kultivácii zdravých primárnych buniek nemusí dôjsť k prekročeniu prahu pre významnú nadreguláciu týchto génov [1].

Z hľadiska klinických implikácií bol meta-analýzou potvrdený vplyv vitamínu K2 na biomarkery kostného obratu u postmenopauzálnych pacientiek, čo podčiarkuje terapeutický význam menachinónu *in vivo* [2]. Limity nášho *in vitro* modelu, najmä relatívne krátka doba pôsobenia (72 hodín) a absencia synergicky pôsobiacich látok, ako je 1,25-dihydroxyvitamín D3, mohli prispieť k neprítomnosti pozorovaných zmien v expresnom profile génov *Alpl* a *Col1a1* [12]. Dosiahnuté výsledky tak dopĺňajú diskusiu o komplexnosti účinkov vitamínu K2 a poukazujú na potrebu ďalšieho skúmania časovo a dávkovo závislých interakcií v primárnych bunkových systémoch.

Záver

Vitamín K2, predovšetkým vo forme menachinónu-4, zohráva významnú úlohu v procese mineralizácie kostného tkaniva a regulácii transkripcie génov spojených s osteoblastickou diferenciáciou.

Hoci viaceré zahraničné štúdie dokumentujú stimulačný účinok vitamínu K2 na osteoblastickú diferenciáciu, v podmienkach nášho experimentálneho modelu nebola takáto odpoveď potvrdená. Naše výsledky naznačujú, že pri 72-hodinovej expozícii primárnych osteoblastov testovaným koncentraciám vitamínu K2 nedochádza k štatisticky významnej modulácii skorých markerov osteogenézy.

Uvedené poznatky prispievajú k hlbšiemu pochopeniu komplexnosti pôsobenia vitamínu K2 *in vitro* a môžu slúžiť ako východisko pre ďalšie štúdie zamerané na optimalizáciu dĺžky pôsobenia a kombinovanej liečby pri poruchách kostného metabolizmu.

PodĎakovanie

Tento výskum bol uskutočnený s podporou projektu KEGA 027UKF-4/2026.

Touto cestou by som sa chcela poďakovať školiteľke doc. RNDr. Vladimíre Mondočkovej, PhD. za cenné rady, odporúčania a usmernenia pri vypracovávaní práce.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] TAO, L.; ZHANG, Y.; LIU, H.; LI, Z.; CHEN, X.; WANG, J. and CHEN, L., (2025). Vitamin K2 inhibits PGE2-mediated osteoblast ferroptosis by upregulation of CBR1 via the Nrf2/Keap1 pathway. *Communications*

- Biology*, vol. 8, no. 1116, pp. 1-15. ISSN 2399-3642.
- [2] ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, Q.; LI, Y.; JIN, P. and ZHANG, Z., (2025). The effect of vitamin K2 supplementation on bone turnover biochemical markers in postmenopausal osteoporosis patients: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 16, article 1703116, pp. 1-13. ISSN 1664-2392.
- [3] STAUDINGER, J. L.; MAHROKE, A.; PATEL, G. and KHANNA, R., (2024). Pregnane X Receptor Signaling Pathway and Vitamin K. *Cells*, vol. 13, no. 8, article 681. ISSN 2073-4409.
- [4] ANSARI, S.; RAZAOKI, M. A.; WHITING, P. S.; JING, Y.; TRACY, K.; PUROHIT, R. and XIE, H., (2021). Matrix Vesicles: Role in Bone Mineralization and Potential Use as Therapeutics. *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 4, pp. 1-23. ISSN 1424-8247.
- [5] WANG, C.; ZHENG, X.; SHEN, Y.; LIU, J.; MAO, S.; SUN, Z.; XU, W.; LIU, Y. and LI, F., (2022). Vitamin K2 improves osteogenic differentiation by inhibiting STAT1 via the Bcl-6 and IL-6/JAK/STAT pathway. *Nutrients*, vol. 14, no. 14, article 2934, pp. 1-16. ISSN 2072-6643.
- [6] LI, A. C.; WASILEWSKI, G. B.; RAPP, N.; REINHARDT, A.; HEEG, S.; NEUSS, S. and SCHURGERS, L. J., (2021). Menaquinone-7 supplementation improves osteogenesis in pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, article 618760. ISSN 2296-634X.
- [7] TAYLOR, S. E. B.; SHAH, M. and ORRISS, I. R., (2014). Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey reports*, vol. 3, no. 585. ISSN 2047-6396.
- [8] ATKINS, G. J.; WELLDON, K. J.; WIJENAYAKA, A. R.; BONNEWALD, L. F. and FINDLAY, D. M., (2009). Vitamin K promotes mineralization, osteoblast-to-osteocyte transition, and an anticatabolic phenotype by γ -carboxylation-dependent and -independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 297, no. 6, pp. C1358-C1367. ISSN 0363-6143.
- [9] CHEN, Liang; CHEN, Liang; SHI, Xiang; WENG, She-Ji; XIE, Jun; TANG, Jia-Hao; YAN, De-Yi; WANG, Bing-Zhang; XIE, Zhong-Jie; WU, Zong-Yi and YANG, Lei, (2020). Vitamin K2 Can Rescue the Dexamethasone-Induced Downregulation of Osteoblast Autophagy and Mitophagy Thereby Restoring Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, article 1209, pp. 1-14. ISSN 1663-9812.
- [10] ICHIKAWA, T.; HORIE-INOUE, K.; IKEDA, K.; BLUMBERG, B. and INOUE, S., (2007). Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and

expression of novel target genes in osteoblastic cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 39, no. 4, pp. 239-247. ISSN 0952-5041.

- [11] TABB, M. M.; SUN, A.; ZHOU, C.; GRONEMEYER, H.; WESTIN, S.; FORREST, L. A.; BLUMBERG, B.; XIE, W. and EVANS, R. M., (2003). Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 45, pp. 43919-43927. ISSN 0021-9258.
- [12] POON, C. C. W.; LI, R. W. S.; SETO, S. W.; LI, S. M.; HO, H. P.; LUK, S. S. W.; LAW, W. I. and WONG, M. S., (2015). In vitro vitamin K2 and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 combination enhances osteoblasts anabolism of diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, vol. 767, pp. 30-40. ISSN 0014-2999.

Vyhodnotenie vplyvu kadmia na mladé rastliny slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) pri hydroponickej kultivácii

Evaluation of the impact of cadmium on young sunflower plants (*Helianthus annuus* L.) during hydroponic cultivation

Michal Melich¹

Školiteľ: Roman Kuna²

^{1,2}Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

¹ michal.melich@student.ukf.sk, ² rkuna@ukf.sk

Abstrakt

Cieľom našej práce bolo zistiť akým spôsobom vplýva Cd na rast slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) v skorých štádiách vývinu. Kadmium malo podobu CdCl₂ s koncentráciou 3 mg/l. Odoberali sme vzorky prvých listov a koreňov raz týždenne počas troch týždňov. Vzorky sme následne použili na stanovenie životaschopnosti buniek a určenie obsahu H₂O₂. Podarilo sa nám zaznamenať štatisticky významné rozdiely v množstvách H₂O₂ v koreňoch počas prvého a druhého týždňa. Pri nami použitej koncentrácii kadmia sme nezaznamenali štatisticky významný rozdiel pri vplyve na životaschopnosť buniek. Výsledky práce nasvedčujú ukladaniu kadmia v koreňoch slnečnic, kde spôsobuje zvýšený oxidačný stres. Aj napriek tomu, nebola životaschopnosť buniek výrazne ovplyvnená.

Kľúčové slová: kadmium, *Helianthus annuus*, životaschopnosť buniek, H₂O₂, hydroponia

Abstract

The aim of our work was to determine how Cd affects the growth of annual sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the early stages of development. Cadmium was in the form of CdCl₂ with a concentration of 3 mg/l. We collected samples of the first leaves and roots once a week for three weeks. We then used the samples to determine cell viability and H₂O₂ content. We managed to record statistically significant differences in the amounts of H₂O₂ in the roots during the first and second week. At the cadmium concentration we used, we did not record a statistically significant difference in the effect on cell viability. The results of the work suggest the deposition of cadmium in the roots of sunflowers, where it causes increased oxidative stress. Despite this, cell viability was not significantly affected.

Key words: cadmium, *Helianthus annuus*, cell viability, H₂O₂, hydroponics

Úvod

Kadmium (Cd) je ťažký kov, ktorý sa v periodickej tabuľke prvkov nachádza v II.B skupine a nesie protónové číslo 48 [1]. Ťažké kovy ako sú Cd, Cu, Pb, Cr a Hg sú považované za hlavné látky znečisťujúce životné prostredie. V prírode sa bežne vyskytuje 90 prvkov, z toho 53 je zaradených medzi ťažké kovy. Je to preto, že každý kov s hustotou väčšou ako 5 g.cm³ je považovaný za ťažký. Iba 17 z nich je na základe rozpustnosti prístupných pre živé bunky [2]. Nie všetky z nich majú iba negatívne účinky pre živé organizmy, niektoré sú biologicky významné.

Za objaviteľov Cd sa považujú Friedrich Stromeyer a Karl Hermann. Objavili ho takmer súčasne v roku 1817, vo vzorkách oxidu zinočnatého. Bežne sa nachádza v zinkovej rude. Ide o relatívne vzácny prvok a zvyčajne sa v prírode nevyskytuje v čistom stave. Kadmium nemá amfoterné vlastnosti a je nerozpustné v zásadách. Vo vzduchu sa rýchlo oxiduje na oxid kademnatý. Ľahko reaguje s oxidom uhličitým, vodnou parou, oxidom siričitým, oxidom sírovým alebo chlorovodíkom a vytvára uhličitán hydroxid, sulfid alebo chlorid kademnatý [3]. Je to siedmy najtoxickejší kov a je považovaný za karcinogén prvej triedy podľa Medzinárodnej agentúry pre výskum rakoviny [1].

Nie je esenciálny pre rastliny a nachádza sa v nich ako stopový [3, 4]. V prírode ho však môžeme nájsť vo veľkom množstve.

K zvyšovaniu množstva kadmia v našom životnom prostredí dopomáha aj ľudská činnosť. Znečistenie pôd je spôsobené zvýšenou koncentráciou metaloidov a kovov.

Za to je hlavne zodpovedné neustále rozrastanie priemyslu. Najvýraznejšie k tomu prispieva likvidácia komunálneho odpadu, tavenie, ťažba, kovovýroba a aplikácia syntetických fosfátových hnojív. Väčšina

anorganických látok, ktoré znečisťujú pôdy, nepodliehajú chemickej ani mikrobiálnej degradácii. To znamená, že po ich prenesení do pôdy, v nej pretrvávajú veľmi dlhú dobu [5]. Kontaminované pôdy poškodzujú ekosystém a ľudské zdravie:

- priamym požitím kontaminovaného jedla
- fyzickým kontaktom so znečistenou pôdou
- cez potravinový reťazec (pôda-rastlina-človek alebo pôda-rastlina-zviera-človek)
- pitím znečistenej vody
- znížením kvality jedla a redukciou množstva pôd, vhodných pre rast poľnohospodárskych rastlín [6], [1].

Najlepšie pozorovateľnými symptómami toxicity kadmia v rastlinách sú nižší vzrast a chloróza. Vysoká toxicita zastavuje rast a vedie k nekróze rastliny [7]. Negatívny vplyv kadmia na rastliny spočíva v inhibícii fixácie uhlíka (C) a v znižovaní obsahu chlorofylu a fotosyntetickej aktivity [8]. Okrem toho vyvoláva v rastlinách aj osmotický stres tým, že zníži relatívny objem vody v listoch, stomatálnu vodivosť a transpiráciu. Toto má za následok fyziologické poškodenie rastliny [9]. Kadmium tiež spôsobuje zvýšenú tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré poškadzujú membrány rastlinných buniek. To vyvrcholí zničením biomolekúl a organel bunky [10]. Zhoršuje aj príjem a transport Ca, P, Mg, K, Mn, z toho najväčší vplyv má na Fe a Zn [11].

1 Príprava, odber a analýza rastlinného materiálu

Vybrali sme približne 100 semien hybridu P64LE136, ktoré sme 24 hodín imbibovali v Petriho miske s destilovanou vodou. Po ukončení imbibície sme ich zamotali do papierových roliek a nechali naklíčiť v kadičke s destilovanou vodou 5 až 7 dní v tme pri teplote 24 °C, pokiaľ nevyklíčilo dostatočné množstvo semien pre zahájenie pokusov. Vyklíčené semená sme premiestnili do hydroponie, ktorá pozostávala zo šiestich nádob po 10 rastlín. Z toho 3 nádoby obsahovali okrem plného Hoaglandovho živného roztoku aj rozpustené 3 mg/l CdCl₂ [12].

Hydroponia bola zostavená v skleníku katedry botaniky a genetiky. Rastliny sme pestovali

pod umelým osvetlením dvoch lúčov (AzureGrow Grow LED panel 100 W), s intenzitou žiarenia 140 – 160 PPFD (μmol/m²/s) a fotoperiódou svetlo/tma (16/8 h). Nádoby boli pravidelne prevzdušňované v 15-minútových intervaloch. Miestnosť bola vybavená termoregulačným zariadením nastaveným na 23 – 25 °C a vlhkosť v miestnosti sa pohybovala medzi 50 až 60 %. Každých 7 dní boli z každého vedra odobraté 3 rastliny, z ktorých sme extrahovali vzorky koreňov a prvých listov. Niektoré z nich sme zmrazili pre neskoršie použitie a zvyšné sme hneď po odobratí využili v pokuse. Vzorky boli vyhodnotené na spektrofotometri Rayleigh UV-2601 (Beijing Rayleigh Analytical Instrument Co., Rayleigh UV-. 2601, Čína). Zaznamenané údaje sme vyhodnotili prostredníctvom štatistických nástrojov MS Excel 2013. Výsledné hodnoty boli získané použitím dvojvýberového t-testu s nerovnosťou rozptylu a jednofaktorovej ANOVA.

1.1 *In situ* lokalizácia H₂O₂

Na vyhodnotenie tvorby H₂O₂ „in situ“ postupom farbenia v závislosti od endogénnej peroxidázy sme využili 3,3'-diaminobenzidín (DAB) podľa metodiky Kumar et al., 2014 [13]. Celé listy sme ponorili do roztoku DAB s koncentráciou 1 mg/ml, pH 3,8. Činidlo sme infiltrovali v slabom vákuu počas 5 minút a následne sme vzorky inkubovali pri izbovej teplote počas 2 – 8 hodín na svetle, kým sa neobjavili hnedé škvrny na dôkaz tvorby H₂O₂. Chlorofyly sme následne z listov odstránili vo vriacom etanole. H₂O₂ bol vizualizovaný na liste ako červenohnedé škvrny vytvorené reakciou DAB s endogénnym H₂O₂.

Zafarbené listy sme odfotografovali. Výskyt zafarbenia sme kvantifikovali pomocou analýzy obrazu s použitím voľne dostupného softvéru ImageJ2/Fiji v1.53u.

1.2 Stanovenie životaschopnosti buniek

Odobraté vzorky koreňov a listov sme navážili na 1,5 g a inkubovali v 0,25 % roztoku Evansovej modrej (EB) 20 minút pri izbovej teplote. Po inkubácii sme ich premyli dvakrát destilovanou vodou, vždy po 15-tich minútach. Premyté vzorky sme varili v etanole do odfarbenia chlorofylu. Odfarbené vzorky sme inkubovali v 10 ml 1 % (w/v) roztoku SDS (dodecylsírnanu sodného) v 50 % metanole pri teplote 50 °C 15 minút. Inkubované vzorky sme homogenizovali v trecej miske s 1,5 ml 1 % (w/v) roztoku SDS v 50 % metanole. Homogenát sme centrifugovali pri 14 000 g 15 minút pri 24 °C. Pre porovnanie nameraných hodnôt sme pripravili aj slepú

vzorku ("blank"), ktorá obsahovala iba reakčnú zmes bez vzorky. Zmesi sme preniesli do PMMA kyviet, v ktorých sme merali hodnoty absorpcie v spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 600 nm. Namerané hodnoty sme použili pre výpočet obsahu EB z kalibračnej krivky známych koncentrácií v ng/g podľa [14].

1.3 Spektrofotometrické stanovenie obsahu H₂O₂

Odobraté vzorky (200 mg) sme homogenizovali v predchladenej trecej miske na ľade s 2 ml 0,1 % TCA (kyselina trichlóroctová). Homogenát sme centrifugovali pri 12 000 g 15 minút pri teplote 4 °C. Reakčnú zmes sme pripravili z 0,5 ml supernatantu, 0,5 ml 10 mM fosfátového pufru s pH 7,4 a 1 ml 1 M KI. Pre porovnanie nameraných hodnôt sme pripravili aj "blank" vzorku, ktorá obsahovala iba reakčnú zmes bez vzorky materiálu. Zmesi sme preniesli do PMMA kyviet, v ktorých sme merali hodnoty absorpcie v spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 390 nm. Namerané hodnoty sme použili pre výpočet obsahu H₂O₂ ich dosadením do štandardnej krivky známych koncentrácií v μmol/g podľa [15].

2 Výsledky a diskusia

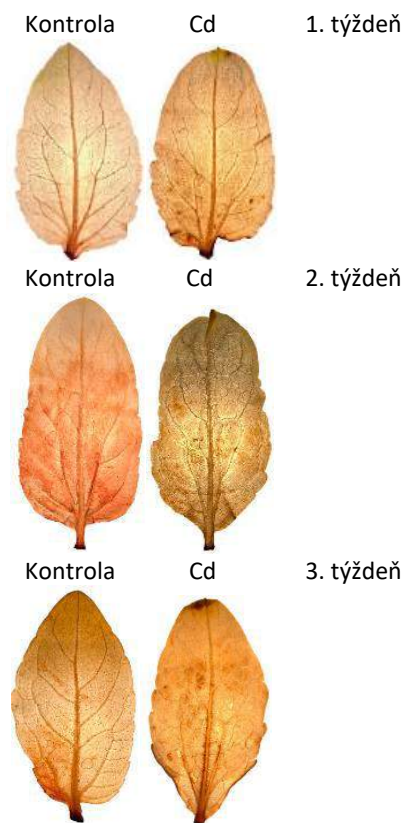
Praktická časť práce bola zameraná na sledovanie vplyvu kadmia mladé rastliny slnečnice ročnej. Špecializovali sme sa na pozorovanie oxidačného stresu porovnávaním tvorby a akumulácie reaktívnych foriem kyslíka a životaschopnosti buniek. Nami vybraný hybrid P64LE136, *Helianthus annuus* sme zasadili do hydroponie s Hoaglandovým roztokom. Rastliny sme vystavili pôsobeniu kadmia s koncentráciou 3 mg/l. Pre porovnanie sme zaviedli kontrolnú hydroponiu s tým istým hybridom a živným roztokom bez rozpusteného kadmia. Vzorky prvých listov a koreňov sme odoberali každých 7 dní a vyhodnotili sme na nich vybrané parametre.

2.1 In situ lokalizácia H₂O₂

Výsledky vizualizácie prítomnosti peroxidu vodíka v listoch experimentálnych rastlín potvrdili doterajšie zistenia o individuálnej odpovedi rastlín na kadmiový stres.

Na Obr. 1 uvádzame reprezentatívne príklady na dôkaz prítomnosti H₂O₂ v listoch po použití DAB. Vizualne preukazný rozdiel v listoch sme zaznamenali predovšetkým po prvom týždni pestovania rastlín. Pri kontrolných rastlinách neboli prejavy akumulácie H₂O₂ odlišiteľné, kým pri kadmiových rastlinách boli depozity už výraznejšie. Najsilnejšia pozitívna reakcia bola

v druhom týždni, následne v treťom týždni nastal mierny pokles oproti druhému týždňu pri kontrolných aj stresovaných rastlinách.



Obr. 1 Porovnanie pozitívnej reakcie na činidlo DAB v prvých (1. a 2. týždeň) a druhých listoch (3. týždeň), kontrolných a stresovaných rastlín slnečnice.

Celková plocha listov stresovaných rastlín bola v prvom týždni menšia v porovnaní s kontrolou. Naopak % zafarbenej plochy bolo väčšie. V druhom týždni došlo k nárastu celkovej plochy listov stresovaných rastlín aj kontroly, ktorá bola stále väčšia v porovnaní so stresovanými rastlinami. Pri stresovaných rastlinách sme sledovali mierny pokles % zafarbenej plochy listov, zatiaľ čo v kontrole došlo k miernemu nárastu, ktorý stále nepresiahol zafarbené % plochy stresovaných rastlín. V treťom týždni došlo k nárastu celkovej listovej plochy kontrolných a stresovaných rastlín. % zafarbenej plochy listov kontrolných rastlín sa výrazne nezmenilo. Pri stresovaných rastlinách došlo k nárastu % zafarbenej plochy listov, ktorá bola stále menšia ako v prvom týždni.

Tabuľka 1 Výsledné hodnoty celkovej plochy listov v mm² a % zafarbenej plochy kontroly a slnečnic rastúcich v 3 mg/l CdCl₂, získané pomocou softvéru Fiji.

	Celková plocha (mm ²)	% plochy
Kontrola 1. týždeň	527,45	1,63
Cd 1. týždeň	442,35	6,9
Kontrola 2. týždeň	876,03	3,88
Cd 2. týždeň	796,41	5,11
Kontrola 3. týždeň	2487,23	3,75
Cd 3. týždeň	878,93	6,18

In situ lokalizácia nasvädčuje tomu, že kadmium vyvoláva v listoch oxidačný stres. Ten sa najviac prejavil v prvom týždni. Následný pokles % zafarbenej plochy listov môžeme vysvetliť ako adaptáciu na stres spôsobený kadmiumom. Naše výsledky naznačujú zvýšenú funkciu antioxidantných enzýmov, ako sú napríklad peroxidázy.

Lokalizáciu H₂O₂ farbením DAB uskutočnili Tan et al. 2023, ktorý sa zamerali na štyri odrody slnečnice, kultivované v hydroponii štyri týždne. Následne ich vystavili 0, 50 a 100 μM CdCl₂ po dobu 15 dní. Výraznosť zafarbenia stresovaných odrôd stúpala so zvyšujúcou sa koncentráciou kadmia v hydroponii. Odlišnosť zafarbenia pozorovali aj medzi odrodami navzájom. Najsilnejšie zafarbenie zachytili vo všetkých prípadoch pri koncentrácii 100 μM CdCl₂.

2.2 Stanovenie životaschopnosti buniek

Použitím Evansovej modrej sme dokázali identifikovať životaschopnosť buniek stanovením miery ich poškodenia. Usmrtenie rastlinných buniek je spôsobené poškodením ich membrán reaktívnymi formami kyslíka, čo umožňuje preniknutie farbiva do ich vnútra. Takýmto spôsobom sme stanovili jeho koncentráciu a namerané hodnoty absorbancí sme prepočítali dosadením do rovnice:

$$y = 0,002x - 0,057$$

Hodnoty znázornené v grafe 1 sú výsledkom priemeru troch biologických opakovaní. Vo vzorkách listov vystavených 3 mg/l CdCl₂ sme pozorovali nárast koncentrácie EB s časom. V kontrole koncentrácia EB počas prvých dvoch týždňov kolísala a tretí týždeň stúpala. V stresovaných rastlinách bola počas prvého týždňa v listoch nameraná koncentrácia EB 274,11 ng/g, v druhom týždni stúpala táto hodnota

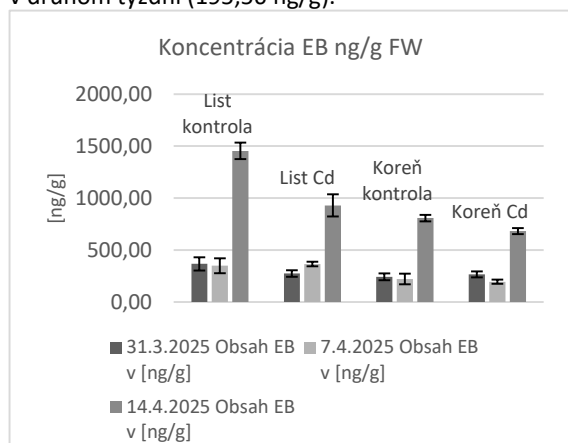
o 33,44 % a v treťom týždni stúpala o 239,28 %, tzn. že v prechode medzi druhým a tretím týždňom bol nárast o 154,25 %. Po porovnaní boli väčšie koncentrácie EB namerané v kontrole, s výnimkou druhého týždňa, kedy koncentrácia EB v kontrole mierne klesla a v porovnávannej vzorke mierne stúpala. Koncentrácia EB bola prvý týždeň v kontrole o 33,77 % vyššia v porovnaní s kadmiovou vzorkou. V druhom týždni došlo k poklesu koncentrácie EB v kontrole, kvôli čomu bola nameraná vyššia koncentrácia EB o 4,87 % vo vzorkách listov pestovaných v hydroponii s kadmiumom. Tretí týždeň stúpali namerané obsahy EB v kontrole aj stresovanej vzorke s Cd, pričom v kontrolnej vzorke bola koncentrácia EB o 56,42 % vyššia. Počas celého pokusu sme v listoch nepozorovali signifikantne významný rozdiel v nameraných obsahoch EB.

V kadmiumom stresovaných vzorkách listov slnečnice sme pozorovali očakávaný trend nárastu koncentrácie EB. V kontrole však došlo ku stagnácii vyšších hodnôt EB počas prvých dvoch týždňov a následnému prudkému nárastu počas tretieho týždňa, pričom koncentrácie EB boli väčšinu času vyššie ako v listoch kadmiumom stresovaných slnečnic. Za prudký nárast obsahov EB v kontrole, môže pravdepodobne rýchly rast slnečnic, s neskorým zapojením antioxidantných mechanizmov, čo spôsobilo vysoké koncentrácie ROS, ktoré znížili životaschopnosť buniek. Na druhú stranu, v stresovanej vzorke rastlín sme zaznamenali nižší vzrast. Ten môže byť pripísaný skorému spusteniu obranných mechanizmov proti toxicite ťažkých kovov, čomu nasvedčuje aj trend pomalého nárastu koncentrácie EB až do tretieho týždňa, kedy sa začala prejavovať nedostatočná funkcia obranných mechanizmov proti toxickým účinkom Cd.

Rozdiely medzi koncentraciami EB v kontrole a vzorkách koreňov vystavených 3 mg/l CdCl₂ boli v porovnaní s hodnotami nameranými v listoch nižšie. Obsahy EB v koreňoch kolísali v oboch vzorkách, kde podobne ako pri listoch sme pozorovali ich prudký nárast v treťom týždni. V stresovaných rastlinách bola počas prvého týždňa v koreňoch nameraná koncentrácia EB 265,89 ng/g, v druhom týždni klesla táto hodnota o 26,45 % a v treťom týždni stúpala o 156,62 %, tzn. že v prechode medzi druhým a tretím týždňom bol nárast o 248,91 %. Prvý týždeň bola koncentrácia EB v stresovanej vzorke o 9,67 % vyššia v porovnaní s kontrolou. Druhý a tretí týždeň boli vyššie obsahy namerané v kontrole. Druhý týždeň bola koncentrácia EB v stresovanej vzorke o 11,74 % a tretí týždeň o 15,48 % nižšia oproti kontrole. Počas celého

pokusu sme v koreňoch nepozorovali signifikantne významný rozdiel v nameraných obsahoch EB.

Slničnice vystavené 3 mg/l CdCl₂ mali v každom týždni vyššie koncentrácie EB v listoch oproti koreňom a to o 3,9 %, 87,04 % a 36,3 %, prvý, druhý a tretí týždeň v tomto poradí. Veľký rozdiel obsahov EB v druhom týždni je pravdepodobne spôsobený rýchlejšim spustením obranných mechanizmov v koreňoch, kvôli skoršiemu vystaveniu toxickým účinkom Cd. Tiež to môže byť spôsobené primárnym ukladaním kadmia v listoch, čo v nich spôsobilo väčšiu úmrtnosť. Vo všetkých prípadoch došlo k najväčšiemu poškodeniu buniek slnečnice v treťom týždni. Najvyššia nameraná koncentrácia EB bola v listoch kontrolných rastlín v treťom týždni (1454,67 ng/g) a najnižšia bola v koreňoch rastlín rastúcich v hydroponii s Cd v druhom týždni (195,56 ng/g).



Graf 1 Výsledné hodnoty koncentrácie EB v listoch a koreňoch v ng/g čerstvej hmotnosti kontrolných rastlín a rastlín rastúcich v hydroponii s 3 mg/l CdCl₂. Použité sú priemerné hodnoty z každého odberu v priebehu troch týždňov. V grafe sú znázornené chybové úsečky štandardnej chyby priemeru.

Bari et al. 2020 pozorovali detoxifikačné vlastnosti kremíku na rastlinách ryže. Vybraná vzorka rastlín bola kultivovaná v hydroponii s pridaným 10 μM CdSO₄. Vzorky listov a koreňov zafarbili Evansovou modrou. Stresované korene mali výrazne vyššiu koncentráciu EB v porovnaní s listami. Korene stresovaných rastlín mali o 10 % vyššiu koncentráciu EB v porovnaní s kontrolou. Listy stresovaných rastlín mali o 4 % vyššiu koncentráciu EB v porovnaní s kontrolou. Podobnosť s našimi výsledkami sme zaznamenali iba v koreňoch.

Lehotai et al. 2011 pozorovali vplyv rapidného stresu spôsobeného kadmim na koreňové meristémy hrachu. Vyklíčené semená umiestnili na 10 dní do hydroponie s Hoaglandovým roztokom. Rapidnu

stresovú reakciu spustili po desiatich dňoch pridaním 100 μM CdCl₂. Vzorky odoberali po 2, 24 a 48 hodinách. Vzorky zafarbili Evansovou modrou. Zaznamenali signifikantne významné rozdiely vo všetkých meraniach. Koncentrácia EB klesla po 24 hodinách a znovu stúpila po 48 hodinách.

2.3 Spektrofotometrické stanovenie obsahu H₂O₂

Na spektrofotometrické stanovenie H₂O₂ sme využili KI, ktorý s ním oxiduje za vzniku hnedého sfarbenia. Namerané hodnoty absorbancií sme vypočítali dosadením do rovnice:

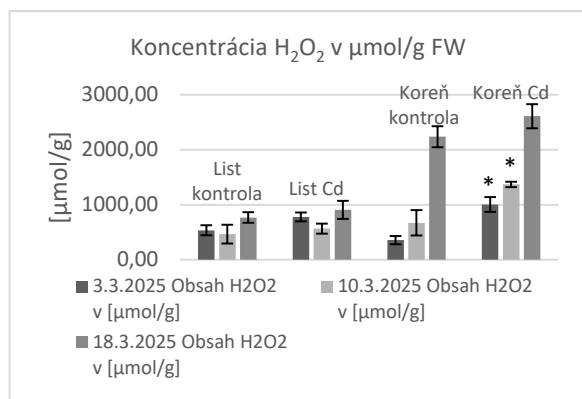
$$x = 1000y - 28$$

Hodnoty znázornené v grafe 2 sú výsledkom priemeru troch biologických opakovaní. Vo vzorkách listov vystavených 3 mg/l CdCl₂ sme pozorovali vyššiu koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s kontrolou počas všetkých troch týždňov. V obidvoch prípadoch boli najvyššie obsahy namerané počas tretieho týždňa. V stresovaných rastlinách bola počas prvého týždňa v listoch nameraná koncentrácia H₂O₂ 777,69 μmol/g, v druhom týždni klesla táto hodnota o 27,37 % a v treťom týždni stúpila o 16,52 %, tzn. že v prechode medzi druhým a tretím týždňom bol nárast o 60,42 %. Koncentrácia H₂O₂ v listoch rastlín rastúcich v hydroponii s kadmim, v porovnaní s kontrolou bola prvý, druhý a tretí týždeň vyššia o 31,12 %, 17,7 % a 15,28 % v uvedenom poradí. Znamená to, že najväčší rozdiel v nameraných obsahoch bol v prvom týždni, pričom v nasledujúcich týždňoch sa tento rozdiel znižoval. Tento jav je spôsobený primárne väčšími rozdielmi v koncentráciách H₂O₂ rastlín rastúcich v hydroponii s kadmim v rámci jednotlivých týždňov. Medzi nameranými koncentraciami H₂O₂ v listoch nebol pozorovaný signifikantný rozdiel v porovnaní s kontrolou.

Vo vzorkách koreňov vystavených 3 mg/l CdCl₂ sme pozorovali vyššiu koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s kontrolou počas všetkých troch týždňov. V obidvoch prípadoch boli najvyššie obsahy namerané v treťom týždni. V stresovaných rastlinách bola počas prvého týždňa v koreňoch nameraná koncentrácia H₂O₂ 1004,36 μmol/g, v druhom týždni stúpila táto hodnota o 36,25 % a v treťom týždni stúpila o 159,79 %, tzn. že v prechode medzi druhým a tretím týždňom bol nárast o 90,67 %. Koncentrácia H₂O₂ v koreňoch rastlín rastúcich v hydroponii s kadmim, v porovnaní s kontrolou, bola prvý, druhý a tretí týždeň vyššia o 182,41 %, 103,93 % a 16,68 % v uvedenom poradí. Podobne ako pri listoch, aj v koreňoch bol najväčší rozdiel v nameraných obsahoch v prvom týždni.

Nasledujúci trend poklesu tohto rozdielu bol v koreňoch viac výrazný ako pri listoch. V tomto prípade za to primárne môžu prudké zmeny koncentrácie H₂O₂ stresovaných rastlín a to hlavne v treťom týždni. V prvom a druhom týždni sme zaznamenali signifikantný rozdiel v koncentrácii H₂O₂ v porovnaní s kontrolou ($p < 0,05$). Môžeme usúdiť, že počas prvých dvoch týždňov, nie sú slnečnice rastúce v hydroponii s 3 mg/l CdCl₂ schopné efektívne sa zbavovať peroxidu vodíka z koreňov.

Rastliny rastúce v hydroponii s 3 mg/l CdCl₂ mali vyššiu koncentrácie H₂O₂ v koreňoch oproti listom o 22,57 %, 58,72 % a 65,27 %, v prvom, druhom a treťom týždni v uvedenom poradí. Tento rozdiel je spôsobený kolísaním koncentrácie H₂O₂ v listoch, oproti jeho priamoúmernému nárastu v koreňoch. Môže to byť spôsobené tým, že stresované rastliny čiastočne blokujú transport Cd z koreňa do listov. Najvyššia koncentrácia H₂O₂ v stresovaných rastlinách bola nameraná v treťom týždni v koreňoch stresovaných slnečnic (2609,23 $\mu\text{mol/g}$) a najnižšia koncentrácia bola nameraná v prvom týždni v kontrolných koreňoch (355,64 $\mu\text{mol/g}$).



Graf 2 Výsledné hodnoty koncentrácie H₂O₂ v listoch a koreňoch v $\mu\text{mol/g}$ čerstvej hmotnosti kontrolných rastlín a rastlín rastúcich v hydroponii s 3 mg/l CdCl₂. Použité sú priemerné hodnoty z každého odberu v priebehu troch týždňov. V grafe sú znázornené chybové úsečky štandardnej chyby priemeru a významnosť pri $p < 0,05$ (*) v rámci jednofaktorovej ANOVA.

Bari et al. 2020 pozorovali detoxifikačné vlastnosti kremíku na rastlinách ryže. Vybraná vzorka rastlín bola hydroponii s pridaným 10 μM CdSO₄. Stresované korene mali vyššiu koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s listami. Korene stresovaných rastlín mali o 8 % vyššiu

koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s kontrolou. Listy stresovaných rastlín mali o 6 % vyššiu koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s kontrolou.

Lehotai et al. 2011 pozorovali vplyv rapidného stresu spôsobeného kadmiiom na koreňové meristémy hrachu. Vyklíčené semená umiestnili na 10 dní do hydroponie s Hoaglandovým roztokom. Rapídnu stresovú reakciu spustili po desiatich dňoch pridaním 100 μM CdCl₂. Vzorky odoberali po 2, 24 a 48 hodinách. Koncentrácia H₂O₂ narastala s časom a po 24 a 48 hodinách zaznamenali signifikantne významný rozdiel.

Ef et al. 2015 pozorovali vplyv arbuskulárnej mykorízy na stres spôsobený kadmiiom v slnečnici. Sterilizované, naklíčené semená zasadili do substrátu pozostávajúceho z: rašeliny, perlitu a piesku (1:1:1). Slnečnice zavlažovali 2 týždne Hoaglandovým roztokom a následne pridávali Hoagland so 100 μM CdCl₂ každé 2 dni. Rapídne stresované korene mali o 56,34 % vyššiu koncentráciu H₂O₂ v porovnaní s kontrolou. V našom prípade sme v stresovaných koreňoch zaznamenali po týždni koncentráciu H₂O₂ nižšiu o 63,81 % v porovnaní s kontrolou. Tento rozdiel môže byť spôsobený odlišným spôsobom kultivácie. V hydroponickom prostredí sa kadmium dostáva ľahšie do listov a má menší negatívny vplyv na korene.

2.4 Korelácia

Tabuľka 2 Korelačné koeficienty (r) medzi obsahom EB a H₂O₂ v listoch

Listy	Korelácia (r)
1. týždeň	-0,860
2. týždeň	0,886
3. týždeň	0,614

Takto interpretovaným výsledkom nasvedčujú aj korelačné koeficienty v listoch. Zaznamenali sme silnú negatívnu väzbu medzi týmito parametrami vo vzorkách odobraných po prvom týždni experimentu. Životaschopnosť buniek bola v tomto prípade stále vysoká aj napriek stúpajúcej koncentrácii H₂O₂. V druhom týždni sme zaznamenali silnú pozitívnu väzbu. Životaschopnosť buniek klesala s nárastom H₂O₂ ako reaktívnej formy kyslíka, ktorá poškodila membrány a DNA bunky, čím zapríčinila ich smrť. Tretí týždeň korelácia poklesla, čo spôsobili nízke hodnoty H₂O₂ v listoch. Aj napriek tomu však naďalej klesala životaschopnosť buniek. Namerané obsahy EB v stresovaných slnečniciach neboli vyššie ako v kontrole a preto nemôžeme konštatovať, že by sa jednalo o nadmernú úmrtnosť buniek (Tabuľka 2).

Tabuľka 3 Korelačné koeficienty (r) medzi obsahom EB a H₂O₂ v koreňoch

Korene	Korelácia (r)
1. týždeň	-0,976
2. týždeň	-0,329
3. týždeň	0,272

Korelačné koeficienty v koreňoch nevypovedajú o vplyve H₂O₂ na životaschopnosť buniek. Silná negatívna väzba medzi týmito hodnotami bola pozorovaná jedine v prvom týždni. Podobne ako pri listoch to vypovedá o vysokej životaschopnosti buniek aj napriek nárastu H₂O₂. Slniečnice pravdepodobne zachytávajú kadmium v koreňoch, ktorých bunky sú schopné sa adaptovať na vysoký obsah ťažkých kovov v pôde a znížiť ich príjem do vnútra bunky (Tabuľka 3).

Záver

Zamorením pôd ťažkými kovmi dochádza k úbytku plochy vhodnej pre pestovanie rastlín. Riešením je dekontaminácia alebo selekcia vhodných odrôd. Hlavný vplyv kadmia na rastliny je vznik oxidačného stresu. Toho sa môže rastlina zbaviť enzymatickými alebo neenzymatickými antioxidantami. Existuje mnoho mechanizmov, ktoré rastliny využívajú na zmiernenie škodlivého vplyvu ťažkých kovov. Ide o rôzne formy vylučovania, zneškodňovania a ukladania mimo výhonkov. Našou prácou sme sledovali pôsobenie stresu vyvolaného kadmiumom na korene a listy slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) v priebehu troch týždňov. Spektrofotometricky sme stanovili životaschopnosť buniek a koncentráciu H₂O₂. Tiež sme vykonali lokalizáciu H₂O₂ *in situ* v listoch. Táto práca by mala objasniť zmeny vplyvu oxidačného stresu na životaschopnosť buniek v priebehu troch týždňov a možné korelácie medzi nimi.

Výsledky naznačujú zvýšenie oxidačného stresu v slnečnici, bez vplyvu na životaschopnosť buniek. Namerané množstvá H₂O₂ v koreňoch podporili tento trend, so štatisticky významným rozdielom počas prvých dvoch týždňov. Nasvedčuje to ukladaniu kadmia v koreňoch. Vzhľadom na absenciu štatisticky významného rozdielu pri meraní koncentrácie EB, môžeme usúdiť, že kadmium nemá výrazný vplyv na životaschopnosť buniek slnečnice. Výsledky *in situ* lokalizácie H₂O₂ nasvedčujú tomu, že slnečnice transportujú a ukladajú malé množstvá kadmia aj v listoch. Tmavšie zafarbenie je pozorovateľné v bazálnej a apikálnej oblasti listovej čepele.

Analýzou korelácie medzi obsahom H₂O₂ a EB sme potvrdili vplyv H₂O₂ na životaschopnosť buniek

v listoch, predovšetkým počas prvých dvoch týždňov. Pri koreňoch sme nezaznamenali taký výrazný vplyv H₂O₂ na životaschopnosť buniek, negatívna závislosť sa potvrdila len v prvom týždni.

Poďakovanie

Rád by som poďakoval môjmu školiteľovi doc. RNDr. Romanovi Kunovi, PhD. za pripomienky k práci, odborné vedenie, konzultácie a za všetok venovaný čas a trpezlivosť.

Použitá literatúra

- [1] HUSSAIN, B. – ASHRAF, M.N. – ABBAS, A. – LI, J. – FAROOQ, M. 2021. Cadmium stress in paddy fields: effects of soil conditions and remediation strategies. In *Science of the Total Environment*, vol. 754, pp. 142188. ISSN 0048-9697.
- [2] JALI, P. – PRADHAN, C. – DAS, A.B. 2016. Effects of cadmium toxicity in plants: a review article. In *Scholar Academic Journal of Biosciences*, vol. 4, no. 12, pp. 1074–1081. ISSN 2321-6883.
- [3] TRAN, T.A. – POPOVA, L.P. 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. In *Turkish Journal of Botany*, vol. 37, no. 1, pp. 1–13. ISSN 1300-008X.
- [4] ZHANG, F. – LIU, M. – LI, Y. – CHE, Y. – XIAO, Y. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, biochar and cadmium on the yield and element uptake of *Medicago sativa*. In *Science of the Total Environment*, vol. 655, pp. 1150–1158. ISSN 0048-9697.
- [5] KUBIER, A. – WILKIN, R.T. – PICHLER, T. 2019. Cadmium in soils and groundwater: a review. In *Applied Geochemistry*, vol. 108, pp. 104388. ISSN 0883-2927.
- [6] ZULFIQAR, U. – FAROOQ, M. – HUSSAIN, S. – MAQSOOD, M. – HUSSAIN, M. – ISHFAQ, M. – AHMAD, M. – ANJUM, M.Z. 2019. Lead toxicity in plants: impacts and remediation. In *Journal of Environmental Management*, vol. 250, pp. 109557. ISSN 0301-4797.
- [7] HERMANS, C. – CHEN, J. – COPPENS, F. – INZÉ, D. – VERBRUGGEN, N. 2011. Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure. In *New Phytologist*, vol. 192, pp. 428–439. ISSN 0028-646X.
- [8] GALLEGU, S.M. – PEÑA, L.B. – BARCIA, R.A. – AZPILICUETA, C.E. – IANNONE, M.F. – ROSALES, E.P. – ZAWOZNIK, M.S. – GROPPA, M.D. – BENAVIDES, M.P. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into

- regulatory mechanisms. In *Environmental and Experimental Botany*, vol. 83, pp. 33–44. ISSN 0098-8472.
- [9] RIZWAN, M. – ALI, S. – ABBAS, T. – ZIA-UR-REHMAN, M. – HANNAN, F. – KELLER, C. – AL-WABEL, M.I. – OK, Y.S. 2016. Cadmium minimization in wheat: a critical review. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 130, pp. 43–53. ISSN 0147-6513.
- [10] ABBAS, T. – RIZWAN, M. – ALI, S. – ADREES, M. – ZIA-UR-REHMAN, M. – QAYYUM, M.F. – OK, Y.S. – MURTAZA, G. 2017. Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil. In *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, pp. 25668–25680. ISSN 0944-1344.
- [11] NAZAR, R. – IQBAL, N. – MASOOD, A. – KHAN, M.I.R. – SYEED, S. – KHAN, N.A. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. In *American Journal of Plant Science*, vol. 3, pp. 1476–1489. ISSN 2158-2742.
- [12] HOAGLAND, D.R. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. In *California Agricultural Experiment Station*, no. 347, p. 1.
- [13] KUMAR, D. – YUSUF, M. A. – SINGH, P. – SARDAR, M. – SARIN, N. B. 2014. Histochemical detection of superoxide and H₂O₂ accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *Bio-protocol*, 4(8), e1108-e1108.
- [14] BORGULOVÁ, V. 2024. Anatomické a fyziologické aspekty v odpovedi rastlín na abiotický stres. Nitra: UKF, 87 s.
- [15] PETRÍKOVÁ, K. 2023. Hodnotenie fyziologických zmien na rastlinách snečnice vystavených abiotickému stresu. Diplomová práca. Nitra: UKF, 71 s.

Vývin *Phyllium letiranti*, Cumming, Teemsma, 2018 v podmienkach chovu insektária

Development of *Phyllium letiranti*, Cumming, Teemsma 2018 under Insectarium Rearing Conditions

Adriana Mikulová¹ – Vladimír Langraf¹

¹ Katedra zoológie a antropológie, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra,

¹ adriana.duricova@student.ukf.sk, ²vlangraf@ukf.sk

Abstrakt

Teplota a vlhkosť vplýva na životný cyklus, liahnutie a príjem potravy *Phyllium letiranti*. Výskum prebiehal v domácich podmienkach na 75 jedincoch v 5 insektáriách s rozdielnou teplotou a vlhkosťou. Dáta boli získané meraním teploty a vlhkosti. Kruskal-Wallisovým testom sme potvrdili signifikantný rozdiel ($p = 0.0000006$) v počte prírastkov. Najväčší počet bol v insektáriu s vyššou teplotou, menší v insektáriách s normálnou teplotou a vyššou vlhkosťou, najmenší počet v insektáriách s nižšou teplotou a vlhkosťou. Algoritmom KNN sme predikovali vývoj prírastkov. Model KNN rozdelil insektária na základe teploty s presnosťou na 79 %. Predikovaný bol aj vývoj prírastkov na základe vlhkosti, kde KNN model dosiahol 64 %. Polynomiálnou regresiou sme zistili závislosť medzi optimálnou teplotou a vlhkosťou, ktorá ovplyvňuje životný cyklus. Optimálna teplota je podľa modelu 23 – 26 °C a nárast jedincov je aj pri 30 °C (stredne silná väzba, $R^2=0,65$). Optimálna vlhkosť je 63 – 75 % a nárast je aj pri 85 % (silná väzba, $R^2=0,79$ %). Výsledky poskytujú chovateľom cenné informácie, môžu prispieť k optimalizácii chovu v zariadeniach, zoológických záhradách a viváriách.

Kľúčové slová: Phylliidae, insektárium, teráriový chov, teplota, vlhkosť

Abstract

Temperature and humidity influence the life cycle, hatching, and feeding behavior of *Phyllium letiranti*. This study was conducted under controlled domestic conditions on 75 individuals across five insectariums with varying temperature and humidity levels. Environmental data were collected through direct measurements of temperature and humidity. A Kruskal-Wallis test revealed a significant difference ($p = 0.0000006$) in the number of observed increments. The highest number of increments occurred in the insectarium with elevated temperature, a moderate number in insectariums with normal temperature and higher humidity, and the lowest number in insectariums with lower temperature and humidity. A K-Nearest Neighbors (KNN) algorithm was employed to predict increment development. The model

successfully classified insectariums based on temperature with 79% accuracy. Predictions based on humidity achieved 64% accuracy. Polynomial regression analysis identified the relationship between optimal temperature and humidity and their effects on the life cycle. The model indicated an optimal temperature range of 23–26 °C, with moderate population increases also observed at 30 °C (moderate correlation, $R^2 = 0.65$). Optimal humidity ranged from 63–75%, with strong increases even at 85% (strong correlation, $R^2 = 0.79$). These findings provide valuable insights for breeders and can inform the optimization of rearing conditions in facilities, zoos, and vivariums.

Key Words: Phylliidae, insectarium, terrarium breeding, temperature, humidity

Úvod

Listovky, ktoré sa často v publikáciách označujú ako „leaf insects“ sú príbuzné s paličkovým hmyzom, inak nazývaným aj „stick insects“ a pochádzajú z rovnakého radu Phasmatodea [1]. Sú to herbivorné živočíchy [2] a primárne vynikajú svojou schopnosťou maskovania sa vo vegetácii, ktorá im umožňuje efektívne splyvať s prostredím, pričom táto schopnosť predstavuje jednu z ich najvýznamnejších črt [3].

Životný cyklus hmyzu radu Phasmatodea pozostáva z troch štádií: vajíčko, nymfa a dospelý jedinec. Trvanie jednotlivých štádií môže byť ovplyvnené faktormi, ako sú teplota, vlhkosť, alebo dostupnosť potravy [4].

Pri chove listoviek je teplota významným faktorom. V našich podmienkach by mali byť tropické druhy hmyzu držané výhradne v interiéri v teplých miestnostiach. Je dôležité vyhnúť sa umiestneniu insektária na príliš teplé alebo slnečné miesto, pretože príliš vysoká teplota môže spôsobiť ich úhyn. Pre mnoho druhov hmyzu z radu Phasmatodea je všeobecne ideálna teplota 21 - 27 °C [5] v kombinácii s vlhkosťou približne 60 – 80 % [6].

Teplota reguluje kľúčové fyziologické vlastnosti hmyzu, ako je dýchanie, metabolizmus, rast, prežívanie, alebo správanie, pričom teplotný stres zvyšuje riziko úhynu [7]. Vyššia teplota všeobecne urýchľuje vývoj, avšak skracuje životnosť [8]. Nižšie teploty zase môžu zabrániť hmyzu dokončiť vývoj a tým

zvyšujú mortalitu. Obidve extrémne podmienky sú pre prežitie škodlivé [9]. V niektorých prípadoch môže zmena teploty a vlhkosti spôsobiť zmenu farby tela. Pigmentové granuly v epiderme sa počas chladných dní rozptyľujú, čím umožňujú absorbovať viac tepla [10]. Dlhodobé pôsobenie vysokej teploty a vlhkosti na hmyz môže mať negatívne následky nie len kvôli urýchleniu metabolizmu, ale aj z dôvodu zvýšeného výskytu ochorení, ktoré môžu zapríčiniť ich predčasný úhyn [11].

Okrem teploty a vlhkosti môže mať na životný cyklus listoviek vplyv aj spôsob ich rozmnožovania. Pri partenogenetickom spôsobe rozmnožovania nedochádza ku genetickému kríženiu a dochádza k vzniku uniformných generácií, čo môže mať negatívne dopady pri zmene podmienok prostredia [12].

Naším cieľom bolo zistiť vplyv teploty a vlhkosti na druh listovky *Phyllium letiranti*. Zisťovali sme vplyv týchto podmienok na rozmnožovanie dospelých samíc, zároveň ich vplyv na liahnutie a vývin juvenilných jedincov.

1 Metodika a materiál

Výskum bol realizovaný od začiatku decembra 2024 do polovice novembra 2025. Dáta použité vo výskume sme získali z piatich výskumných insektárií. Tieto výskumné insektária boli umiestnené v dvoch izbách v dome so stálou teplotou a vlhkosťou. V insektáriách sme udržiavali rozdielne podmienky. V insektáriu 1 sme udržiavali optimálnu teplotu 22 – 26 °C a vlhkosť 60 – 70 %, v insektáriu 2 sme udržiavali vyššiu teplotu 29 – 32 °C a optimálnu vlhkosť 60 – 70 %, v insektáriu 3 sme udržiavali nižšiu teplotu 22 – 26 °C a optimálnu vlhkosť 60 – 70 %, v insektáriu 4 sme udržiavali optimálnu teplotu 22 – 26 °C a vyššiu vlhkosť 80 – 100 % a v insektáriu 5 sme udržiavali optimálnu teplotu 22– 26 °C a nižšiu vlhkosť 40 – 60 %.

Insektária boli zo skla s výškou 60 cm a s rovnakou plochou podstavu. V insektáriách bol umiestnený ako substrát lignocel, kokosová kôra a rašelinník. Vo všetkých insektáriách sa nachádzali teplomery a vlhkomery. V insektáriu č. 2 bol nainštalovaný tepelný zdroj (výhrevná 75 W žiarovka) pripojený na termostat na reguláciu tepelného zdroja pre udržanie žiadanych podmienok. Ako zdroj potravy bolo v každom insektáriu do nádob s vodou umiestnených po 5 konárov černíc s dĺžkou 50 cm s približne rovnakým počtom listov a rovnakou veľkosťou listovej plochy. Po skončení skúmaní jedincami sme tieto konáre vymenili a výmenu zapísali do databázy. Na začiatku výskumu sa v každom insektáriu nachádzalo 15 subadultných až adultných samíc *Phyllium letiranti* (Obrázok 1).



Obr. 1 Samice druhu *Phyllium letiranti*

Na začiatku výskumu pri plnom počte samíc bolo nutné konáriky meniť v insektáriu č. 2 (Obrázok 2) približne raz za 7 dní. V ostatných insektáriách sa konáriky menili len každé 2 až 3 týždne. Najdlhšie úseky medzi výmenami boli v insektáriu 3. Postupne sa čas medzi výmenami predlžoval kvôli úhynu jedincov. Vlhkosť sme sa snažili udržať v stanovenom rozpätí vo všetkých insektáriách. Pre udržanie vlhkosti sme v insektáriu č. 1 rosili vodou 1-krát denne, v insektáriu 2 až 2-krát denne, v insektáriu 3 sme rosili len 2-krát týždenne, v insektáriu 4 až 3-krát denne a v insektáriu 5 sme rosili 1-krát denne. Rosenie prebiehalo vždy až po odmeraní teploty a vlhkosti, aby nedošlo ku skresleniu výsledkov. Vo všetkých insektáriách sme sa počas výskumu snažili udržiavať stále podmienky. Hodnoty sme zaznamenávali 3-krát denne a zapisovali do databázy.



Obr. 2 Insektarium č. 2 s tepelným zdrojom

Prvé juvenilné jedince sa začali liahnuť približne 3 mesiace od začiatku výskumu. Novo vyliahnuté jedince boli pravidelne vyberané z insektárií každý deň. Prírastky sme následne zaznamenali do databázy.

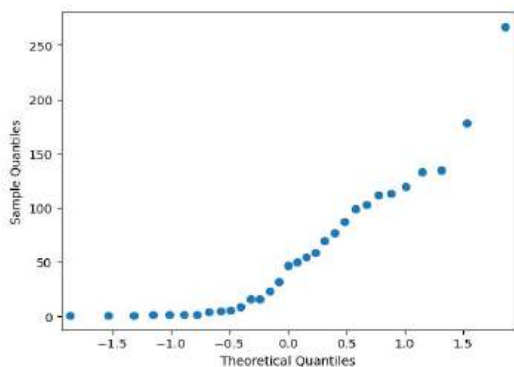
Štatistická analýza dát

Normalitu rozdelenia dát prírastkov jedincov sme testovali pomocou Shapiro-Wilkovho testu. Rozdiel v prírastkoch jedincov sme testovali Kruskal-Wallisovým testom. Polynomiálnou regresiou sme testovali silu väzby medzi prírastkami jedincov v závislosti od teploty a vlhkosti. Algoritmom K- nearest neighbour (KNN) (machine learning podoblasť AI) sme predpovedali vývoj prírastkov v závislosti od teploty a vlhkosti. Analýzy sme vykonali v jazyku Python verzie 3.12.

2 Výsledky a diskusia

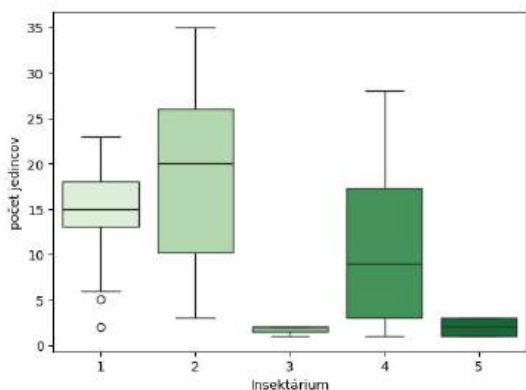
Analýza abundancie druhu *Phyllium letiranti*

Pomocou Shapiro-Wilkovho W testu sme testovali normalitu rozloženia dát počtu narodených jedincov. Zistili sme, že bola porušená ($p = 0.0004$).



Graf 1. Normalita rozloženia dát počtu narodených jedincov u druhu *Phyllium letiranti*

V dôsledku porušenia normality rozloženia dát sme použili neparametrický Kruskal-Wallisov test, ktorým sme potvrdili signifikantný rozdiel ($p = 0,0000006$) v počte vyliahnutých jedincov medzi insektáriami (1-5). Z výsledkov vidíme, že najviac vyliahnutých jedincov bolo v insektáriu 2, následne menší počet v insektáriu 1 a 4. Najmenší počet jedincov bol v insektáriu 3 a 5 (Graf 2).



Graf 2. Rozdiel v počte jedincov medzi insektáriami (1-5).

Vyššia teplota v insektáriu 2 spôsobila zrýchlenie vývinu embryí vajíčok listoviek, čo výrazne skrátilo dobu inkubácie. Preto sme zaznamenali najviac vyliahnutých jedincov práve v insektáriu 2. Insektárium 1 a 4 vytváralo optimálne podmienky, avšak normálna teplota v insektáriách neumožnila urýchlenie inkubácie vajíčok, ako tomu bolo v insektáriu 2. Zároveň, zvýšená vlhkosť v insektáriu 4 sťažovala vývin embryí kvôli výskytu plesní. V insektáriu 3 sme vytvorili extrémne podmienky vplyvom zníženia teploty a v insektáriu 5 vplyvom zníženia vlhkosti, čo signifikantne znížilo počet narodených jedincov v týchto dvoch insektáriách. Embryá sa z dôvodu nedostatočnej teploty vyvíjali pomaly a z dôvodu nedostatočnej vlhkosti sa nedokázali správne vyvinúť a prejsť procesom liahnutia.

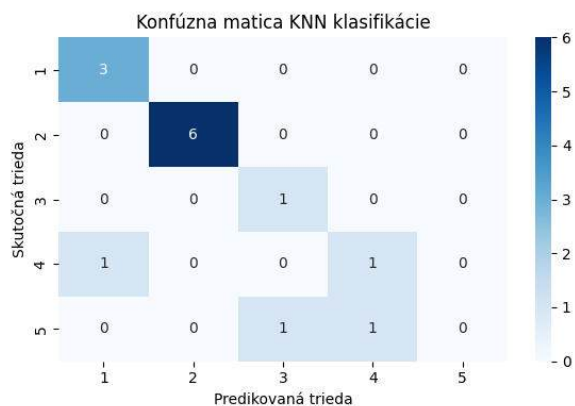
Druhy tropického hmyzu, ako je druh *Phyllium letiranti*, vykazujú značnú senzitivitu na environmentálne prostredie v jeho okolí [13]. Druh *Phyllium letiranti*, ktorý bol použitým skúmaným organizmom v našej práci skutočne výrazne ovplyvňuje teplota a vlhkosť. Avšak môžu existovať aj iné vplyvy prostredia, ktoré môžu mať tiež vplyv na tento druh, avšak neboli predmetom nášho skúmania. Jedným z takýchto faktorov by mohla byť degenerácia nových jedincov a zlyhanie ich liahnutia z dôvodu čisto partenogenetického rozmnožovania dospelých samíc, čo bolo už u niektorých druhov radu Phasmatodea dokázané ako významný faktor vplyvajúci na populáciu [21].

Teplota je primárnym faktorom, ktorý vplyva na rýchlosť inkubácie vajíčok listoviek rodu *Phyllium*. Pri teplote 20 – 24 °C sa dĺžka inkubácie vajíčok pohybuje od približne 4 do 5 mesiacov, čo je signifikantne dlhšie obdobie inkubácie, ako pri zvýšenej teplote, kedy sa inkubácia skraca [15]. To môžeme potvrdiť vysokým prírastkom mladých jedincov v insektáriu 2 so zvýšenou teplotou.

V prostredí s nižšou teplotou dochádza k spomaleniu vývinu v porovnaní s jedincami žijúcimi v podmienkach s vyššou teplotou prostredia [22]. Pri vysokej teplote sa listovkám zrýchľuje metabolizmus, čo má za následok urýchlenie ich starnutia a následnú smrť. Preto zvýšená teplota spôsobuje vyčerpanie a skrátenie životného cyklu. Príliš nízka teplota zase spôsobuje spomalenie metabolizmu a aj pohybu, čo listovkám predlžuje ich životný cyklus [15]. Adultné jedince žijú dlhšie v prostredí so zníženou teplotou [16]. Podľa našich výsledkov sa optimálna teplota prostredia pohybuje od 23 do 26 °C a v insektáriu so zníženou teplotou sme zaznamenali signifikantne nižšie prírastky jedincov v porovnaní s insektáriami s normálnou a zvýšenou teplotou. Zároveň ku výraznému nárastu jedincov dochádza pri teplote 30 °C, čo môže zase dokazovať to, že pri zvýšenej teplote dochádza k zvýšeniu metabolizmu a teda k urýchleniu inkubácie

embryí v insektáriu so zvýšenou teplotou.

Pomocou algoritmu K-nearest neighbour (KNN) bol predikovaný vývoj prírastkov jedincov medzi insektáriami (1-5) na základe teploty. Výkonnosť klasifikátora KNN zobrazujeme pomocou matice konfúznosti. Väčšina prípadov bola správne klasifikovaná do tried, čo dokazuje vysoký podiel hodnôt na diagonále matice (Graf 3).

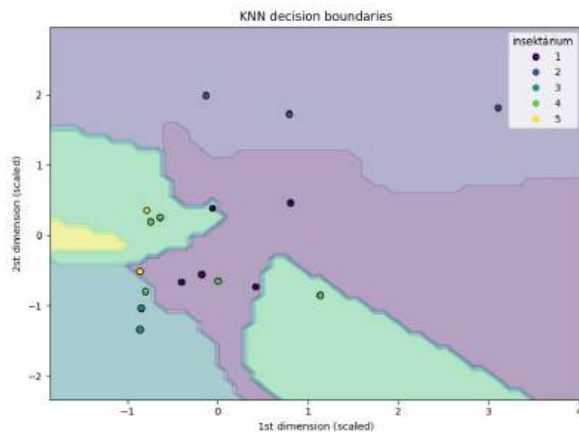


Graf 3. Konfúzna matica klasifikácie KNN so znázornením priradenia klasifikácie prípadov

Na základe týchto výsledkov sme vytvorili model KNN, ktorý rozdelil jednotlivé insektária (1-5) podľa prírastkov jedincov na základe teploty. Presnosť modelu dosiahla 79 %, čo znamená, že 79 % testovacích príkladov bolo modelom správne klasifikovaných. Väčšina predpovedí sa teda zhoduje so skutočnými triedami a predpoveď modelu o vývoji je správna. Vizualizácia výsledkov ukazuje, ako model rozdeľuje priestor podľa hodnôt počtu jedincov a teploty medzi insektáriami. Oblasti sú zafarbené podľa predpokladanej triedy. Body (škálované dáta) znázorňujú, kde sa v priestore nachádzajú tréningové dáta. Ak sa nachádzajú v správnej oblasti podľa farby, sú správne klasifikované. Zafarbené oblasti znázorňujú, ako model KNN predpovedá klasifikáciu priestoru podľa dvoch parametrov: počet jedincov a teploty.

Výsledky naznačujú, že pri určitých kombináciách teploty a počtu jedincov dochádza k vytváraniu rozsiahlych homogénnych oblastí (insektárium 2, 1), ktoré poukazujú na stabilné podmienky vývoja populácie, kde zmeny teploty alebo počtosti jedincov nemajú výrazný vplyv na klasifikovaný stav populácie. Naopak, v oblastiach, kde sa farebné prechody vyskytujú veľmi tesne pri sebe (insektárium 3,4), môžu predstavovať kritické hodnoty teploty alebo hustoty populácie, pri ktorých dochádza k významným zmenám vo vývoji jedincov. Prítomnosť menších izolovaných oblastí (insektárium 5) odlišných tried naznačuje existenciu špecifických podmienok, pri ktorých sa vývoj jedincov odlišuje od ostatných insektárií. Z biologického hľadiska môžu tieto javy

poukazovať na neštandardné reakcie jedincov na konkrétne teplotné podmienky alebo na vplyv interakcií medzi jedincami pri určitej hustote populácie (Graf 4).



Graf 4. Analýza KNN vyjadrujúca vývoj počtu jedincov v závislosti od teploty medzi insektáriami (1-5)

Algoritmom K-nearest neighbour (KNN) bol predikovaný vývoj prírastkov jedincov medzi Insektáriami (1-5) na základe vlhkosti. Výkonnosť klasifikátora KNN zobrazujeme pomocou matice konfúznosti. Väčšina prípadov bola správne klasifikovaná do tried, čo dokazuje vysoký podiel hodnôt na diagonále matice (Graf 5).

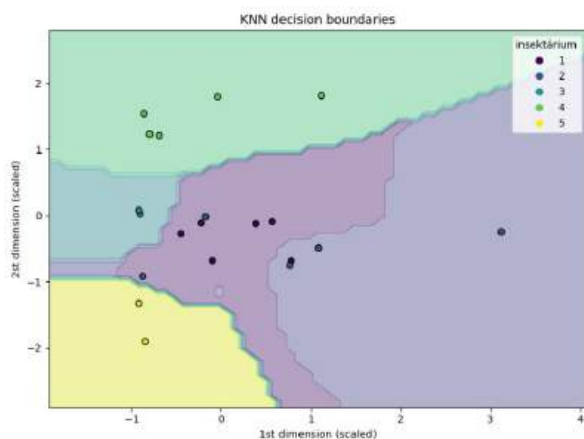


Graf 5. Konfúzna matica klasifikácie KNN so znázornením priradenia klasifikácie prípadov

Na základe týchto výsledkov sme vytvorili model KNN, ktorý rozdelil jednotlivé insektária (1-5) podľa prírastkov jedincov na základe vlhkosti. Presnosť modelu dosiahla 64 %, čo znamená, že 64% testovacích príkladov bolo modelom správne klasifikovaných. Väčšina predpovedí sa teda zhoduje so skutočnými triedami a predpoveď modelu o vývoji je správna.

Z grafu vyplýva, že pri vyšších hodnotách vlhkosti sa vytvára rozsiahla homogénna oblasť (insektárium 4), ktorá naznačuje, že vlhkosť má významný vplyv na

stabilizáciu vývojových podmienok populácie, pričom pri dostatočne vysokých hodnotách vlhkosti dochádza k relatívne konzistentnému správaniu populácie bez výrazných prechodov medzi jednotlivými triedami. Naopak, pri nižších hodnotách vlhkosti (insektárium 5) a menšom počte jedincov sú rozhodovacie hranice výrazne členitejšie, čo poukazuje na zvýšenú citlivosť vývoja jedincov na zmeny prostredia v týchto oblastiach. V centrálnych častiach grafu (insektárium 1, 2, 3), kde sa počet jedincov a vlhkosť nachádzajú v stredných hodnotách, dochádza k výraznému prekryvaniu tried. Táto skutočnosť naznačuje, že pri týchto podmienkach nie je možné jednoznačne určiť vývojový stav populácie len na základe sledovaných premenných, keďže podobné kombinácie vstupných hodnôt môžu viesť k odlišným vývojovým výsledkom (Graf 6).

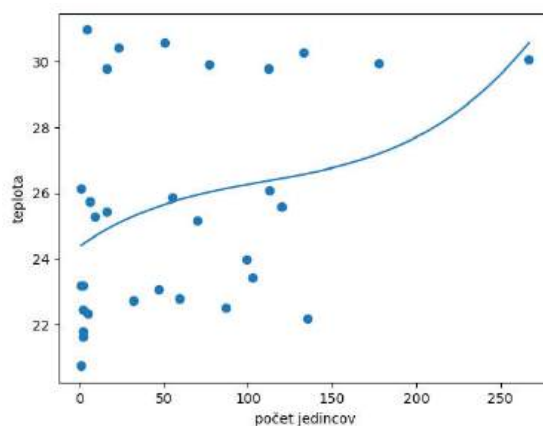


Graf 6. Analýza KNN vyjadrujúca vývoj počtu jedincov v závislosti od vlhkosti medzi insektáriami (1-5)

Vlhkosť má významný vplyv na prichytenie vajíčok listoviek v prostredí a celý mechanizmus adhézie povrchu vajíčok a jeho špecifických štruktúr. Keďže vlhkosť ovplyvňuje povrch vajíčok, môže vplývať na kvalitu inkubácie a plodnosť [17]. Vajíčka sú prispôbené na príľnutie k špecifickým povrchom a adhéznym mechanizmom sa aktivuje len v prostredí s dostatočnou vlhkosťou [2]. Vajíčka väčšiny druhov s povrchovými štruktúrami, ako má aj druh *Phyllium letiranti*, vyžadujú na svoj vývoj vysokú vlhkosť okolitého prostredia. Pozorovania získané z chovu v zajatí naznačujú, že vajíčka vyžadujú dostatočne vysokú vlhkosť okolitého prostredia na dokončenie embryonálneho vývoja a úspešné vyliahnutie mladých jedincov [18, 19].

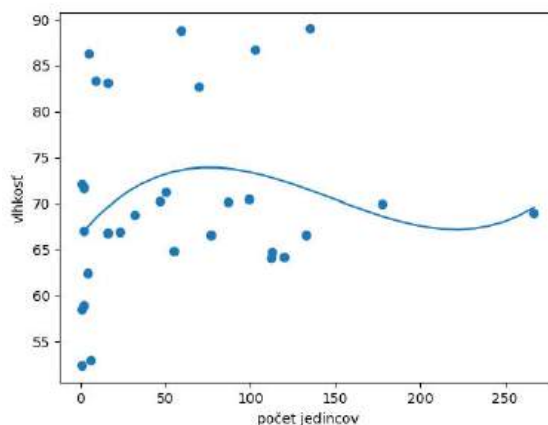
Polynomiálnou regresiou sme zistili závislosť medzi optimálnou teplotou a vlhkosťou, ktorá ovplyvňuje životný cyklus druhu *Phyllium letiranti*. Z modelu vyjadrujúceho závislosť počtu narodených jedincov od teploty vieme povedať že optimálna teplota pre *P. letiranti* je 23 – 26 °C avšak k výraznému nárastu jedincov dochádza aj pri 30 °C. Väzba teploty a počtu

jedincov je stredne silná $R^2 = 0,65$ (65 %) (Graf 7).



Graf 7. Model vyjadrujúci závislosť počtu narodených jedincov druhu *Phyllium letiranti* od teploty

Z modelu vyjadrujúceho závislosť počtu narodených jedincov od vlhkosti vieme povedať že optimálna vlhkosť pre *Phyllium letiranti* je 63 – 75 % avšak k výraznému nárastu jedincov dochádza aj pri 85 %. Väzba vlhkosti a počtu jedincov je silná $R^2 = 0,79$ (79 %) (Graf 8).



Graf 8. Model vyjadrujúci závislosť počtu narodených jedincov druhu *Phyllium letiranti* od vlhkosti

Zvýšený počet jedincov pri teplote 30 °C sme zaznamenali z dôvodu výrazného skrátenia inkubácie vajíčok a urýchlenia životného cyklu, pričom inak sú optimálne teplotné podmienky pre vývin juvenilných jedincov až o 4 – 7 °C nižšie. Zároveň sa zvýšená vlhkosť (85 %) ukazuje pri rozmnožovaní listoviek ako výhodná z niekoľkých dôvodov. Urýchľuje a uľahčuje liahnutie a zabraňuje vysušeniu embryí pri ich inkubácii. Avšak na základe našich pozorovaní a výsledkov je pre rozmnožovanie efektívnejšia nižšia vlhkosť (63 – 75 %), pri ktorej sa znižujú problémy s výskytom plesní, ktoré môžu spôsobiť zlyhanie vývinu embryí.

V našom výskume sme dospeli k záveru, že pri

zníženej vlhkosti sme zaznamenali signifikantne nižšie prírastky jedincov ako pri vyššej vlhkosti, čo potvrdzuje aj záver, že optimálna vlhkosť sa pohybuje od 63 do 75 %. Avšak dospeli sme aj k záveru, že k výraznému nárastu jedincov dochádza aj pri 85 %. Bežne sa udržuje vlhkosť prostredia v insektáriách na úrovni približne 65–70 % [20].

Záver

Cieľom práce bolo zistiť, aký vplyv má teplota a vlhkosť na druh *Phyllium letiranti* v podmienkach chovu v insektáriách. Výskum trval od decembra 2024 do novembra 2025. Dáta sme získali z 5 výskumných insektárií. Kruskal-Wallisovým testom sme potvrdili signifikantný rozdiel ($p = 0.0000006$) v počte vyliahnutých jedincov medzi insektáriami. Najväčší počet bol v insektáriu s vyššou teplotou, menší v insektáriách s normálnou teplotou a vyššou vlhkosťou, najmenší počet v insektáriách s nižšou teplotou a vlhkosťou.

Algoritmom KNN sme predikovali vývoj prírastkov medzi insektáriami na základe teploty. Presnosť modelu dosiahla 79 %. Algoritmom KNN bol predikovaný aj vývoj prírastkov jedincov medzi insektáriami na základe vlhkosti. Presnosť modelu dosiahla 64 %, takže predpoveď modelu o vývoji bola správna. Vlhkosť má významný vplyv na stabilizáciu vývojových podmienok populácie, pričom pri dostatočne vysokých hodnotách dochádza k relatívne konzistentnému správaniu populácie. Pri nižšej vlhkosti a menšom počte jedincov sú rozhodovacie hranice členitejšie, čo poukazuje na zvýšenú citlivosť vývoja jedincov na zmeny prostredia. V stredných hodnotách dochádza k výraznému prekryvaniu tried, čo naznačuje, že pri týchto podmienkach nie je možné jednoznačne určiť vývojový stav populácie len na základe sledovaných premenných.

Polynomiálnou regresiou sme zistili závislosť medzi optimálnou teplotou a vlhkosťou, ktorá ovplyvňuje životný cyklus *Phyllium letiranti*. Z modelu vyplýva, že optimálna teplota je 23 – 26 °C, avšak k výraznému nárastu jedincov dochádza aj pri 30 °C. Väzba teploty a počtu jedincov je stredne silná ($R^2=0,65$). Optimálna vlhkosť je 63 – 75 %, avšak k výraznému nárastu jedincov dochádza aj pri 85 %. Väzba vlhkosti a počtu jedincov je silná ($R^2=0,79$).

Výsledky tejto štúdie poskytujú chovateľom listoviek druhu *Phyllium letiranti* cenné informácie o ich chove v rôznych typoch podmienok. Zároveň naša práca môže prispieť k optimalizácii chovu listovitého hmyzu na vyššej úrovni, a to v špecializovaných chovných zariadeniach, zoológických záhradách zaoberajúcich sa chovom tropického hmyzu, alebo vo viváriách. Výsledky tejto práce zároveň môžu byť prínosom do budúcnosti pre iné výskumy zaoberajúce sa podobnou tematikou chovu tropického hmyzu.

Podakovanie

This research was supported by the grants VEGA 1/0603/25 data integration (Big data) for spatial modeling of biodiversity in different ecosystem conditions, KEGA No. 010UKF-4/2025 data science for biology, and No. 037SPU-4/2024 data integrity in biological and ecological databases.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BRITANNICA. (2025). Leaf insect. Online. Date of update 2025-04-24. Available from: <https://www.britannica.com/animal/leaf-insect>. [viewed 2026-02-18].
- [2] Büscher TH et al., (2023). Leaves that walk and eggs that stick: comparative functional morphology and evolution of the adhesive system of leaf insect eggs (Phasmatodea: Phylliidae). Online. BMC Ecology and Evolution, vol. 23, 17, pp. 1-22. [Accessed 2026-02-21]. [10.1186/s12862-023-02119-9](https://doi.org/10.1186/s12862-023-02119-9) [viewed 2026-02-21].
- [3] Bank S, Cumming RT, Yunchang L, Henze K, Le Tirant S, Bradler S., (2021). A tree of leaves: Phylogeny and historical biogeography of the leaf insects (Phasmatodea: Phylliidae). Communications Biology, vol. 4, 932 pp. 1-932. [Accessed 2026-02-21]. [10.1038/s42003-021-02436-z](https://doi.org/10.1038/s42003-021-02436-z) [viewed 2026-02-21].
- [4] Goldberg, J., Bresseel, J. & Constant, J., (2019). Effect of temperature on egg development of the stick insect *Megacrania tsudai*. *Insects*, vol. 10, 3, p. 84. [Accessed 2026-02-21]. <https://www.mdpi.com/2075-4450/10/3/84> [viewed 2026-02-21].
- [5] BROCK, P. D., (2000). A Complete Guide to Breeding Stick and Leaf Insects. Kingdom: Havant, 64 p. ISBN: 1-85279-124-1.
- [6] TIME TO BREED. (2025). How to Breed Phasmids: A Complete Guide to Stick and Leaf Insects. Available at: <https://www.timetobreed.com/how-to-breed-phasmids-a-complete-guide-to-stick-and-leaf-insects/> [viewed 2026-02-22].
- [7] Harvey, J.A. (2020). Climate change-mediated temperature extremes and insects: From outbreaks to breakdowns. *Global change biology*, vol. 26, 12, pp. 6685-6701. [Accessed 2026-02-22]. [Climate change-mediated temperature extremes and insects: From outbreaks to breakdowns - PubMed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34488888/) [viewed 2026-02-22].
- [8] Tamiru, A., Getu, E., Jembere, B. and Bruce, T.J.A., (2012). Effect of temperature and relative humidity on the development and fecundity of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae). *Bulletin of Entomological Research*, vol. 102, 1, pp. 9–15.

- [Accessed 2026-02-22]. Effect of temperature and relative humidity on the development and fecundity of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae) - PubMed [viewed 2026-02-22].
- [9] Skendžić, J., Zovko, M., Živković, I.P., Lešić, V. and Lemić, D., (2013). The effect of temperature and humidity changes on insects development and their impact on forest ecosystems under climate change, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 78, 2, pp. 103–107. [Accessed 2026-02-22]. Agriculturae Conspectus Scientificus, Vol. 78 No. 2, 2013. [viewed 2026-02-22].
- [10] North Carolina State University. (2015). Order Phasmatodea – ENT 425 – General Entomology. Available from: <https://genent.cals.ncsu.edu/insect-identification/order-phasmatodea/> [viewed 2026-02-22].
- [11] Min, D., Shin, S., Lee, N.-H., Baek, M.J., Park, S.-J., Kim, K.-H., Son, H. & Jung, J.-K., (2024). Survival dynamics of stick insect and the impact of environmental factors on natural fungal infection during the rainy season. *Frontiers in Microbiology*, vol. 15, 1383055. [Accessed 2026-02-22]. Frontiers | Survival dynamics of stick insect and the impact of environmental factors on natural fungal infection during the rainy season [viewed 2026-02-22].
- [12] SVERDRUP-THYGESON, A. (2020). Úžasný hmyz. Bratislava: Eastone Books. 198 s. ISBN 978-80-8109-391-3.
- [13] Deutsch C., A., Tewksbury J., J., Huey R., B., Sheldon K., S., Ghalambor C., K., Haak D., C. & Martin P., R., (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 6668-6672. [Accessed 2026-02-21]. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude - PubMed [viewed 2026-02-21].
- [14] Conle, O. et al., (2000). Phasmatodea. [Accessed 2026-02-21]. <https://www.phasmatodea.com/about-phasmatodea-com-team> [viewed 2026-02-21].
- [15] LANG, E., (2014). Stick insects, stick bugs and leaf insects as pets. USA: IMB Publishing, 116 p. ISBN 978-1-909151-92-5.
- [16] Souček, M., (2007). *Phyllium* sp. Online. Date of update 2007. Available from: *Phyllium* sp. (PSG278) [viewed 2026-02-22].
- [17] Büscher T., H., Quigley E., Gorb S., N., (2020). Adhesion performance in the eggs of the Philippine Leaf Insect *Phyllium philippicum* (Phasmatodea: Phylliidae). *Insects*, vol. 11, 7, pp. 1-400. [Accessed 2026-02-21]. <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/7/400> [viewed 2026-02-21].
- [18] GRÖßER, D., (2008). Wandelnde Blätter: Ein Katalog aller bisher beschriebenen Phylliinae-Arten. Frankfurt: Edition Chimaira, 175 p. ISBN 978-3-930612-46-8.
- [19] GRÖßER, D., (2013). Wandelnde Blätter: Biologie – Haltung – Zucht. Berlin: SungayaVerlag, 79 p. ISBN 978-3-943592-18-4.
- [20] Phasmatodea. (2025). *Phyllium letiranti* "Tataba". Online. Date of update 2025. Available from: <https://phasmatodea.com/phyllium-letiranti-tataba> [viewed 2026-02-22].
- [21] DELFOSSE, E. (1998). Fiche d'élevage simple : *Extatosoma tiaratum* (Macleay, 1826). Online. Available from: (PDF) Fiche d'élevage simple : *Extatosoma tiaratum* (Macleay, 1826) [viewed 2026-02-22].
- [22] Shelomi M., Zeuss D., (2017). Bergmann's and Allen's Rules in Native European and Mediterranean Phasmatodea. *Frontiers in Ecology and Evolution*, vol. 25, 5, pp. 1-13. [Accessed 2026-02-21]. Bergmann's and Allen's Rules in Native European and Mediterranean Phasmatodea | Semantic Scholar [viewed 2026-02-21].

SEKCIA

BIOTECHNOLÓGIE



1 0 1
1 1 1 1
1 1 1 0 1
1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1
1 1 1 0 1 0 1
1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 0 1
1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1

Vplyv extrahovadiel na antibakteriálnu aktivitu extraktov šalvie (*Salvia officinalis* L.) a mäty (*Mentha x piperita* L.)

The influence of solvents on the antibacterial activity of sage (*Salvia officinalis* L.) and mint (*Mentha x piperita* L.) extracts

Kristína Chudá¹ – Eva Ürgeová²

^{1,2}Ústav biológie a biotechnológie, Oddelenie biológie, FPV UCM v Trnave, Námestie Jozefa Herdu 577/2, 917 01 Trnava

¹ chuda7@ucm.sk, ² eva.urgeova@ucm.sk

Abstrakt

Vplyv extrahovadla podmieňuje výslednú antibakteriálnu aktivitu extraktov. Liečivé rastliny, ako šalvia a mäta, sú známe obsahom fenolových zlúčenín, flavonoidov a terpenoidov, ktoré zodpovedajú za ich antibakteriálnu aktivitu. Antibakteriálnu aktivitu extraktov sme stanovili proti baktériám *Micrococcus luteus* DSM 1790 a *Escherichia coli* CCM 3954 diskovou difúznou a mikrodilučnou metódou.

Výsledky diskovej difúznej metódy preukázali výrazne vyššiu antibakteriálnu aktivitu etanolových extraktov v porovnaní s vodnými. Najvyššiu inhibičnú zónu (25 mm) sme zaznamenali pri etanolovom extrakte šalvie proti *M. luteus*, pričom proti *E. coli* dosiahla 17 mm. Etanolový extrakt mäty vytvoril inhibičné zóny 15 mm proti oboj baktériám. Vodné extrakty nevykazovali inhibičnú aktivitu. Mikrodilučnou metódou sme stanovili minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) pri etanolovom extrakte šalvie (7,8 µl/ml pre *M. luteus* a 15,63 µl/ml pre *E. coli*). Etanolový extrakt mäty inhiboval rast oboch baktérií pri koncentrácii 125 µl/ml, zatiaľ čo vodné extrakty neinhibovali rast baktérií.

Kľúčové slová: antibakteriálna aktivita, extrahovadlá, rastlinné extrakty

Abstract

The influence of the extractant determines the resulting antibacterial activity of the extracts. Medicinal plants such as sage and mint are known to contain phenolic compounds, flavonoids and terpenoids, which are responsible for antibacterial activity. We determined the antibacterial activity of the extracts against bacteria *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* using the disc diffusion and microdilution methods.

The results of the disc diffusion method showed significantly higher antibacterial activity of ethanol

extracts compared to aqueous extracts. We recorded the highest inhibition zone (25 mm) for the ethanol extract of sage against *M. luteus*, while against *E. coli* it reached 17 mm. The ethanol extract of mint formed inhibition zones of 15 mm against both bacteria. Water extracts showed no inhibitory activity. Using the microdilution method, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) for sage ethanol extract (7.8 µl/ml for *M. luteus* and 15.63 µl/ml for *E. coli*). The ethanol extract of mint inhibited the growth of both bacteria at a concentration of 125 µl/ml, while the water extracts did not inhibit bacterial growth.

Key Words: antibacterial activity, solvents, plant extracts

Úvod

So zvyšujúcou sa antibiotickou rezistenciou narastá potreba hľadania nových antibakteriálnych látok. Liečivé rastliny produkujú široké spektrum bioaktívnych látok s antibakteriálnou aktivitou [1].

Šalvia lekárska (*Salvia officinalis* L.) patrí do čeľade hluchavkovité (Lamiaceae) a je to trváci nízky ker. Aplikuje sa na liečbu tráviacich porúch, bronchitídy, zápalov hrdla a ústnej dutiny. Obsahuje zložky ako kyselina rozmarínová, kyselina karnozová, eukalyptol, borneol, kyselinu chlorogénovú, flavonoidy a iné látky, ktoré preukázali pozitívny vplyv na ľudské zdravie a antibakteriálny účinok [2].

Mäta pieporná (*Mentha x piperita* L.) obsahuje mnoho zložiek rôzneho charakteru ako sú flavonoidy rutín, kvercetín, naringenín; kaempferol, hesperidín, fenolové kyseliny, rozmarínová alebo kávová, taktiež terpény mentol, mentón alebo eukalyptol, ktoré vykazujú nie len antibakteriálne a antifungálne účinky ale aj protizápalové, protirakovinové a antioxidačné účinky. Droga pomáha pri tráviacich ťažkostiach, nakoľko pozitívne vplyva na vylučovanie tráviacich žliaz a predovšetkým žlče. Mnohokrát sa využíva pri

zápaloch ústnej dutiny, bolesti zubov alebo na inhaláciu pri ochorení horných dýchacích ciest [3].

Biologická aktivita rastlinných extraktov je podmienená voľbou vhodného extrahovadla prípadne zmesí extrahovadiel pre izoláciu požadovaných látok na základe charakteru (polarity) bioaktívnych látok [4]. Polárne rozpúšťadlá, ako je metanol etanol alebo voda, sú zvyčajne používané na extrakciu polárnych sekundárnych metabolitov medzi, ktoré patria fenolové zlúčeniny ich glykozidy alebo flavonoidy. Spomínané zlúčeniny obsahujú vo svojej štruktúre polárne skupiny, ktoré interagujú s polárnymi rozpúšťadlami [5].

Nepolárne extrahovadlá sú hexán, chloroform, dichlórmetán alebo éter. Chloroform sa aplikuje na extrakciu nepolárnych metabolitov, najmä látok terpenoidného charakteru. Dietyléter je nepolárne rozpúšťadlo, ktoré sa používa na extrakciu terpenoidov, kumarínov alebo alkaloidov [6].

1 Materiál a metódy

1.1 Rastlinný materiál

Rastlinný materiál použitý v experimentálnej časti boli liečivé rastliny šalvia lekárska (*Salvia officinalis* L.) a mäta pieporná (*Mentha x piperita* L.).

Liečivé rastliny boli vypestované v domácom prostredí v poľných podmienkach. Po vypestovaní do požadovanej zrelosti sme listy šetrne pozbierali a nechali ich voľne vysušiť. Po usušení sme rastliny mechanicky pomleli na menšie časti.

1.2 Príprava extraktov

Navážili sme 2 g pomletých listov šalvie a mäty. Kvzorkám sme priliali 20 ml 96% etanolu alebo destilovanej vody. Extrakcia prebiehala v ultrazvukovom kúpeli 30 minút pri teplote 40 °C. Získané extrakty sme prefiltrovali a uchovali v chladničke pri 4 °C.

1.3 Bakteriálne kmene

Získané extrakty sme testovali na antibakteriálnu aktivitu proti gram-pozitívnej baktérii *Micrococcus luteus* DSM 1790 a gram-negatívnej baktérii *Escherichia coli* CCM 3954.

1.4 Disková difúzna metóda

Disková difúzna metóda je založená na difúzii antibakteriálneho činidla, ktorým je papierový disk a umiestnený na agárovej platni s naočkovaným inokulom [7]. Antibakteriálne činidlo radiálne difunduje

cez agar, pričom koncentrácia sa znižuje so vzdialenosťou od disku. Výsledkom je kruhová zóna okolo disku [8].

Na Mueller-Hintonovej agarové platne s priemerom 90 mm sme napipetovali 0,5 ml zriedenej nočnej bakteriálnej kultúry so zákalom 0,5 McFarlanda. Pomocou sterilnej plastovej hokejky sme kultúru rozotrelí po celom povrchu agarových platní. Kultúru sme nechali vsiaknuť a preschnúť po dobu 15-20 minút. Po uschnutí kultúry sme sterilnou pinzetou položili sterilné disky s priemerom 6 mm na platne. Na disky sme napipetovali 20 µl extraktu. Tento postup sme aplikovali v triplikáte a 2x pre každú baktériu a extrakty. Agarové platne s nasýtenými diskami sme vložili do termostatu na 24 hodín pri teplote 30 °C. Po uplynutí 24 hodín sme zmerali priemer vzniknutých inhibičných zón.

1.5 Mikrodilučná metóda

Mikrodilučná metóda predstavuje štandardizovanú *in vitro* techniku určenú na hodnotenie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky. Ide o presnú, ekonomicky nenáročnú a metodicky relatívne jednoduchú techniku, ktorá umožňuje spoľahlivé stanovenie účinnosti a efektivity testovaných antimikrobiálnych látok [9]. Pri realizácii mikrodilučnej metódy sa používa 96-jamková mikrotitračná platnička. Výsledkom analýzy je stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (Minimum Inhibitory Concentration, MIC), ktorá predstavuje najnižšiu koncentráciu antibakteriálnej látky schopnú inhibovať viditeľný rast testovaného mikroorganizmu. Výhodou použitia 96-jamkovej platničky je možnosť testovania širokého rozsahu koncentrácií v rámci jedného experimentu pri aplikácii minimálneho objemu kultivačného média, čo zvyšuje efektivitu [10].

Do 1. stĺpca sme napipetovali 100 µl zriedeného extraktu (500 µl/ml), kontrola sterility. Do 2. stĺpca 96-jamkovej mikropatničky bolo napipetovaných 200 µl extraktu nariadeného v Mueller-Hintonovej bujóne (500 µl/ml). Do stĺpca 3-12 sme pridali 100 µl bujónu. Následne sme vykonali riedenie extraktu prepipetovaním 100 µl z 2. stĺpca do 3. stĺpca. Z 3. stĺpca do 4. stĺpca. Takto sme nariedili extrakt až po 11. stĺpec.

Inokulum sme si pripravili z nočnej kultúry s výsledným zákalom 0,5 McFarlanda. Nariadenú nočnú kultúru sme napipetovali do 2.-12. stĺpca po 100 µl. Posledný stĺpec predstavuje kontrolu rastu testovaných mikroorganizmov.

Platničky sme inkubovali 24 hodín pri teplote 30 °C. Po 24 hodinách inkubácie sme do každej jamky pridali 30 µl 0,03 % roztoku 3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), Platničky sme inkubovali 1 hodinu pri teplote 37 °C. V jamkách, kde vzniklo fialové sfarbenie narástli testované baktérie, jamky, v ktorých sa farba nezmenila koncentrácia extraktov inhibovala rast testovaných baktérií. MIC predstavuje najnižšiu koncentráciu, pri ktorej nedošlo k zmene zafarbenia.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Disková difúzna metóda

Tabuľka 1. Výsledné inhibičné zóny šalviových a mäťových extraktov testovaných na baktériách *M. luteus* a *E. coli*.

Priemerné inhibičné zóny (mm)		
Liečivá rastlina	Baktérie	Etanol
Š. lekárska	<i>M. luteus</i>	25 ± 1,05
	<i>E. coli</i>	17 ± 1,55
M. pieporná	<i>M. luteus</i>	15 ± 0,84
	<i>E. coli</i>	15 ± 0,55

V Tabuľka 1. sú zaznamenané namerané hodnoty inhibičných zón antibakteriálnej aktivity extraktov šalvie lekárskej a mäty piepornej voči baktériám *M. luteus* a *E. coli*.

Etanolový extrakt šalvie vykazoval najvyššia antibakteriálnu aktivita, kde inhibičná zóna proti *M. luteus* dosiahla 25 mm a proti *E. coli* 17 mm. Vodné extrakty pri testovaných koncentráciách vykazovali nulovú antibakteriálnu aktivitu.

Mokhtari a kol. [11] testovali etanolový extrakt šalvie proti baktériám *Bacillus cereus*, *Escheria coli*, *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Najväčšiu inhibičnú zónu namerali pri testovanej baktérii *B. subtilis*, kedy dosiahla veľkosť 21,73 mm. Inhibičná zóna bola menšia v porovnaní s nami nameranou zónou, 25 mm pri *M. luteus*. Pre baktériu *E. coli* výsledná inhibičná zóna dosiahla hodnotu 16,76 mm, čo je približne rovnaké, ako inhibičná zóna nameraná v našom experimente (17 mm).

V štúdiu Bălăşoiu a kol. [12] testovali vodný a etanolový extrakty šalvie proti baktérii *E. coli*. Vodný extrakt, rovnako ako v našom prípade, nevykazoval antibakteriálnu aktivitu voči testovanej baktérii.

Etanolové extrakty mäty vykazovali inhibičnú aktivitu, kedy inhibičná zóna bola 15 mm proti oboj baktériám. Vodné extrakty mäty piepornej

nevykazovali žiadnu inhibičnú aktivitu voči testovaným baktériám.

Al-Hajri a kol. [13] testovali extrakty mäty pripravené rôznymi rozpúšťadlami. Metanolový extrakt vytvoril inhibičnú zónu 7 mm proti *E. coli*, pričom naše výsledky ukazujú, že etanolový extrakt vytvoril inhibičné zóny s veľkosťou 15 mm.

Murtaza a kol. [14] zistili, že vodný extrakt mäty pripravený za stáleho miešania pri teplote 33 °C, účinkoval proti patogénnej baktérii *E. coli*. Extrakt vytvoril inhibičnú zónu s veľkosťou 21 mm. Naš vodný extrakt na baktériu *E. coli* neúčinkoval.



Obrázok 1. Disková difúzna metóda – *M. luteus* a šalviové extrakty (1,2 – etanolový extrakt; 3, 4 – vodný extrakt, K-kontrola – 96% etanol)

2.2 Mikrodilučná metóda

Tabuľka 2. MIC etanolových a vodných extraktov šalvie a mäty testovaných proti *M. luteus* a *E. coli*.

Liečivé rastliny	Extrakty	Baktérie	MIC (µl/ml)
Š. lekárska	Etanol	<i>M. luteus</i>	7,8
		<i>E. coli</i>	15,63
M. pieporná	Etanol	<i>M. luteus</i>	125
		<i>E. coli</i>	125

V Tabuľke 2. sú zaznačené minimálne inhibičné koncentrácie extraktov šalvie a mäty proti testovanej gram-pozitívnej baktérii *M. luteus* a gram-negatívnej bktérii *E. coli*. Etanolový extrakt vykazoval najnižšiu inhibičnú koncentráciu 7,8 µl/ml proti baktérii *M. luteus*. Hodnoty MIC ukazujú, že etanolový extrakt šalvie inhiboval rast baktérie *E. coli* pri koncentrácii 15,63 µl/ml.

Ako v prípade diskovej difúznej metódy ani v mikrodilučnej metóde nebola potvrdená

antibakteriálna aktivita vodného extraktu šalvie pri testovaných koncentráciách.

Kramar a kol. [15] skúmali vo svojej štúdií antibakteriálnu aktivitu etanolového extraktu šalvie proti baktérii *S. aureus*. Zaznamenali minimálnu inhibičnú koncentráciu 120 µg/ml.

Vo svojej práci Maliki a kol. [16] stanovovali minimálnu inhibičnú koncentráciu vodného extraktu šalvie, ktorý testovali proti gram-pozitívnej baktérii *S. aureus*. Minimálna inhibičná koncentrácia bola 250 µg/ml. Vodný extrakt šalvie, pripravený v našich experimentoch, nevykazoval antibakteriálnu aktivitu proti baktérii *M. luteus*.

Etanolový extrakt mäty spôsobil inhibíciu pri oboch testovaných baktériách v koncentrácií 125 µl/ml, čo je výrazne vyššia koncentrácia ako v prípade šalviového extraktu. Vodný extrakt mäty rovnako ako šalviový extrakt nevykazoval antibakteriálnu aktivitu.

Kramar a kol. [15] zisťovali minimálnu inhibičnú koncentráciu etanolového extraktu mäty voči gram-pozitívnej baktérii *S. aureus*. MIC bola 120 µg/ml.

Patel a kol. [17] testovali antimikrobiálnu aktivitu metanolového extraktu mäty, inhibícia rastu *E. coli* nastala pri koncentrácii 100 µg/ml.

Tourabi a kol. [18] testovali antibakteriálnu aktivitu etanolového a vodného extraktu mäty proti baktériám *E. coli* a *S. aureus*. MIC vodného extraktu bola voči *E. coli* bola 0,78 mg/ml proti *S. aureus* nezaznamenali. V prípade etanolového extraktu MIC proti *E. coli* nadobudla hodnotu 0,78 mg/ml a proti *S. aureus* 8 mg/ml.

Predpokladáme, že neúčinnosť vodných extraktov šalvie alebo mäty mohla byť spôsobená nerozpustnosťou terpenov vo vode, nakoľko sa lepšie rozpúšťajú v organických rozpúšťadlách.

Záver

Cieľom práce bolo zistiť ako výber extrahovadla ovplyvní antibakteriálnu aktivitu extraktov šalvie a mäty.

Výsledky diskovej difúznej metódy preukázali vyššiu aktivitu etanolových extraktov v porovnaní s vodnými extraktami. Najvyššiu inhibičnú zónu sme zaznamenali pri etanolovom extrakte šalvie testovanom proti *M. luteus* (25 mm), etanolový extrakt účinne inhiboval rast *E. coli*, pričom sme namerali inhibičnú zónu o veľkosti 17 mm. Etanolový extrakt mäty vykazoval nižšiu antibakteriálnu aktivitu v porovnaní so šalviovým extraktom. Zaznamenaná inhibičná zóna mala veľkosť 15 mm pre oba testované baktérie.

Mikrodilučnou metódou sme zaznamenali MIC etanolového extraktu šalvie s hodnotu 7,8 µl/ml pri baktérii *M. luteus*, v prípade *E. coli* hodnota MIC bola 15,63 µl/ml. Hodnota MIC etanolového extraktu mäty bola 125 µl/ml pre obe testované baktérie.

Vodné extrakty nevykazovali antibakteriálne účinky proti testovaným baktériám v oboch aplikovaných metódach.

Na základe výsledkov sme zistili, že etanol je účinnejšie extrakčné činidlo v porovnaní s vodou, čo sa odzrkadlilo v antibakteriálnej aktivite extraktov.

PodĎakovanie

Práca bola vypracovaná v rámci projektu APVV-24-0180.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ALLEMAILEM, Khaled S., (2021). Antimicrobial Potential of Naturally Occurring Bioactive Secondary Metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, roč. 13, č. 2, s. 155–162. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_753_20.
- [2] MENDES, Filipe Santos Ferreira; MATANOVICH GARCIA, Letícia; DA SILVA MORAES, Thais; ASSIRATI CASEMIRO, Luciana; BARBOSA DE ALCÂNTARA, Clauber; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo; SOLA VENEZIANI, Rodrigo Cássio; DANTAS MIRANDA, Mayker Lazaro; GOMES MARTINS, Carlos Henrique, (2020). Antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe*, roč. 63, s. 102194. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102194.
- [3] HUDZ, Nataliia; KOBLYANSKA, Lesya; POKAJEWICZ, Katarzyna; HORČINOVÁ SEDLÁČKOVÁ, Vladimira; FEDIN, Roman; VOLOSHYN, Mariia; MYSKIV, Iryna; BRINDZA, Ján; PAWEŁ WIECZOREK, Piotr; LIPOK, Jacek, (2023). *Mentha piperita: Essential Oil and Extracts, Their Biological Activities, and Perspectives on the Development of New Medicinal and Cosmetic Products. Molecules*, roč. 28, č. 21, s. 7444. DOI: 10.3390/molecules28217444.
- [4] USMAN, Ifrah; HUSSAIN, Muzzamal; ALI, Imran; AFZAAL, Muhammad; SAEED, Farhan; JAVED, Mehak; AFZAL, Atka; ASHFAQ, Iqra; AL JBAWI, Entessar; SAEWAN, Shamaail, (2022). Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. *International Journal of Food Properties*, roč. 25, č. 1, s. 1215–1233. DOI: 10.1080/10942912.2022.2074030.

- [5] DIRAR, Amina Ibrahim; ALSAADI, Doaa Husham Majeed; WADA, Mikiyo; MOHAMED, Magdi Awadalla; WATANABE, Takashi; DEVKOTA, Hari Prasad, (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, roč. 120, s. 261–267. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.07.003.
- [6] ABUBAKAR, Abdullahi R.; HAQUE, Mainul, (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, roč. 12, č. 1, s. 1–10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_175_1.
- [7] RIVERA, Alba; VIÑADO, Belén; BENITO, Natividad; DOCOBO-PÉREZ, Fernando; FERNÁNDEZ-CUENCA, Felipe, FERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, Javier; GUINEA, Jesús; LÓPEZ-NAVAS, Antonio; MORENO, Miguel Ángel; LARROSA, María Nieves; OLIVE, Antonio; NAVARRO, Ferran, (2023). Recommendations of the Spanish Antibiogram Committee (COESANT) for in vitro susceptibility testing of antimicrobial agents by disk diffusion. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, roč. 41, č. 9, s. 571–576. DOI: 10.1016/j.eimce.2022.12.009.
- [8] SYKES, Jane Emily a RANKIN Shelley C., (2014). Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria. In: Sykes, Jane Emily. *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier, s. 17–28. ISBN 978-1-4377-0795-3
- [9] EUCAST, (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, roč. 9, č. 8. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
- [10] ZHUANG, Qian; GUO, Huijun; PENG, Tian; DING, Enjie; ZHAO, Hui; LIU, Qiulan; HE, Shiyin; ZHAO, Guojie, (2023). Advances in the detection of β -lactamase: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 251, s. 1261259. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126159.
- [11] MOKHTARI, Raziye; KAZEMI FARD, Mohammad; REZAEI, Mansour; MOFTAKHARZADEH, Seyed Adel; MOHSENI, Amir, (2023). Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of Phenolic Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts. *Journal of Food Quality*, roč. 2023, č. 1, s. 1–9. DOI: 10.1155/2023/2602454
- [12] BĂLĂȘOIU, Roxana Maria; BIȚĂ, Andrei; STĂNCIULESCU, Elena Camelia; BĂLĂȘOIU, Maria; BEJENARU, Cornelia; BEJENARU, Ludovic Everard; PISOSCHI, Cătălina Gabriela, (2023). In vitro Antimicrobial Activity of Some Extracts of *Salvia* spp Harvested from the Oltenia Flora Using Different Solvents. *Current Health Sciences Journal*, roč. 49, č. 3, s. 397–402. DOI: 10.12865/CHSJ.49.03.12.
- [13] AL-HAJRI, Zahra Mohammed; HOSSAIN, Mohammad Amzad; AL-TOUBY, Salim Said, (2022). Composition analysis and antibacterial activity evaluation of different crude extracts of *Mentha piperita* (Lamiaceae). *International Journal of Secondary Metabolite*, roč. 9, č. 4, s. 387–396. DOI: 10.21448/ijsm.1079952
- [14] MURTAZA, Mian Anjum; ASHRAF, Sonia; MAHMOOD, Sammina; HAFIZ, Iram; REHMAN, Aziz Ur; HUSSAIN, Hafiz Iftikhar; ZAKRIA, Hafiz Muhammad; DILBAR, Ghulam Hussain, (2021). Antioxidant and Antibacterial Potential of Cinnamon Bark, Fennel Seeds and Peppermint Leaves. *Progress in Nutrition*, roč. 23, č. 4, s. e2021232. DOI: 10.23751/pn.v23i4.10701.
- [15] KRAMAR, Ana; PETROVIĆ, Marija; MIHAJLOVSKI, Katarina; MANDIĆ, Boris; VUKOVIĆ, Gorica; BLAGOJEVIĆ, Stevan; KOSTIĆ, Mirjana, (2021). Selected aromatic plants extracts as an antimicrobial and antioxidant finish for cellulose fabric - direct impregnation method. *Fibers and Polymers*, roč. 22, č. 6, s. 3317–3325. DOI: 10.1007/s12221-021-3007-1.
- [16] MALIKI, I.; EL MOUSSAOUI, A.; RAMDANI, M.; ELBADAOUI, K., (2021). Phytochemical screening and the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of aqueous extracts from the leaves of *Salvia officinalis* planted in Morocco. *Moroccan Journal of Chemistry*, roč. 9, č. 2, s. 354–368. DOI: 10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v9i2.24840.
- [17] PATEL, Disha; UPADHYE, Vijay; UPADHYAY, Tarun K.; RAMI, Esha; PANCHAL, Rakesh Kumar, (2021). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Mentha arvensis* L. [Pudina]: A Medicinal Plant. *Canadian Journal of Medicine*, roč. 3, č. 2, s. 67–76. DOI: 10.33844/cjm.2021.60506.
- [18] TOURABI, Meryem; FAIZ, Khaoula; EZZOUGGARI, Rachid; LOUASTÉ, Bouchra; MERZOUKI, Mohammed; DAUELBAIT, Musaab; BOURHIA, Mohammed; ALMAARY, Khalid S.; SIDDIQUE, Farhan; LYOUSSI, Badiia; DERWICH, Elhousseine,

(2025). Optimization of extraction process and solvent polarities to enhance the recovery of phytochemical compounds, nutritional content, and biofunctional properties of *Mentha longifolia* L. extracts. *Bioresources and Bioprocessing*, roč. 12, č. 1, s. 24. DOI: 10.1186/s40643-025-00859-8.

Inhibičný účinok vybraných esenciálnych olejov na *Candida glabrata*

Inhibitory effect of selected essential oils against *Candida glabrata*

Petra Janitorová – Libuša Lengyelová

Katedra botaniky a genetiky, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

petra.janitorova@student.ukf.sk, llengyelova@ukf.sk

Abstrakt

Táto práca sa zameriava na detekciu citlivosti patogénnej kvasinky *Candida glabrata* na vybrané esenciálne oleje. Experimentálna časť pozostáva z metód zisťovania citlivosti piatich kmeňov *C. glabrata* na päť vybraných esenciálnych olejov (EO): ajowan, borovica, klinček, oregano a tea tree. Boli použité metódy difúzny diskový test agarový a vzdušný a mikrodilučný test. Na základe štatistického spracovania výsledkov diskových difúzných testov majú EO ajowan a EO oregano štatisticky významne najvyšší antimykotický účinok, naopak EO borovica a EO tea tree najnižší. Na základe hodnôt MIC/MFC v mikrodilučnom teste má EO ajowan najvyšší inhibičný účinok spomedzi testovaných EO a EO borovica najnižší antifungálny efekt na testované kmene *C. glabrata*. Práca poukazuje na význam hľadania dostupnejších látok, ktoré by v budúcnosti mohli doplniť alebo podporovať liečbu kvasinkových infekcií.

Kľúčové slová: *Candida glabrata*, esenciálny olej, kandidózy, MIC

Abstract

This work focuses on the detection of the sensitivity of the pathogenic yeast *Candida glabrata* to selected essential oils. The experimental part consists of methods for determining the sensitivity of five strains of *C. glabrata* to five selected essential oils (EO): pine, oregano, clove, tea tree and ajowan. The methods used were agar and air diffusion disk test and microdilution test. Based on the statistical processing of the results of the disk diffusion tests, EO ajowan and EO oregano have a statistically significant highest antifungal effect, while EO pine and EO tea tree have the lowest, and based on the MIC/MFC values in the microdilution test, EO ajowan has the highest inhibitory effect among the tested EOs and EO pine has the lowest antifungal effect on the tested strains of *C. glabrata*. The work points to the importance of finding more accessible substances that could supplement or support the treatment of yeast infections in the future.

Key Words: *Candida glabrata*, essential oil, candidiasis, MIC

Úvod

Candida glabrata patrí do rodu *Candida*, ktorý zahŕňa približne 150 druhov kvasiniek a mnohé z nich sú súčasťou mikrobioty človeka. Za určitých podmienok však môžu spôsobiť infekcie, najmä u imunokompromitovaných pacientov [1].

C. glabrata patrí medzi druh *Candida non-albicans* a spôsobuje menej prípadov kandidémie ako *C. albicans*, avšak v posledných desaťročiach sa zaznamenal nárast prípadov, kedy kandidémiu spôsobila *Candida non-albicans* a výsledky sú porovnateľné s kandidémiami, kedy pôvodcom bola *C. albicans* [2]. *C. glabrata* je haploidná kvasinka patriaca do kladu *Nakaseomyces* [3]. *C. glabrata* rastie prevažne vo forme kvasiniek a jej patogenita nie je závislá od morfológických prechodov. Je schopná tvoriť biofilmy. Infekcie spôsobené *Candida* sa delia na povrchové a systémové. Povrchové infekcie sú infekcie kože alebo slizníc tela, napr. orofaryngeálna, pažeráková, vulvovaginálna a kožná kandidóza. Systémové infekcie sú diseminované a môžu postihnúť takmer všetky vnútorné orgány. Pri imunosupresii môžu systémové infekcie *Candida* pochádzať z komenzálov, ktoré sa nachádzajú v gastrointestinálnom trakte alebo z externých zdrojov, napr. z centrálnych venózných katétrov. Systémové infekcie môžu prostredníctvom krvného obehu postihnúť srdce, mozog, obličky a mnoho ďalších orgánov. Závažným prejavom systémovej infekcie spôsobenej druhmi *Candida* je sepsa [4]. V posledných rokoch výskyt patogénov rezistentných na lieky upriamil pozornosť na EO vzhľadom na ich potenciálne antimikrobiálne vlastnosti [5].

EO a ich jednotlivé zložky pôsobia na rôzne bunkové štruktúry, najmä na bunkovú membránu a cytoplazmu. Keďže majú hydrofóbny charakter, dokážu ľahko prenikať do bunkovej membrány. Ich zložky sú schopné meniť priepustnosť aj fluiditu membrány *Candida* tým, že spôsobujú jej zvýšenú permeabilitu a taktiež aj štruktúrne a funkčné zmeny. Niektoré EO môžu zasahovať do funkcie mitochondrií tým, že inhibujú aktivitu mitochondriálnych dehydrogenáz zapojených do syntézy ATP, ako sú laktátdehydrogenáza,

malátdehydrogenáza či sukcinátdehydrogenáza. Taktiež terpenoidy môžu významne prispievať k znižovaniu množstva mitochondriálneho obsahu, čo sa následne prejavuje zmenami v hladinách reaktívnych foriem kyslíka a v produkcii ATP. Účinok eugenolu a tymolu pravdepodobne pôsobí na úrovni membrány, obe zlúčeniny inhibujú aktivitu H⁺-ATPázy. Karvakrol a tymol sú fenolové deriváty p-cyménu, spôsobujú poškodenie bunkovej membrány interakciou so sterolmi, najmä s ergosterolom. Podobný mechanizmus bol pozorovaný aj u zlúčeniny linalool, ktorý tiež zasahuje do stability húb a tvorby biofilmu. Štruktúra a funkcia membrány hubových buniek je kľúčovým faktorom pre prežitie týchto mikroorganizmov. Každá dôležitá zmena, ktorá zahŕňa syntézu alebo údržbu bunkovej membrány, môže spôsobiť poškodenie a následne smrť kvasinky [6].

Cieľom tohto experimentu bolo analyzovať citlivosť piatich klinických izolátov *C. glabrata* na päť rôznych esenciálnych olejov s antimikrobiálnym účinkom pomocou laboratórnych metód DDT a dilučného testu na MIC. Zámerom bolo tiež zistiť, ktoré z testovaných EO a pri akých koncentráciách sú najúčinnějšíe v potlačení rastu izolátov *C. glabrata*.

1 Materiál a metodika

V našom experimente sme použili kvalitatívne metódy diskového difúzneho testu dotykového (DDTD) a jeho obmeny - diskového difúzneho testu výparového (DDTV), ďalej sme použili kvantitatívnu mikrodilučnú metódu na zisťovanie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) a minimálnej fungicídnej koncentrácie (MFC). MIC je najnižšia koncentrácia antibiotika, pri ktorej dochádza k inhibícii rastu mikroorganizmov. MFC predstavuje minimálnu fungicídnu koncentráciu, teda najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, ktorá usmrtí baktérie.

Výskum sme realizovali na Oddelení klinickej mikrobiológie Nemocnice Poprad, a. s., kde nám poskytli 5 kmeňov *C. glabrata* získaných z klinických vzoriek izolovaných zo spúta, z výteru hrdla a nosa pacientov..

Všetky metodiky, ako aj uvedené postupy, sú v súlade s požiadavkami Európskeho výboru pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti EUCAST [7].

Ako živné pôdy pre *C. glabrata* sme použili Sabouraudov agar (SA) a Sabouraudov bujón (SB) od firmy Bio-Rad, Francúzsko, ktoré sme pripravili podľa postupu výrobcu.

V našich experimentoch sme použili francúzske EO značky Aromazone. Konkrétne to boli EO: ajowan, borovica, klinček, oregano a tea tree (tab. 1).

1.1 Disková difúzna metóda (DDT)

Ide o kvalitatívnu metódu, bola realizovaná v súlade s odporúčaniami EUCAST [7].

Príprava inokula a kultivácia

Inokulum *C. glabrata* bolo pripravené na hustotu 0,5 McFarland. Sterilnou vatovou tyčinkou ponorenou do suspenzie, z ktorej sme prebytočnú tekutinu odstránili pritlačením tyčinky o stenu skúmavky, sme kvasinky rovnomerne rozotrelí po povrchu SA v troch smeroch. Tak sme zabezpečili homogénny rast mikroorganizmov.

Tabuľka 1 Zloženie použitých esenciálnych olejov

Esenciálny olej	Latinský a slovenský názov druhu a čeľade	Zloženie použitej šarže (www.aromazone.com 2024)
Ajowan	<i>Trachyspermum ammi</i> Drsnoplodka parascová Apiaceae Mrkvovité	Fenoly: <u>tymol</u> (42,85 %); karvakrol (0,22 %); Monoterpény: <u>gama-terpinén</u> (35,49 %); paracymén (16,23 %); alfa-pinén(0,45 %); beta-pinén (2,24 %);
Borovica	<i>Pinus sylvestris</i> Borovica lesná Pinaceae Borovicovité	Monoterpény: <u>alfa-pinén</u> (54,95 %); beta-pinén (10,81 %); delta-3 - karén (11,17 %); myrcén (5 %); limonén (8,98 %);
Klinček	<i>Syzygium aromaticum</i> Klinčekovec voňavý Myrtaceae Myrtovité	Fenylpropény: <u>eugenol</u> (82,35 %); Estery: eugenylacetát (11,55 %); Seskviterpény: beta-karyofylén (4,45 %);
Oregano	<i>Origanum vulgare</i> Pamajorán obyčajný Lamiaceae Hluchavkovité	Fenoly: <u>karvakrol</u> (63,12 %); thymol (3,59 %); Monoterpény: gama-terpinén (7,79 %); paracymén (12,77 %); Terpénové alkoholy: linalol(1,02 %);
Tea tree	<i>Melaleuca alternifolia</i> Čajovník austrálsky Myrtaceae Myrtovité	Monoterpény: <u>gama-terpinén</u> (21,27 %); Alfa – terpinén (9,9 %); terminolén (3,49 %); paracymén(2,23 %); Monoterpenoly: <u>terpinén - 4 - ol</u> (43,35 %); alfa-terpineol (3,1 %); Monoterpenoidy: eukalyptol (2,94 %); Fenylpropény: methyleugenol (0,03 %);

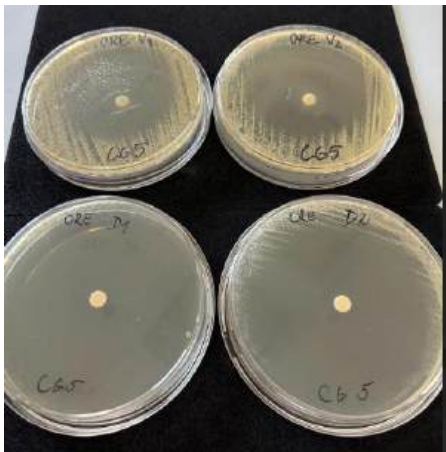
Disková difúzna metóda dotyková (DDTD)

Sterilný papierový disk (HIMEDIA) bol pomocou sterilnej ihly umiestnený do stredu na povrch stuhnutého SA v Petriho miske. Na disk sme s mikropipetou aplikovali 10 µl EO v 100 % koncentracii. Petriho misky boli inkubované pri teplote 37 °C počas 48 hodín.

Disková difúzna metóda výparová (DDTV)

Pri metóde diskovej difúzie vzdušnou cestou bol na vnútornú stranu viečka Petriho misky aplikovaný malý objem SA, na ktorý bol po stuhnutí umiestnený sterilný papierový disk. Na disk sme napipetovali 10 µl 100 % EO.

Naočkované Petriho misky boli inkubované hore dnom pri 37 °C počas 48 hodín. Antimikrobiálny účinok EO bol sprostredkovaný jeho difúziou vzduchom, čo v prípade citlivosti kvasiniek viedlo k tvorbe inhibičných zón (IZ). Všetky experimenty DDT boli praktizované dvojmo. Počas vyhodnocovania výsledkov sme sledovali veľkosť inhibičných zón. Čím vyššia je hodnota IZ, tým vyššia je citlivosť kmeňa na EO. Meranie sa vykonávalo pomocou posuvného meradla. Pri DDTD sme izoláty *C. glabrata* na základe veľkosti IZ zaradili do nasledujúcich kategórií: rezistentné (R) pri IZ = 6–8 mm, so strednou citlivosťou (I) pri IZ = 9–14 mm, citlivé (S) pri IZ = 15–20 mm a s extrémnou citlivosťou (SS) pri IZ > 21 mm podľa [8]. Pri DDTV pokiaľ nedošlo k tvorbe žiadnej IZ, považovali sme daný kmeň za rezistentný voči výparom testovaného EO.



Obrázok 1 DDTV kmeň *C. glabrata* č. 5 EO oregano (hore)
DDTD kmeň č. 5 EO oregano (dole)
Zdroj: [Foto: P. Janitorová]

1.2 Mikrodilučná metóda

Túto kvantitatívnu metódu k detekcii MIC a MFC sme prebrali od [9, 10]. V 96 jamkových mikroplatničkách sme v jednotlivých stĺpcoch pripravili sériu riedení testovaných EO v koncentráciách 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,3 %, 0,6 %, 0,3 %, 0,16 % a 0,08 %. Súčasťou testu bola negatívna kontrola (bez inokula) a pozitívna kontrola (bez EO). Každá jamka obsahovala spolu 200 µl suspenzie, z toho 50 µl inokula v SB bujóne s hustotou 0,5 McFarlanda (okrem negatívnej kontroly), 135 µl vopred pripraveného riedenia EO v SB bujóne (okrem pozitívnej kontroly) a 15 µl Tween 80, ktorý slúžil ako emulgátor EO v suspenzii.

Mikroplatničky sme vždy po naplnení prikryli a zhomogenizovali na trepačke mikroplatničiek orbitálne 60 sekúnd pri 800 RPM. Po naplnení sme mikroplatničky inkubovali 48 hodín pri teplote 37 °C. Všetky pokusy sme

vykonali v troch opakovaniach. Na jednej mikroplatničke sme použili vždy rovnaký EO.

Vyhodnotenie MIC prebiehalo na základe vizuálneho posúdenia prítomnosti alebo neprítomnosti zákalu v jednotlivých jamkách mikroplatničky. Za MIC sme považovali najnižšiu koncentráciu látky, pri ktorej nebol pozorovaný viditeľný zákal.

Vyhodnotenie MFC (minimálnej fungicídnej koncentrácie) prebehlo následne po odčítaní MIC, kedy sme z každej jamky v smere k vyššej koncentrácii EO vrátane jamky s MIC pomocou mikropipety preniesli 10 µl kultúry na SA na riadne označené Petriho misky. Tie sme nechali podobne kultivovať 48 hodín pri 37 °C. Po inkubácii sme ako MFC vyhodnotili tú koncentráciu EO, ktorá ako prvá najvyššia bola úplne bez prítomnosti kolónií *C. glabrata*.

1.3 Štatistické vyhodnotenie

Shapiro-Wilk test poukázal na to, že niektoré alebo všetky dáta nemali normálne rozdelenie. Preto sme použili na vyhodnotenie rozdielnosti účinkov EO Kruskal-Wallis test. Na podrobnejšie rozdiely bol potom použitý Conoverov alebo Dunnov test.

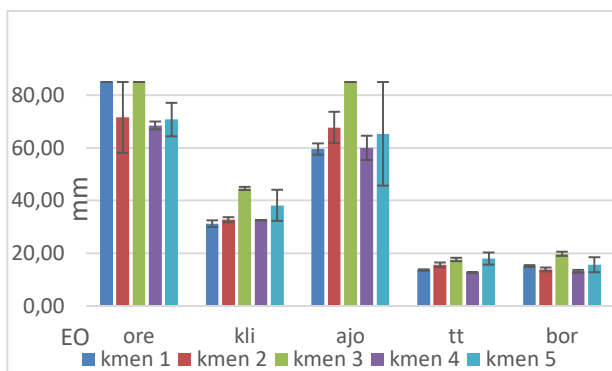
2 Výsledky a diskusia

2.1 DDTD

Pri stanovení citlivosti *C. glabrata* na EO sme použili metódu DDTD. Testovali sme 5 kmeňov piatimi rôznymi EO.

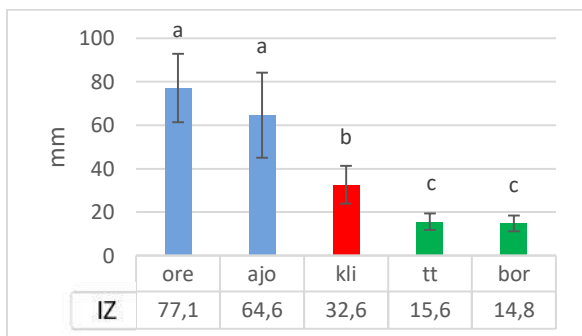
V grafe 1 sú vyjadrené hodnoty IZ v mm zvlášť pre každý testovaný kmeň *C. glabrata*. Najvyššie dosiahnutá veľkosť IZ bola 85 mm, čo je celkový priemer Petriho misky. Tento výsledok poukazuje na veľmi silný inhibičný účinok niektorých EO. Z grafu vidieť, že medzi jednotlivými kmeňmi sú výrazné rozdiely v hodnote IZ pri rôznych EO. Celkovo môžeme skonštatovať, že testované EO prejavili vysokú antimykotickú aktivitu týmto testom. Najväčšie IZ spôsobil EO oregano s priemernou hodnotou 76,16 mm (*C. g.* klasifikované ako SS). Hodnoty IZ pri EO ajowan dosahovali o 11,33 % (SS) a pri EO klinček o 52,9 % (SS) nižšie priemery. EO tea tree a EO borovica mali o 79,6 % (I-S) nižšie hodnoty IZ v porovnaní s EO oreganom.

Tieto výsledky korešpondujú so zisteniami, že EO oregano patrí medzi EO s výraznou antimykotickou aktivitou [11, 12]. Najväčšie inhibičné zóny zaznamenané pri tomto EO v DDTD metóde potvrdzujú jeho silný inhibičný účinok voči *C. glabrata*.



Graf 1 Antifungálna aktivita esenciálnych olejov voči kmeňom *Candida glabrata* v milimetroch (DDTD)
Vysvetlivky: ore – oregano, kli – klinček, ajo – ajowan, tt – tea tree, bor – borovica.

Štatistické vyhodnotenie pomocou Kruskal–Wallisovho testu a následného Conoverovho Post-hoc testu (graf 2) tieto rozdiely potvrdilo. V grafe 2 je signifikancia znázornená farbami a písmenami, pričom EO označené rovnakým písmenom sa štatisticky významne nelíšia.



Graf 2 DDTD - inhibičné zóny esenciálnych olejov bez ohľadu na kmene *Candida glabrata*
Vysvetlivky: a, b, c – označenie štatisticky homogénnych skupín

EO klinček má štatisticky nižší antimikrobiálny efekt (menšie IZ) na testované kmene *C. glabrata* ako EO oregano a EO ajowan, zatiaľ čo má ale štatisticky vyšší efekt (väčšie IZ) v porovnaní s EO tea tree a EO borovica. EO klinček tvorí samostatnú skupinu „b“ medzi skupinami „a“ (ore, ajo) a „c“ (tt, bor). Skupina „a“ sa v našom teste preukázala štatisticky najvyššie.

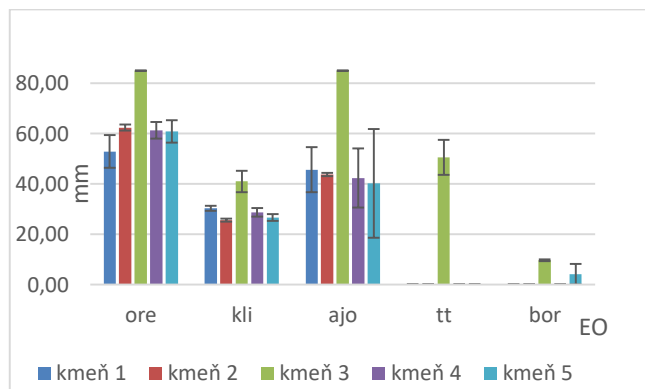
Výrazná aktivita EO oregano môže byť vysvetlená jeho chemickým zložením, najmä vysokým obsahom fenolických zlúčenín, ako sú karvakrol a tymol. Tieto látky narúšajú integritu bunkovej membrány kvasiniek, zvyšujú jej permeabilitu a spôsobujú únik intracelulárnych komponentov. Antifungálny účinok EO je všeobecne spájaný s narušením cytoplazmatickej membrány a interferenciou s metabolickými procesmi bunky. Podobné

výsledky uvádzajú aj [13], ktorí potvrdili vysokú citlivosť *C. glabrata* na EO oregano pri stanovení MIC.

DDTV

Graf 3 zobrazuje priemerné veľkosti IZ DDTV pre jednotlivé z piatich testovaných kmeňov *C. glabrata*. Pri testovaní EO oregano IZ dosahovali 52 - 85 mm, pri EO klinček to boli hodnoty 25 - 40 mm. Pri EO ajowan kmene vytvorili IZ v rozmedzí 40 - 85 mm. Pri použití EO tea tree sa vytvorila IZ iba pri 3. kmeni s hodnotou 50 mm. EO borovica vytvoril IZ iba pri kmeňoch 3 a 5, a to s hodnotami 4 a 9 mm. Vo viacerých prípadoch sa nevytvorila žiadna IZ, čo poukazuje na nedostatočný antifungálny účinok výparov EO na testované kmene kvasiniek.

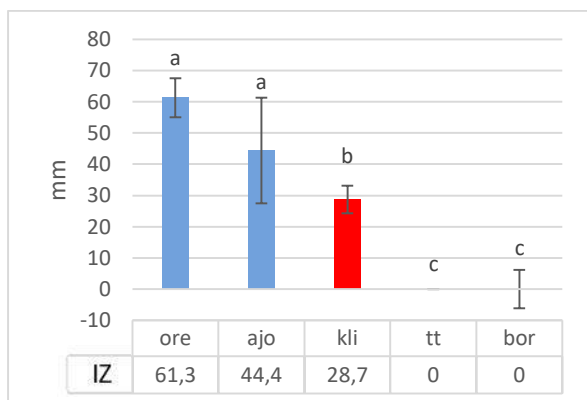
Rozdiely v citlivosti medzi jednotlivými EO môžu súvisieť s prirodzene nižšou citlivosťou *C. glabrata* v porovnaní s inými druhmi rodu *Candida*, ako uvádzajú [14]. Táto vlastnosť môže vysvetľovať variabilitu účinku medzi jednotlivými EO v našom experimente. Výrazná aktivita EO oregano a EO ajowan je preto z tohto hľadiska obzvlášť významná.



Graf 3 Antifungálna aktivita esenciálnych olejov voči kmeňom *Candida glabrata* v milimetroch (DDTV)
Vysvetlivky: ore – oregano, kli – klinček, ajo – ajowan, tt – tea tree, bor – borovica.

Pri DDTV sú štatistické výsledky podobné ako pri DDTD: Účinok dvojice EO tea tree a EO borovica sa štatisticky významne líši od EO klinček a jeho pôsobenie sa štatisticky významne líši od dvojice EO oregano a EO ajowan (graf 4).

Zaujímavé je, že napriek literárnym údajom o významnej antifungálnej aktivite EO tea tree voči *C. glabrata* [15], sa v našom experimente ukázali účinnejšie iné EO – ajowan, oregano i klinček.



Graf 4 DDTV - inhibičné zóny esenciálnych olejov bez ohľadu na kmene *Candida glabrata*
Vysvetlivky: a, b, c – označenie štatisticky homogénnych skupín

Môžeme konštatovať, že najvyšší a porovnateľný antimikrobiálny efekt vzdušnou cestou preukázali EO oregano a EO ajowan a najnižší a porovnateľný efekt preukázali EO tea tree a EO borovica. EO klinček aj tu vykázal spomedzi testovaných EO stredne silný antimikrobiálny efekt.

2.2 Mikrodilučný test

V tabuľke 2 sú zosumarizované výsledky MIC/MFC. EO ajowan sa javí ako EO s najvyššou antimykotickou aktivitou voči testovaným kmeňom *C. glabrata*, nakoľko takmer u všetkých kmeňov MIC a MFC mala hodnotu 0,8 mg/l. Nízka MFC naznačuje, že tento EO pôsobí už pri týchto koncentráciách pravdepodobne fungicídne.

EO oregano má silnú antimykotickú aktivitu. MIC tohto EO u takmer všetkých kmeňov dosiahla hodnotu 1,6 mg/l. Kmeň 4 bol najcitlivejší, úplne inhiboval už pri koncentrácii 0,8 mg/l. EO klinček má mierne nižšiu aktivitu ako EO oregano. Väčšina hodnôt MIC je 1,6 mg/l, okrem kmeňa 3, kde dosiahla MIC EO hodnotu 3,1 mg/l. MIC EO tea tree dosahuje pri takmer všetkých kmeňoch hodnotu 1,6 mg/l, výnimkou je kmeň 3, ktorý je mierne odolnejší. EO borovica vykazuje najslabšiu aktivitu, keďže jej účinok sa prejavuje až pri vyšších koncentráciách, a to pri MIC v rozmedzí 3,1 – 25 mg/l.

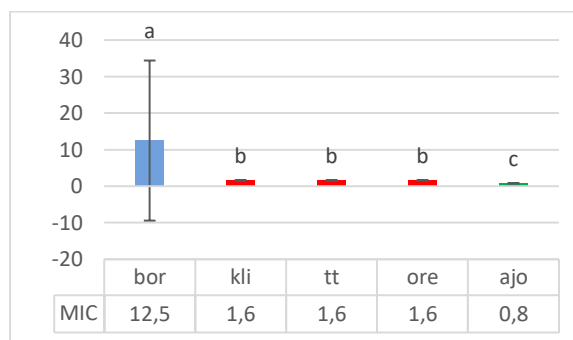
Tieto výsledky potvrdzujú, že EO ajowan a EO oregano patria medzi najúčinnšie EO voči *C. glabrata*. Naopak, EO borovica vykazuje najnižšiu účinnosť, hoci niektoré štúdie [16] uvádzajú vyššiu antimykotickú aktivitu tohto EO. Rozdiely v účinnosti EO v porovnaní s literatúrou môžu byť spôsobené rozdielnym chemickým zložením EO, ktoré závisí od chemotypu, geografického pôvodu, podmienok pestovania, času zberu, ako aj od extrakčného postupu.

Tabuľka 2 Hodnoty MIC a MFC (mg/l) esenciálnych olejov na testované kmene *Candida glabrata*

EO		kmeň 1	kmeň 2	kmeň 3	kmeň 4	kmeň 5
ore	MIC	1,6	1,6	1,6	0,8	1,6
	MFC	3,1	1,6	3,1	0,8	1,6
kli	MIC	1,6	1,6	3,1	1,6	1,6
	MFC	1,6	1,6	6,25	1,6	1,6
ajo	MIC	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	MFC	0,8	0,8	1,6	0,8	0,8
tt	MIC	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	MFC	1,6	1,6	3,1	1,6	1,6
bor	MIC	3,1	3,1	25	12,5	25
	MFC	3,1	3,1	25	12,5	25

Na základe štatistických výsledkov, ktoré sme získali Kruskal-Wallisovým a následne Dunnovým Post hoc testom možno konštatovať, že EO z ajowanu je najúčinnjší voči testovaným kmeňom *C. glabrata*, zatiaľ čo EO z borovice je najmenej účinný. Ostatné tri esenciálne oleje vykazujú štatisticky porovnateľný, stredne silný antimykotický účinok (viď graf 5).

Je potrebné zdôrazniť, že výsledky antimykotickej aktivity EO sú výrazne ovplyvnené použitou metodikou, vrátane veľkosti inokula, typu kultivačného média, použitých rozpúšťadiel, teploty a dĺžky inkubácie, čo môže čiastočne vysvetľovať rozdiely medzi jednotlivými štúdiami.



Graf 5 MIC esenciálnych olejov bez ohľadu na kmene
Vysvetlivky: a, b, c – skupiny EO so štatisticky rozdielnym účinkom

Celkovo literatúra podporuje naše zistenia o relatívnej účinnosti jednotlivých esenciálnych olejov, pričom fenolbohaté oleje ako oregano a ajowan vykazujú vysokú inhibičnú aktivitu proti *C. glabrata*, zatiaľ čo monoterpen-dominantné oleje ako borovica a tea tree môžu byť menej účinné. Tieto rozdiely sú relevantné pri výbere EO pre ďalší výskum alebo potenciálne terapeutické aplikácie [17].

3. Záver

Všetky tri metódy (DDTD, DDTV, mikrodilučný test) sa zhodli, že najvyššiu antimykotickú aktivitu voči kmeňom *C. glabrata* mali esenciálne oleje ajowan a oregano, zatiaľ čo EO borovica bol najmenej účinný.

Difúzne testy preukázali veľmi veľké inhibičné zóny najmä pri EO oregano a ajowan, stredné pri EO klinček a výrazne menšie alebo chýbajúce pri EO tea tree a borovica. Pri DDTV bol účinok výparov celkovo slabší, no poradie účinnosti EO zostalo podobné.

Mikrodilučný test potvrdil tieto trendy: EO ajowan dosiahol najnižšie MIC/MFC (väčšinou 0,8 mg/l), čo naznačuje možný fungicídny účinok pri nízkych koncentráciách. EO oregano a klinček vykazovali prevažne MIC 1,6 mg/l, zatiaľ čo EO borovica pôsobil až pri podstatne vyšších koncentráciách. Štatistická analýza preukázala významné rozdiely medzi najúčinnjšími (ajowan, oregano) a stredne účinnými EO (klinček a tea tree) a najmenej účinným EO (borovica).

V praxi tieto výsledky poukazujú na potenciál EO ajowan a oregano ako perspektívnych prírodných antimykotík alebo adjuvantov pri kontrole infekcií spôsobených *C. glabrata*. EO klinček môže byť vhodný v kombinovaných preparátoch, zatiaľ čo EO borovica má v cieľenej antifungálnej terapii proti *C. glabrata* podľa našich výsledkov limitované využitie.

Podakovanie

Moje podakovanie patrí mojej školiteľke, RNDr. Libuši Lengyelovej, PhD., za jej odborné rady, usmernenia, trpezlivosť, nadšenie a motiváciu pri písaní tohto článku.

Podakovanie patrí aj pracovníkom mikrobiologického laboratória Nemocnice Poprad, a. s. za pomoc pri experimentálnej časti práce a za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] CIUREA, C. N., I. – B. KOSOVSKI, A. D. MARE, F. TOMA, I. A. PINTEA-SIMON a A. MAN, 2020. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms* [online]. 2020, vol. 8, no. 6, pp. 857 [cit. 23.11.2025]. ISSN 2076-2607. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>

[2] BEARDSLEY, J., H. Y. KIM, A. DAO, S. KIDD, A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, T. C. SORRELL, E. TACCONELLI, A. CHAKRABARTI, T. S. HARRISON, F. BONGOMIN, V. GIGANTE, M. GALAS, S. SISWANTO, D. A. DAGNE, F. ROITBERG, H. SATI, C. O. MORRISSEY a J. – W. ALFFENAAR, 2024. Candida glabrata (Nakaseomyces glabrata): A systematic review of clinical and

microbiological data from 2011 to 2021 to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Medical Mycology* [online]. 2024, vol. 62, no. 6, pp. myae041 [cit. 22.11.2025]. ISSN 1369-3786. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/mmy/myae041>

[3] HASSAN, Y., S. Y. CHEW a L. T. L. THAN, 2021. Candida glabrata: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. *Journal of Fungi* [online]. 2021, vol. 7, no. 8, pp. 667 [cit. 23.11.2025]. ISSN 2309-608X. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/jof7080667>

[4] KATSIPOULAKI, M., M. H. T. STAPPERS, D. MALAVIA-JONES, S. BRUNKE, B. HUBE a N. A. R. GOW, 2024. Candida albicans and Candida glabrata: global priority pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2024, vol. 88, no. 2, p. e00021-23. [cit. 1.2.2026]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00021-23>

[5] SAKKAS, H. a CH. PAPADOPOULOU, 2017. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils [online]. 2017, vol. 27, no. 3, pp. 429–438. [cit. 26.9.2025]. Dostupné na: <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

[6] NAZZARO, F., F. FRATIANNI, R. COPPOLA a V. DE FEO, 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* [online]. 2017, vol. 10, no. 4, pp. 86 [cit. 5.2.2026]. ISSN 1424-8247. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ph10040086>

[7] EUCAST, 2025. Disk Diffusion and Quality Control [online] [cit. 25.2.2026]. Dostupné na: <https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/>

[8] DJABOU, LORENZI, GUINOISEAU, ANDREANI a AI ET., 2013. Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control* [online]. 2013 [cit. 27.2.2026]. Dostupné na: <https://scihub.hlgczx.com/10.1016/j.foodcont.2012.06.025>

[9] BALOUIRI, M., M. SADIKI a S. K. IBNSOUDA, 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, vol. 6, no. 2, pp. 71–79 [cit. 23.2.2026]. ISSN 2095-1779. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

[10] PUŠKÁROVÁ, A., M. BUČKOVÁ, L. KRAKOVÁ, D. PANGALLO a K. KOZICS, 2017. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports* [online]. 2017, vol. 7, no. 1, pp. 8211 [cit.

- 23.2.2026]. ISSN 2045-2322. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>
- [11] RHARS, A., M. OUBELHAS, Y. ABERCHA, N. EZZARIGA a Z. LEMKHENTE, 2025. Harnessing Herbal Strength: Exploring the Synergy between *Origanum Vulgare* Essential Oil and Fluconazole in Combating *Candida Glabrata*. *EAS Journal of Parasitology and Infectious Diseases* [online]. 2025, vol. 7, no. 04, pp. 97–101 [cit. 3.3.2026]. ISSN 26630982, 26636727. Dostupné na: <https://doi.org/10.36349/easjpid.2025.v07i04.007>
- [12] PROŠKOVCOVÁ, M., E. ČONKOVÁ, P. VÁCZI, M. HARČÁROVÁ a Z. MALINOVSKÁ, 2021. Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the *Lamiaceae* family against *Candida albicans* clinical isolates. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* [online]. 2021, vol. 28, no. 2, pp. 260–266 [cit. 3.3.2026]. ISSN 1232-1966, 1898-2263. Dostupné na: <https://www.aaem.pl/pdf13589265782?filename=Antibiofilm-activity-of-s.pdf>
- [13] SOARES, I.H., É.S. LORETO, L. ROSSATO, D.N. MARIO, T.P. VENTURINI, F. BALDISSERA, J.M. SANTURIO a S.H. ALVES, 2015. In vitro activity of essential oils extracted from condiments against fluconazole-resistant and -sensitive *Candida glabrata*. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 2015, vol. 25, no. 3, pp. 213–217 [cit. 27.2.2026]. ISSN 11565233. Dostupné na: <https://sci-hub.hlgczx.com/10.1016/j.mycmed.2015.06.003>
- [14] CÓRDOBA, S., W. VIVOT, W. SZUSZ a G. ALBO, 2019. Antifungal Activity of Essential Oils Against *Candida* Species Isolated from Clinical Samples. *Mycopathologia* [online]. 2019, vol. 184, no. 5, pp. 615–623 [cit. 27.2.2026]. ISSN 0301-486X, 1573-0832. Dostupné na: <https://sci-hub.hlgczx.com/10.1007/s11046-019-00364-5>
- [15] HAMMER, K. A., 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2004, vol. 53, no. 6, pp. 1081–1085 [cit. 27.2.2026]. ISSN 1460-2091. Dostupné na: <https://sci-hub.hlgczx.com/10.1093/jac/dkh243>
- [16] MANDRAS, N., A. NOSTRO, J. ROANA, D. SCALAS, G. BANCHE, V. GHISSETTI, S. DEL RE, G. FUCALE, A. M. CUFFINI a V. TULLIO, 2016. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2016, vol. 16, no. 1, p. 330 [cit. 27.2.2026]. ISSN 1472-6882. Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1316-5>
- [17] MASSA, N., S. CANTAMESSA, G. NOVELLO, E. RANZATO, S. MARTINOTTI, M. PAVAN, A. ROCCHETTI, G. BERTA, E. GAMALERO a E. BONA, 2018. Antifungal activity of essential oils against azole-resistant and azole-susceptible vaginal *Candida glabrata* strains. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2018, vol. 64, no. 10, pp. 647–663 [cit. 2.3.2026]. ISSN 1480-3275. Dostupné na: <https://sci-hub.hlgczx.com/10.1139/cjm-2018-0082>

Biosorpcia Li z vodných roztokov pomocou chemicky modifikovanej biomasy zelených rias

Biosorption of Li from aqueous solutions by chemically modified biomass of green algae

Romana Kormúthová¹ – Šimon Ján Rezbárik^{2,3} – Vanda Adamcová⁴ – Martin Valica⁵ –
Monika Šutáková⁶ – Miroslav Horník⁷

^{1,2,4,5,6,7}Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2,
917 01 Trnava

³GEOFIX, s.r.o., Starohájska 9/C, 917 01 Trnava

¹kormuthova1@ucm.sk, ²rezbarik1@ucm.sk, ³simon.rezbarik1@gmail.com, ⁴vanda.adamcova@ucm.sk,
⁵martin.valica@ucm.sk, ⁶monika.bardacova@ucm.sk, ⁷hornik@ucm.sk

Abstrakt

Cieľom práce bolo pripraviť a charakterizovať biosorbenty na báze biomasy zelených rias *Chlorella pyrenoidosa* (CHB), chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou $K_4[Fe(CN)_6]$ (FCHB) alebo pomocou H_3PO_4 (PCHB), magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu (MCHB), ktoré by bolo možné využiť pri účinnom separovaní Li z nízkoobsahových vodných roztokov. Pri fyzikálno-chemickej charakterizácii pripravených biosorbentov a realizácii biosorpčných experimentov sa aplikovala SEM-EDX, FT-IR, resp. AES analýza. SEM-EDX a FT-IR analýzy nám umožnili odhaliť úspešnosť a charakter chemickej modifikácie biosorbentu. Pri hodnotení separácie Li z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $5,8 \text{ mg/dm}^3$ Li sme zistili, že najvyššiu biosorpčnú účinnosť, ako aj kapacitu viazania Li^+ iónov vykazoval fosforylovaný biosorbent (PCHB), pričom táto účinnosť klesala v poradí: PCHB – 47,0 % > CHB – 33,7 % > FCHB – 22,7 % > MCHB – 12,2 % > MNFe – 10,3 %.

Kľúčové slová: lítium, biosorpcia, *Chlorella pyrenoidosa*, chemická modifikácia, magnetický biosorbent

Abstract

The aim of the work was to prepare and characterise biosorbents based on biomass of green algae *Chlorella pyrenoidosa* (CHB), chemically modified biosorbent using $K_4[Fe(CN)_6]$ (FCHB) or using H_3PO_4 (PCHB), magnetic nanoparticles Fe_3O_4 (MNFe) and magnetic biosorbent (MCHB), which could be used for efficient separation of Li from low-concentration aqueous solutions. SEM-EDX, FT-IR, and AES analysis were applied for the physico-chemical characterization of the prepared biosorbents and the realization of biosorption experiments, respectively. SEM-EDX and FT-IR analyses

allowed us to reveal the success and nature of the chemical modification of biosorbent. When evaluating the separation of Li from the environment of deionized water containing 5.8 mg/dm^3 Li, we found that the phosphorylated biosorbent (PCHB) showed the highest biosorption efficiency, as well as the capacity to bind Li^+ ions, whereby this efficiency decreased in the following order: PCHB – 47.0 % > CHB – 33.7 % > FCHB – 22.7 % > MCHB – 12.2 % > MNFe – 10.3 %.

Key Words: lithium, biosorption, *Chlorella pyrenoidosa*, chemical modification, magnetic biosorbent

1 Úvod

Lítium (Li) je vďaka svojim elektrochemickým vlastnostiam a špecifickej tepelnej kapacite jedným z najdôležitejším prvkom tohto storočia [1]. Aplikácie Li a jeho využitie v praxi zahŕňajú najmä produkciu batérií, farmaceutík, keramiky a iných produktov. V posledných rokoch pozorujeme výrazné zvýšenie dopytu po Li, a to najmä vďaka elektromobilom a iným zariadeniam, ktorých energia závisí od batérií, s čím súvisí aj nahradenie fosílnych palív za čistou obnoviteľnú energiu [2-4].

Rozmach globálnej spotreby Li, ktorá sa zvýšila z 24,5 kt v roku 2010 na 93,0 kt v roku 2021 a neustále stúpa, predstavuje výzvu v zmysle získavania Li z dostupných konvenčných zdrojov rudy [5]. V tomto zmysle sa zdá, že Li získavané z vodných zdrojov predstavuje výhodný alternatívny zdroj Li, keďže približne 75 % celosvetových zásob Li je obsiahnutých v geotermálnych soľankách alebo v tzv. slaných jazerách v Južnej Amerike, Číne alebo v Austrálii [6, 7]. Zdroje tohto prvku vyskytujúce sa v oceánoch sú dokonca viac než 16 000-násobne bohatšie v porovnaní s ostatnými zdrojmi na Zemi [2].

Spomínané nízkoobsahové roztoky Li však predstavujú komplikované zdroje pre jeho získavanie. Navyše, v mnohých prípadoch situáciu zhoršujú zvýšené úrovne K^+ , Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} ako ko-iónov ku Li^+ iónom, ako aj častokrát prítomný vysoký pomer Mg/Li , čo predstavuje prekážky pre efektívne získavanie Li [8, 9]. V súčasnosti sa používajú rôzne techniky pre separáciu Li z takýchto zdrojov, akými sú extrakcia rozpúšťadlom [2], iónová výmena [10], membránová separácia [11], precipitácia [12], elektrochemické [13, 14] a adsorpčné metódy [15]. Významným faktorom, ktorý ovplyvňuje výber danej techniky alebo metódy pre extrakciu Li je najmä efektivita a možné interferencie vyskytujúce sa v prítomnosti ko-iónov, predovšetkým Mg^{2+} iónov [5, 16].

V porovnaní s vyššie uvedenými metódami sa adsorpcia ukazuje ako výhodná metóda vykazujúca vysokú selektivitu voči Li, jednoduchý a efektívny priebeh procesu, aplikovateľnosť pre väčšinu zdrojov soľaniek, minimálny vplyv na životné prostredie a ekonomickú výhodnosť [17]. Základným aplikačným princípom tejto metódy je, že ióny Li^+ sa viažu na adsorbenty selektívne z multikomponentného vodného prostredia a následne sa Li uvoľňuje rôznymi rozpúšťadlami, resp. desorpčnými činidlami [5]. Tento princíp vyžaduje vhodný adsorpčný materiál, ktorý vykazuje vysokú selektivitu pre Li, adekvátnu adsorpčnú kapacitu a vhodnú stabilitu počas realizácie tohto procesu [18]. Väčšinu študovaných adsorbentov pre Li reprezentujú rôzne anorganické, organické i kompozitné materiály. Aplikovateľnosť organických adsorbentov, ako krown-éterov a iónovýmienných polymérov, je dosť limitovaná najmä z dôvodu rizikovosti organických zložiek týchto materiálov. Anorganické adsorbenty zahŕňajú predovšetkým adsorbenty na báze nanočastíc kovov alebo prírodných adsorbentov na báze minerálov [5].

Určitou, finančne výhodnou a environmentálne akceptovateľnou alternatívou k adsorpcii je biosorpcia, pri ktorej sa aplikujú sorbenty odvodené od rôznych typov biomás. Biosorpcia získala uznanie ako vysoko sľubná metóda na odstraňovanie škodlivých látok a toxických kovov. Proces biosorpcie zahŕňa rôzne mechanizmy, ako je iónová výmena, tvorba koordinačných zlúčenín, komplexácia, chelátácia, adsorpcia, mikroprecipitácia a difúzia [19]. V závislosti od druhu a charakteristík biomasy ako biosorbentu, jej modifikácie, ako aj od fyzikálno-chemických charakteristík roztokov sa použité mechanizmy môžu líšiť. Mikroorganizmy ako baktérie, plesne, kvasinky a riasy majú schopnosť viazať a akumulovať rôzne typy iónov kovov [20].

Biomasa rias vykazuje vysokú účinnosť pri biosorpcii

iónov kovov, a to najmä prostredníctvom povrchovej iónovej výmeny, pričom reprezentuje ekonomicky výhodné biosorbenty. Tieto biosorbenty zahŕňajú biomasu mikrorias aj makrorias, ktoré prevládajú v sladkovodných i morských ekosystémoch [21]. *Chlorella vulgaris* alebo *Chlorella pyrenoidosa* sú riasy, ktoré slúžia ako doplnok výživy. Využívajú sa aj na biosorpciu rôznych látok, predovšetkým vďaka svojim metabolickým a povrchovým charakteristikám [22]. Taktiež ich biomasy sú vhodné aj pre realizáciu chemických modifikácií povrchových funkčných skupín, akými sú karboxylové, fosforylové a amínové skupiny, s cieľom zvýšenia účinnosti biosorpcie, napr. pri odstraňovaní alebo separovaní iónov kovov [23, 24].

Cieľom prezentovanej práce bolo pripraviť biosorbenty na báze biomasy zelených rias *Chlorella pyrenoidosa* za uplatnenia jej chemickej modifikácie prostredníctvom hexakynoželeznanu draselného, jej fosforylácie alebo prostredníctvom zabudovania nanočastíc Fe_3O_4 za vytvorenia magnetického biosorbentu. Pripravené biosorbenty sa v prvom kroku podrobili fyzikálno-chemickej charakterizácii za využitia SEM-EDX a FT-IR analýzy. Následne sa uskutočnili komparatívne biosorpčné experimenty s cieľom zistenia efektivity separovania Li z modelových roztokov za podmienok vsádzkových systémov.

2 Materiál a metódy

2.1 Príprava biosorbentov

Pri príprave biosorbentu sme vychádzali z komerčne dostupnej biomasy zelených rias *Chlorella pyrenoidosa* (CHB), ktorá sa predáva na trhu ako výživový doplnok pod názvom Chlorella Premium Natural, Dr. Max (Česká republika). Pred jej samotnou aplikáciou v biosorpčných experimentoch alebo pred chemickou modifikáciou biosorbentu sa biomasa zhomogenizovala použitím homogenizátora (pri 20 Hz počas 1 min; TissueLyser II, Qiagen, Nemecko) a následne preosiala cez štandardizované sítá za účelom získania homogénneho a dobre definovateľného biosorbentu s veľkosťou častíc $< 300 \mu m$ a zároveň $> 150 \mu m$.

Chemická modifikácia pripraveného biosorbentu CHB pomocou hexakynoželeznanu draselného, $K_4[Fe(CN)_6]$ (FCHB) sa realizovala podľa postupu prezentovaného v práci [25].

Pri fosforylačnej modifikácii pripraveného biosorbentu CHB pomocou H_3PO_4 (PCHB) sa postupovalo na základe patentu [26].

Pri syntéze magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) sa postupovalo prostredníctvom metódy opísanej v prácach [27, 28], ktorá je založená na chemickom spoluzrážaní $Fe(II) : Fe(III)$ v pomere 1 : 2 a v atmosfére

dušika. V prípade prípravy magnetického biosorbentu (MCHB) sa postupovalo obdobne, ako tomu bolo pri príprave magnetických nanočastíc MNFe, avšak s tým rozdielom, že do zmesi sa navyše pridalo presné množstvo pripraveného biosorbentu CHB.

Pri všetkých, chemicky modifikovaných biosorbentoch sa získaný produkt nechal 3x premyť v deionizovanej vode s cieľom odstránenia nezreagovaných reagentov a následne sa nechal sušiť pri 60 °C počas 24 h. Výsledný produkt sa po tomto kroku zhomogenizoval pomocou homogenizátora (pri 20 Hz počas 1 min; TissueLyser II, Qiagen, Nemecko) a preosial cez štandardizované sitá s dosiahnutím dobre definovaného modifikovaného biosorbentu s veľkosťou častíc < 300 μm a zároveň > 150 μm.

2.2 SEM-EDX a FT-IR analýza

Analýza povrchu pripravených a chemicky modifikovaných biosorbentov na báze biomasy zelených rias *C. pyrenoidosa*, ako aj magnetických nanočastíc MNFe bola realizovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (Vega 2 SEM, Tescan, a.s., Česká republika) v spojení s energiovo-disperznou röntgenovou spektroskopiou (Quantax QX2, Rontec, Nemecko). Každý z analyzovaných biosorbentov bol zafixovaný na hliníkový držiak vzorky pomocou vodivého lepidla (Ag). Následne bol analyzovaný biosorbent potiahnutý Au pomocou vákuového pokovovacieho systému (BP 343,7, TESLA ELMI a.s., Česká republika). Analýzy povrchu boli vykonané pri napätí 30 kV, vákuovom tlaku $3,6 \cdot 10^{-3}$ Pa a zväčšení 500x.

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FT-IR) jednotlivých pripravených a chemicky modifikovaných biosorbentov, ako aj magnetických nanočastíc MNFe bola uskutočnená pomocou FT-IR spektrofotometra s ATR nástavcom (IRAffinity-1, Shimadzu, Japonsko) v rozsahu infračerveného spektra 400 – 4 000 cm^{-1} . Každá vzorka bola meraná 2-krát, pričom spektrum sa získalo ako priemer z dvoch meraní.

2.3 Biosorpčné experimenty

Jednotlivé typy pripravených a chemicky modifikovaných biosorbentov na báze biomasy zelených rias *C. pyrenoidosa*, ako aj magnetických nanočastíc MNFe sa kvantitatívne preniesli do 10 cm^3 roztoku LiNO_3 o známej koncentrácii v deionizovanej vode a celá táto zmes bola umiestnená v 15 cm^3 skúmavkách. Počiatočná hodnota pH pripravených roztokov sa nastavila prostredníctvom roztokov 1 mol/dm^3 HCl alebo 1 mol/dm^3 NaOH. Expozícia sa realizovala za kontrolovaných podmienok na rotačnej trepačke (150 min^{-1}) a pri 25 °C. Na konci expozície sa pripravený biosorbent alebo MNFe odstredil

(pri 4 500 min^{-1} počas 5 min) alebo separoval pomocou magnetu, pričom získaný supernatant sa ešte následne prefiltraval cez striekačkové filtre (priemer 25 mm; priepustnosť 0,45 μm). Zostatková koncentrácia Li v supernatante sa stanovila za využitia atómovej emisnej spektrometrie. Účinnosť biosorpcie Li (v %-tách), resp. špecifická biosorpcia (v mg/g; such. hm.) sa vypočítali prostredníctvom nižšie uvedených matematických rovníc (1 a 2):

$$Q_{\%} = 100 - \left(\frac{C_t}{C_0} * 100 \right) \quad (1)$$

$$Q = \frac{(C_0 - C_t) * V}{m_B} \quad (2)$$

kde $Q_{\%}$ reprezentuje účinnosť biosorpcie Li [%]; C_0 a C_t predstavujú koncentrácie Li v roztoku vyskytujúce sa na začiatku a na konci experimentu [mg/dm^3]; Q kvantitatívne opisuje špecifickú biosorpciu Li [mg/g ; suchá hm.]; V reprezentuje objem roztoku [dm^3]; a m_B predstavuje hmotnosť aplikovaného biosorbentu alebo nanočastíc MNFe [g ; such. hm.].

2.4 Stanovenie Li pomocou AES

Stanovenie počiatočných alebo finálnych koncentrácií Li v roztokoch pochádzajúcich z biosorpčných experimentov bolo uskutočnené prostredníctvom atómoveho emisného spektrometra s plameňovou atomizáciou (iCE 3000, Thermo Fisher Scientific, USA). Pri zostrojení kalibračnej krivky určenej pre výpočet koncentrácie Li v analyzovaných vzorkách sa pracovalo so štandardnými roztokmi LiNO_3 v rozmedzí koncentrácií 4,0 – 0,4 mg/dm^3 alebo 1,0 – 0,1 mg/dm^3 . V rámci samotného procesu analýzy štandardných kalibračných roztokov a vzoriek pochádzajúcich z biosorpčných experimentov sa pracovalo v plameňovom móde atomizácie vzorky, ktorý sa zabezpečil spaľovaním zmesi acetylénu so vzduchom v titánovom horáku so šírkou 100 mm, pričom sa pracovalo za nasledovných podmienok: prietok acetylénu 1,1 dm^3/min a vlnová dĺžka pre stanovenie Li: 670,784 nm. Neistota merania nepresiahla 10 %.

2.5 Spracovanie údajov

Štatistické vyhodnotenie výsledkov biosorpčných experimentov a ich opis v podobe grafov sa realizovali za využitia programov OriginPro2016, OriginLab Corp. (USA) a MS Excel 365, Microsoft Corp. (USA). Rozdiely v biosorpčných charakteristikách viazania Li jednotlivými pripravenými biosorbentmi boli testované analýzou rozptylu (ANOVA). Štatistická významnosť rozdielov bola analyzovaná pomocou Tukeyho HSD post hoc testu ($P \leq 0,05$) a softvéru Statgraphics Centurion ver. 19.5.01, Statgraphics Technologies Inc. (USA).

3 Výsledky a diskusia

V prvom kroku charakterizácie jednotlivých pripravených, resp. chemicky modifikovaných biosorbentov na báze biomasy zelených rias *Chlorella pyrenoidosa*, a nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) sme uskutočnili zhodnotenie výťažku aplikovaných chemických modifikačných reakcií, resp. syntetickej reakcie prípravy MNFe a magnetického biosorbentu. Zistili sme, že najvyššiu celkovú výťažnosť prípravy daného biosorbentu z pohľadu všetkých vnesených reagentov do reakcie sme dosiahli pri príprave magnetického biosorbentu (MCHB), pričom táto výťažnosť klesala v poradí: MCHB (46,7 %) > MNFe (45,6 %) > FCHB (36,4 %) > PCHB (4,8 %). Na druhej strane výťažnosť vzťahovaná na množstvo nemodifikovaného biosorbentu CHB vneseného do reakcie klesala v poradí: MCHB (248,9 %) > FCHB (77,8 %) > PCHB (53,2 %). Z uvedeného výsledku sa dá vyvodiť záver, že pri príprave magnetického biosorbentu (MCHB) dochádza k zvýšeniu množstva pripraveného finálneho produktu – biosorbentu MCHB oproti vnesenému množstvu primárneho biosorbentu pripraveného na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa* (CHB), a to až skoro 2,5-násobne. To sa dá vysvetliť tým, že podstatnú časť tohto biosorbentu tvorili vytvorené nanočastice Fe_3O_4 (MNFe). Naproti tomu, chemická modifikácia pomocou roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (biosorbent FCHB) a fosforylačná reakcia (biosorbent PCHB) spôsobili pokles z pohľadu vneseného množstva suchej biomasy *C. pyrenoidosa* (CHB) do reakcie. Konkrétne pri $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ubudlo 22,2 % z pôvodnej hmotnosti vnesenej biomasy a pri fosforylačnej reakcii dokonca až 46,8 %. Táto strata mohla súvisieť jednak náročnosťou jednotlivých krokov prípravy modifikovaného biosorbentu, ako napr. strata medzi produktu, resp. produktu pri jeho transporte v rámci jednotlivých reakčných krokov, ako aj pri premývaní medzi produktu/produktu s cieľom odstránenia zvyškov reakčnej zmesi, ale aj čiastočnou oxidáciou medzi produktu/produktu modifikačnej reakcie.

Pri fyzikálno-chemickej charakterizácii jednotlivých pripravených, resp. chemicky modifikovaných biosorbentov na báze biomasy zelených rias *C. pyrenoidosa*, a nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) sme uskutočnili SEM-EDX analýzu ich povrchov. Teda popri mikroskopickom pozorovaní sa uskutočnila aj EDX analýza zameraná na získanie spektier, z ktorých bolo následne možné uskutočniť semikvantitatívne stanovenie prvkového zloženia povrchov pripravených biosorbentov a nanočastíc MNFe. V Tab. 1 je sumarizovaná kompozícia povrchov biosorbentov na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa*, chemicky modifikovaných biosorbentov a magnetických

nanočastíc Fe stanovená pomocou EDX analýzy. Z uvedenej analýzy je možné vyvodiť závery, že pri chemicky modifikovanom biosorbente pomocou roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ došlo v porovnaní s pôvodnou suchou biomasou *C. pyrenoidosa* k miernemu zvýšeniu zastúpenia N a Fe, ktoré indikuje čiastočnú modifikáciu biosorbentu touto modifikačnou reakciou. V prípade biosorbentu fosforylačne modifikovaného pomocou H_3PO_4 prakticky nedošlo k zmene zastúpenia P na povrchu takto pripraveného biosorbentu, Na druhej strane sme však zistili signifikantné zvýšenie zastúpenia N v porovnaní s pôvodným, nemodifikovaným biosorbentom z percentuálneho podielu 7,0 % na 11,6 %. Prakticky podobný výsledok pozorovali aj autori práce [29] zameranej na fosforyláciu dreva ako adsorbentu Ni^{2+} iónov, kedy zvýšenie zastúpenia N po fosforylačnej modifikácii tohto adsorbentu vysvetľovali účasťou močoviny na fosforylácii ako jedného z činidiel aplikovaných pri tejto modifikačnej reakcii. Pri porovnaní pripravených nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu (MCHB) môžeme povedať, že biosorbent MCHB vo významnej miere obsahoval nanočastice MNFe, hoci podiel Fe v tejto vzorke bol zhruba o polovicu nižší ako pri samotných nanočasticiach MNFe. To nasvedčuje tomu, že sa v tejto vzorke biosorbentu vyskytovali častice reprezentujúce biomasu rias *C. pyrenoidosa* štruktúrne zahŕňajúce aj nanočastice Fe_3O_4 , keďže pri príprave, resp. získavaní tohto produktu – biosorbentu sme použili magnet na odseparovanie častíc biomasy bez neviazania MNFe.

Tab. 1 Kompozícia povrchov biosorbentov na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa*, chemicky modifikovaných biosorbentov a magnetických nanočastíc Fe_3O_4 stanovená pomocou EDX analýzy.

Dominantný prvok [%]*	Biosorbent				
	CHB	FCHB	PCHB	MNFe	MCHB
C	21,4	19,4	20,0	2,1	5,1
O	70,9	68,4	67,3	52,8	55,4
N	7,0	8,8	11,6	9,3	9,2
P	0,3	0,5	0,1	n.d.	0,2
K	0,2	0,8	n.d.	n.d.	n.d.
Fe	n.d.	0,2	n.d.	22,6	11,9
S, Na, Cl	0,2	1,9	1,0	13,2	18,2

CHB – biosorbent na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa*; FCHB – chemicky modifikovaný biosorbent pomocou $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; PCHB – chemicky modifikovaný biosorbent pomocou H_3PO_4 ; MNFe – magnetické nanočastice Fe_3O_4 a MCHB – magnetický biosorbent.

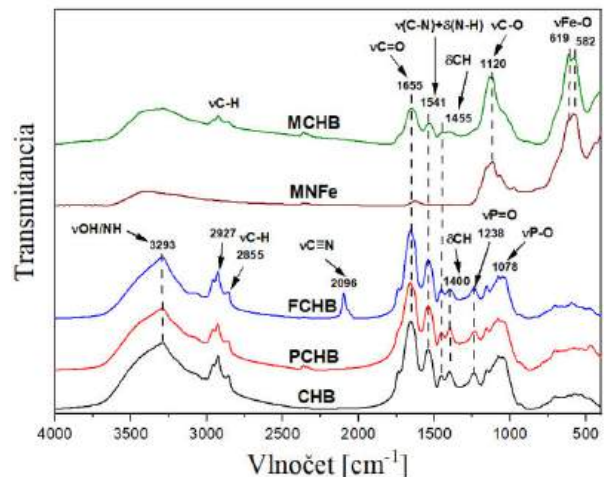
* semikvantitatívny podiel z pohľadu celkového zastúpenia prvkov vo vzorke.

Na Grafe 1 sú vyobrazené získané FT-IR spektra s vyznačením zistených vlnočtov a vibrácií

identifikujúcich príslušné väzby, resp. funkčné skupiny pre jednotlivé pripravené vzorky biosorbentov (FCHB, PCHB a MCHB) a magnetických nanočastíc MNFe, pri ktorých sa ako porovnávaciu vzorku použil nemodifikovaný biosorbent na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa* (CHB). Na základe charakteristických píkov zodpovedajúcich rôznym väzbám, resp. funkčným skupinám sme identifikovali pri vlnočte: $3\,293\text{ cm}^{-1}$ – valenčné vibrácie pre väzby O–H a N–H pozorované pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB, pričom tieto vibrácie môžu korešpondovať s peptidmi a viazanou vodou v biosorbente; $2\,927\text{ cm}^{-1}$ – asymetrické valenčné vibrácie pre CH_2 a CH_3 , ktoré sa opäť identifikovali pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB, a môžu reprezentovať alkylové reťazce, prípadne lipidy; $2\,855\text{ cm}^{-1}$ – symetrická valenčná vibrácia pre CH_2 a CH_3 s totožným opisom ako je uvedené pri asymetrických vibráciách; $2\,096\text{ cm}^{-1}$ – valenčné vibrácie zodpovedajúce väzbe $\text{C}\equiv\text{N}$, ktoré boli opísané len v prípade biosorbentu FCHB. To potvrdzuje inkorporáciu CN skupiny pochádzajúcej z modifikačného činidla $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; $1\,655\text{ cm}^{-1}$ – valenčné vibrácie identifikujúce väzbu $\text{C}=\text{O}$, ktoré boli potvrdené pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB, pričom môžu zodpovedať predovšetkým peptidom a karboxylovým skupinám; $1\,547\text{ cm}^{-1}$ – valenčné vibrácie pre väzby C–N a deformačné vibrácie pre väzby N–H pozorované pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB, pričom tieto vibrácie môžu korešpondovať najmä s peptidmi; $1\,455\text{ cm}^{-1}$ – deformačné vibrácie pre CH_2 a CH_3 , ktoré boli identifikované pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB; $1\,400\text{ cm}^{-1}$ – deformačné vibrácie pre väzby C–H, ktoré boli opísané pri všetkých pripravených biosorbentoch CHB, FCHB, PCHB a MCHB, a môžu zodpovedať aj karboxylom; $1\,238\text{ cm}^{-1}$ – asymetrické valenčné vibrácie pre $\text{P}=\text{O}$, ktoré sa potvrdili pri biosorbentoch CHB, PCHB a FCHB, pričom môžu korešpondovať s výskytom fosfátových skupín; $1\,120\text{ cm}^{-1}$ – valenčné vibrácie pre väzby C–O, ktoré sa zistili len pri magnetickom biosorbente MCHB a magnetických nanočasticiach MNFe. Teda s najväčšou pravdepodobnosťou súvisia s MNFe; $1\,078\text{ cm}^{-1}$ – symetrické valenčné vibrácie pre väzby P–O pozorované pri biosorbentoch CHB, FCHB a PCHB, pričom tieto vibrácie môžu korešpondovať s výskytom fosfátových skupín; 619 cm^{-1} – valenčné vibrácie pre väzby Fe–O, ktoré sa identifikovali len pri magnetickom biosorbente MCHB a magnetických nanočasticiach MNFe. Tieto vibrácie reprezentujú mriežkový mód oxidov železa (spinelová Fe(III) zložka);

582 cm^{-1} – valenčné vibrácie pre väzby Fe–O, ktoré boli opäť potvrdené len pri magnetickom biosorbente MCHB a magnetických nanočasticiach MNFe, a súvisia najmä s mriežkovým módom (menej oxidovaná fáza).

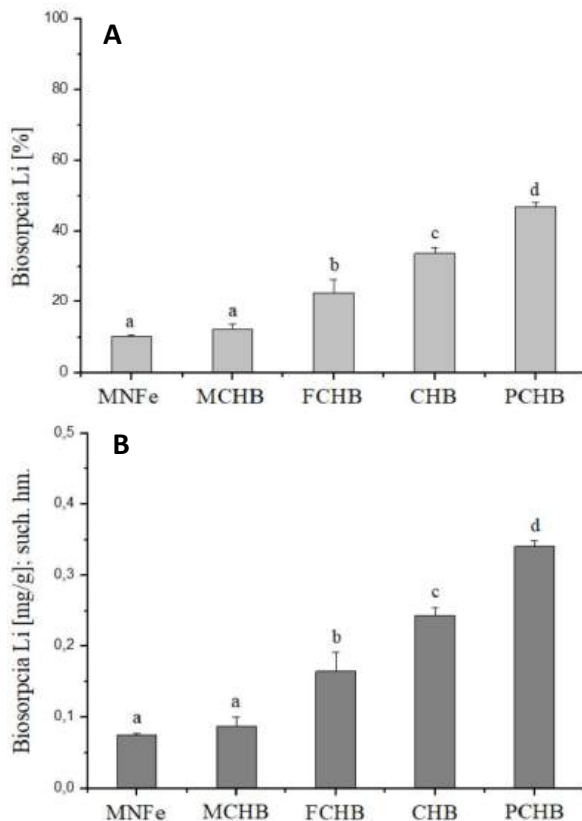
FT-IR analýza nám potvrdila prítomnosť bežne sa vyskytujúcich väzieb (O–H, N–H, C–H, C–N, P–O, C=O a P=O), resp. príslušných funkčných skupín v suchej biomase zelených rias *C. pyrenoidosa*, resp. pri všetkých pripravených biosorbentoch. V prípade biosorbentu chemicky modifikovaného pomocou $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (FCHB) nám táto analýza odhalila špecifickú inkorporáciu CN skupiny. Naopak, pri biosorbente chemicky modifikovaného pomocou H_3PO_4 (PCHB) sme nezistili signifikantnú zmenu v kvalitatívnom zastúpení väzieb, resp. očakávaných príslušných funkčných skupín potvrdzujúcich úspešnú fosforyláciu tohto biosorbentu. V prípade magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu (MCHB) sme jednoznačne potvrdili prítomnosť väzieb Fe–O, a teda úspešnú väzbu medzi biomasou *C. pyrenoidosa* a nanočasticami Fe_3O_4 .



Graf 1 Porovnanie získaných spektier z FT-IR analýzy biosorbentu na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa* (CHB), chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (FCHB), chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou H_3PO_4 (PCHB), magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu (MCHB) o veľkosti častíc $< 300\ \mu\text{m}$ a zároveň $> 150\ \mu\text{m}$. Na grafe sú vyznačené zistené vlnočty a vibrácie identifikujúce príslušné väzby. Popis vibračných kmitov: ν - valenčný, δ - deformačný.

Následne sme uskutočnili biosorpčné experimenty zamerané na hodnotenie účinnosti biosorpcie Li^+ iónov, resp. biosorpčnej kapacity nemodifikovaného biosorbentu pripraveného na báze suchej biomasy *C.*

pyrenoidosa, ako aj chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou $K_4[Fe(CN)_6]$ (FCHB), fosforylačne modifikovaného biosorbentu pomocou H_3PO_4 (PCHB), pripravených magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu pripraveného na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa* a nanočastíc Fe_3O_4 (MCHB) pre viazanie Li^+ iónov z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $5,8 \text{ mg/dm}^3 Li$.



Graf 2 Porovnanie biosorpcie Li pripravenými biosorbentmi na báze suchej biomasy *C. pyrenoidosa* (CHB), chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou $K_4[Fe(CN)_6]$ (FCHB), chemicky modifikovaného biosorbentu pomocou H_3PO_4 (PCHB), magnetických nanočastíc Fe_3O_4 (MNFe) a magnetického biosorbentu (MCHB) o veľkosti častíc $< 300 \mu m$ a zároveň $> 150 \mu m$ (koncentrácia biosorbentu $C_B = 1,0 \text{ g/dm}^3$; such. hm.) z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $5,8 \text{ mg/dm}^3 Li$, $pH = 6,85$. Expozícia prebiehala na rotačnej trepačke (150 ot./min) počas 24 h a pri $25 \text{ }^\circ C$. Biosorpcia Li vyjadrená v %-tách z celkového množstva Li v roztoku (A) a v mg/g (such. hm.; B). Rôzne písmená nad chybovými úsečkami reprezentujúcimi smerodajné odchýlky aritmetického priemeru výsledkov troch nezávislých experimentov ($\pm SD$; $n = 3$) indikujú štatisticky významné rozdiely pri hladine významnosti $P \leq 0,05$.

Na Grafe 2 porovnáваме biosorpčné charakteristiky pripravených biosorbentov v tomto smere. V rámci tohto porovnania sme zistili, že najvyššiu biosorpčnú účinnosť, ako aj kapacitu viazania Li^+ iónov vykazoval fosforylovaný biosorbent (PCHB), pričom táto účinnosť klesala v poradí: PCHB – 47,0 % ($0,340 \pm 0,007 \text{ mg/g}$; such. hm.) > CHB – 33,7 % ($0,244 \pm 0,011 \text{ mg/g}$; such. hm.) > FCHB – 22,7 % ($0,164 \pm 0,027 \text{ mg/g}$; such. hm.) > MCHB – 12,2 % ($0,088 \pm 0,012 \text{ mg/g}$; such. hm.) > MNFe – 10,3 % ($0,075 \pm 0,003 \text{ mg/g}$; such. hm.). Z uvedeného vyplýva, že vyššiu biosorpčnú kapacitu k viazaniu Li^+ iónov za daných podmienok v porovnaní s pôvodným, nemodifikovaným biosorbentom CHB zaznamenal len fosforylovaný biosorbent PCHB. Ostatné modifikované biosorbenty vykazovali signifikantne nižšiu biosorpčnú kapacitu ako pôvodný biosorbent CHB. Najnižšiu účinnosť biosorpcie Li^+ iónov dosiahli pripravené nanočastice MNFe a o niečo vyššie hodnoty sa pozorovali pri magnetickom biosorbente MCHB. Je však potrebné podotknúť, že pri tejto modifikácii sme skôr chceli demonštrovať možnosť modifikácie biosorbentu, ktorej cieľom by bolo zefektívniť jeho uplatnenie v praxi v zmysle jeho technologicky jednoduchšej separácie z roztoku. Túto novú vlastnosť tohto biosorbentu sme experimentálne potvrdili. V tomto kontexte by v ďalšom riešení tejto problematiky stálo za úvahu uskutočniť dvojnásobnú sekvenčnú modifikáciu, kedy v prvom kroku by sme pripravili fosforyláciu modifikovaný biosorbent PCHB a v druhom kroku by sme z neho pripravili jeho magnetickú verziu, čím by sme získali tzv. hybridný sorbent vykazujúci viacero aplikačne kľúčových charakteristík, ako je cenová výhodnosť, vysoká účinnosť separovania Li^+ iónov a jeho ľahká separovateľnosť z roztokov.

4 Záver

V rámci prípravy jednotlivých biosorbentov sa ukázalo, že najvyššiu celkovú výťažnosť prípravy biosorbentu z pohľadu všetkých vnesených reagentov sme dosiahli pri príprave magnetického biosorbentu (MCHB), pričom táto výťažnosť klesala v poradí: MCHB (46,7 %) > MNFe (45,6 %) > FCHB (36,4 %) > PCHB (4,8 %). FT-IR analýza nám potvrdila, že v prípade biosorbentu FCHB došlo k špecifickej inkorporácii CN skupiny. Naopak, pri PCHB sme nezistili signifikantnú zmenu v kvalitatívnom zastúpení väzieb, potvrdzujúcu úspešnú fosforyláciu tohto biosorbentu. V MNFe a MCHB sme potvrdili prítomnosť väzieb Fe–O. Tieto zistenia nám prakticky potvrdila aj SEM-EDX analýza. Pri testovaní biosorpčnej účinnosti jednotlivých pripravených biosorbentov z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $5,8 \text{ mg/dm}^3 Li$ sme zistili, že najvyššiu biosorpčnú účinnosť z pohľadu separovania Li^+ iónov vykazoval

fosforylovaný biosorbent (PCHB).

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená agentúrou APVV v rámci riešenia projektu č. APVV-24-0133.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MARTIN, Gunther; RENTSCH, Lars; HÖCK, Michael a BERTAU, Martin, (2017). Lithium market research – global supply, future demand and price development. *Energy Storage Materials*, vol. 6, pp. 171-179. ISSN 2405-8297.
- [2] YANG, Sixie; ZHANG, Fan; DING, Huaiping; HE, Ping a ZHOU, Haoshen, (2018). Lithium metal extraction from seawater. *Joule*, vol. 2, no. 9, pp. 1648-1651. ISSN 2542-4785.
- [3] TAN, Darren H.S.; XU, Panpan a Chen, Zheng, (2020). Enabling sustainable critical materials for battery storage through efficient recycling and improved design: A perspective. *MRS Energy & Sustainability*, vol. 7, 27. ISSN 2329-2237.
- [4] HU, Jiangtao; JIANG, Yuan; LI, Linze; YU, Zhaoxin; WANG, Chongmin; GILL, Gary; XIAO, Jie; CAVAGNARO, Robert J.; KUO, Li-Jung; ASMUSSEN, R. Matthew a LU, Dongping, (2022). A lithium feedstock pathway: Coupled electrochemical extraction and direct battery materials manufacturing. *ACS Energy Letters*, vol. 7, no. 8, pp. 2420-2427. ISSN 2380-8195.
- [5] YU, Hanwei; NAIDU, Gayathri; ZHANG, Chunyao; WANG, Chen; RAZMJOU, Amir; HAN, Dong Suk; HE, Tao a SHON, Hokyong, (2022). Metal-based adsorbents for lithium recovery from aqueous resources. *Desalination*, vol. 539, 115951. ISSN 1873-4464.
- [6] SWAIN, Basudev, (2017). Recovery and recycling of lithium: A review. *Separation and Purification Technology*, vol. 172, pp. 388-403. ISSN 1873-3794.
- [7] AMBROSE, Hanjiro a KENDALL, Alissa, (2020). Understanding the future of lithium: Part 2, temporally and spatially resolved life-cycle assessment modeling. *Journal of Industrial Ecology*, vol. 24, no. 1, pp. 90-100. ISSN 1530-9290.
- [8] MARTHI, Rajashekhar a SMITH, York R., (2021). Application and limitations of a H_2TiO_3 – Diatomaceous earth composite synthesized from titania slag as a selective lithium adsorbent. *Separation and Purification Technology*, vol. 254, 117580. ISSN 1873-3794.
- [9] XU, Jiaqi a CHEN, Pan, (2024). Selective biosorption of Li^+ in aqueous solution by lithium ion-imprinted material on the surface of chitosan/attapulgit. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 273, 133150. ISSN 0141-8130.
- [10] PUTRA, Andri Rahma; TACHIBANA, Yu; TANAKA, Masahiro a SUZUKI, Tatsuya, (2018). Lithium isotope separation using displacement chromatography by cation exchange resin with high degree of cross-linkage. *Fusion Engineering and Design*, vol. 136, pp. 377-380. ISSN 0920-3796.
- [11] HONGCHANG, Pei; FENG, Yan; HAO, Liu; TUANLE, Li; MINGXIA, Wang; JIANXIN, Li; XIAOHUA, Ma; ZHENYU, Cui a BENQIAO, He, (2019). Formoxylbenzo-15-crown-5 ether functionalized PVA/NWF composite membrane for enhanced $^7Li^+$ enrichment. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 97, pp. 496-502. ISSN 1876-1070.
- [12] LI, Jia; ZHANG, Guoquan; LI, Gaomiao; YAN, Yue; HE, Jun a ZHANG, Ying, (2026). Separation of lithium from magnesium in salt lake brine via ammonium carbonate precipitation. *Minerals Engineering*, vol. 237, 110010. ISSN 1872-9444.
- [13] LI, Tianyu; LV, Huitao; CHEN, Jiaqi; PENG, Chao; XUE, Yun; MA, Fuqiu; ZHENG, Yanghai; GUO, Sheng rong a YAN, Yongde, (2026). Electromigration separation of lithium isotopes in choline chloride-ethylene glycol deep eutectic solvent systems. *Separation and Purification Technology*, vol. 382, 135730. ISSN 1873-3794.
- [14] MORITA, Kenji; ISHII, Kodai; SEKIYA, Makiko; TANAKA, Yumiko a HOSHINO, Tsuyoshi, (2023). Effects of applied voltages on Lithium-6 enrichment by electrodialysis with lithium ionic conductor. *Fusion Engineering and Design*, vol. 190, 113521. ISSN 0920-3796.
- [15] WANG, Lei; WANG, Lei a LI, Lingping, (2023). Preparation of PVC-LMZO membrane and its lithium adsorption performance from brine. *Desalination*, vol. 561, 116689. ISSN 1873-4464.
- [16] KHALIL, Abdullah; MOHAMMED, Shabin; HASHAIKEH, Raed a HILAL, Nidal, (2022). Lithium recovery from brine: Recent developments and challenges. *Desalination*, vol. 528, 115611. ISSN 1873-4464.
- [17] OROOJI, Yasin; NEZAFAT, Zahra; NASROLLAHZADEH, Mahmoud; Shafiei, Nasrin; AFSARI, Morteza; PAKZAD, Khatereh a RAZMJOU, Amir, (2022). Recent advances in nanomaterial development for lithium ion-sieving technologies. *Desalination*, vol. 529, 115624. ISSN 1873-4464.
- [18] XU, Ping; HONG, Jun; QIAN, Xiaoming; XU, Zhiwei; XIA, Hong; TAO, Xuchen; XU, Zhenzhen a NI, Qing-Qing, (2021). Materials for lithium recovery from salt lake brine. *Journal of Materials Science*, vol. 56, pp. 16-63. ISSN 1573-4803.

- [19] SARANGI, Naduvil Veettil; RAJKUMAR, Renganathan; KUMAR, Nadavala Siva; ARUNKUMAR, Priya; ALROMAEH, Abdulaziz I.; ALRESHAIDAN, Salwa a AL-FATESH, Ahmed S., (2025). Seaweed biosorption: A green solution for heavy metal remediation in aquatic and soil environments. *Desalination and Water Treatment*, vol. 321, 101036. ISSN 1944-3986.
- [20] GOOTY, Jaffer Mohiddin; MANDALA, Srinivasulu; MOSQUERA, Juan Alejandro Neira; LLAGUNO, Sungey Naynee Sánchez a MALIK, Junaid Ahmad, (2022). Role of biosorption technology in removing cadmium from water and soil. In: MALIK, Junaid Ahmad. *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*. Cambridge : Elsevier, pp. 405-422. ISBN 978-3-030-91342-1.
- [21] DEVI, Anuradha; VERMA, Meenakshi; SARATALE, Ganesh Dattatraya; SARATALE, Rijuta Ganesh; FERREIRA, Luiz Fernando R.; MULLA, Sikandar I. a BHARAGAVA, Ram Naresh, (2023). Microalgae: A green eco-friendly agents for bioremediation of tannery wastewater with simultaneous production of value-added products. *Chemosphere*, vol. 336, 139192. ISSN 1879-1298.
- [22] KUMAR, Mahendra; SETH, Aparna; SINGH, Alak Kumar; RAJPUT, Manish Singh a SIKANDAR, Mohd, (2021). Remediation strategies for heavy metals contaminated ecosystem: A review. *Environmental and Sustainability Indicators*, vol. 12, 100155. ISSN 2665-9727.
- [23] HEGDE, Shubha M.; BABU, R.L.; VIJAYALAKSHMI, E.; PATIL, Rajeshwari H.; KUMAR, M. Naveen; KUMAR, K.M. Kiran; NAGESH, Rashmi; Kavya, K. a SHARMA, S. Chidananda, (2016). Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution using chemically modified *Spirulina platensis* algal biomass: an ecofriendly approach. *Desalination and Water Treatment*, vol. 57, pp. 8504-8513. ISSN 1944-3994.
- [24] LEBRON, Y.A.R.; MOREIRA, V.R. a SANTOS, L.V.S., (2019). Studies on dye biosorption enhancement by chemically modified *Fucus vesiculosus*, *Spirulina maxima* and *Chlorella pyrenoidosa* algae. *Journal of Cleaner Production*, vol. 240, 118197. ISSN 0959-6526.
- [25] DABBAGH, R.; EBRAHIMI, M.; AFLAKI, F.; GHAFOURIAN, H. a SAHAFIPOUR, M.H., (2008). Biosorption of stable cesium by chemically modified biomass of *Sargassum glaucescens* and *Cystoseira indica* in a continuous flow system. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 159, no. 2-3, pp. 354-357. ISSN 0304-3894.
- [26] YABUSAKI, K., (2010). *Cellulose II phosphate ester and metal-adsorbing material using the same*. Japonsko. Patent US7803937B2. Dátum publikovania: 2010-09-28.
- [27] EBRAHIMIAN PIRBAZARI, A.; SABERIKHAH, E. a HABIBZADEH KOZANI, S.S., (2014). Fe₃O₄-wheat straw: preparation, characterization and its application for methylene blue adsorption. *Water Resources and Industry*, vol. 7-8, pp. 23-37. ISSN 2212-3717.
- [28] LIN, Huan-Cheng; LIU, Yi-Ju a YAO, Da-Jeng, (2024). Preparation of magnetic microalgae composites for heavy metal ions removal from water. *Heliyon*, vol. 10, no. 18, e37445. ISSN 2405-8440.
- [29] HUO, Huashuang; YU, Yuanyuan; ZHANG, Xiaoxuan; TANG, Mengqi; CHEN, Changzhou; WANG, Shuangfei a MIN, Douyong, (2022). Phosphorylated wood designed as a biosorbent for effectively removing Ni²⁺ from wastewater. *Industrial Crops and Products*, vol. 188, 115727. ISSN 1872-633X.

Celulolytická aktivita baktérií izolovaných z drevených húb

Cellulolytic activity of bacteria isolated from wood-decaying fungi

¹Janka Kureková – ²školiťel: Terézia Beck

^{1,2} Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹jkurekova2@student.umb.sk, ³terezia.gasparcova@umb.sk

Abstrakt

Rozklad dreva je komplexný proces, na ktorom sa podieľajú drevené huby spolu s baktériami, ktoré s nimi často vytvárajú ekologické interakcie. Cieľom príspevku bolo izolovať a identifikovať baktérie asociované s bazídiokarpami drevených húb z troch vybraných lokalít Slovenska a predbežne overiť ich schopnosť degradovať celulózu. Zo 14 odobraných bazídiokarpov boli huby na základe makromorfologických znakov determinované ako *Phellinus igniarius*, *Fomitopsis betulina*, *F. pinicola*, *Trametes versicolor*, *T. gibbosa* a *T. hirsuta*. Z bazídiokarpov bolo izolovaných 78 bakteriálnych izolátov. Baktérie boli identifikované pomocou MALDI-TOF MS analýzy (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), pričom medzi najčastejšie zastúpené patrili rody *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Achromobacter*. Schopnosť 46 bakteriálnych baktérií degradovať celulózu bola testovaná metódou „Congo Red Staining method“ s využitím živného média CMC. Celulolytická aktivita bola potvrdená pri 12 izolátoch, pričom najvyššiu aktivitu vykázal izolát *Pseudomonas* sp. Získané výsledky naznačujú, že baktérie asociované s bazídiokarpami drevených húb môžu predstavovať potenciálny zdroj mikroorganizmov využiteľných pri degradácii ťažko rozložiteľnej lignocelulózovej biomasy.

Kľúčové slová: drevené huby, baktérie, celulolytické baktérie, degradácia, celulóza

Abstract

Wood decomposition is a complex process involving wood-decaying fungi along with bacteria that often form ecological interactions with them. The aim of this study was to isolate and identify bacteria associated with the basidiocarps of wood-decaying fungi from three locations in Slovakia and to preliminarily assess their ability to degrade cellulose. Based on macromorphological characteristics, the 14 collected basidiocarps were identified as *Phellinus igniarius*, *Fomitopsis betulina*, *F. pinicola*, *Trametes versicolor*, *T. gibbosa*, and *T. hirsuta*. A total of 78 bacterial isolates were obtained from the basidiocarps. The bacteria

were identified using MALDI-TOF MS analysis (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), with the most frequently represented genera being *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Achromobacter*. The ability of the bacteria to degrade cellulose was tested using the Congo Red staining method on CMC medium. Cellulolytic activity was confirmed in 12 isolates, with the highest activity observed in a *Pseudomonas* sp. isolate. These results suggest that bacteria associated with the basidiocarps of wood-decaying fungi may represent a potential source of microorganisms useful for the degradation of recalcitrant lignocellulosic biomass.

Key words: wood-decaying fungi, bacteria, cellulolytic bacteria, degradation, cellulose

Úvod

Drevené huby sú významnou skupinou organizmov podieľajúcich sa na rozklade drevenej hmoty, čím prispievajú ku neustálemu kolobehu živín vo všetkých lesných ekosystémoch [1]. Drevená hmota je tvorená najmä lignocelulózou, ktorej hlavné zložky – lignín, hemicelulózy a celulóza – sú vysoko odolné voči degradácii [2]. Drevené huby sú však schopné tieto komplexné polyméry kolonizovať a rozkladať prostredníctvom enzymatických aj neenzymatických mechanizmov. Na základe degradačných stratégií a schopnosti rozkladať lignín sa tieto huby zvyčajne delia do troch hlavných skupín: huby spôsobujúce bielu hnilobu, hnedú hnilobu a mäkkú hnilobu [3].

Okrem drevených húb sa na rozklade dreva aktívne podieľajú aj baktérie, ktorých význam sa v posledných rokoch dostáva čoraz viac do popredia. Produkujú totiž celý rad enzýmov, ktoré im umožňujú degradovať organickú hmotu vrátane drevených substrátov [4]. Na základe spôsobu degradácie dreva sa tieto baktérie zvyčajne klasifikujú do dvoch skupín: tunelové a erózne baktérie [5, 6]. Bakteriálna degradácia je síce v porovnaní s degradáciou drevenými hubami pomalšia, avšak baktérie si vyvinuli špecifické mechanizmy a fyziologické adaptácie, ktoré im umožňujú získavať živiny z lignocelulózových substrátov v extrémnych podmienkach, napríklad v prostredí s nedostatkom kyslíka alebo s vysokými koncentraciami toxických

látok [5]. Okrem toho môžu s drevnými hubami vstupovať do rôznych pozitívnych aj negatívnych interakcií, ktoré ovplyvňujú rýchlosť rozkladu a dostupnosť živín v substráte [4]. Niektoré baktérie zohrávajú dôležitú úlohu pri podpore fungovania drevných húb degradujúcich lignocelulózu, napríklad fixáciou atmosférického dusíka alebo neutralizáciou zlúčenín, ktoré sú pre huby toxické [7]. Naopak, iná skupina baktérií prejavuje naopak antagonistické správanie voči iným organizmom kolonizujúcim ten istý drevný substrát [8]. Vylučovaním rôznych toxických zlúčenín môžu tieto baktérie inhibovať alebo úplne zastaviť rast konkurenčných organizmov, vrátane drevných húb [9].

Cieľom tejto štúdie bolo izolovať baktérie asociované s drevnými hubami odobratými vo vybraných lokalitách Slovenska, identifikovať ich pomocou MALDI-TOF MS a vykonať predbežný skrining na vyhodnotenie ich celulytickej aktivity, a tým prehĺbiť chápanie mikrobiálnych spoločenstiev zapojených do degradácie lignocelulózy a preskúmať potenciál týchto baktérií v biotechnologických aplikáciách.

1 Materiál a metodika

1.1 Odber bazídiokarpov drevných húb a ich determinácia

Zber bazídiokarpov drevných húb sme vykonali vo vybraných lokalitách Slovenska v mesiacoch jún až september v roku 2023, v zmiešanom lese v dedine Oravské Veselé, v Banskej Bystrici na miestnom cintoríne neďaleko Kostola Nanebovzatia Panny Márie, a vo Vrútkach v zmiešanom až listnatom lese. Pri determinácii drevných húb sme študovali makromorfologické znaky bazídiokarpov s využitím odbornej mykologickej literatúry [10, 11, 12, 13]. Sledovali sme najmä tvar a farbu klobúka, charakter povrchu, farbu dužiny, rúrok a kôry a hostiteľskú drevinu. Všetky študované bazídiokarpy sú uložené v Laboratóriu environmentálnej mikrobiológie na Katedre biológie a environmentálnych štúdií na Fakulte prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici. Nomenklatúru drevných húb uvádzame podľa databázy Index Fungorum [14] a nomenklatúru drevín podľa databázy International Plant Names Index [15].

1.2 Izolácia a kultivácia baktérií asociovaných s bazídiokarpami drevných húb

Na izoláciu baktérií z bazídiokarpov drevných húb sme použili tuhé kultivačné médium Tryptic Soy Agar (TSA,

Oxoid Limited, Spojené kráľovstvo), ktoré sme pripravili podľa návodu výrobcu (40 g média na 1 l destilovanej vody) a sterilizovali 20 minút pri teplote 121 °C v autokláve (Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Satuelle, Nemecko). Po ochladení sme médium v sterilných podmienkach rozliali do plastových Petriho misiek a nechali stuhnúť do druhého dňa.

Zo všetkých bazídiokarpov odobratých v teréne sme bezprostredne po prenesení do laboratória v sterilných podmienkach odobrali pomocou sterilného skalpela časti kôry, dužiny a rúrok. V prípadoch, keď bola na bazídiokarpoch prítomná aj kôra dreva alebo zvyšky dreva kolonizovanej dreviny, pokúsili sme sa o izoláciu baktérií aj z týchto častí. Odobratý materiál sme sterilne umiestnili na Petriho misky s pripraveným médium TSA. Každú Petriho misku sme označili identifikačným číslom huby, dátumom izolácie a skratkami odobratých častí bazídiokarpov, prípadne častí dreviny. Petriho misky sme následne kultivovali pri teplote 36 °C v termostate (Laboratory Thermostatic Cabinet ST 2 COMF) počas 48 až 72 hodín. Narastené bakteriálne kolónie, ktoré bolo možné odpichnúť, sme pomocou sterilných bakteriologických očiek preočkovali na nové Petriho misky s médium TSA a označili vlastným kódom vzorky.

1.3 Identifikácia baktérií pomocou MALDI-TOF MS

Všetky vykultivované bakteriálne izoláty sme identifikovali pomocou MALDI-TOF MS. Pri identifikácii sme najskôr použili priamu metódu odporúčanú výrobcom. Malé množstvo čerstvo narastenej bakteriálnej biomasy sme pomocou sterilného špáradla preniesli na MALDI doštičku (MSP 96 target polished steel BC, Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko), nechali zaschnúť pri laboratórnej teplote a následne prekryli 1 µl MALDI matrice (IVD Matrix HCCA-portioned, Bruker Daltonics, Bruker, Nemecko; 1% roztok kyseliny alfa-kyano-4-hydroxy škoricovej v roztoku 50% acetonitril, 47,5% voda a 2,5% kyselina triflóroctová) opäť sme ich nechali vyschnúť pri laboratórnej teplote. Každú vzorku sme analyzovali na prístroji Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko) s použitím softvéru flexControl verzia 3.4 (Bruker Daltonics). Kalibrácia bola vykonaná s použitím Bruker Bacterial Test Standard for Mass Spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko). Pri MALDI-TOF MS boli použité tieto nastavenia: spectrometer ion source 1 – 19.98kV, source 2 – 18.03kV, lens – 6.00kV, laser frequency – 60Hz. Spektrá boli zaznamenávané v rozmedzí 1960 – 20 137 Da. Všetky vygenerované MALDI spektrá boli

analyzované pomocou softvéru MALDI Biotyper, verzia 4.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko) a porovnávané s referenčnou databázou MBT Compass Library Revision K (2022) na identifikáciu izolátov. Miera zhody bola vyjadrená prostredníctvom skóre v súlade s odporúčaniami výrobcu. Hodnoty v rozmedzí 2.00 – 3.00 boli interpretované ako vysoko spoľahlivá identifikácia, skóre v intervale 1.70 – 1.99 predstavovalo nízku mieru spoľahlivosti a hodnoty v rozsahu 0.00 – 1.69 sa považovali za neúspešnú identifikáciu organizmu.

Bakteriálne izoláty, ktoré nebolo možné spoľahlivo identifikovať priamou metódou, sme následne podrobili extrakčnej metóde odporúčanej výrobcom. Malé množstvo bakteriálnej kultúry sme rozsuspendovali v sterilných mikroskúmavkách v 300 μ l destilovanej vody (LC-MS CHROMASOVOL[®], Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, USA). Do mikroskúmaviek sme následne pridali 900 μ l absolútneho etanolu (Sigma-Aldrich, Nemecko). Všetky vzorky sme dôkladne premiešali na vortexe (Vortex V-1 plus, Lotyšsko) a centrifugovali po dobu 2 minút pri maximálnej rýchlosti (17350g) na centrifúge Mikro 120 centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Nemecko). Z každej vzorky sme odstránili pomocou pipety supernatant a získané pelety sme nechali vysušiť v otvorených mikroskúmavkách. K vysušeným peletom sme pridali 50 μ l 70% kyseliny mravčej (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Nemecko) a 50 μ l 100% acetonitrilu (OTIMA[®] LC/MS GRADE, Fisher Scientific, Spojené kráľovstvo). Vzorky sme opäť pomocou vortexu dôkladne premiešali a centrifugovali pri maximálnej rýchlosti. Následne sme na MALDI doštičku preniesli 1 μ l supernatantu a nechali vyschnúť pri laboratórnej teplote. Vysušené vzorky sme prekryli 1 μ l MALDI matrice a opäť nechali vyschnúť pri laboratórnej teplote. Každú vzorku sme analyzovali na prístroji Microflex LT rovnako ako pri priamej metóde.

1.4 Predbežný skrining celulózu degradujúcich baktérií izolovaných z bazídiokarpov drevných húb

Na predbežné overenie schopnosti bakteriálnych izolátov degradovať celulózu sme použili metódu „Congo Red Staining method“ na médiu CMC (carboxymethylcellulose) podľa Kumar et al. (2018) [16]. Pred samotným experimentom sme si pripravili kultúry všetkých testovaných bakteriálnych izolátov v tekutom médiu Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid Limited, Spojené kráľovstvo), ktoré sme inkubovali 24 až 48 hodín pri teplote 36 °C v teplovzdušnej trepačke IKA[®]

KS 4000 i control (IKA – WERKE GMBH & CO. KG, Nemecko) Na skrining celulólytickej aktivity sme pripravili CMC médium podľa Kumar et al. (2018) [16], ktoré obsahovalo 0,05% K₂HPO₄; 0,025% MgSO₄; 0,188% CMC sodium salt (carboxymethylcellulose sodium salt) (Čaderský-Envitek spol s.r.o, Česká republika); agar (Agar, Bacteriological, American Type No. 2, Neogen, USA). Podmienky sterilizácie boli 20 minút pri teplote 121°C v autokláve (Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Satuelle, Nemecko). Pripravené médium sme nechali mierne vychladnúť pri laboratórnej teplote a následne v očkovacích boxe (Biosafety Cabinet BSC-700II-I, HMC-Europe, Germany) rozliali do sterilných plastových Petriho misiek s priemerom 85 mm. Médium sme nechali stuhnúť do druhého dňa. Za pomoci pipety sme na stuhnuté médium naočkovali do stredu Petriho misky 5 μ l kultúry bakteriálnych izolátov (každý bakteriálny izolát osobitne na 1 Petriho misku). Petriho misky sme vložili do termostatu (Laboratory Thermostatic Cabinet ST 2 COMF), kde sa kultivovali pri teplote 36 °C pokým sme zaznamenali nárast bakteriálneho izolátu (približne 4–6 dni), a následne sme baktérie ešte nechali kultivovať 48 hodín.

Po ukončení kultivácie sme Petriho misky zaliali roztokom 0,1 % Congo Red a inkubovali 15 – 20 minút pri laboratórnej teplote. Následne sme farbivo zliali a misky sme zaliali roztokom 1 M NaCl, v ktorom sme ich inkubovali ďalších 15 – 20 minút. Po odstránení roztoku sme sledovali vznik priehľadných (odfarbených) zón v okolí narastených bakteriálnych kolónií, ktoré indikovali hydrolýzu celulózy. Ako negatívnu kontrolu sme použili Petriho misku s CMC médiom bez naočkovaného bakteriálneho izolátu, ktorú sme podrobili rovnakému postupu. V prípade izolátov, pri ktorých sa vytvorili priehľadné zóny, sme merali priemer kolónie (KD) a priemer vyčirenej zóny (ZD) a následne sme vypočítali pomer ZD/KD, ktorý sme použili na zistenie najvyššej celulólytickej aktivity bakteriálnych izolátov.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Odber drevných húb a ich determinácia

Vo vybraných lokalitách na Slovensku (v zmiešanom lese v dedine Oravské Veselé, v Banskej Bystrici na miestnom cintoríne neďaleko Kostola Nanebovzatia Panny Márie, a vo Vrútkach v zmiešanom až listnatom lese) sme odobrali spolu 14 bazídiokarpov drevných húb. Jednotlivé vzorky sme označili evidenčnými kódmi JK01, JK02, JK03, JK04, JK05, JK06, JK08, OV4, OV5,

JK014, JK015, JK017, JK018 a JK019. Na základe štúdia makromorfologických znakov odobraných bazídiokarpov sme zistili, že analyzované vzorky patrili do šiestich druhov drevných húb. Deväť odobraných bazídiokarpov drevných húb s evidenčnými číslami JK01, JK02, JK03, JK04, JK05, JK06, JK08, OV4, OV5 bolo identifikovaných ako *Phellinus igniarius* (L.) Quél. Ostatné bazídiokarpy boli identifikované ako: *Fomitopsis betulina* (Bull) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai (JK014), *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst (JK015), *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (JK017), *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. (JK018) a *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd (JK019). Prehľad študovaných bazídiokarpov a typu hniloby, ktorú spôsobujú uvádzame v Tabuľke 1.

2.2 Izolácia a identifikácia baktérií asociovaných s bazídiokarpmi drevných húb

Z analyzovaných bazídiokarpov bolo celkovo získaných 78 bakteriálnych izolátov, ktoré sme označili evidenčnými číslami JK1 – JK78. Všetky bakteriálne izoláty boli podrobené analýze MALDI-TOF MS na ich identifikáciu. Na základe získaného skóre boli izoláty so skóre v rozsahu 2,00 – 3,00 identifikované na úrovni druhu, zatiaľ čo pri hodnotách v rozsahu 1,70 – 1,99 boli identifikované na úrovni rodu. Izoláty so skóre nižším ako 1,69 neboli identifikované. Po identifikácii pomocou MALDI-TOF MS sme vyradili duplicitné izoláty rovnakého druhu pochádzajúce z toho istého bazídiokarpu. Prehľad rodov a druhov identifikovaných baktérií izolovaných z drevných húb uvádzame v Tabuľke 1.

MALDI-TOF MS analýza odhalila prítomnosť viacerých bakteriálnych taxónov, pričom najčastejšie sa vyskytovali rody *Bacillus* a *Pseudomonas*. Tieto výsledky korešpondujú s viacerými štúdiami [4, 17, 18], podľa ktorých sú bakteriálne spoločenstvá v bazídiokarpoch drevných húb druhovo pestré, no s častou dominanciou práve týchto dvoch rodov. Prítomnosť spomínaných baktérií môže mať pre hostiteľa funkčný význam, nakoľko sú v literatúre často popisované ako významní antagonisti drevokazných húb. Mnohé druhy (napr. *B. subtilis* či *P. fluorescens*) sa dokonca využívajú v biologickej ochrane dreva vďaka produkcii antifungálnych metabolitov [19, 20]. Okrem týchto rodov sme zaznamenali aj výskyt rodu *Ewingella*, ktorého zástupcovia sú podľa Lladó et al. (2017) [21] spojení s priamym rozkladom bazídiokarpov vďaka schopnosti produkovať chitinolytické enzýmy.

Bakteriálne izoláty však môžu s hostiteľskými hubami vstupovať aj do pozitívnych interakcií, ktoré sú

prospešné pre ich rast a prežívanie v dreve. Príkladom je rod *Raoultella* identifikovaný pri bazídiokarpe *Trametes hirsuta*, ktorý je v literatúre známy schopnosťou fixovať vzdušný dusík. Táto vlastnosť môže byť pre huby rastúce na substráte chudobnom na živiny, akým je drevo, významným prínosom pre ich celkový metabolizmus, čo vo svojej štúdií potvrdzujú Hoppe et al. (2014) [32].

Okrem predtým spomenutých interakcií medzi hubami a baktériami sa v našich vzorkách objavili aj taxóny, u ktorých je v literatúre popísaná významná úloha pri rozklade dreva a organických zlúčenín. Druhy rodu *Pseudomonas*, ktoré sme zaznamenali v rôznych bazídiokarpoch, sú metabolicky flexibilné baktérie schopné využívať produkty lignocelulózy a lignínu a ich úloha v rozklade aromatických zlúčenín bola preukázaná v predchádzajúcich štúdiách. Podobne aj členovia rodov *Bacillus*, *Stenotrophomonas* a *Achromobacter*, ktoré sme izolovali, sa často vyskytujú v prostrediach bohatých na lignocelulózu a aromatické produkty a boli spájaní s ligninolytickou aktivitou počas rozkladu organickej hmoty [33, 34, 35].

Tieto údaje dopĺňajú naše zistenia, že bakteriálne spoločenstvá asociované s bazídiokarpoch drevokazných húb nie sú len pasívnymi kolonizátormi, ale pravdepodobne aktívne participujú na mikrobiálnych procesoch súvisiacich s degradáciou lignocelulózy a transformáciou živín v rozkladajúcom sa dreve.

Zloženie bakteriálnych spoločenstiev v bazídiokarpoch je determinované viacerými faktormi, najmä druhom hostiteľa a fyzikálno-chemickými vlastnosťami substrátu [22]. Významným faktorom je taktiež typ hniloby (biela vs. hnedá), ktorý zásadným spôsobom mení pH a dostupnosť nutričov v dreve [23]. Vzhľadom na nerovnomerné zastúpenie analyzovaných vzoriek húb spôsobujúcich bielu a hnedú hnilobu v našej práci však nie je možné tieto dve skupiny z hľadiska ich mikrobiómu komplexne porovnávať. Jediným zaznamenaným rozdielom v kvalitatívnom zložení bola identifikácia rodu *Sporosarcina*, ktorý bol izolovaný výhradne z plodnice huby spôsobujúcej hnedú hnilobu (*Fomitopsis betulina*).“

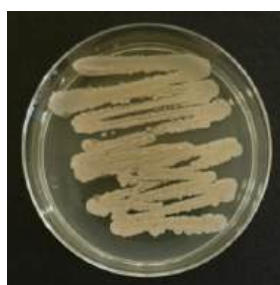
Tabuľka 1: Baktérie asociované s drevnými hubami

Drevná huba	Typ hniloby	Baktérie asociované s drevnou hubou
<i>Phellinus igniarius</i>	biela	<i>Ewingella americana</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>

		<i>Lelliottia amnigena</i> <i>Enterobacter bugandensis</i> 2 <i>Achromobacter</i> spp. Viacero druhov <i>Pseudomonas</i> spp. vrátane <i>Pseudomonas extremorientalis</i> <i>Pseudomonas synxantha</i> <i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Enterobacter asburiae</i>
<i>Fomitopsis betulina</i>	hnedá	2 <i>Bacillus</i> sp <i>Sporosarcina</i> sp.
<i>Fomitopsis pinicola</i>	hnedá	bakteriálne izoláty v počte 3 neidentifikované pomocou MALDI-TOF MS analýzy
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	biela	<i>Ochrobactrum</i> sp. <i>Lelliottia amnigena</i>
<i>Trametes gibbosa</i>	biela	2 <i>Bacillus</i> sp. 2 <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
<i>Trametes hirsuta</i>	biela	3 <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Raoultella terrigena</i>



JK66 *Bacillus pumilus*



JK71 *Lysinibacillus fusiformis*

Obrázok 1: Vybrané bakteriálne izoláty z bazídiokarpov drevných húb.

2.3 Predbežný skrining celulytickej aktivity bakteriálnych izolátov

Schopnosť degradovať celulózu sme testovali u 46 bakteriálnych izolátov metódou „Congo Red Staining method“ na médiu CMC. Po inkubácii sme pozorovali odfarbené, priehľadné zóny v okolí bakteriálnych kolónií. Pozitívny výsledok sme zaznamenali pri 12 izolátoch, konkrétne pri JK54 (*Bacillus pumilus*), JK69 (*Bacillus subtilis*), JK17 (neidentifikovaný izolát), JK58 (*Achromobacter* sp.), JK74 (*Pseudomonas* sp.), JK32 (neidentifikovaný izolát), JK61 (*Bacillus subtilis*), JK55 (*Bacillus subtilis*), JK64 (*Bacillus* sp.), JK66 (*Bacillus pumilus*), JK68 (*Pseudomonas* sp.) a JK60 (*Bacillus subtilis*).

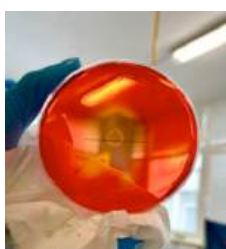
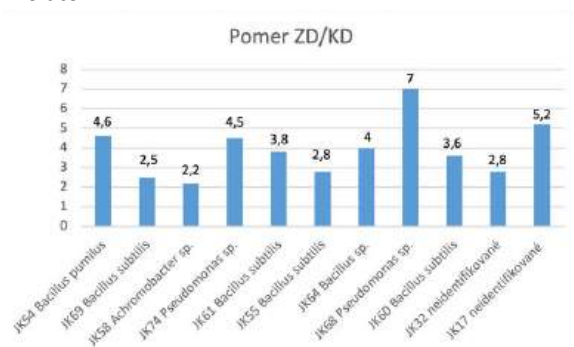
V prípade týchto izolátov sme merali priemer bakteriálnej kolónie (KD) a priemer vyčirenej zóny (ZD), na základe ktorých sme vypočítali pomer ZD/KD. Výnimkou bol izolát JK66 (*Bacillus* sp.), pri ktorom sa pomer ZD/KD nepodarilo určiť, keďže kolónia po inkubácii s použitými roztokmi nebola viditeľná, preto ho vo výsledkoch neuvádzame. Najvyššiu celulytickú aktivitu vykazoval izolát JK68 identifikovaný ako *Pseudomonas* sp., pri ktorom bol zistený pomer ZD/KD v hodnote 7. Vyššie hodnoty boli zaznamenané aj pri izolátoch JK17 (neidentifikovaný; 5,2) JK54 (*Bacillus pumilus*; 4,6), JK74 (*Pseudomonas* sp.; 4,5) a JK64 (*Bacillus* sp.; 4,0). Podrobné výsledky predbežného skriningu celulytickej aktivity bakteriálnych izolátov uvádzame v Grafe 1.

Napriek tomu, že v odbornej literatúre sú za primárnych producentov celulytických enzýmov považovaní zástupcovia rodu *Bacillus* [25, 26, 27], kľúčovým zistením našej práce je dominantná enzymatická aktivita izolátu z rodu *Pseudomonas*. Tento výsledok potvrdzuje, že viaceré druhy z tohto rodu disponujú účinným aparátom extracelulárnych celuláz, ktoré im umožňujú využívať celulózu ako primárny zdroj uhlíka [28, 29]. Podobné zistenia uvádzajú Viswanath a Beena (2018) [30], ktorí identifikovali druh *Pseudomonas fluorescens* ako producenta extracelulárnych celuláz schopných efektívne degradovať rôzne rastlinné materiály a poľnohospodársky odpad. Naše výsledky preto naznačujú, že baktérie rodu *Pseudomonas* môžu predstavovať významnú skupinu mikroorganizmov podieľajúcich sa na biodegradácii lignocelulóзовých materiálov.

Schopnosť degradovať celulózu sme v rámci predbežného skriningu zaznamenali u viacerých taxonomicky odlišných baktérií, pričom najpočetnejšie boli zastúpené izoláty rodu *Bacillus*. Tento výsledok je v súlade s prácami viacerých autorov [25, 26, 27], podľa ktorých zástupcovia tohto rodu patria medzi kľúčových producentov extracelulárnych enzýmov zodpovedných za degradáciu polysacharidov rastlinného pôvodu. Napríklad Meddeb-Mouelhi et al. (2016) [22] pri štúdiu baktérií izolovaných z rozkladajúceho sa dreva zaznamenali výrazný degradačný potenciál kmeňov *Bacillus subtilis*, zatiaľ čo Zhou et al. (2021) [27] poukázali na schopnosť viacerých druhov tohto rodu efektívne degradovať organický odpad. Podobné výsledky uvádzajú aj Rojas-Jiménez a Hernández (2015) [31], ktorí zaznamenali produkciu enzýmov ako celulóza, β -glukozidáza či β -xylanáza u bakteriálnych rodov *Bacillus*, *Enterobacter*

a *Acinetobacter*. Zistenie, že v našom prípade vykazoval najvyššiu celulytickú aktivitu práve izolát rodu *Pseudomonas*, však naznačuje, že schopnosť degradovať lignocelulóзовé substráty môže byť v mikrobiálnych spoločenstvách rozšírená medzi širším spektrom bakteriálnych taxónov. Keďže použitá metóda predstavovala iba predbežný skrining celulytickej aktivity, tieto zistenia bude potrebné potvrdiť ďalšími experimentmi.

Graf 1: Pomer ZD/KD u jednotlivých bakteriálnych izolátov



Obrázok 2: Fotografie bakteriálnych izolátov na CMC agare s priehľadnou zónou po farbení roztokmi 0,1 % Congo Red a 1 M NaCl

Záver

Cieľom práce bolo izolovať a identifikovať baktérie asociované s bazídiokarpami drevných húb a predbežne overiť ich schopnosť degradovať celulózu. Zo 14 odobratých bazídiokarpov patriacich šiestim druhom

drevných húb sme izolovali spolu 78 bakteriálnych izolátov, pričom po vylúčení opakujúcich sa baktérií bolo do predbežného skriningu celulytických baktérií zahrnutých 46 izolátov. Identifikácia pomocou MALDI-TOF MS analýzy potvrdila druhovú pestrosť bakteriálnych spoločenstiev asociovaných s bazídiokarpami, pričom najčastejšie sa vyskytovali rody *Pseudomonas* a *Bacillus*. Predbežný skrining celulytickej aktivity na CMC médiu ukázal schopnosť degradovať celulózu pri 12 izolátoch, pričom najvyššiu aktivitu preukázal izolát *Pseudomonas* sp. (JK68). Získané výsledky naznačujú, že baktérie asociované s bazídiokarpami drevných húb môžu predstavovať zaujímavý zdroj mikroorganizmov s potenciálnym využitím pri degradácii organického, lignocelulóзовého odpadu. V budúcnosti by tieto izoláty mohli nájsť uplatnenie aj pri zvyšovaní kvality pôdy, podpore rastu rastlín alebo pri výrobe biopalív a hnojív. Zároveň výsledky predstavujú vhodný základ pre ďalší výskum zameraný na detailnejšie štúdium génov spojených s degradáciou celulózy a lignínu a , ako aj na analýzu interakcií medzi drevnými hubami a asociovanými baktériami.

Podakovanie

Predovšetkým by som sa chcela poďakovať vedúcej práce RNDr. Terézii Beck, PhD., za odbornú pomoc a trpezlivosť pri tvorbe práce a príspevku. Práca je podporovaná projektom VEGA 1/0564/21.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] LONSDALE, D.; PAUTASSO, M. and HOLDENRIEDER, O., (2007). Wood-decaying fungi in the forest: conservation needs and management options. *European Journal of Forest Research*, vol. 127, no. 1, pp. 1-22. ISSN 1612-4677. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s10342-007-0182-6> [cit. 2026-02-20].
- [2] NILSSON, R., (2009). Biological Wood Degradation. In: Ek, Monica. *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*. Berlin: Walter De Gruyter, pp. 219-263. ISBN 9783110213409. Dostupné na: <https://doi.org/10.1515/9783110213409.219> [cit 2026-02-20].
- [3] LANGER, G. J.; BUŠKAMP, J.; TERHONEN, E. and BLUMENSTEIN, K., (2021). Fungi inhabiting woody tree tissues. In: *Forest Microbiology: The microbiome: phyllosphere, endosphere and rhizosphere*. Cambridge: Academic Press, pp. 175-205. ISBN 9780128225424. Dostupné

- na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822542-4.00012-7> [cit 2026-02-20].
- [4] JOHNSTON, S.; BODDY, L. and WEIGHTMAN, A. J., (2016). Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 92, no. 11. ISSN 1574-6941. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw179> [cit 2026-02-20].
- [5] SINGH, A. P. et al., (2016). Bacterial Degradation of Wood. In: Kim, Y. S. et al. *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, and Applications*. London: Academic Press, pp. 169–190. ISBN 9780128021859.
- [6] MARTÍN, J. A. and LÓPEZ, R., (2023). Biological Deterioration and Natural Durability of Wood in Europe. *Forests*, vol. 14, no. 2, 283. ISSN 1999-4907.
- [7] DE BOER, W. and VAN DER WAL, A., (2008). Interactions between saprotrophic basidiomycetes and bacteria. In: Boddy, L. *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. London: Elsevier, pp. 143-153. ISBN 9780123743442. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/S0275-0287\(08\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0275-0287(08)80010-0) [cit 2026-02-20].
- [8] GREAVES, H., (1971). The bacterial factor in wood decay. *Wood Science and Technology*, vol. 5, no. 1, pp. 6–16. ISSN 1432-5225. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/BF00363116> [cit 2026-02-20].
- [9] REINPRECHT, L., (2018). *Ochrana dreva*. Zvolen: Technická univerzita vo Zvolene, 316 s. ISBN 978-80-228-3136-9.
- [10] BERNICCHIA, A., (2005). *Polyporaceae s.l. Fungi Europaei*. Alasio: Candusso Edizioni, 808 s. ISBN 9788890105753.
- [11] HAGARA, L.; ANTONÍN, V. a BAYER, J., (2005). *Velký atlas húb*. Bratislava: Ottovo nakladateľstvo, 432 s. ISBN 9788073603335.
- [12] HOLEC, J.; BIELICH, A. a BERAN, M., (2012). *Přehled hub střední Evropy*. Praha: Academia, 624 s. ISBN 978-80-200-2077-2.
- [13] RYVARDEN, L. a MELO, I., (2014). *Poroid fungi of Europe*. Oslo: Fungiflora, 455 s. ISBN 978-82-90724-46-2.
- [14] RYVARDEN, L. a MELO, I., (2014). *Poroid fungi of Europe*. Oslo: Fungiflora, 455 s. ISBN 978-82-90724-46-2.
- [15] COOPER, J. a KIRK, P., (2024). *Index Fungorum*. Softvér. Dostupné na: <https://www.indexfungorum.org> [cit 2026-02-20].
- [16] *International Plant Names Index*, (2024). Softvér. Dostupné z: <https://www.ipni.org> [cit 2026-02-20].
- [17] KUMAR, A.; KAMESHWAR, A. S. and QIN, W., (2018). Isolation and Screening of Cellulose-Degrading Microorganisms from Different Ecological Niches. In: *Methods in Molecular Biology*. Switzerland: Springer, pp. 47-56. ISBN 978-1-4939-7877-9. Dostupné na: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_4 [cit 2026-02-20].
- [18] EMBACHER, J.; NEUHAUSER, S.; ZEILINGER, S. a KIRCHMAIR, M., (2020). Bacterial community associated with the dry-rot fungus *Serpula lacrymans* is dominated by Firmicutes and Proteobacteria. *bioRxiv*. Dostupné na: <https://doi.org/10.1101/2020.11.24.397216> [cit 2026-02-20].
- [19] REN, W.; PENTTILÄ, R.; KASANEN, R. a ASIEGBU, F. O., (2022). Bacteria Community Inhabiting Heterobasidion Fruiting Body and Associated Wood of Different Decay Classes. *Frontiers in Microbiology*, roč. 13. ISSN 1664-302X.
- [20] SUSI, P.; AKTUGANOV, G.; HIMANEN, J. and KORPELA, T., (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of Environmental Management*, vol. 92, no. 7, pp. 1689-1694. ISSN 0301-4797. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.03.004> [cit 2026-02-20].
- [21] CALDEIRA, A. T.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; ANTEIRO, J. M. and ROSEIRO, J. C., (2006). *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 in vitro activity against wood contaminant fungi. *Annals of Microbiology*, vol. 57, no. 1, pp. 29-33. ISSN 1590-4261. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/BF03175046> [cit 2026-02-20].
- [22] LLADÓ, S.; LOPÉZ-MONDEJÁR, R. and BALDRIAN, P., (2017). Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 81, no. 2. ISSN 1092-2172. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00063-16> [cit 2026-02-20].
- [23] MEDDEB-MOUELHI, F.; MOISAN, J. K. and BEAUREGARD, M., (2016). Characterization of Bacteria Community Isolated from Wood Decay. *British Biotechnology Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 1-14. ISSN 2231-2927. Dostupné na: <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/21512> [cit 2026-02-20].

- [24] ODRIOZOLA, I. et al., (2021). Fungal Communities Are Important Determinants of Bacterial Community Composition in Deadwood. *mSystems*, vol. 6, no. 4. ISSN 2379-5077. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/msystems.01017-20> [cit 2026-02-20].
- [25] HAQ, I.; HILLMANN, B.; MORAN, M. et al., (2022). Bacterial communities associated with wood rot fungi that use distinct decomposition mechanisms. *ISME Communications*, vol. 2, no. 1. ISSN 2730-6151. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00108-5> [cit 2026-02-20].
- [26] LOPÉZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K. a BALDRIAN, P., (2016). Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, roč. 6. ISSN 2045-2322.
- [27] BAUTISTA-CRUZ, A.; AQUINO-BOLAÑOS, T.; HERNÁNDEZ-CANSECO, J. and QUIÑONES-AGUILAR, E. E., (2024). Cellulolytic Aerobic Bacteria Isolated from Agricultural and Forest Soils: An Overview. *Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 1-22. ISSN 2079-7737. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/biology13020102> [cit 2026-02-22].
- [28] ZHOU, S.; ZHOU, H.; XIA, S. et al., (2021). Efficient bio-degradation of food waste through improving the microbial community compositions by newly isolated *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, roč. 321. ISSN 1873-2976. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124451> [cit 2026-02-20].
- [29] SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B. L. and GUPTA, S., (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*, vol. 2013. ISSN 2356-7872. Dostupné na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4393041/> [cit 2026-02-19].
- [30] HEMASREE, A. and DAWN, C. P. S., (2025). Exploring the Synergistic Potential of Lignocellulolytic Bacterial and Fungal Consortia for Enhanced Bio-Degradation. *BIO Web of Conferences*, vol. 123. ISSN 2117-4458. Dostupné na: https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/abs/2025/23/bioconf_nittebio2025_01002/bioconf_nittebio2025_01002.html [cit 2026-02-20].
- [31] VISHWANATH, M. et al., (2023). Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil. *Biomedical Research and Therapy*, vol. 10, no. 6. ISSN 2198-4093. Dostupné na: <https://br.biomedpress.org/index.php/br/article/view/775> [cit 2026-02-21].
- [32] ROJAS-JIMÉNEZ, K. and HERNÁNDEZ, M., (2015). Isolation of Fungi and Bacteria Associated with the Guts of Tropical Wood-Feeding Coleoptera and Determination of Their Lignocellulolytic Activities. *International Journal of Microbiology*, vol. 2015, Article ID 285018. ISSN 1687-918X. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2015/285018> [cit 2026-02-21].
- [33] HOPPE, T. et al., (2014). Network Analysis Reveals Ecological Links between N-Fixing Bacteria and Wood-Decaying Fungi. *PLOS ONE*, vol. 9, no. 2, e88141. ISSN 1932-6203. Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088141> [cit 2026-02-25].
- [34] RU, J. et al., (2025). High-efficiency degradation of wood waste by a newly isolated lignin-degrading bacterium *Bacillus anthracis* R-1. *Frontiers in Microbiology*, vol. 16, 1709019. ISSN 1664-302X. Dostupné na: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1709019> [cit 2026-02-24].
- [35] LIU, Q. et al., (2022). Deciphering the dominant components and functions of bacterial communities for lignocellulose degradation at the composting thermophilic phase. *Bioresource Technology*, vol. 348, 126801. ISSN 0960-8524. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126801> [cit 2026-02-20].
- [36] RANA, H. et al., (2025). The Structural and Functional Diversities of Bacteria Inhabiting Plant Woody Tissues and Their Interactions with Fungi. *Microorganisms*, vol. 13, no. 1, 212. ISSN 2076-2607. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010212> [cit 2026-02-20].

Antibakteriálna a antibiofilmová aktivita laktobacilov voči biofilm tvoriacim patogénom

Antibacterial and antibiofilm activity of lactobacilli against biofilm-forming pathogens

Michaela Lajčinová¹ – Lucia Bocánová^{1,2} – Gabriela Bukovská²

¹ Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

² Oddelenie genomiky a biotechnológií, Ústav molekulárnej biológie, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava

¹lajcinova1@ucm.sk, ^{1,2}lucia.bocanova@savba.sk, ²gabriela.bukovska@savba.sk

Abstrakt

Baktérie mliečneho kvasenia, vrátane laktobacilov, produkujú bioaktívne látky, ako sú biosurfaktanty a bakteriocíny, ktoré predstavujú perspektívnu alternatívu k tradičným antimikrobiálnym látkam. Cieľom výskumu bolo analyzovať antibakteriálnu a antibiofilmovú aktivitu laktobacilov a ich bezbunkových supernatantov (CFS) voči biofilm tvoriacim patogénom *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Antibakteriálna aktivita laktobacilov bola hodnotená modifikovanou difúznou metódou na agarových platniach (metóda oneskoreného antagonizmu) meraním vzniknutých inhibičných zón. Antibiofilmová aktivita CFS bola testovaná *in vitro* v 96-jamkových mikrotitračných platničkách pri rôznych koncentráciách CFS. Tvorba biofilmu bola vizualizovaná farbením kryštálovou violeťou a kvantifikovaná spektrofotometricky. Výrazný inhibičný účinok preukázali najmä vaginálne izoláty voči *S. aureus* a *S. agalactiae*. V prípade *P. aeruginosa* boli výsledky variabilnejšie a menej konzistentné. Výsledky potvrdzujú potenciál laktobacilov ako zdroja bioaktívnych látok schopných inhibovať rast patogénov a tvorbu biofilmu, ako aj ich možné využitie pri vývoji probiotík zameraných na prevenciu infekcií spojených s biofilmom.

Kľúčové slová: laktobacily, bezbunkový supernatant, biofilm

Abstract

Lactic acid bacteria, including lactobacilli, produce bioactive compounds such as biosurfactants and bacteriocins, representing a promising alternative to conventional antimicrobial agents.

This study analysed the antibacterial and antibiofilm activity of lactobacilli and their cell-free supernatants (CFS) against biofilm-forming pathogens *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibacterial activity of lactobacilli was evaluated using a modified agar diffusion method (deferred antagonism assay) by measuring inhibition zones. Antibiofilm activity of CFS was analysed *in vitro* in 96-well microplates at different CFS concentrations. Biofilm formation was visualised by crystal violet staining and quantified spectrophotometrically. Pronounced inhibitory effects were observed particularly for vaginal lactobacilli isolates against *S. aureus* and *S. agalactiae*, whereas results for *P. aeruginosa* were less consistent. The results confirm lactobacilli as a source of bioactive compounds inhibiting pathogen growth and biofilm formation, suggesting their possible use in developing probiotics to prevent biofilm-associated infections.

Key Words: lactobacilli, cell-free supernatant, biofilm

Úvod

Zvýšený výskyt infekcií spôsobených biofilm tvoriacimi patogénmi a narastajúci problém antibiotickej rezistencie zvyšujú potrebu vývoja alternatívnych antimikrobiálnych stratégií. Biofilmy predstavujú štruktúrované mikrobiálne spoločenstvá obklopené extracelulárnou matrix produkovanou samotnými mikroorganizmami. Táto organizovaná štruktúra poskytuje mikroorganizmom zvýšenú odolnosť nielen voči imunitnému systému, ale aj antimikrobiálnym látkam. Odhaduje sa, že 65–80 % všetkých infekcií je spojených s tvorbou biofilmu. Baktérie viazané v biofilmoch vykazujú v porovnaní s planktonickými

bunkami niekoľkonásobne vyššiu rezistenciu voči antibiotikám, čo predstavuje závažný medicínsky problém. Tradičné antimikrobiálne stratégie často nedokážu biofilmy účinne eliminovať, a práve preto je dôležitý vývoj alternatívnych postupov [1, 2].

Jedným z významných biofilm tvoriacich patogénov je *S. aureus*, oportunistická Gram-pozitívna baktéria kolonizujúca kožu a nosovú sliznicu približne u 30 % zdravej populácie. Je pôvodcom rôznych infekcií vrátane infekcií kože a mäkkých tkanív, pneumónie, infekcií močových ciest, osteomyelitídy, endokarditídy či infekcií spojených so zdravotníckymi pomôckami. Rovnako je významným pôvodcom bovinnej mastitídy a alimentárnych infekcií. Schopnosť tvorby biofilmu výrazne komplikuje jeho eradikáciu, pričom osobitne závažný problém pre verejné zdravie predstavujú kmene rezistentné voči metilínu (MRSA) [3,4,5].

Ďalším sledovaným patogénom bol *S. agalactiae*, Gram-pozitívna beta-hemolytická baktéria, ktorá kolonizuje urogenitálny a gastrointestinálny trakt až 40 % zdravých žien v reprodukčnom veku. Je hlavnou príčinou sepsy a meningitídy u novorodencov a zároveň spôsobuje závažné infekcie u imunokompromitovaných pacientov a starších ľudí, vrátane bakterémie, pneumónie a infekcií kože a mäkkých tkanív. Taktiež je zodpovedný za mastitídu u hovädzieho dobytká [6,7].

Tretou testovanou baktériou bol známy nozokomiálny patogén *P. aeruginosa*. Ide o Gram-negatívny oportunistický patogén spôsobujúci závažné infekcie, najmä v zdravotníckych zariadeniach, kde postihuje hlavne imunokompromitovaných pacientov, pacientov s popáleninami, cystickou fibrózou a pacientov na umelej pľúcnej ventilácii. Charakteristickým znakom je jeho schopnosť tvoriť biofilmy a vyvíjať rezistenciu voči všetkým dostupným triedam antibiotík [2,8].

Baktérie mliečneho kvasenia rodu *Lactobacillus* sú prirodzenou súčasťou ľudskej mikrobioty napríklad v gastrointestinálnom trakte a pošve. Zástupcovia tohto rodu vynikajú antimikrobiálnou aktivitou voči patogénom vďaka produkcii látok, ako sú bakteriocíny, biosurfaktanty, organické kyseliny, peroxid vodíka a nízkomolekulové antimikrobiálne zlúčeniny [9, 10].

Cell-free supernatant (CFS), teda bezbunkový supernatant, je kvapalná zložka kultúry, ktorá obsahuje metabolické produkty vzniknuté počas rastu mikroorganizmov spolu so zvyškami živín z kultivačného média. Získava sa centrifugáciou kultúry a následnou filtráciou cez membránový filter, čím sa zabezpečí úplné odstránenie buniek [11]. Takto

získané CFS patria medzi postbiotiká, teda metabolické a štruktúrne mikrobiálne zlúčeniny s priaznivým účinkom na zdravie hostiteľa [12]. CFS kultúr laktobacilov obsahujúce tieto extracelulárne produkované bioaktívne látky predstavujú perspektívny nástroj na kontrolu biofilm tvoriacich patogénov.

1 Materiál a metódy

1.1 Mikroorganizmy

Na výskum sme použili päť kmeňov laktobacilov s literárne preukázanou antimikrobiálnou aktivitou. Konkrétne tri klinické kmene laktobacilov izolované z vaginálneho prostredia zdravých žien – *Lactobacillus crispatus* 17A, *Lactobacillus gasseri* 13C a *Lactobacillus jensenii* 31A – poskytnuté Farmaceutickou fakultou Univerzity Komenského v Bratislave, a dva potravinárske kmene *Lactobacillus plantarum* LV4/10 a *Lactobacillus parabuchneri* P20b, poskytnuté Výskumným ústavom potravinárskym (VÚP) v Bratislave.

Antibakteriálnu a antibiofilmovú aktivitu sme testovali voči trom biofilm tvoriacim patogénom: *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Streptococcus agalactiae* KMB-534 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960.

1.2 Kultivácia

Na kultiváciu laktobacilov sme využili De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) médium (Sigma Aldrich, USA), pričom kultivácia prebiehala pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach.

S. aureus CCM 4223 a *P. aeruginosa* CCM 1960 sme kultivovali v Mueller-Hinton Broth (MHB) médiu (Sigma Aldrich, USA) a *S. agalactiae* KMB-534 v Todd-Hewitt Broth (THB) médiu (Bioline, Taliansko).

Tekuté kultúry sme inkubovali pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach na trepačke pri 200 ot./min. Na prípravu tuhých médií sme použili 15 g agar (Biomedicals, Francúzsko) na 1 l média.

1.3 Analýza antibakteriálnej aktivity

Na analýzu antibakteriálnej aktivity vybraných izolátov laktobacilov sme použili modifikovanú difúznú metódu na agarových platniach, konkrétne test oneskoreného antagonizmu, podľa postupu Klein *et al.* (2020) s úpravami.

Na povrch sterilného stuhnutého MRS agaru sme bodovo naniesli 10 µl nočnej kultúry testovaného izolátu laktobacilov. Takto naočkovanie platničky sme

inkubovali pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach v termostate. Po inkubácii sme naočkované agarové platne preliali vrchným agarom (top agarom) obsahujúcim patogénnu bakteriálnu suspenziu v pomere 1:50. Následne sme platne inkubovali pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach v termostate. Antibakteriálnu aktivitu sme vyhodnotili zmeraním priemeru inhibičných zón (mm) vytvorených v okolí miesta, kde bol bodovo naočkovaný vybraný izolát rodu *Lactobacillus*. Každý experiment sme realizovali v troch opakovaníach a získané výsledky sme spriemerovali.

V rámci optimalizácie sme vykonali chloroformové ošetrenie s cieľom overiť, či sú antimikrobiálne látky produkované laktobacilmi vylučované extracelulárne počas rastu buniek, pričom sme vychádzali z práce Fagheei Aghmiyuni *et al.* (2024) s nasledovnými úpravami. Platne s bodovo naočkovaným *L. crispatus* 17A sme vystavili výparom chloroformu po dobu 5-10 min. Na rozdiel od pôvodného protokolu (20 min) sme zvolili kratší čas expozície, aby sme minimalizovali riziko inaktívácie produkovaných antimikrobiálnych látok, keďže chloroform môže pri dlhšom pôsobení negatívne ovplyvniť ich biologickú aktivitu (Brock *et al.*, 1963). Následne sme platne preliali vrchným top agarom obsahujúcim patogénnu bakteriálnu suspenziu v pomere 1:50. Po stuhnutí top agaru sme platne inkubovali pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach. Na overenie vplyvu chloroformového ošetrenia sme súbežne pripravili kontrolné platne bez chloroformovej inaktívácie producenta. Antibakteriálnu aktivitu sme vyhodnotili zmeraním priemeru inhibičných zón (mm) vytvorených v okolí miesta, kde bol bodovo naočkovaný *L. crispatus* 17A.

1.4 Príprava bezbunkového supernatantu (CFS)

Jednotlivé kmene laktobacilov sme kultivovali v tekutom MRS médiu pri 37 °C, 24 hod, v aeróbných podmienkach. Po kultivácii sme kultúry centrifugovali pri 6000 g, 4 °C, 15 min na oddelenie bunkovej masy od supernatantu. Získaný supernatant sme sterilne prefiltrovali cez 0,22 µm membránový filter (Millipore, USA). Následne sme pH CFS upravili na hodnotu 6,0 sterilným roztokom 1 M NaOH, aby sme eliminovali inhibičný účinok organických kyselín, najmä kyseliny mliečnej. Takto pripravený CFS obsahujúci extracelulárne metabolity, ako sú biosurfaktanty a bakteriocíny, sme použili na testovanie antibiofilmovej aktivity.

1.5 Analýza antibiofilmovej aktivity CFS

Antibiofilmovú aktivitu CFS sme testovali *in vitro* v 96-jamkových mikrotitračných platničkách s plochým dnom (Sarstedt, Nemecko).

Do každej jamky sme napipetovali 200 µl zmesi príslušného kultivačného média (MHB alebo THB, v závislosti od testovaného patogénu), bakteriálnej suspenzie testovaného patogénu a CFS. Hustotu buniek v kultúrach testovaných patogénov sme stanovili denzitometrom (DEN-600, BioSan) a upravili na hodnotu OD600 ≈ 1. Následne sme kultúry nariedili v príslušnom tekutom médiu tak, aby výsledná optická hustota v jamkách dosahovala hodnotu ≈ 0,01.

CFS sme pridávali do finálneho objemu 200 µl v postupne klesajúcich objemových podieloch: 100, 70, 50, 20, 10, 5 a 1 % (v/v). Zostatok objemu sme v každom prípade doplnili kultivačným médiom obsahujúcim bakteriálnu suspenziu tak, aby celkový objem v jamke dosiahol 200 µl.

Positívna kontrola obsahovala kultivačné médium a bakteriálnu suspenziu bez CFS a negatívna kontrola obsahovala CFS a kultivačné médium bez bakteriálnej kultúry a slúžila na korekciu pozadia farbenia.

Pripravené mikrotitračné platničky sme inkubovali pri 37 °C, 24 hod v statických podmienkach.

1.6 Farbenie a kvantifikácia biofilmu

Po ukončení inkubácie sme obsah jamiek opatrne odstránili a jamky dvakrát premyli sterilnou destilovanou vodou o objeme 150 µl. Vzniknutý biofilm sme zafarbili pridaním 150 µl 0,5 % roztoku kryštálovej violeť (CV) a inkubovali 20 min pri laboratórnej teplote. Po odstránení farbiva a dvojnásobnom premytí destilovanou vodou sme platničku nechali uschnúť. Na uvoľnenie naviazanej CV sme do každej jamky pridali 150 µl 33 % kyseliny octovej.

Intenzitu zafarbenia, úmernú množstvu vzniknutého biofilmu, sme stanovili spektrofotometricky meraním absorpcie pri vlnovej dĺžke 600 nm na mikroplatňovom spektrofotometri Microplate reader BioTek 800 TS (BioTek Instruments, USA).

Mieru inhibície tvorby biofilmy sme vyjadrili ako percentuálny pokles absorpcie v experimentálnych vzorkách voči pozitívnej kontrole po odčítaní negatívnej kontroly.

2 Výsledky a diskusia

V tomto výskume sme sa zamerali na hodnotenie antibakteriálnej aktivity vybraných kmeňov

laktobacilov a na analýzu antibiofilmového účinku ich CFS voči biofilm tvoriacim patogénom *S. aureus* CCM 4223, *S. agalactiae* KMB-534 a *P. aeruginosa* CCM 1960.

2.1 Analýza antibakteriálnej aktivity

Antibakteriálnu aktivitu piatich vybraných kmeňov laktobacilov sme potvrdili prostredníctvom testu oneskoreného antagonizmu na agarových platniach. Schopnosť jednotlivých kmeňov inhibovať rast patogénov sme vyjadrili zmeraním priemeru vzniknutých inhibičných zón. Každý test bol vykonaný trikrát a hodnoty inhibičných zón sme spriemerovali.

Výsledky sú zhrnuté v Tab. 1.

Tab. 1 Namerané priemery inhibičných zón v teste antibakteriálnej aktivity – SAU CCM 4223 – *S. aureus* CCM 4223, SAG KMB-534 – *S. agalactiae* KMB-534, PAE CCM 1960 – *P. aeruginosa* CCM 1960 (- inhibičná zóna nebola pozorovaná)

Zástupca LAB	Patogén	Priemer inhibičnej zóny (mm)
<i>L. crispatus</i> 17A	SAU CCM 4223	16
	SAU CCM 4223 (chloroform)	15,5
	SAG KMB-534	19,5
	PAE CCM 1960	-
<i>L. gasseri</i> 13C	SAU CCM 4223	17
	SAG KMB-534	20,5
	PAE CCM 1960	-
<i>L. jensenii</i> 31A	SAU CCM 4223	12,5
	SAG KMB-534	31
	PAE CCM 1960	-
<i>L. plantarum</i> LV4/10	SAU CCM 4223	23
	SAG KMB-534	19
	PAE CCM 1960	-
<i>L. parabuchneri</i> P20b	SAU CCM 4223	14
	SAG KMB-534	8
	PAE CCM 1960	-

Všetky testované kmene vykazovali inhibičnú aktivitu voči *S. aureus* CCM 4223 a *S. agalactiae* KMB-534.

Najvyššiu antibakteriálnu aktivitu voči *S. aureus* CCM 4223 vykazoval *L. plantarum* LV4/10 s priemernou inhibičnou zónou 23 mm, nasledovaný *L. gasseri* (17 mm), *L. crispatus* (16 mm), *L. parabuchneri* P20b (14 mm) a *L. jensenii* 31A (12,5 mm).

Voči *S. agalactiae* KMB-534 dosiahol najvyššiu

aktivitu kmeň *L. jensenii* 31A s priemernou inhibičnou zónou 31 mm, následne *L. gasseri* (20,5 mm), *L. crispatus* (19,5 mm), *L. plantarum* LV4/10 (19 mm) a *L. parabuchneri* P20b (8 mm).

V rámci optimalizácie sme overili vplyv chloroformového ošetrenia laktobacilov pred aplikáciou patogénneho inokula. Chloroformové ošetrenie *L. crispatus* 17A (Obr. 1) nemalo zásadný vplyv na veľkosť inhibičnej zóny, čo naznačuje, že účinné antimikrobiálne látky sú produkované primárne extracelulárne počas rastu. Na základe týchto výsledkov sme ďalšie experimenty realizovali bez chloroformového ošetrenia.



Obr. 1 Porovnanie veľkosti inhibičných zón pri teste antimikrobiálnej aktivity *L. crispatus* 17A voči *S. aureus* CCM 4223 bez chloroformového ošetrenia (vľavo) a po chloroformovom ošetrení (vpravo). V oboch prípadoch bola nameraná rovnaká veľkosť inhibičnej zóny (15 mm).

Zaujímavým javom, ktorý sme pozorovali pri teste oneskoreného antagonizmu bolo, že bakteriálny kmeň *P. aeruginosa* CCM 1960 v prítomnosti testovaných kmeňov laktobacilov vôbec nerástol na agarových platniach. Pravdepodobne to znamená, že rast patogénu bol inhibovaný ešte predtým, ako by mohlo dôjsť k vzniku inhibičnej zóny. Z tohto dôvodu nebolo možné vykonať kvantitatívne vyhodnotenie prostredníctvom merania inhibičných zón. V štúdií Shokri *et al.* (2018) preukázali, že kmene *Lactobacillus fermentum* vykazujú silný inhibičný, baktericídny a dokonca aj antibiofilmový účinok voči všetkým testovaným kmeňom *P. aeruginosa*, pričom však ako hlavný mechanizmus inhibičného účinku identifikovali produkciu troch organických kyselín – kyseliny mliečnej, octovej a mravčej. Chappell a Nair (2020) pozorovali, že *L. plantarum* a *L. rhamnosus* účinne inhibujú rast *P. aeruginosa*, pričom tento účinok bol závislý od nízkeho pH vzniknutého počas kultivácie laktobacilov. Za inhibíciu rastu *P. aeruginosa* CCM 1960 pravdepodobne zodpovedá hlavne produkcia organických kyselín laktobacilmi, najmä kyseliny

mliečnej, ktorá výrazne znižuje pH prostredia.

Gram-pozitívne baktérie (*S. aureus*, *S. agalactiae*) disponujú viacerými mechanizmami, ktoré im umožňujú vyššiu toleranciu na nízke pH – využívajú protónové pumpy, opravné mechanizmy makromolekúl, zmeny bunkovej membrány, produkujú zásadité látky, regulujú metabolické dráhy či bunkovú signalizáciu [14]. Naopak *P. aeruginosa*, zástupca Gram-negatívnych baktérií, je voči kyseline mliečnej výrazne citlivejšia. Kyselina mliečna znižuje pH prostredia a zároveň narúša vonkajšiu membránu Gram-negatívnych baktérií, čím zvyšuje prienik ďalších antimikrobiálnych látok do bunky [15]. To vysvetľuje možný dôvod úplnej inhibície rastu *P. aeruginosa* na agarových platniach pri teste oneskoreného antagonizmu.

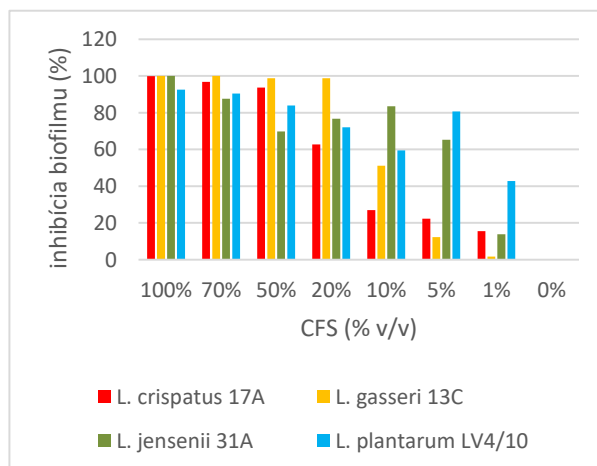
2.2 Analýza antibiofilmovej aktivity CFS

Inhibičný účinok CFS na tvorbu biofilmu vybraných patogénov sme hodnotili pri rôznych objemových podieloch CFS od 1 po 100 % (v/v). Schopnosť inhibície tvorby biofilmu sme vyjadrili v %, ako percentuálny pokles tvorby biofilmu v prítomnosti CFS voči pozitívnej kontrole, a to po odčítaní negatívnej kontroly (1).

$$\text{Inhibícia (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{vzorka}} - A_{\text{neg. kontrola}}}{A_{\text{pozit. kontr.}} - A_{\text{neg. kontr.}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

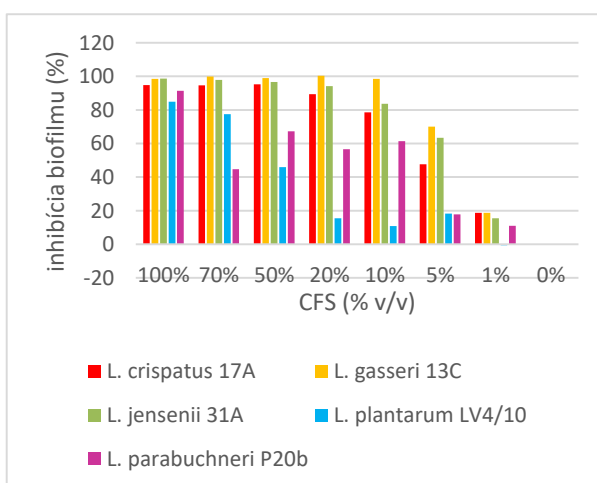
Pri analýze inhibičného účinku CFS na tvorbu biofilmu sme vo väčšine prípadov pozorovali postupný pokles absorbancie, teda redukciu množstva vytvoreného biofilmu, so zvyšujúcim sa objemovým podielom CFS. Najvýraznejšiu inhibíciu tvorby biofilmu sme zaznamenali pri najvyšších podieloch CFS – 70 a 100 % v/v, kde došlo k výraznému až úplnému obmedzeniu tvorby biofilmu v porovnaní s pozitívnou kontrolou.

Najvýraznejší inhibičný účinok na tvorbu biofilmu *S. agalactiae* KMB-534 sme zaznamenali pri CFS kmeňov *L. gasseri* 13C a *L. crispatus* 17A (Graf 1). Takýto výrazný inhibičný účinok pretrvával aj pri strednej koncentrácii CFS (50 % v/v). V prípade *L. gasseri* 13C sme pozorovali takmer rovnakú inhibičnú aktivitu pri vysokých (100 a 70 % v/v) aj nižších (50 a 20 % v/v) koncentráciách CFS, čo poukazuje na vysokú účinnosť už pri nižšom množstve účinných látok. Nižšiu, i keď stále výraznú, antibiofilmovú aktivitu vykazoval CFS *L. plantarum* LV4/10.

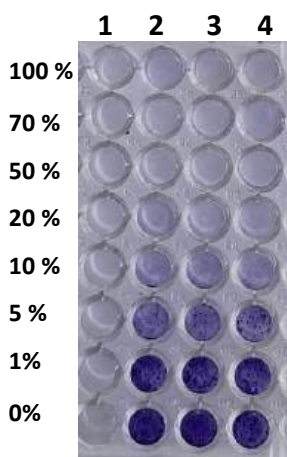


Graf 1 Antibiofilmový účinok CFS laktobacilov na tvorbu biofilmu *S. agalactiae* KMB-534

Pri hodnotení antibiofilmovej aktivity CFS voči *S. aureus* CCM 4223 sme rovnako ako v predchádzajúcom prípade pri *S. agalactiae* KMB-534 zaznamenali výraznejší antibiofilmový účinok u vaginálnych izolátov (Graf 2). Pri vyšších (100 a 70 % v/v) a stredných (50 % v/v) objemových podieloch dosahoval CFS vaginálnych izolátov laktobacilov takmer úplnú inhibíciu tvorby biofilmu s hodnotami presahujúcimi 94 %. Potravinárske kmene *L. plantarum* LV4/10 a *L. parabuchneri* P20b vykazovali výraznú inhibíciu hlavne pri vyšších koncentráciách CFS, avšak pri nižších koncentráciách CFS bol ich antibiofilmový účinok výrazne slabší v porovnaní s vaginálnymi izolátmi.



Graf 2 Antibiofilmový účinok CFS laktobacilov na tvorbu biofilmu *S. aureus* CCM 4223



Obr. 2 Antibiofilmový účinok CFS *L. crispatus* 17A na tvorbu biofilmu *S. aureus* CCM 4223 v mikrotitračnej platničke po farbení CV. Riadky zodpovedajú rastúcim objemovým podielom CFS (1 – 100 % v/v). 1. stĺpec predstavuje negatívnu kontrolu (CFS + kultivačné médium); 2 – 4. stĺpec obsahujú CFS, kultivačné médium a bakteriálnu suspenziu *S. aureus* CCM 4223.

Zaznamenaný antibiofilmový účinok CFS laktobacilov voči *S. aureus* CCM 4223 a *S. agalactiae* KMB-534 koreluje s výsledkami viacerých štúdií. Scillato *et al.* (2021) vo svojej štúdií preukázali, že CFS *L. gasseri* a *L. crispatus* vykazuje antimikrobiálnu aktivitu voči *S. aureus* a *S. agalactiae*, pričom za kľúčovú aktívnu látku identifikovali baktériocín acidocín A.

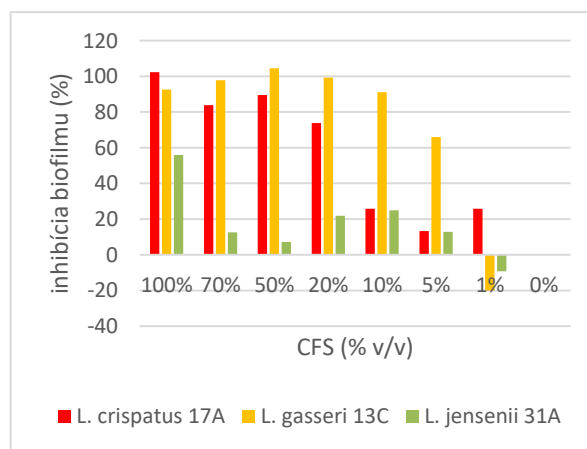
V štúdií Singh *et al.* (2025) hodnotili antibiofilmovú aktivitu CFS laktobacilov izolovaných z materského mlieka a detskej stolice voči *S. aureus* (MTCC 96) a *P. aeruginosa* (MTCC 741) za použitia podobného postupu – 96-jamkových mikrotitračných platničiek, farbenia kryštálovou violeťou a spektrofotometrickej kvantifikácie pri 570 nm. *Lacticaseibacillus rhamnosus* v tejto štúdií vykazoval 85,19 % inhibíciu tvorby biofilmu. Naše výsledky tieto hodnoty ešte prevýšili. Rozdiel môže byť dôsledkom odlišného biologického pôvodu testovaných kmeňov. Vaginálne izoláty, *L. crispatus* 17A, *L. gasseri* 13C a *L. jensenii* 31A, sú prirodzenými antagonistami týchto patogénov, čo mohlo prispieť k výraznejšiemu inhibičnému účinku.

Antibiofilmový a antimikrobiálny potenciál biosurfaktantov laktobacilov voči *S. aureus* potvrdili tiež v štúdií Sambanthamoorthy *et al.* (2014), v ktorej analyzovali účinok *L. jensenii* a *L. rhamnosus* voči klinickým multirezistentným kmeňom, vrátane MRSA. Biosurfaktant izolovaný z *L. jensenii* vykazoval takmer úplnú antibakteriálnu aktivitu (približne 99 %) pri

koncentráciách 50 mg/ml, zatiaľ čo biosurfaktant *L. rhamnosus* inhiboval kmene *S. aureus* UAMS-1 a MRSA v rozsahu 80 – 93 %. Inhibíciu tvorby biofilmu zaznamenali už pri koncentrácii 25 mg/ml a po približne 18 hodinovej expozícii boli schopné eradikovať už vytvorený biofilm pri koncentrácii 50 mg/ml.

Vplyv CFS na tvorbu biofilmu *P. aeruginosa* CCM 1960 sme hodnotili u troch kmeňov s najlepšimi výsledkami z predchádzajúcich experimentov – *L. crispatus* 17A, *L. gasseri* 13C a *L. jensenii* 31A. Zaznamenané výsledky boli v porovnaní s predchádzajúcimi výrazne variabilnejšie (Graf 3).

CFS vykazoval pri inhibícii tvorby biofilmu *P. aeruginosa* CCM 1960 výraznú variabilitu v závislosti od objemového podielu CFS aj použitého kmeňa. laktobacilov. CFS *L. gasseri* 13C dosahoval najvyšší inhibičný účinok, pričom pri vyšších a stredných objemových podieloch sme zaznamenali hodnoty inhibície nad 90 %. Naopak, CFS kmeňa *L. jensenii* 31A vykazoval v porovnaní s ostatnými testovanými izolátmi len slabý inhibičný účinok. Pozitívna kontrola vykazovala v niektorých experimentoch nízku a variabilnú mieru tvorby biofilmu, čo sťažovalo kvalitatívne vyhodnotenie antibiofilmového účinku.



Graf 3 Antibiofilmová aktivita CFS vaginálnych izolátov na tvorbu biofilmu *P. aeruginosa* CCM 1960.

Rovnaký jav obmedzeného rastu v prítomnosti laktobacilových kultúr sme pozorovali aj pri testoch antibakteriálnej aktivity. *P. aeruginosa* má komplexný regulačný systém tvorby biofilmu, pričom schopnosť vytvárať biofilm in vitro výrazne závisí od konkrétneho kmeňa aj kultivačných podmienok [2]. Zároveň je však možné, že antimikrobiálne látky obsiahnuté v CFS ovplyvnili životaschopnosť planktonických buniek

tohto patogénu ešte pred samotnou iniciáciou tvorby biofilmu, čo mohlo skresliť hodnotenie antibiofilmovej aktivity. Presné kvantitatívne posúdenie inhibičného účinku na tvorbu biofilmu *P. aeruginosa* CCM 1960 by si vyžadovalo ďalšiu optimalizáciu experimentálnych podmienok.

Záver

Táto práca potvrdila, že vybrané kmene laktobacilov vykazujú antibakteriálnu aktivitu a ich bezbunkové supernatanty disponujú antibiofilmovým účinkom voči trom klinicky významným biofilm tvoriacim patogénom – *S. aureus*, *S. agalactiae* a *P. aeruginosa*.

Všetkých päť testovaných kmeňov laktobacilov - *L. crispatus* 17A, *L. gasseri* 13C, *L. jensenii* 31A, *L. plantarum* LV4/10 a *L. parabuchneri* P20b – preukázalo antibakteriálnu aktivitu voči *S. aureus* CCM 4223 a *S. agalactiae* KMB-534 v teste oneskoreného antagonizmu, pričom priemery inhibičných zón sa pohybovali v rozsahu od 8 – 31 mm. Rast *S. aureus* najviac inhiboval potravinársky kmeň *L. plantarum* LV4/10, zatiaľ čo rast *S. agalactiae* bol najviac potlačený vaginálnym izolátom *L. jensenii* 31A. V prípade *P. aeruginosa* došlo v teste oneskoreného antagonizmu k úplnej inhibícii rastu, pravdepodobne v dôsledku produkcie organických kyselín spôsobujúcich zníženie pH prostredia.

V experimentoch zameraných na analýzu antibiofilmovej aktivity sme zaznamenali vyšší inhibičný účinok u vaginálnych izolátov v porovnaní s potravinárskymi kmeňmi. Predpokladáme, že táto skutočnosť súvisí so schopnosťou týchto kmeňov produkovať bioaktívne látky priamo adaptované na boj s patogénmi v prostredí, v ktorom sa prirodzene vyskytujú. Pri vyšších (100 a 70 % v/v) a stredných (50 % v/v) objemových podieloch dosahoval CFS vaginálnych izolátov takmer úplnú inhibíciu tvorby biofilmu *S. aureus* s hodnotami presahujúcimi 94 %. Najúčinnějšíu inhibíciu tvorby biofilmu *S. agalactiae* vykazoval vaginálny izolát *L. gasseri* 13C, ktorý si zachoval vysokú antibiofilmovú aktivitu aj pri stredných a nižších koncentráciách CFS bez výrazného poklesu účinku. Pri *P. aeruginosa* boli výsledky variabilnejšie, čo pravdepodobne súvisí s ovplyvnením životaschopnosti planktonických buniek ešte pred iniciáciou tvorby biofilmu.

Získané výsledky poukazujú na to, že antimikrobiálny účinok laktobacilov je spôsobený extracelulárne produkovanými bioaktívnymi látkami, ako sú bakteriocíny a biosurfaktanty. Výsledky tohto výskumu potvrdzujú, že CFS laktobacilov predstavujú perspektívny zdroj antimikrobiálnych látok

využitelných pri vývoji probiotických prípravkov a prevencii pred infekciami spojenými s tvorbou biofilmov, najmä urogenitálnymi infekciami.

Podakovanie

Finančné prostriedky boli poskytnuté z grantu VEGA 2/0074/26.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MOBAREZI, Z., ESFANDIARI, A. H., ABOLBASHARI, S., MESHKAT, Z. (2025). Efficacy of phage therapy in controlling staphylococcal biofilms: a systematic review. *European Journal of Medical*, vol. 30, no. 605. ISSN 2047-783X.
- [2] FERNÁNDEZ-BILLÓN, M, LLAMBÍAS-CABOT, A. E., JORDANA-LLUCH, E. OLIVER, A., MACIÁ, M.D. (2023). Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*, vol. 5, no. 100129. ISSN 2590-2075.
- [3] LI, X. YANG, Y., GENG, Z., WU, R., LIAN, S., WANG, J. (2026). Antimicrobial activity of cell-free supernatants produced by stains of lactic acid bacteria against *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Sciences*, vol. 13, no. 2. ISSN 2306-7381.
- [4] SUTHANA, S., AARA, S. Z, NOORULAIN, U.K., SARAH, S. M., PADMAJA, G.V (2025). Detection of biofilm production and antibiotic susceptibility pattern of Staphylococci from various clinical specimens at a tertiary care hospital. *International journal of Medical and pharmaceutical research*, vol. 7, no. 1. ISSN 2958-3675.
- [5] TUON, F. F., SUSS, P.H., TELLES, J.P., DANTAS, L.R., BORGES, N.H., RIBEIRO, V. (2023). Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antibiotics*, vol. 12, no. 1. ISSN 2079-6382.
- [6] VERMA, S., KUMARI, M., PATHAK, A., YADAV, V., JOHRI, A.K., YADAV, P. (2023). Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence genes of *Staphylococcus agalactiae* serotypes of Indian origin. *BMC Microbiology*, vol. 23, no. 176. ISSN 1471-2180.
- [7] ROSINI, R., MARGARIT, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 5, no. 6. ISSN 2235-2988.
- [8] ELFADADNY, A., RAGAB, R. F., ALHARBI, M., BADSHAH, F., IBÁÑEZ-ARANCIBIA, E., FARAG, A., NAGEEB, W. M. (2024). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and

- innovations in breaking therapies. *Frontiers in microbiology*, vol. 15. ISSN 1664-302X.
- [9] GÓMEZ-MEJIA, A., ORLIETTI, M., TANUTZER, A., SHAMBAT, S. M., ZINKERNAGEL, A.S. (2024). Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm by *Lactiplatibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*. *Mosphere*, vol. 9, no. 10. ISSN 2379-5042.
- [10] SHARMA, D., SAHARAN, B.S., KAPIL, S. (2016). Biosurfactants of probiotic lactic acid bacteria. p. 17 – 29.
- [11] MANI-LÓPEZ, E., ARRIOJA-BRETÓN, D., LÓPEZ-MALO, A. (2022) The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 21, no.1. ISSN 1541-4337.
- [12] SANTARELLI, G. *et al.* (2025) The activity of cell-free supernatant of *Lactobacillus crispatus* M247: a promising treatment against vaginal infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2025, vol. 15. ISSN 2235-2988.
- [13] KLEIN, J.M., STOCKWELL, V.O., MINSVAGE, G.V., VALLAD, G.E., GOSS, E.M., JONES, J.B. (2020). Improved deferred antagonism technique for detecting antibiosis. *Letters in applied microbiology*, vol. 71, no. 4. ISSN 1472-765X.
- [14] FAGHEEI AGHMIYUNI, Z., SADERI, H., OWLIA, P., SAIDI, N. (2024) Evaluation of the Effect of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Bacteriocin against *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2024. ISSN 2314-6141.
- [15] BROCK, T. D., PEACHER, B, PIERSON, D. (1963) Survey of the bacteriocines of enterococci. *Journal of Bacteriology*, 1963, vol.86, no.4. ISSN 1098-5530.
- [16] SHOKRI, D., KHORASGANI, M.R., MOHKAM, M., FATEMI, S.M., GHASEMI, Y., TAHERI-KAFRANI, A. (2018). The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, vol. 10, no. 1. ISSN 1867-1306.
- [17] CHAPPELL, T.C., NAIR, N.U. (2020). Engineered lactobacilli display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2020, vol. 6, no. 48. ISSN 2055-5008.
- [18] COTTER, P.D., HILL, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol and Molecular Biolog Reviews*, vol. 67, no. 3. ISSN 1098-5557.
- [19] ALAKOMI, H.L., SKYTТА, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, vol. 66, no. 5. ISSN 1098-5336.
- [20] SCILLATO, M. *et al.* 2021. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiologyopen*, 2021, vol. 10, no. 2. ISSN 2045-8827.
- [21] SINGH, N. *et al.* 2025. Exploring the antimicrobial potential of lactobacilli against early-stage and mature biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Chemistry*, 2025, vol. 13. ISSN 2296-2646.
- [22] SAMBANTHAMOORTHY, K., FENG, X., PATEL, R., PATEL, S., PARANAVITANA, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC microbiology*, vol. 14, no. 197. ISSN 1471-2180.
- [23] DE GIANI, A., ZAMPOLLI, J., DI GENNARO, P. (2021). Recent trends on biosurfactants with antimicrobial activity produced bacteria associated with human health: different perspectives on their properties, challenges, and potential applications. *Frontiers in microbiology*, vol. 12. ISSN 1664-302X.

Antifungálna aktivita vybraných esenciálnych olejov na *Candida albicans*.

Antifungal activity of selected essential oils against *Candida albicans*.

Petra Madejová – Libuša Lengyelová

Katedra botaniky a genetiky, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

petra.madejova@student.ukf.sk, llengyelova@ukf.sk

Abstrakt

Candida albicans patrí k významným patogénom človeka. Jej schopnosť tvoriť biofilm, meniť morfológiu a adaptovať sa na rôzne podmienky prispieva k zvýšenej tolerancii k antimykotikám. Rastúca rezistencia vyžaduje hľadanie alternatívnych terapeutických možností.

Táto práca sa zameriava na hodnotenie citlivosti *C. albicans* na vybrané esenciálne oleje (EO), s cieľom porovnať ich antifungálny účinok. Posudzovala sa inhibícia rastu kvasinky prostredníctvom mikrodilučnej a diskovej difúznej metódy.

Výsledky poukázali na štatisticky významné rozdiely v antifungálnej aktivite. Pri DDTD vykazovali EO ajowan a EO oregano štatisticky významne vyšší účinok na rast testovaných kmeňov *C. albicans* v porovnaní s EO klinček, tea tree a borovica. Pri DDTV mal najvyšší účinok len EO ajowan a pri mikrodilučnom teste sa, napriek najnižším hodnotám MIC, EO ajowan štatisticky líšil len od EO borovica.

Kľúčové slová: *Candida albicans*, patogén, esenciálny olej, rezistencia, MIC

Abstract

Candida albicans is one of the important human pathogens. Its ability to form biofilm, change morphology and adapt to different conditions contributes to increased tolerance to antifungal drugs. The increasing resistance requires the search for alternative therapeutic options.

This work focuses on the evaluation of the sensitivity of *C. albicans* to selected essential oils (EO), with the aim of comparing their antifungal effect. The inhibition of yeast growth was assessed using the microdilution and disk diffusion methods.

The results showed statistically significant differences in antifungal activity. In DDTD, EO ajowan and EO oregano showed a statistically significantly higher effect on the growth of the tested *C. albicans* strains compared to EO clove, tea tree and pine. In

DDTV, only EO ajowan had the highest effect and in the microdilution test, despite the lowest MIC values, EO ajowan was statistically different only from EO pine.

Key Words: *Candida albicans*, pathogen, essential oil, resistance, MIC

Úvod

Rastúce obmedzenia tradičnej farmakoterapie zvyšujú potrebu hľadania alternatívnych antifungálnych látok. Do popredia sa dostávajú prírodné produkty, najmä EO. Skúmanie citlivosti *C. albicans* na vybrané EO môže prispieť k rozšíreniu možností kontroly jej rastu a k identifikácii nových antifungálnych prístupov.

Patogénne kvasinky

Rod *Candida* zahŕňa približne 150 druhov, mnohé z nich sú endosymbiontmi ľudí a spôsobujú infekcie najmä imunosuprimovaným hostiteľom. Približne 80 % kandidóz spôsobuje *Candida albicans*, hoci infekcie spôsobené *Candida non-albicans* (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*) sú čoraz častejšie [1].

Niekoľko medzinárodných prieskumov sledovalo výskyt infekcie spôsobenej rodom *Candida* a mieru rezistencie na lieky v posledných desaťročiach. Jedna z najkomplexnejších štúdií (ARTEMIS), ktorá využívala údaje zo 142 inštitúcií v 41 krajinách, identifikovala 31 druhov *Candida* v klinických vzorkách počas 10-ročného obdobia (1997 – 2007). Vyššie spomínaných päť druhov je zodpovedných za vyše 92 % prípadov a 13 ďalších druhov bolo identifikovaných veľmi zriedkavo. Jednou z ťažkostí pri charakterizácii druhov *Candida* je, že nezdediajú jeden evolučný pôvod. Termín „*Candida*“ bol priradený nedokonalým hubám (bez jasne definovaného pohlavného cyklu) [2].

Candida albicans

C. albicans je diploidná polymorfná kvasinka, široko rozšírená v prirodzenom prostredí. Má však značný patogénny potenciál a za určitých podmienok, môže byť infekčná. Tieto infekcie sa môžu pohybovať od

miernych infekcií kože a slizníc až po závažné invazívne infekcie, najmä u jedincov s oslabeným imunitným systémom [3].

C. albicans je schopná adaptovať sa na rôzne prostredia v ľudskom tele a vďaka viacerým faktorom virulencie, ako sú premena medzi kvasinkovou a hýfovou formou či schopnosť adherovať, predstavuje závažnú hrozbu najmä pre hospitalizovaných pacientov [4].

Výskyt

U ľudí je známa ako kolonizátor oro-gastrointestinálneho traktu (vrátane ústnej dutiny, pažeráka a čriev) a dolných častí genitourinárneho traktu najmä u žien, kde je identifikovaná ako súčasť normálnej flóry bez príznakov ochorenia. Okrem toho je táto kvasinka detegovaná aj na pokožke a iných slizničných povrchoch, hoci jej prítomnosť sa vždy hodnotí v klinickom kontexte, aby sa odlíšila od aktívnej infekcie [5, 6].

Ochorenia

C. albicans je najbežnejším druhom zodpovedným za invazívnu kandidózu (IC). Predchádzajúce štúdie preukázali širokú škálu anatomických miest postihnutých *C. albicans* a definovali jej komplexnú patogenézu. Jej prispôsobivosť sa rôznym miestam a meniacim sa podmienkam hostiteľa sa považuje za hlavný faktor jej schopnosti spôsobiť rôzne stavy, od slizničných infekcií až po invazívne infekcie [3].

Kandidóza sa v klinickej praxi tradične delí na dve hlavné kategórie: povrchovú a hlbokú (invazívnu):

Povrchová kandidóza zahŕňa postihnutie kože, nechtovej a slizníc. Do tejto skupiny patria aj mukózne infekcie, ako sú orálna, vaginálna či ezofageálna kandidóza, ktoré predstavujú jej najčastejšiu podskupinu.

Hlboká kandidóza – označovaná aj ako systémová alebo invazívna – zahŕňa kandidémiu a postihnutie vnútorných orgánov vrátane pečene, obličiek a myokardu.

Tieto infekcie majú typicky nozokomiálny charakter a vyskytujú sa najmä u pacientov s ťažkou imunosupresiou, pričom sú spojené s vysokou mortalitou [1].

Hoci väčšina bežných mukózných infekcií spôsobených *C. albicans* je dobre liečiteľná, hlboké invazívne formy ochorenia predstavujú vážny klinický problém. Kožná kandidóza je naopak relatívne zriedkavá a typicky sa vyskytuje len u malej skupiny pacientov s vrodenými poruchami imunity, čo poukazuje na to, že samotná

kolonizačná schopnosť *C. albicans* ešte nepostačuje na vznik kožných lézií v neprítomnosti závažnej imunodeficiencie [4].

Terapia

C. albicans je vo všeobecnosti dobre citlivá na azolové antimykotiká, avšak existujú dôkazy o postupnom náraste rezistencie, najmä v regiónoch so strednou úrovňou ich spotreby. Údaje z oblastí s nízkou expozíciou azolom sú zatiaľ obmedzené. Napriek týmto trendom zostáva *C. albicans* naďalej citlivá na echinokandíny, amfotericín B a flukonazol [3].

Identifikácia

Predbežná identifikácia sa vykonáva pozorovaním rastu na kultivačnom médiu a mikroskopickými aj makroskopickými vyšetreniami. Presnú a rýchlu identifikáciu možno dosiahnuť proteomickými (MALDI-TOF) a molekulárnymi metódami, ako sú RFLP (s použitím gélovej elektroforézy), hybridizácia DNA-DNA a PCR [3].

Esenciálne oleje

Vzhľadom na ich antimikrobiálnu účinnosť sa EO stali predmetom mnohých experimentálnych štúdií na príslušných mikroorganizmoch. Medzinárodná organizácia pre normalizáciu definuje EO ako produkt vyrobený destiláciou s vodou alebo parou alebo mechanickým spracovaním alebo suchou destiláciou prírodných materiálov. Ide o kvapalné, prchavé, číre a farebné zmesi viacerých aromatických zlúčenín. EO sa získavajú zo všetkých častí rastlín, najmä z bylín ako sú kvety, semená, púčiky, listy, plody, drevo, korene, kôra a vetvičky, hoci v súčasnosti sa skúmajú nové zdroje EO, napríklad z potravinového a rastlinného odpadu [7, 8].

Tieto oleje môžu obsahovať zmes viac ako 300 zlúčenín rôznych chemických látok, pričom ich molekulová hmotnosť je zvyčajne nižšia ako 300 Da.

Hlavnými chemickými zložkami esenciálnych olejov sú terpény a terpenoidy. Ako sekundárne rastlinné metabolity s aromatickým jadrom sú v nich zastúpené fenylypropanoidy; v menšej miere sa vyskytujú malé organické zlúčeniny s rôznymi funkčnými skupinami ako amíny, alkoholy, fenoly, étery a karbonylové zlúčeniny (aldehydy, ketóny, amidy, estery) [8].

1 Materiál a metodika

V rámci experimentálnej časti práce sme pracovali s piatimi kmeňmi *C. albicans*, ktoré pochádzali z laboratória klinickej mikrobiológie v Poprade. Kmene boli získané od anonymných pacientov z klinického

materiálu ako nazofaryngeálne, orofaryngeálne a nazálne výtery.

V experimentoch boli použité francúzske EO od výrobcu Aromazone. Testované boli EO získané z ajowanu (AJO), borovice (BOR), čajovníka (TT), klinčeka (KLI) a oregana (ORE) (obr. 1). Bližšie informácie o použitých EO sú uvedené v tabuľke 1.



Obrázok 1 Použité esenciálne oleje
Foto: P. Madejová

Tabuľka 1 Zloženie použitých esenciálnych olejov

Esenciálny olej:	Latinský názov:	Zloženie:
Ajowan	Trachyspermum ammi	Fenoly: <u>tymol</u> (42,85%); karvakrol (0,22%); Monoterpény: <u>gama-terpinén</u> (35,49%); paracymén (16,23%); alfa-pinén(0,45%); beta-pinén (2,24%);
Borovica	Pinus sylvestris	Monoterpény: <u>alfa-pinén</u> (54,95%); beta-pinén (10,81%); delta-3-karén (11,17%); myrcén (5%); limonén (8,98%);
Čajovník	Melaleuca alternifolia	Monoterpény: <u>gama-terpinén</u> (21,27%); alfa-terpinén (9,9%); terminolén (3,49%); paracymén (2,23%); Monoterpenoly: <u>terpinén-4-ol</u> (43,35%); alfa-terpineol (3,1%); Monoterpenoidy: eukalyptol (2,94%); Fenylpropény: <u>methyleugenol</u> (0,03%);
Klinček	Syzygium aromaticum	Fenylpropény: <u>eugenol</u> (82,35%); Estery: <u>eugenylacetát</u> (11,55%); Seskviterpény: <u>beta-karyofylén</u> (4,45%);
Oregano	Origanum vulgare	Fenoly: <u>karvakrol</u> (63,12%); thymol (3,59%); Monoterpény: <u>gama-terpinén</u> (7,79%); paracymén (12,77%); Terpénové alkoholy: <u>linalol</u> (1,02%);

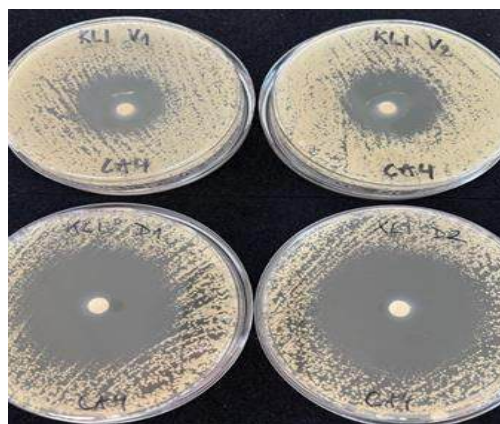
Počas experimentu sme na pomnoženie a rast kvasiniek používali živné médiá ako: Sabouraud agar (SA) a Sabouraud bujón (SB). SA je obzvlášť vhodný pre

rast kvasiniek vzhľadom na svoje mierne kyslé pH, ktoré sa pohybuje okolo hodnoty 5,6. Toto pH vytvára prostredie, ktoré inhibuje rast väčšiny bakteriálnych druhov, zatiaľ čo rast kvasiniek nie je negatívne ovplyvnený [9].

1.1. Diskový difúzny test (DDT)

DDT je kvalitatívna metóda na stanovenie citlivosti mikrobiálneho druhu na antibiotiká. Kmeň je citlivý, alebo naopak rezistentný vzhľadom na veľkosť inhibičnej zóny (IZ) okolo disku na tuhej pôde – ak je priemer IZ menší ako stanovená hranica (breakpoint), znamená to, že podanie tohto antibiotika by nebolo účinné, kmeň je teda rezistentný [10].

V rámci experimentu sme pracovali s dvoma variantami diskového difúzneho testu – dotykovým (agarovým) a výparovým (vzdušným). Ako živnú pôdu sme použili SA, ktorý sme o objeme 21 ml naliali do Petriho misiek a nechali stuhnúť. Inokulum bolo štandardizované na hustotu zodpovedajúcu 0,5 podľa McFarlanda. Pomocou sterilnej vatovej tyčinky ponorenej do suspenzie, z ktorej bol prebytočný objem odstránený pritlačením k stene skúmavky, sme kvasinky rovnomerne naočkovali na povrch agar v troch smeroch [11].



Obrázok 2 DDTV kmeň *C. albicans* č. 4 EO KLI (hore)
DDTD kmeň *C. albicans* č. 4 EO KLI (dole)
Foto: P. Madejová

Diskový difúzny test - dotykový (DDTD)

Pri DDTD sme po krátkom vsiaknutí inokula na povrch agaru do stredu Petriho misky pomocou sterilnej ihly umiestnili sterilný disk s priemerom 6 mm a pomocou mikropipety sme naň aplikovali 10 µl testovaného EO. Petriho misky sme následne inkubovali v termostate pri

37 °C približne 48 hodín. Obe diskové metódy sme pre každý kmeň a každý EO opakovali dvakrát.

Po skončení inkubačnej doby sme digitálnym posuvným meradlom odmerali veľkosť (priemer) IZ okolo jednotlivých diskov v mm.

Pri testovaní účinku esenciálnych olejov sa hodnotila ich citlivosť podľa priemeru IZ. Veľkosti IZ sme stanovili nasledovne: za necitlivosť (R) sme považovali priemerný priemer IZ = 6–8 mm, za strednú citlivosť (I) IZ = 9–14 mm, za citlivosť (S) IZ = 15–20 mm a za extrémnu citlivosť (SS), ak bola IZ \geq 21 mm. [12].

Diskový difúzny test – výparový (DDTV)

Pri metóde DDTV bol sterilný disk umiestnený na vnútornú stranu viečka v strede Petriho misky na malé množstvo stuhnutého SA. Na disk sme následne aplikovali 10 μ l EO. Petriho misky boli inkubované v obrátenej polohe (viečkom nadol – kvôli umožneniu rozptylu EO difúziou) pri teplote 37 °C počas 48 hodín.

Pokiaľ sa nevytvorila žiadna IZ, považovali sme daný kmeň za rezistentný voči vzduchom rozptýlenému testovanému EO.

1.2 Mikrodilučná metóda

Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) a minimálna fungicídna koncentrácia (MFC) jednotlivých EO na testované kmene *C. albicans* boli stanovené pomocou dilučnej mikroriediacej metódy, realizovanej v 96-jamkových mikrotitračných platniach.

V mikropatničkách (stĺpce) sme pripravovali rôzne koncentrácie testovaných EO (10 %, 5 %, 2,5 %, 1,3 %, 0,6 %, 0,3 %, 0,16 % a 0,08 %). Súčasťou testu bola aj negatívna (bez inokula) a pozitívna kontrola (bez EO). Každá jamka na platničke obsahovala spolu 200 μ l suspenzie, z toho 50 μ l tvorilo inokulum v SB o hustote 0,5 McFarlanda (okrem negatívnej kontroly) a 135 μ l EO (okrem pozitívnej kontroly) zriedené v SB a 15 μ l Tween 80 (použitý ako emulgátor EO v suspenzii). Mikropatničky sme po naplnení vždy zakryli a následne homogenizovali na orbitálnej trepačke po dobu 60 sekúnd pri rýchlosti 800 ot./min. a inkubovali pri teplote 37 °C po dobu približne 48 hodín. Každá platňa obsahovala vždy len jeden druh EO. Každý pokus sme realizovali v troch nezávislých opakovaniach.

MIC

MIC sme určili na základe vizuálneho posúdenia neprítomnosti zákalu v prvej koncentrácii v poradí. Za MIC sme považovali najnižšiu koncentráciu testovanej látky, pri ktorej nedošlo k zakaleniu, čo naznačuje

takmer úplné potlačenie rastu skúmaného mikroorganizmu [11].

MFC

Po odčítaní zákalu sme z každej jamky počnúc jamkou s hodnotou MIC postupne k vyšším koncentráciám preniesli 10 μ l kultúry na SA do označených Petriho misiek. Následne sme misky inkubovali 48 hodín pri teplote 37 °C. Po inkubácii sme určili MFC esenciálneho oleja ako tú koncentráciu, pri ktorej sa ako u prvej najvyššej nevyskytli žiadne kolónie *C. albicans*.

1.3 Štatistické vyhodnotenie

Shapiro-Wilkov test ukázal, že časť dát (prípadne celý súbor) nespĺňa predpoklad normálneho rozdelenia. Z tohto dôvodu sme na porovnanie účinkov jednotlivých EO použili Kruskal-Wallisov test. Na identifikáciu rozdielov medzi konkrétnymi skupinami sme následne aplikovali Conoverov alebo resp. Dunnov Post-hoc test.

2 Výsledky a diskusia

2.1 DDTD

V grafe 1 sú znázornené výsledky DDTD, ktorým bola hodnotená účinnosť vybraných esenciálnych olejov (EO AJO, EO BOR, EO TT, EO ORE a EO KLI) proti piatim testovaným kmeňom *C. albicans*. Hodnota IZ bola vyjadrená v milimetroch ako priemer z troch meraní. Citlivosť či rezistencia izolovaných kmeňov kvasiniek bola určená podľa veľkosti IZ (čím väčšia hodnota IZ, tým vyššia citlivosť kmeňa na EO).

Na posúdenie celkovej rozdielnosti medzi skupinami bol aplikovaný Kruskal-Wallisov test. Na následnú identifikáciu konkrétnych dvojíc so štatisticky významnými rozdielmi bol použitý Conoverov Post-hoc test (Graf 2).

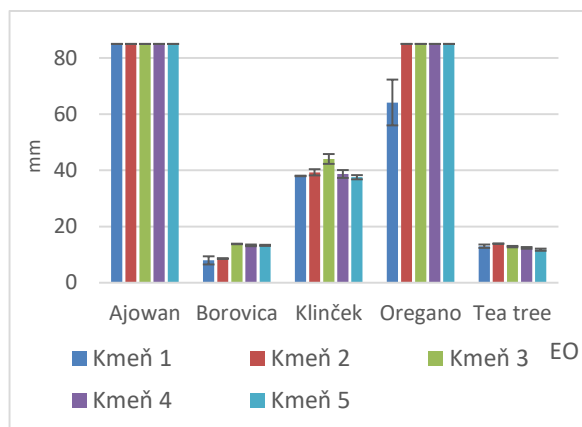
IZ všetkých EO sa štatisticky významne odlišovali. Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu preukázal EO AJO, pri ktorom bola zaznamenaná IZ o priemere 85 mm u všetkých testovaných kmeňov. Táto hodnota naznačuje veľmi silný inhibičný účinok a minimálne rozdiely medzi kmeňmi poukazujú na jeho širokospektrálnu účinnosť. Podľa [12] táto hodnota IZ vykazuje vysokú citlivosť (SS) daného EO voči kmeňom *C. albicans*.

Dominancia EO AJO v diskovom difúznom teste korešponduje s literárnymi údajmi, ktoré poukazujú na vysoký antifungálny potenciál EO bohatých na fenolické zlúčeniny, predovšetkým tymol, známy svojím schopnosťou narušovať integritu bunkovej membrány kvasiniek [13, 14, 15].

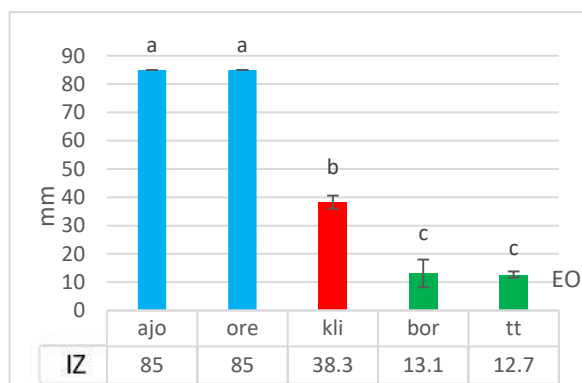
Porovnateľné výsledky malo EO ORE s IZ v rozmedzí 64 – 85 mm (SS). EO KLI dosahoval priemerné hodnoty v rozmedzí 38 – 44 mm, ktoré pri hodnotení kmeňov podľa [12] patria tiež k vysoko citlivým, no podľa štatistického vyhodnotenia išlo o stredné hodnoty IZ, čím sa zaradil KLI medzi oleje so stredne silným antifungálnym účinkom (graf 2, skupina b).

Tieto zistenia sú v súlade so štúdiou [13], ktorí potvrdili antifungálny potenciál EO KLI a EO TT pri dermálne bezpečných koncentráciách, pričom ich účinok bol nižší v porovnaní s EO s vyšším obsahom fenolických zložiek, ako je ORE alebo AJO.

Najmenšie IZ boli zaznamenané pri EO TT a EO BOR, ktoré štatisticky predstavovali najslabšie pôsobiace oleje (graf 2, skupina c) s priemernou veľkosťou IZ okolo 10 – 15 mm, čo podľa [12] predstavuje strednú citlivosť, pričom sa medzi nimi nepreukázal štatisticky významný rozdiel.



Graf 1 DDTD: Inhibičné zóny (mm) EO voči kmeňom *C. albicans*

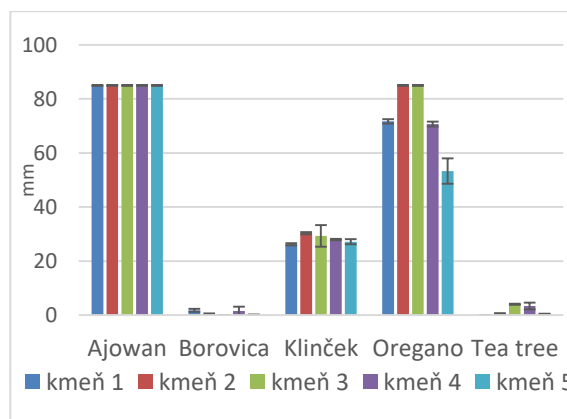


Graf 2 DDTD: Inhibičné zóny EO bez ohľadu na kmene *C. albicans*

Vysvetlivky: a,b,c – označenie štatisticky homogénnych skupín

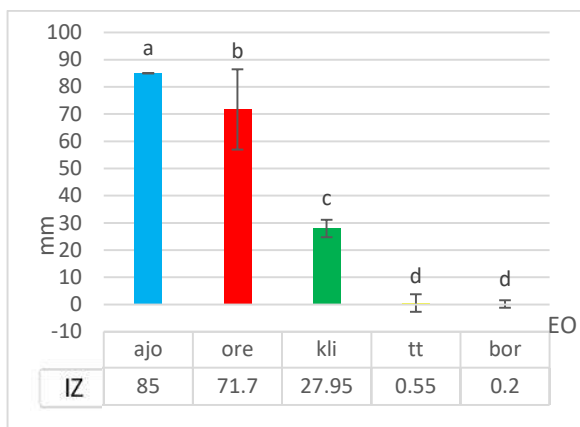
2.2 DDTV

Aj pri metóde DDTV testujúcej pôsobenie prchavých zložiek EO difúziou vo vzduchu, boli medzi jednotlivými EO rovnakými testami preukázané štatisticky významné rozdiely. Najvyššiu inhibičnú aktivitu pri difúznom rozptyle preukázal EO AJO, kde IZ bola u všetkých kmeňov najvyššia možná – 85 mm (graf 3), čo poukazuje na citlivosť testovaných kmeňov. Tieto hodnoty potvrdzujú jeho stabilný a výrazný antimykotický účinok, podobne ako v predchádzajúcom diskovom dotykovom teste. EO ORE vykazovalo pomerne vysoké IZ v rozmedzí 53,3 – 85 mm, no jeho účinok bol štatisticky významne nižší ako u EO AJO (Graf 4).



Graf 3 DDTV: Inhibičné zóny (mm) EO voči kmeňom *C. albicans*

Napriek tomu bol jeho vzdušný účinok v porovnaní s ďalšími tromi EO štatisticky významne vyšší. EO BOR a EO TT nevykazovali prakticky žiadnu inhibičnú aktivitu difúziou vo vzduchu, keďže veľkosti IZ sa pohybovali len na úrovni niekoľkých milimetrov, čo ich pri pôsobení vzdušnou difúziou zaraďuje medzi štatisticky najmenej účinné EO na testované *C. albicans*. Medzi týmito dvoma EO (BOR, TT) sa nepreukázal štatistický rozdiel, oba sa však svojim nízkym antifungálnym účinkom štatisticky odlišujú od vyššie spomínaných EO, čo je farebne znázornené v grafe 4.



Graf 4 DDTV: Inhibičné zóny EO bez ohľadu na kmene *C. albicans*

Vysvetlivky: a,b,c,d – označenie štatisticky homogénnych skupín

Celkovo pri DDTV boli najúčinnnejšie EO AJO a ORE, EO KLI dosiahol strednú účinnosť a EO BOR a TT mali iba minimálny, resp. žiadny antimykotický účinok voči študovaným kmeňom kvasiniek.

V našich výsledkoch metód DDTD a DDTV dominujú ako najúčinnnejšie EO AJO a ORE, čo je štatisticky potvrdené. Práca [14] vysvetľuje, že IZ v diskových testoch lepšie odrážajú antifungálnu silu EO pre topické aplikácie (krémy, gély), zatiaľ čo MIC stanovuje presné terapeutické koncentrácie; kombinácia oboch metód tak poskytuje komplexný pohľad na potenciál EO. Porovnanie našich výsledkov s inými štúdiami je však problematické vzhľadom na existujúce rozdiely v testovacích technikách.

2.3 Mikrodilučná metóda

Medzi jednotlivými kmeňmi bola pozorovaná istá variabilita v hodnotách MIC/MFC, teda nie všetky EO pôsobili rovnako na všetky testované kmene.

Tabuľka 2 zobrazuje MIC a MFC piatich testovaných EO na päť rôznych kmeňov *C. albicans*.

Tabuľka 2 Hodnoty MIC a MFC (mg/l) EO na kmene *C. albicans*

EO	mg/l	kmeň 1	kmeň 2	kmeň 3	kmeň 4	kmeň 5
AJO	MIC	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	MFC	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
BOR	MIC	66,67	83,34	8,34	8,34	6,25
	MFC	100	100	12,5	12,5	6,25
KLI	MIC	5,2	3,1	1,6	3,1	3,1
	MFC	6,25	3,1	3,1	3,1	3,1
ORE	MIC	3,1	2,1	1,6	1,6	1,6
	MFC	3,1	3,1	1,6	1,6	1,6
TT	MIC	3,1	2,1	1,07	1,6	2,6
	MFC	3,1	3,1	3,1	3,1	6,25

EO AJO vykazoval najnižšie a zhodné hodnoty MIC aj MFC (1,6 mg/l) vo všetkých testovaných kmeňoch, čo naznačuje jeho pravdepodobný fungicídny účinok na kmene *C. albicans*.

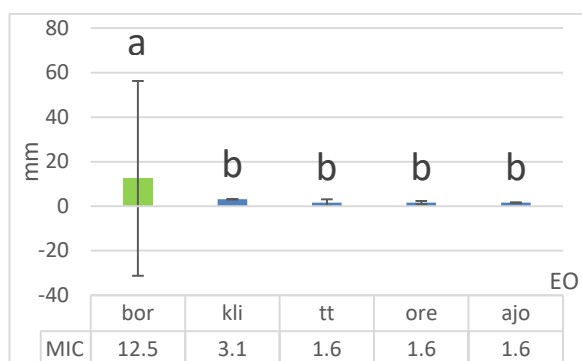
U EO BOR boli pri prvých dvoch kmeňoch namerané najvyššie hodnoty MIC/MFC (50 – 100 mg/l), zatiaľ čo pri kmeňoch 3 – 5 boli tieto hodnoty nižšie (6,25 – 12,5 mg/l), čo svedčí o vyššej antimykotickej účinnosti v porovnaní s prvými dvoma kmeňmi; celkové hodnoty MIC však poukazujú na veľmi nízku účinnosť EO BOR voči testovaným kmeňom oproti ostatným testovaným EO.

EO KLI dosiahol mierne vyššie hodnoty MIC (približne 3,1–6,25 mg/l), čo poukazuje na dobrú, avšak menej stabilnú účinnosť v porovnaní s EO AJO.

EO ORE sa vyznačoval nízkymi hodnotami MIC a MFC (1,6 – 3,1 mg/l), čo poukazuje na výrazný inhibičný aj fungicídny efekt voči väčšine testovaných kmeňov.

EO TT vykazoval podobné výsledky ako EO ORE, s hodnotami MIC v rozmedzí 1,07 – 3,1 mg/l a mierne vyššími hodnotami MFC, čo naznačuje silný antimykotický účinok a vhodnosť na ďalšie štúdium. Tabuľka 2 celkovo ukazuje, že najvýraznejší antimykotický účinok mali EO AJO, EO ORE a EO TT, zatiaľ čo EO BOR vykazoval najslabší účinok. Rozdiely medzi MIC a MFC boli u väčšiny olejov minimálne, čo naznačuje, že pôsobia nielen inhibične, ale skôr fungicídne ako fungistaticky.

V grafe 5 – EO AJO, EO TT, EO ORE a EO KLI – boli zaradené do druhej skupiny s navzájom porovnateľnými MIC, ktoré sú štatisticky významne nižšie ako pri EO BOR. Celkovo tak rozlišujeme dve úrovne účinnosti: menej účinný EO BOR a skupinu ostatných štyroch olejov s výrazne lepším, navzájom porovnateľným antimykotickým efektom.



Graf 5 Hodnoty MIC EO bez ohľadu na kmene *C. albicans*
Vysvetlivky: a,b – skupiny EO so štatisticky preukázaným rozdielom v inhibičnom účinku

Štúdia [15] komplexne vyhodnotila antifungálny potenciál 12 komerčných EO a terpénu linalool voči biofilmu *C. albicans*, pričom všetky EO vykázali výraznú antimykotickú aktivitu s MIC v rozmedzí 0,06–0,4%. Linalool bol analyzovaný samostatne, keďže predstavuje jedinou významnú terpénovú zložku v EO ORE z nášho súboru, hoci len v nízkej koncentrácii; jeho izolované testovanie umožnilo kvantifikovať potenciálny synergický alebo aditívny príspevok k nadštandardnému antifungálnemu účinku EO ORE pozorovanému v našej štúdii a objasniť úlohu jednotlivých bioaktívnych metabolitov v komplexných EO.

V ďalšej práci [16] boli testované EO, ktoré inhibovali rast kmeňov *C. albicans* v koncentráciách 0,1–100 mg/ml, pričom najvýraznejšiu antikandidóznou aktivitu preukázali oleje z medovky lekárskej a oregána. Hodnoty MIC pre tieto oleje nepresiahli 3,125 mg/ml, čo koreluje s našimi zisteniami o nízkych hodnotách MIC pre EO ORE (1,6 – 3,1 mg/l). EO čeľade Lamiaceae (vrátane EO ORE) sú charakterizované fenolickými zlúčeninami (karvakrol, tymol), monoterpénmi a seskviterpénmi, pričom chemický profil je variabilný v závislosti od geografickej lokality, fenologického štádia a času zberu; táto chemická heterogenita môže vysvetľovať rozptyl antifungálnych účinkov. Výhodou citovanej štúdie je široký screening (12 EO, viacero kmeňov *Candida spp.*) oproti nášmu modelu zameranému na 5 homogénnych kmeňov *C. albicans*.

Záver

Výsledky tejto práce preukázali štatisticky významné rozdiely v antifungálnej aktivite testovaných látok, čím sa potvrdil potenciál niektorých testovaných EO ako perspektívnej alternatívy alebo doplnku ku konvenčnej antimykotickej terapii.

Najvyššiu antimykotickú účinnosť vykazoval EO AJO, ktorý dosahoval najnižšie a stabilné hodnoty MIC aj MFC (1,6 mg/l) pri všetkých testovaných kmeňoch kvasiniek. Táto účinnosť sa potvrdila aj v diskovej difúznej metóde (DDT), kde EO AJO vytvoril najväčšie IZ s priemerom až 85 mm. EO ORE dokázal tiež veľmi vysoký inhibičný efekt na *C. albicans*, pri DDTD a hodnotách MIC porovnateľných s EO AJO.

Naopak, EO BOR preukázal najnižšiu účinnosť spomedzi testovaných EO, keďže vykazoval vysoké hodnoty MIC/MFC (50–100 mg/l) a zároveň najmenšie IZ v DDT (10–15 mm).

Naše zistenia potvrdzujú antifungálny potenciál EO a prispievajú k rozšíreniu poznatkov o testovaní citlivosti mikroorganizmov, čím podporujú výskum prírodných antifungálnych agens v kontexte rastúcej rezistencie *C. albicans*.

Poďakovanie

Rada by som vyjadrila hlboké poďakovanie svojej školiteľke RNDr. Libuši Lengyelovej, PhD. za jej odborné vedenie, cenné rady, neoceniteľnú trpezlivosť a ochotu kedykoľvek pomôcť. Jej podnetné pripomienky, odborné znalosti a ľudský prístup boli pre mňa veľkou inšpiráciou a motiváciou počas celej práce.

Ďalej by som chcela poďakovať svojej konzultantke MVDr. Daniele Ohlasovej, PhD. za jej cenné odporúčania, metodické usmernenia a ochotu zdieľať svoje skúsenosti, ktoré významne prispeli k zlepšeniu kvality a odbornosti tejto práce.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] CIUREA, Cristina Nicoleta, KOSOVSKI, Irina Bianca, MARE, Anca Delia, TOMA, Felicia, PINTEA-SIMON, Ionela Anca a MAN, Adrian. 2020. *Candida and candidiasis—Opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. Microorganisms.* 8(6), 857. Dostupné na: doi:10.3390/microorganisms8060857
- [2] TURNER, Siobhán A. a BUTLER, Geraldine. 2014. *The Candida pathogenic species complex. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 4(9), a019778. ISSN 2157-1422. Dostupné na: doi:10.1101/cshperspect.a019778.
- [3] PARAMBATH, Sarika, DAO, Aiken, KIM, Hannah Yejin et al. 2024. *Candida albicans—A systematic review to inform the World Health Organization fungal priority pathogens list. Medical Mycology.*

- 62(6), myae045. Dostupné na: doi:10.1093/mmy/myae045.
- [4] LOPES, José Pedro a LIONAKIS, Michail S. 2021. *Pathogenesis and virulence of Candida albicans. Virulence*. 13(1), 89–121. Dostupné na: doi:10.1080/21505594.2021.2019950.
- [5] MORAN, Gary P., David C. COLEMAN a Derek J. SULLIVAN. 2011. *Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. Eukaryotic Cell*, 10(1), 34–42. Dostupné na: doi:10.1128/EC.00242-10
- [6] FRÓIS-MARTINS, Ricardo, LAGLER, Julia a LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé. 2024. *Candida albicans virulence traits in commensalism and disease. Current Clinical Microbiology Reports*. 11(4), 231–240. Dostupné na: doi:10.1007/s40588-024-00235-8.
- [7] NAZZARO, Filomena, Florinda FRATIANNI, Raffaele COPPOLA a Vincenzo DE FEO. 2017. *Essential oils and antifungal activity. Pharmaceuticals*, 10(4), 86. Dostupné na: doi:10.3390/ph10040086.
- [8] VORA, Lalitkumar K., Amol D. GHOLAP, Navnath T. HATVATE et al. 2024. *Essential oils for clinical aromatherapy: A comprehensive review. Journal of Ethnopharmacology*, 330 (august 2024), 118180. Dostupné na: doi:10.1016/j.jep.2024.118180.
- [9] FORBES, B. A. 2016. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. National Library of Medicine, Institution [online]. Dostupné na: https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay/aIma9913004593406676/01NLM_INST:01NLM_INST
- [10] MEFANET. 2026. *Diskový difúzný test – WikiSkripta* [online]. Dostupné na: https://www.wikiskripta.eu/w/Diskov%C3%BD_dif%C3%BAzn%C3%AD_test
- [11] EUCAST. 2025. *Disk diffusion and quality control* [online]. Dostupná na: <https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/>
- [12] DJABOU, Nassim, LORENZI, Vanina, GUINOISEAU, Elodie et al. 2013. Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxin-infectious pathogens. *Food Control*. 30(1), 354–363. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.025
- [13] PARKER, Bryan A., GABRIEL, Kyle T., GRAHAM, Kayla D., BUTTS, Bethany K. a CORNELISON, Christopher T. 2022. "Antifungal Activity of Select Essential Oils against *Candida auris* and Their Interactions with Antifungal Drugs". *Pathogens* 11(8) (2022): 821. Dostupné na: doi:10.3390/pathogens11080821
- [14] KRATOCHVÍLOVÁ, Viola. 2024. Hodnocení antifungální aktivity esenciálních olejů prostřednictvím vybraných laboratorních metod. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- [15] SERRA, Elisa, HIDALGO-BASTIDA, Lucia A., VERRAN, Joanna, WILLIAMS, David a MALIC, Sanja. 2018. *Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against Candida albicans. Pathogens*. 7(1), 15. Dostupné na: doi:10.3390/pathogens7010015
- [16] KARPIŃSKI, Tomasz M., OŻAROWSKI, Marcin, SEREMAK-MROZIKIEWICZ, Agnieszka et al. 2023 *Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. Frontiers in Bioscience-Landmark* 28(2) Dostupné na: doi:10.31083/j.fbl2802028.

Vplyv vybraných kultivačných faktorov na rast koreňových kultúr *Datura stramonium* L. a produkciu tropánových alkaloidov

Effect of selected culture factors on the growth of *Datura stramonium* L. root cultures and tropane alkaloid production

Sofia Mikulášková¹ – Šarlota Kaňuková^{1,2}

¹Ústav biológie a biotechnológie, Oddelenie biotechnológií, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Odbor rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

¹mikulaskova1@ucm.sk, ¹sarlota.kanukova@ucm.sk

Abstrakt

Durman obyčajný (*Datura stramonium* L.) je významným zdrojom tropánových alkaloidov, medzi ktoré patria hyoscyamín, atropín a skopolamín. Ich obsah v prirodzene rastúcich rastlinách je nízky a výrazne závisí od vegetačného cyklu a podmienok prostredia. In vitro kultivačné systémy preto predstavujú vhodnú alternatívu na stabilnú a kontrolovanú produkciu týchto metabolitov, pričom efektívnym modelom pre ich tvorbu sú najmä kultúry koreňov. Cieľom práce bolo stanoviť optimálne podmienky kultivácie, ktoré podporia vznik čo najväčšieho množstva koreňovej biomasy a zároveň umožnia vysokú produkciu tropánových alkaloidov. Najvhodnejším sa ukázalo B5 médium so sacharózou ako uhlíkovým zdrojom. Pre produkciu hyoscyamínu bola optimálna koncentrácia 60 g/L, zatiaľ čo pre skopolamín 10 až 20 g/L. Produkcia skopolamínu dosahovala maximum pri pH 4,5 až 5, kým hyoscyamín sa syntetizoval najefektívnejšie pri pH 5,8. Z rastových regulátorov sa najlepšie osvedčila kyselina indolyl-3-octová (IAA) v koncentrácii 2 mg/L, pričom prídavok kyseliny askorbovej nevedol k zvýšeniu biomasy ani obsahu alkaloidov.

Kľúčové slová: durman obyčajný, koreňové kultúry, tropánové alkaloidy

Abstract

Jimson weed (*Datura stramonium* L.) is an important source of tropane alkaloids, including hyoscyamine, atropine, and scopolamine. Their content in naturally growing plants is low and strongly dependent on the vegetation cycle and environmental conditions. In vitro

cultivation systems therefore represent a suitable alternative for the stable and controlled production of these metabolites, with root cultures serving as particularly effective models for their synthesis. The aim of this study was to determine the optimal cultivation conditions that support the formation of the highest possible amount of root biomass while ensuring high production of tropane alkaloids. The most suitable medium was found to be B5 medium with sucrose as the carbon source. For hyoscyamine production, the optimal sucrose concentration was 60 g/L, whereas for scopolamine it was 10 to 20 g/L. Scopolamine production reached its maximum at pH 4.5 to 5, while hyoscyamine was synthesized most efficiently at pH 5.8. Among the growth regulators tested, indole-3-acetic acid (IAA) at a concentration of 2 mg/L proved to be the most effective, while the addition of ascorbic acid did not enhance root biomass production or alkaloid content.

Key Words: *Datura stramonium* L., root cultures, tropane alkaloids

Úvod

Durman obyčajný (*Datura stramonium* L.) je liečivá rastlina z čeľade *Solanaceae*, známa produkciou tropánových alkaloidov najmä hyoscyamínu, atropínu a skopolamínu, ktoré majú anticholinergne, spazmolytické a sedatívne účinky, využívané vo farmaceutickom priemysle [1]. V prirodzených podmienkach je obsah alkaloidov nízky a premenlivý, ovplyvnený vegetačným cyklom, dostupnosťou živín a environmentálnym stresom [2,3]. Preto sa na stabilnú produkciu týchto látok využívajú in vitro kultúry, najmä koreňové a hairy root kultúry, ktoré umožňujú rýchly

rast a vysokú akumuláciu alkaloidov [4,5]. Produkcia metabolitov je citlivá na kultivačné podmienky, vrátane zloženia média, uhlíkového zdroja, pH, rastových regulátorov a oxidačno-redukčných pomerov [6,7]. Cieľom práce bolo nájsť vhodné zloženie kultivačného média pre rast koreňových kultúr *Datura stramonium* L. a produkciu tropánových alkaloidov.

1 Materiál a metódy

1.1 Príprava donorových rastlín

Explantáty boli odobraté z donorových klíčencov durmanu obyčajného, ktoré sme získali in vitro kultiváciou zo zreých semien na ½MS médiu (Murashige & Skoog, Duchefa Biochemie, Holandsko). Pred výsevom boli semená skarifikované kyselinou sírovou, potom dôkladne premyté sterilnou vodou a povrchovo sterilizované: najskôr 30 sekúnd v etanole a následne 15 minút v 4,7 % roztoku chlórnanu sodného (Savo) s prídavkom Tween 20 za stáleho miešania. Po sterilizácii boli semená viackrát premyté sterilnou vodou, a uložené na ½MS médiu s agarom s pH 5,7 - 5,8. Kultivácia prebiehala 4 týždne pri teplote 23 °C ± 2 °C

1.2 Indukcia rastu koreňov

Po štyroch týždňoch sterilnej kultivácie boli z donorových rastlín odobrané koreňové explantáty dlhé približne 1 - 2 cm, a presunuté do Erlenmayerových baniek s tekutým živným médiom. V skupinách testovaných faktorov sa vždy menil iba jeden parameter, t.j. typ živného média, koncentrácia sacharózy, pH, koncentrácia rastového regulátora (IAA), uhlíkový zdroj, vplyv kyseliny askorbovej, zatiaľ čo ostatné zložky média zostávali nezmenené. Základné médium obsahovalo 30 g/L sacharózy, 2 mg/L IAA a bolo upravené na pH 5,7. Prehľad jednotlivých testovaných parametrov je uvedený v Tabuľke 1. Koreňové kultúry boli následne dynamicky kultivované počas 4 týždňov v tme pri 23 °C ± 2 °C, pričom každý týždeň sa hodnotil čerstvá hmotnosť biomasy a morfológia koreňov.

Tabuľka 1: Prehľad sledovaných a fixných parametrov v tekutých médiách koreňových kultúr *Datura stramonium* L.

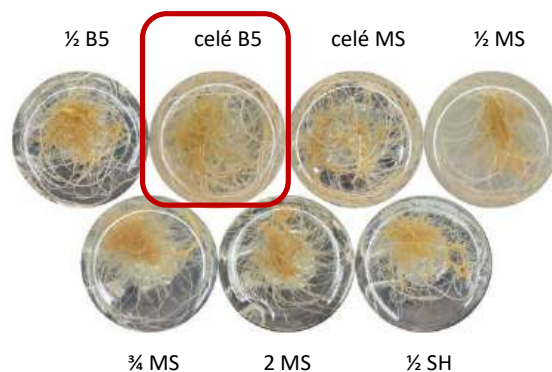
Sledovaný parameter	Menený parameter	Fixný parameter
Typ média	MS médium ½MS médium ¾ MS médium 2 MS médium B5 médium ½ B5 médium ½ SH médium	30 g/L sacharóza 2 mg/L IAA
Uhlíkový zdroj	Sacharóza Glukóza Fruktóza Maltóza	MS médium 2 mg/L IAA
Koncentrácia sacharózy	10 g/L 20 g/L 30 g/L 40 g/L 50 g/L 60 g/L 70 g/L	MS médium 2 mg/L IAA
Koncentrácia IAA	0,5 mg/L 1 mg/L 2 mg/L 3 mg/L 4 mg/L 5 mg/L	MS médium 30 g/L sacharóza
pH optimum	4,5 5 5,5 5,8 6 7 5,8 + MES	MS médium 30 g/L sacharóza 2 mg/L IAA
Koncentrácia kyseliny askorbovej	Bez kyseliny askorbovej 50 mg/L 100 mg/L 200 mg/L	MS médium 30 g/L sacharóza 2 mg/L IAA

1.3 GC-MS analýza

Koreňové kultúry boli po 4 týždňoch kultivácie vysušené pri teplote 50 - 55 °C a následne zhomogenizované. Z každej vzorky (0,1 g) boli lipidické zložky odstránené extrakciou n-hexánom, následne bola suchá vzorka extrahovaná v 0,1 M HCl, pH roztoku upravené na hodnotu 10 a trikrát extrahované chloroformom. Chloroformové extrakty boli vysušené bezvodným síranom sodným a odparené vo vákuu, čím vznikli surové frakcie alkaloidov, ktoré boli rozsuspendované v CH₂Cl₂. Analýza sekundárnych metabolitov sa realizovala pomocou GC-MS (Agilent 7890B/5977A) s nízkopriepustnou kolónou VF-5 MS a split-less vstrekovaním. Identifikácia a kvantifikácia hyoscyamínu a skopolamínu bola vykonaná pomocou štandardných roztokov a porovnaním hmotnostných spektier s databázou NIST 2007. Hodnoty m/z analyzovaných alkaloidov boli 124 pre hyoscyamín a 94 pre skopolamín.

2 Výsledky a diskusia

V tejto práci sme sa zamerali na identifikáciu kľúčových faktorov kultivácie (Tab. 1) ovplyvňujúcich rast koreňovej biomasy a produkciu tropánových alkaloidov v koreňových kultúrach *D. stramonium* L. Hodnotili sme vplyv typu kultivačného média, uhlíkového zdroja a jeho koncentrácie, pH média, koncentrácie rastového regulátora IAA a prídavku kyseliny askorbovej ako antioxidantu. Produkcia hyoscyamínu a skopolamínu bola stanovená pomocou GC-MS a vyjadrená na suchú hmotnosť biomasy. Výsledky preukázali výrazný vplyv typu kultivačného média na rast koreňových kultúr aj akumuláciu sledovaných alkaloidov. Zo skúmaných médií sa ako najmenej vhodné ukázalo SH médium v polovičnej koncentrácii, kde bola zaznamenaná najnižšia produkcia biomasy (0,028 g DW) aj alkaloidov (43,99 mg/g hyoscyamínu a 3,35 mg/g skopolamínu). Naopak, B5 médium podporovalo najvyšší rast koreňovej biomasy (0,22 g DW) a zároveň najvyššiu produkciu hyoscyamínu (61,91 mg/g DW) a skopolamínu (10,26 mg/g DW). Vyššia efektívnosť B5 média môže súvisieť s jeho priaznivejším zložením živín, najmä dusíka a vitamínov, ktoré podporujú sekundárny metabolizmus. Tieto zistenia sú v súlade s prácou Shimomura a kol. (2002), ktorí identifikovali B5 médium ako najvhodnejšie aj pre iné typy koreňových kultúr.



Obrázok 1: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v rôznych typoch kultivačných médií.

Zdroj: Autori

Typ uhlíkového zdroja významne ovplyvnil rast biomasy aj produkciu alkaloidov. Sacharóza sa ukázala ako najvhodnejší uhlíkový zdroj, keďže podporovala najvyššiu tvorbu biomasy (0,16 g DW) a zároveň vysokú produkciu skopolamínu (2,67 mg/g DW). Hoci koncentrácia hyoscyamínu pri sacharóze nebola najvyššia (32,73 mg/g DW), výrazne vyššia biomasa v porovnaní s glukózou, maltózou a fruktózou viedla k jej celkovo vyššej produkcii. Tieto výsledky korešpondujú s literatúrou, kde je sacharóza považovaná za najčastejšie a najefektívnejšie využívaný uhlíkový zdroj v rastlinných in vitro kultúrach [7,8].

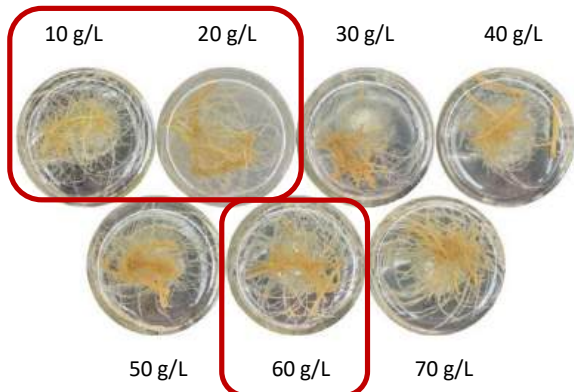


Obrázok 2: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v médiách s rôznymi uhlíkovými zdrojmi.

Zdroj: Autori

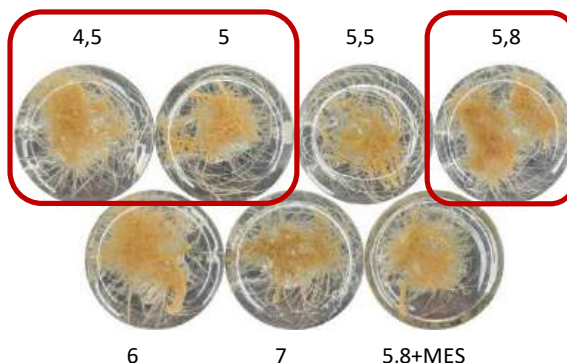
Koncentrácia sacharózy mala rozdielny vplyv na biosyntézu jednotlivých tropánových alkaloidov. Najvyšší obsah hyoscyamínu bol dosiahnutý pri koncentrácii 60 g/L (50,29 mg/g DW), zatiaľ čo produkcia skopolamínu bola najvyššia pri nižších koncentráciách sacharózy (10 - 20 g/L; 6,32-8,28 mg/g DW) a so zvyšujúcou sa koncentráciou výrazne klesala. Tento jav naznačuje, že metabolické dráhy jednotlivých alkaloidov reagujú odlišne na dostupnosť uhlíkového zdroja. Podobné výsledky opisujú aj Martínez a kol. (2023) a Skała a kol. (2022), ktorí uvádzajú, že vyššie

koncentrácie sacharózy môžu podporovať rast biomasy, no zároveň vyvolávať osmotický stres a inhibovať syntézu niektorých sekundárnych metabolitov, v závislosti od rastlinného druhu.



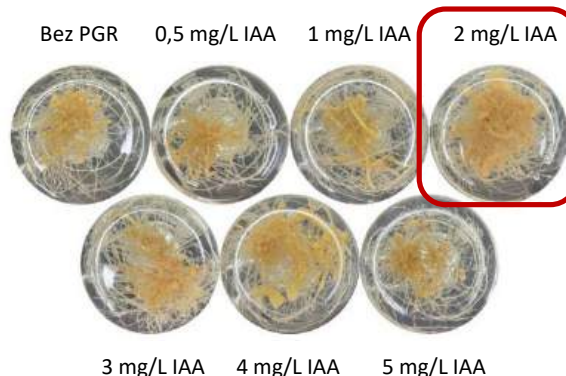
Obrázok 3: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v médiách s rôznymi koncentraciami sacharózy.
Zdroj: Autori

Hodnota pH kultivačného média sa potvrdila ako významný faktor ovplyvňujúci produkciu tropánových alkaloidov. Najvyšší obsah hyoscyamínu bol zaznamenaný pri pH 5,8 (83,21 mg/g DW), čo zodpovedá štandardnému odporúčanému pH pre médium Murashige a Skoog podľa [10] ktoré sa bežne používa pri kultivácii rastlinných tkanív. Naopak, skopolamín dosahoval najvyššie hodnoty pri nižšom pH (4,5 - 5,0; 5,47-6,25 mg/g DW), pričom jeho koncentrácia so zvyšujúcim sa pH postupne klesala. Tieto rozdiely odrážajú odlišnú pH citlivosť enzýmových systémov zapojených do biosyntézy jednotlivých alkaloidov, najmä reakcií prebiehajúcich pri konverzii hyoscyamínu na skopolamín. Stabilizácia pH pomocou tlmivého roztoku MES viedla k poklesu produkcie alkaloidov. Tento jav naznačuje, že prirodzené výkyvy pH môžu pôsobiť ako stresový stimul podporujúci tvorbu sekundárnych metabolitov, čo je v súlade s pozorovaniami [11].



Obrázok 4: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v médiách s rôznym pH.
Zdroj: Autori

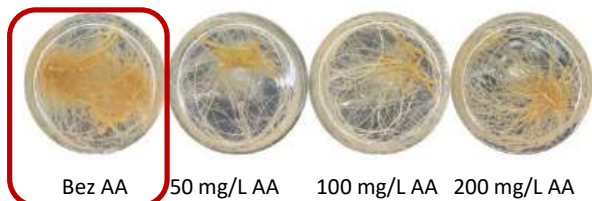
Ďalším sledovaným parametrom bol aj samotný prídavok rastového regulátora IAA, ktorý významne ovplyvnil rast koreňovej biomasy aj produkciu alkaloidov. Optimálna koncentrácia IAA bola stanovená na 2 mg/L, pri ktorej bol zaznamenaný najvyšší obsah hyoscyamínu (73,61 mg/g DW) a zároveň vysoká produkcia skopolamínu (6,50 mg/g DW). Vyššie koncentrácie IAA viedli k miernemu poklesu produkcie alkaloidov (hyoscyamín – pokles o 17,1 – 60,6%; skopolamín – pokles o 23 – 54%), čo je v súlade s poznatkami o inhibičnom účinku nadbytku auxínov na metabolickú aktivitu buniek [6,12].



Obrázok 5: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v médiách s rôznymi koncentraciami rastového regulátora IAA.
Zdroj: Autori

V prítomnosti kyseliny askorbovej síce dochádzalo k efektívnemu zníženiu hndnutia koreňových kultúr, avšak jej prídavok mal negatívny vplyv na rast biomasy aj produkciu tropánových alkaloidov. Najvyššie koncentrácie hyoscyamínu (73,81 mg/g DW) a skopolamínu (4,21 mg/g DW), ako aj tvorba biomasy

(0,23 g DW), boli pozorované v kultúrach bez prídania antioxidantu. Tento výsledok podporuje hypotézu, že oxidačný stres môže stimulovať biosyntézu sekundárnych metabolitov, zatiaľ čo vysoká hladina antioxidantov môže tieto procesy tlmieť [13,14].



Obrázok 6: Porovnanie koreňovej biomasy kultivovanej v médiách s rôznymi koncentraciami kyseliny askorbovej.

Zdroj: Autori

Pri porovnaní s údajmi pre intaktné rastliny bolo zistené, že koreňové kultúry *D. stramonium* dosahovali výrazne vyššie koncentrácie tropánových alkaloidov. Obsah hyoscyamínu bol 40- až 400-násobne vyšší a obsah skopolamínu 6- až 125-násobne vyšší v porovnaní s hodnotami uvádzanými pre korene intaktnej rastliny [2,3]. Na tieto výsledky následne nadväzovalo porovnanie s in vitro systémami publikovanými pre *Atropa belladonna* L. [15,16], ktorá predstavuje modelový druh pre štúdium biosyntézy tropánových alkaloidov. Podľa dostupnej literatúry hairy a adventívne koreňové kultúry *A. belladonna* akumulujú celkové tropánové alkaloidy maximálne do približne 5,3 mg/g sušiny, čo je najvyššia hodnota doposiaľ publikovaná pre tento druh v kontrolovaných podmienkach in vitro. V porovnaní s týmito výsledkami vykazovali nami založené koreňové kultúry *D. stramonium* L. výrazne vyššiu produkciu biomasy a alkaloidov. Tieto výsledky potvrdzujú vysoký produkčný potenciál koreňových kultúr ako perspektívneho systému pre produkciu tropánových alkaloidov.

3 Záver

Výsledky tejto práce potvrdili, že produkcia tropánových alkaloidov v koreňových kultúrach *Datura stramonium* L. je výrazne ovplyvnená podmienkami kultivácie. Ako najvhodnejšie sa ukázalo živné médium B5 so sacharózou ako uhlíkovým zdrojom, pričom optimálne hodnoty pH a koncentrácie rastového regulátora IAA sa líšili v závislosti od konkrétneho alkaloidu. Zatiaľ čo maximálna produkcia hyoscyamínu

bola dosiahnutá pri mierne kyslom pH (5,8) a vyššej koncentrácii sacharózy (60 g/L), produkcia skopolamínu bola preferenčne podporená pri nižších koncentraciách sacharózy (10 - 20 g/L) a nižšom pH (4,5 - 5). V porovnaní s intaktnými rastlinami vykazovali koreňové kultúry výrazne vyšší obsah sledovaných alkaloidov. Koncentrácia hyoscyamínu bola v koreňových kultúrach približne 40- až 400- násobne vyššia v porovnaní s hodnotami uvádzanými pre korene intaktných rastlín, zatiaľ čo obsah skopolamínu bol 6- až 125- násobne vyšší. Tieto výsledky jednoznačne potvrdzujú vysoký produkčný potenciál koreňových kultúr *D. stramonium* L. ako efektívneho systému pre produkciu tropánových alkaloidov.

Poďakovanie

Práca vznikla s podporou Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra a FPPV-05-2026 projektu podporeného FPV, UCM v Trnave.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] GRIFFIN, William J.; LIN, George D., (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 623–637. ISSN 0031-9422.
- [2] MALDONADO-MENDOZA, Ignacio E.; AYORA-TALavera, Guadalupe; LOYOLA-VARGAS, Víctor M., (1992). Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* root cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 28, no. 2, pp. 67–72. ISSN 1054-5476.
- [3] HARFI, Boualem; KHELIFI, Lounès, (2019). Hairy root technology: effect of etiolation on *Datura* sp. transgenic root induction and hyoscyamine production. *Pharmacognosy Journal*, vol. 11, no. 5, pp. 991–995. ISSN 0975-3575.
- [4] GIRI, Anjana; NARASU, Mangamoori L., (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 1, pp. 1–22. ISSN 0734-9750.
- [5] SHIMOMURA, Kiyoshi; YAMAMOTO, Rie; IKEGAMI, Fumio; TABATA, Mamoru, (2002). Tropane alkaloids in auxin-independent root cultures of *Physoclaina physaloides*. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, vol. 120, pp. 85–88. ISSN 1343-4292.
- [6] GASPAR, Thérèse; KEVERS, Claudine; PENEL, Claude; GREPPIN, Hubert; REID, David M.; THORPE, Trevor A., (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular*

- and Developmental Biology – Plant*, vol. 32, pp. 272–289. ISSN 1054-5476.
- [7] YASEEN, M.; AHMAD, T.; SULTAN, M.; MUSHTAQ, N., (2013). Role of carbon sources for in vitro plant growth and development: A review. *Molecular Biology Reports*, vol. 40, pp. 2837–2849. ISSN 1573-4978.
- [8] SKAŁA, Ewa; SITAREK, Piotr; RATUSZNIAK, Ewa; KOLASINSKA, Monika; WYSOKINSKA, Halina, (2022). Effect of sucrose concentration on *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin transformed root biomass, caffeoylquinic acid derivatives, and flavonoid production. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 22, article 13848. ISSN 1422-0067.
- [9] MARTÍNEZ, María E.; MENDOZA, David; RODRÍGUEZ, José L.; RAMÍREZ, Rosa I., (2023). Effect of inoculum size and age, and sucrose concentration on cell growth to promote metabolite production in cultured *Taraxacum officinale*(Weber) cells. *Plants*, vol. 12, no. 5, article 1116. ISSN 2223-7747.
- [10] MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473–497. ISSN 1399-3054.
- [11] MORGAN, John A.; SHANKS, J. V.; CHANG, Y. C.; McDONALD, K. A., (2000). Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no. 3, pp. 262–265. ISSN 1432-0614.
- [12] OVERVOORDE, Paul; FUKAKI, Hidehiro; BEECKMAN, Tom, (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 2, no. 6, article a001537. ISSN 1943-0264.
- [13] APEL, Klaus; HIRT, Heribert, (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 55, pp. 373–399. ISSN 1543-5008.
- [14] PERMADI, Naufal; PUTRI, A. R.; LEE, Seung-Hwan; PARK, Jae-Hoon, (2024). Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. *Current Plant Biology*, vol. 38, article 100339. ISSN 2214-6628.
- [15] BONHOMME, Valérie; LAVAL, Véronique; PENOT, Michel; PEPIN, Renaud; LIONNET, Catherine; ROBERT, Thierry, (2000). Tropane alkaloid production by *hairy roots of Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes 15834* and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C* genes only. *Journal of Biotechnology*, vol. 81, no. 2–3, pp. 155–163. ISSN 0168-1656.
- [16] AHMADIAN CHASHMI, Najmeh; SHAHABI, Sima; MAJIDZADEH, Minoo; MOSHTAGHI, Narges, (2010). Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and in vitro cultured two accessions of *Atropa belladonna* L. under nitrate treatments. *Zeitschrift für Naturforschung C – Journal of Biosciences*, vol. 65, no. 5–6, pp. 349–356. ISSN 0939-5075.

Efekt fluorochinolónového chemoterapeutika sarafloxacín hydrochloridu na bičíkovca *Euglena gracilis*

Effect of the fluoroquinolone chemotherapeutic agent sarafloxacin hydrochloride on *Euglena gracilis* flagellates

Anita Murínová¹ – Vanessa Gelanová² – Dominika Vešelényiová³ – Juraj Krajčovič⁴

¹⁻⁴Oddelenie Biológie, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹ murinova6@ucm.sk, ² gelanova1@ucm.sk, ³ dominika.veselenyiova@ucm.sk, ⁴ juraj.krajcovic@ucm.sk

Abstrakt

Fluorochinolóny patria medzi syntetické širokospektrálne chemoterapeutické antibakteriálne látky celosvetovo využívané v humánnej aj veterinárnej medicíne, zasahujúce do procesu syntézy nukleových kyselín gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií. Sú častými kontaminantami vodných environmentov, kde perzistujú a majú toxický efekt na biotu ekosystémov. Sarafloxacín hydrochlorid je veterinárne využívaný fluorochinolónový derivát s najväčším uplatnením v hydinarstve a akvakultúre. Efekt, ktorý majú rezíduá sarafloxacínu na organizmy v prostredí, sme skúmali na modelovom organizme – fotosyntetizujúcom bičíkovcovi *Euglena gracilis*. *E. gracilis* patrí medzi jednobunkové mikroriasy, ktoré sú súčasťou fytoplanktónu a majú funkciu primárnych producentov vo vodných potravinových reťazcoch. Toxický efekt sarafloxacínu spôsobuje degradáciu chloroplastového genómu bičíkovca v procese tzv. bielenia. V práci sme sledovali úroveň degradácie chloroplastov a znižovanie rýchlosti rastu a životaschopnosti buniek *E. gracilis* po kultivácii v médiu s prídavkom sarafloxacín hydrochloridu v koncentráciách 10, 200 a 1000 µg/ml. Toxický efekt sme analyzovali pomocou mikroskopie, vyhotovením rastových kriviek a hodnotením úrovne vybielenia.

Kľúčové slová: bielenie chloroplastov, *Euglena gracilis*, fluorochinolóny, sarafloxacín

Abstract

Fluoroquinolones are synthetic broad-spectrum chemotherapeutic antibacterial agents used globally in human and veterinary medicine. They interfere with the process of nucleic acid synthesis in Gram-negative and Gram-positive bacteria. These derivatives are common contaminants in aquatic environments, where they persist and have a toxic effect on ecosystem biota. Sarafloxacin hydrochloride is a fluoroquinolone derivative used in veterinary medicine, most commonly used in poultry farming and aquaculture. We investigated the effect of sarafloxacin residues on organisms in the

environment using a model organism – the photosynthetic flagellate *Euglena gracilis*. *E. gracilis* can be classified as a unicellular microalga, which is part of phytoplankton and function as primary producers in aquatic food chains. The toxic effect of sarafloxacin causes degradation of the chloroplast genome of the flagellate in a process known as bleaching. In this work, we monitored the extent of chloroplast degradation and the reduction in growth rate and viability of *E. gracilis* cells following cultivation in a medium supplemented with sarafloxacin hydrochloride at concentrations of 10, 200, and 1000 µg/ml. We analyzed the toxic effect using microscopy, by constructing growth curves, and by assessing the degree of bleaching.

Key Words: chloroplast bleaching, *Euglena gracilis*, fluoroquinolones, sarafloxacin

Úvod

Antimikrobiálne látky patria medzi celosvetovo rozšírené farmaceutické kontaminanty životného prostredia s negatívnym vplyvom environmenty [1]. Fluorochinolónové deriváty sú rozsiahlou triedou syntetických chemoterapeutických látok so širokým spektrom účinku, ktoré sa využívajú v humánnej aj veterinárnej medicíne na liečbu bakteriálnych infekcií. V závislosti od molekulovej štruktúry, farmakokinetických vlastností a spektra účinku klasifikujeme tieto deriváty do piatich generácií (Tabuľka 1) [2].

Antibakteriálna aktivita spočíva v inhibícii funkcie dvoch bakteriálnych enzýmov – DNA gyrázy a DNA topoizomerázy IV. Sú to homologické topoizomerázy typu II, ktoré sa podieľajú na replikácii bakteriálnej DNA. Enzýmy majú úlohu vo väčšine procesov týkajúcich sa nukleových kyselín a ich topologických foriem. Ich blokovaním dochádza k zníženiu životaschopnosti až usmrteniu baktérií. [3, 4].

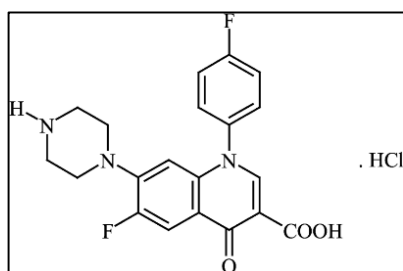
Tabuľka 1 Vybrané chinolónové chemoterapeutiká a ich základná charakteristika.

Zdroj: [2, 5, 6, 7]

Generácia	Chinolónový derivát	Využitie a spektrum účinku na baktérie
1	kyselina nalidixová	humánna medicína; G- baktérie
2	ofloxacín	humánna medicína; G+ a G- baktérie a atypické patogény
3	sarafloxacín	veterinárna medicína; G+ a G- baktérie
4	moxifloxacín	humánna medicína; G+ a G- baktérie a atypické patogény
5	avarofloxacín	humánna medicína; G+ a G- baktérie a atypické patogény (aj rezistentné kmene)

Fluorochinolóny sa vyznačujú častým výskytom vo vodných systémoch po celom svete. Ich obsah vo vode sa pohybuje od nanogramov po miligramy na liter. Do životného prostredia sa fluorochinolóny dostávajú viacerými spôsobmi vrátane procesu výroby, používania a likvidácie týchto liečiv [1]. Veterinárne využívané fluorochinolóny (napr. sarafloxacín) sa v prostredí viažu na organický materiál a v nezmennej forme perzistujú v sedimentoch a pôdach [8]. Sú to látky s toxickým účinkom na živé organizmy [7] a ich prítomnosť v životnom prostredí prispieva k rozširovaniu bakteriálnej rezistencie na antibakteriálne látky [9].

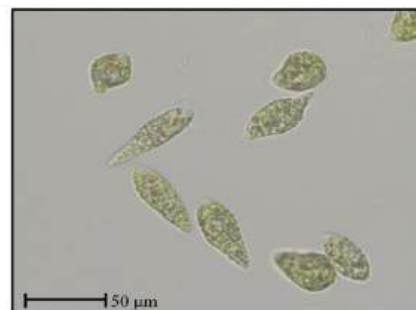
Sarafloxacín hydrochlorid (Obrázok 1) je fluorochinolónový derivát tretej generácie so širokým spektrom účinku, ktoré zahŕňa grampozitívne a gramnegatívne baktérie vrátane taxónu Enterobacteriaceae. Využíva sa vo veterinárnej medicíne v chove zvierat na liečbu a kontrolu kolibacilózy u brojlerov a moriek [10] [11] a pri terapii bakteriálnych ochorení u chovaných akvakultúrnych živočíchov (napr. losos atlantický, kapor obyčajný a iné) [12].



Obrázok 1 Sarafloxacín hydrochlorid – molekulárna štruktúra
Zdroj: [13]

Pojem mikroriasy opisuje polyfyletickú skupinu fotosyntetizujúcich mikroorganizmov, do ktorej radíme cyanobaktérie a jednobunkové protozoá [14]. Narušenie ich životného cyklu ovplyvňuje celý ekosystém, pretože sú primárni producenti v akvatických potravných reťazcoch. Môžeme ich použiť ako environmentálne bioindikátory a vďaka vlastnostiam ako rýchly rast a dobrá kultivovateľnosť v laboratórnych podmienkach sú mikroriasy vhodné na hodnotenie ekotoxicity chemoterapeutík v životnom prostredí [15].

Euglena gracilis je sladkovodný jednobunkový bičíkovec, ktorý primárne získava energiu procesom fotosyntézy (Obrázok 2). Organické látky dokáže prijímať aj z okolitého prostredia procesom osmózy. Patrí medzi auxotrofné organizmy a v procese kultivácie musíme médium obohatiť o vitamíny B₁ a B₁₂. Vplyvom vonkajších faktorov, ako sú napríklad antimikrobiálne látky, môže dôjsť u *E. gracilis* k degradácii chloroplastovej DNA, čo vedie k strate schopnosti fotosyntetizovať. Tento proces sa prejavuje navonok vybielovaním kultúr bičíkovca, čo viedlo k názvu – „chloroplast bleaching“ [16]. Na základe týchto vlastností predstavuje *E. gracilis* vhodný modelový organizmus na sledovanie efektu, ktorý majú fluorochinolóny na fotosyntetizujúcich zástupcov vo sladkovodných prostrediach.



Obrázok 2 Formaldehydom fixované bunky divého kmeňa *E. gracilis* kmeň Z, pod svetelným mikroskopom pri zväčšení 400-krát.

Cieľom práce bolo experimentálne posúdiť efekt sarafloxacín hydrochloridu na bičíkovcovi *E. gracilis*. Sledovali sme degradáciu chloroplastov na zhodnotenie efektu, ktorý tento fluorochinolónový derivát má na iné fotosyntetizujúce mikroorganizmy a rastliny vo sladkovodných ekosystémoch.

1. Materiál a metódy

Ako modelový organizmus sme použili bičíkovca *Euglena gracilis* kmeň Z, získaný z SAG 1224-5/25 Collection of Algae, Göttingen, Nemecko. Na kultiváciu buniek *E. gracilis* sme použili Cramer-Myersovo médium, pH = 6,9 [17], doplnené 96 % etanolom na výslednú koncentráciu 0,6 % (zdroj uhlíka) [18].

Modifikované Cramer-Myersovo médium sme pripravili zo štyroch zásobných roztokov (tabuľka 2). Bunky *E. gracilis* boli kultivované staticky v 100 ml Erlenmeyerových bankách v 50 ml média pri permanentnom svetle, so stálou teplotou (23 °C) za atmosférického tlaku.

Tabuľka 2 Jednotlivé zložky pre prípravu Cramer-Myersovho média s hodnotou pH 6,9

zásobný roztok	chemická látka	koncentrácia zásobného roztoku
CM-1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	25 g/ 250 ml
	KH ₂ PO ₄	25 g/ 250 ml
	trinatriumcitrát (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	16,125 g/250 ml
CM-2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,6625 g/250 ml
CM-3	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g/ 250 ml
CM-4	FeSO ₄ .7H ₂ O	25 g/ 250 ml
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,45 g/250 ml
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,325 g/250 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/250 ml
	NaMoO ₄ .H ₂ O	0,05 g/250 ml
	CuSO ₄ .H ₂ O	0,005 g/250 ml

Pri kultivácii v Erlenmeyerových bankách sme do CM média pridali vitamíny B₁ a B₁₂ (tabuľka 3) a 300 µl 96 % etanolu ako zdroj uhlíka.

Do 100 ml Erlenmeyerových baniek sme sterilne inokulovali kultúru buniek *E. gracilis* v koncentrácii 5x10³ buniek/ml (koncentráciu buniek v kultúrach sme určili počítaním v Bürkerovej komôrke).

Tabuľka 3 Množstvá vitamínov pipetované k 50 ml média (do 100 ml Erlenmeyerovej banky)

látka	objem [µl]
vitamín B ₁	250
vitamín B ₁₂	10

1.1 Kultivácia bunkových kultúr ovplyvnených sarafloxacín hydrochloridom

Pripravili sme si zásobné roztoky sarafloxacín hydrochloridu s koncentráciami 10, 200, 1000 µg/ml rozpustením v dimetylsulfoxide, tak aby konečná koncentrácia dimetylsulfoxidu v médiu bola < 1 %. Pracovali sme v triplikáte.

Ovplyvnené kultúry sme po 24 hodinách, 7 dňoch a 14 dňoch od inokulácie naočkovali na Petriho misky s pevným Cramer-Myersovým médiom (Tabuľka 4).

Tabuľka 4 Príprava pevného Cramer-Mayersovho média (V=300 ml). Médium sme sterilizovali autoklávaním, po čiastočnom ochladení sme do média pridali vitamíny.

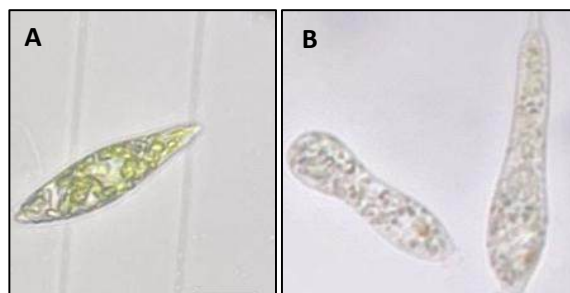
látka/zmes	množstvo
tekuté CM médium	300 ml
octan sodný	1,5 g
bakteriologický agar	3,6 g
vitamín B1	1500 µl
vitamín B2	60 µl

Kultúry sme pred naočkováním na tuhé CM médiu riedili tak, aby sme na jednu Petriho misku naniesli 50-100 buniek. Kultivačné podmienky boli rovnaké ako pri kultivácii v tekutom CM médiu.

2 Výsledky a diskusia

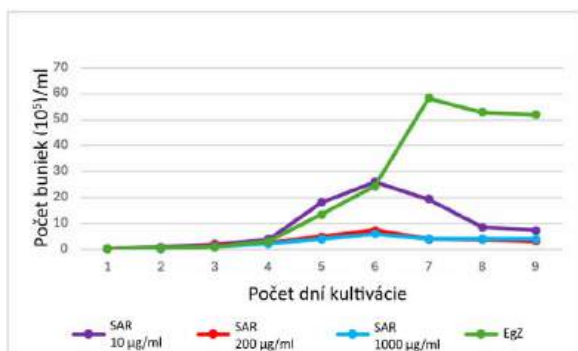
Počas kultivácie sme pozorovali odfarbenie kultúr *E. gracilis* ovplyvňovaných sarafloxacín hydrochloridom v porovnaní s neovplyvnenou kultúrou *Euglena gracilis* Z, ktorá si zachovala počas celej kultivácie zelenú farbu.

Morfologické zmeny buniek sme porovnávali pomocou svetelného mikroskopu. Pri neovplyvnených zelených bunkách *E. gracilis* sme pozorovali bičik, červenú škvrnu – stigma, chloroplasty a vakuolu. Bunky mali prevažne pozdĺžny tvar. Pri pozorovaní buniek ovplyvňovaných fluorochinolónovým derivátom sme zaznamenali úbytok chloroplastov a bunky mali okrem pozdĺžneho aj guľovitý tvar. Motilita buniek bola vo všetkých kultúrach zachovaná (Obrázok 3).



Obrázok 3 Bunky bičikovca *Euglena gracilis* pod svetelným mikroskopom pri 400-násobnom zväčšení, kde A – fluorochinolónami neovplyvnený divý kmeň *E. gracilis*), B – bunky *E. gracilis* kultivované v médiu s prídavkom sarafloxacín hydrochloridu po 7 dňoch kultivácie.

Počas 9 dní kultivácie v tekutom CM médiu sme zaznamenali počet buniek kultúr *E. gracilis* a vyhotovili sme rastové krivky (Graf 1).



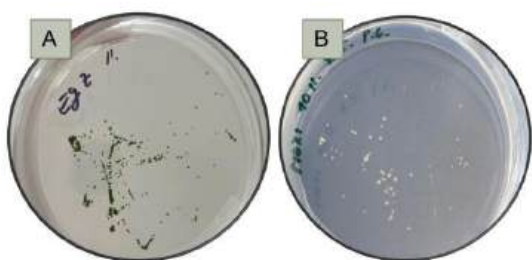
Graf 1 Grafické znázornenie rastovej krivky *E. gracilis* ovplyvňovanej sarafloxacinom (SAR) v koncentráciách 10, 200 a 1000 µg/ml a neovplyvňovaného divého typu (EgZ). Graf predstavuje pomer počtu buniek v hodnotách 10⁵ na 1 ml CM média v závislosti od počtu dní kultivácie.

Na základe porovnania výsledkov z rastových kriviek *E. gracilis* sme pozorovali, že exponenciálna fáza rastu neovplyvňovanej kultúry *E. gracilis* Z dosiahla svoj vrchol na 7. deň kultivácie v tekutom CM médiu.

U ovplyvňovaných kultúr *E. gracilis* sa vrchol exponenciálnej fázy rastu vyskytoval na 5., 6. či 7. deň kultivácie v tekutom CM médiu.

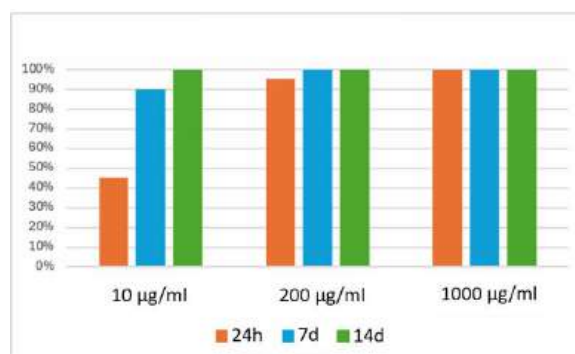
Taktiež sme pozorovali rozdiel v koncentrácii buniek *E. gracilis*. Kultúry ovplyvňované sarafloxacin hydrochloridom pri prídavkoch 200 a 1000 µg/ml chemoterapeutika mali už od druhého dňa kultivácie značne menšiu koncentráciu buniek. Pri množstve 10 µg/ml sarafloxacinu bol počet buniek do 6. dňa kultivácie v hodnotách porovnateľným s neovplyvňovanou zelenou kultúrou.

Po dosiahnutí rastového vrchola v 6 deň, počet buniek pri najnižšej koncentrácii fluorochinolónu začal taktiež rapídne klesať. V rámci štúdie sme sledovali zmeny sfarbenia kolónií počas kultivácie a zaznamenávali sme priebeh procesu degradácie a vybielovania chloroplastov. Po 24 hodinách, 7 dňoch a 14 dňoch kultivácie v tekutom CM médiu sme bunky vysiali na tuhé CM médium (Obrázok 4).



Obrázok 4 Petriho misky s tuhým CM médiom, na ktorých rastie: A – neovplyvnená zelená kultúra *Euglena gracilis*, B – kultúry ovplyvňované sarafloxacin hydrochloridom v koncentracii 200 µg/ml po dobu 14 dní.

V kultúrach ovplyvňovaných sarafloxacin hydrochloridom sme pozorovali pribúdajúci počet bielych kolónií, kedy rýchlosť a množstvo záviselo od koncentrácie chemoterapeutika. Bunky ovplyvňované sarafloxacin hydrochloridom po dobu 24 hodín vykazujú úplné vybielenie iba pri najvyššej koncentrácii 1000 µg/ml. Po 7 dňoch ovplyvňovania došlo k 100 % vybieleniu aj pri koncentrácii 200 µg/ml a po 14 dňoch nastalo úplné vybielenie už pri najnižšej koncentrácii 100 µg/ml (Graf 2).



Graf 2 Percentuálne zobrazenie vybielených buniek vplyvom sarafloxacinu po 24 hod., 7 a 14 dňoch kultivácie pri jednotlivých skúmaných koncentráciách.

Vplyv antibakteriálnych látok, vrátane sarafloxacin hydrochloridu, na rast buniek *E. gracilis* bol analyzovaný v štúdiu, kde pracovali s koncentraciami chemoterapeutika 10, 50, 100, 500 a 1000 mg/ml. Až na koncentráciu 10 mg/ml, bolo sledované vybielenie 100 % kolónií po 24 hodinách kultivácie [19]. V rámci nášho experimentu sme zistili, že aj menšie koncentrácie sarafloxacinu (napr. 1000 µg/ml) môžu už po 24 hod spôsobiť 100 % odfarbenie kultúr, čo je významné pri posudzovaní ekotoxicity a nebezpečenstva fluorochinolónov.

V dlhoročnej štúdiu (roky 2014-2024) stanovovali obsah antibakteriálnych farmaceutických kontaminantov v pobrežných oblastiach Číny. Priemerný obsah sarafloxacinu v skúmaných pobrežných regiónoch bol 4,62 ng/ml, kedy maximálna nameraná koncentrácia bola 80 ng/ml [20]. V štúdiu analýzy koncentrácie fluorochinolónov v jazere Titicaca, Peru a stanovili obsah sarafloxacinu, pričom priemerná koncentrácia sarafloxacinu zistená v povrchovej a pitnej vode bola 0,7 ng/ml [21]. Najnižšia nami analyzovaná koncentrácia (10 mg/ml) spôsobila degradáciu chloroplastov a vybielenie 100 % kolónií po 14 dňoch kultivácie, čo hovorí o vysoko toxickom efekte na fotosyntetizujúce organizmy.

Štúdia zvyrazňuje potrebu analýzy aj iných fluorochinolónových chemoterapeutik, ktoré sú častými kontaminantami vôd. Enrofloxacin je veterinárne využívaný fluorochinolónový derivát, ktorý sa taktiež v environmente vyskytuje v kritických

koncentráciách. Štúdie [22, 23] potvrdili výskyt tohto chemoterapeutika vo vodných systémoch v koncentráciách od 17 ng/l do 8,77 µg/l.

Naša práca prispieva dátami, ktoré potvrdzujú ekotoxickú veterinárnych fluorochinolónov a zväčšuje potrebu ďalšej analýzy, ktorá by zahŕňala nižšie koncentrácie fluorochinolónov a študovala by ich vplyv na biotické zložky vodných environmentov.

Záver

V práci sme študovali vplyv sarafloxacín hydrochloridu na chloroplasty bičkovca *Euglena gracilis*. Posúdili sme a kvantifikovali schopnosť chemoterapeutika indukovať vybielenie buniek.

Rozsah vybielenia zelených kultúr bičkovca *Euglena gracilis* bol výrazne ovplyvnený koncentráciou antibakteriálnej látky a dobou expozície. Vyššie koncentrácie chemoterapeutika a dlhšia expozícia spôsobili výraznejšie bielenie.

Toto zistenie zdôrazňuje dôležitosť zváženia dávkovania a trvania liečby sarafloxacín hydrochloridom a iných fluorochinolónových derivátov. Práca prispieva k výskumu vplyvu, ktorý majú rezíduá antibakteriálnych látok na fotosyntetizujúce organizmy a poskytuje základ pre ďalší výskum mechanizmov, ktoré sa týkajú citlivosti chloroplastov na fluorochinolóny.

PodĎakovanie

Rada by som poďakovala Mgr. Dominike Vešelényiovej, PhD. za odborné vedenie a neustálu ochotu, ktorú mi poskytovala počas písania práce.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] DU, J.; LIU, Q.; PAN, Y.; XU, S.; LI, H. a TANG, J., (2023). The research status, potential hazards and toxicological mechanisms of fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Antibiotics*, roč. 12, AN: 1058. DOI: 10.3390/antibiotics12061058.
- [2] RUSU, A.; LUNGU, I. A.; MOLDOVAN, O. L.; TANASE, C. a HANCU, G., (2021). Structural Characterization of the Millennial Antibacterial (Fluoro)Quinolones—Shaping the Fifth Generation. *Pharmaceutics*, roč. 13, č. 8, AN: 1289. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081289.
- [3] ALDRED, K. J.; KERNS, R. J. a OSHEROFF, N., (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, roč. 53, č. 10, s. 1565–1574. DOI: 10.1021/bi500056.
- [4] KOUTSOUMANIS, K. a kol., (2021). Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 10: Quinolones: flumequine and oxolinic acid. *EFSA Journal*, roč. 19, č. 10, AN: e06862. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6862.
- [5] RODRIGUES, C. F. a SILVA, F., (2025). The rise, fall, and rethink of (fluoro)quinolones: A quick rundown. *Pathogens*, roč. 14, č. 6, AN: 525. DOI: 10.3390/pathogens14060525.
- [6] JONES, T. M.; JOHNSON, S. W.; DIMONDI, V. P. a WILSON, D. T., (2016). Focus on JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, for the management of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. *Infection and Drug Resistance*, roč. 9, s. 119–128. DOI: 10.2147/IDR.S105620.
- [7] BRUCKMANN, F. D. S. a kol., (2025). Occurrence, toxicity, ecological aspects, and environmental removal of ciprofloxacin, levofloxacin, and other fluoroquinolones excreted in urine. *Journal of Water Process Engineering*, roč. 77, AN: 108593. DOI: 10.1016/j.jwpe.2025.108593.
- [8] PARSHIKOV, I. A.; FREEMAN, J. P.; LAY, J. O., Jr; MOODY, J. D.; WILLIAMS, A. J.; BEGER, R. D. a SUTHERLAND, J. B., (2001). Metabolism of the veterinary fluoroquinolone sarafloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, roč. 26, č. 3, s. 140–144. DOI: 10.1038/sj.jim.7000077.
- [9] THAI, V.-A.; DANG, V. D.; NGUYEN, T. T.; PANDIT, B.; VO, T.-K.-Q. a KHEDULKAR, A. P., (2023). Fluoroquinolones: Fate, effects on the environment and selected removal methods. *Journal of Cleaner Production*, roč. 418, AN: 137762. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.137762.
- [10] JONES, R. N. a ERWIN, M. E., (1998). In vitro susceptibility testing and quality control parameters for sarafloxacin (A-56620): a fluoroquinolone used for treatment and control of colibacillosis in poultry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, roč. 32, č. 1, s. 55–64. DOI: 10.1016/S0732-8893(98)00063-7.
- [11] YU, Y.; ZHOU, Y. F.; SUN, J.; SHI, W.; LIAO, X. P. a LIU, Y. H., (2017). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of sarafloxacin against avian pathogenic *Escherichia coli* in Muscovy ducks. *BMC Veterinary Research*, roč. 13, č. 1, s. 47. DOI: 10.1186/s12917-017-0964-0.
- [12] MA, R.; WU, Y.; LI, G.; ZHAO, S.; LI, L. a FANG, W., (2022). Pharmacokinetics of sarafloxacin hydrochloride in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following multiple-dose oral administration. *Aquaculture*, roč. 548, časť 1, AN: 737662. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737662.
- [13] TYRPENOU, A.; IOSSIFIDOU, E.; PSOMAS, I. a FOTIS, G., (2002). Determination of sarafloxacin residues in gilthead seabream

- (*Sparus aurata* L.) tissues by HPLC-SFD-PDA. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, roč. 25, s. 747–758. DOI: 10.1081/JLC-120003032.
- [14] LI, Z.; GAO, X.; BAO, J.; LI, S.; WANG, X.; LI, Z. a ZHU, L., (2023). Evaluation of growth and antioxidant responses of freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus dimorphus* under exposure of moxifloxacin. *Science of the Total Environment*, roč. 858, část 1, AN: 159788. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.159788.
- [15] LIHANOVÁ, D.; LUKÁČOVÁ, A.; BECK, T.; JEDLIČKA, A.; VEŠELÉNYIOVÁ, D.; KRAJCOVIC, J. a VESTEG, M., (2023). Versatile biotechnological applications of *Euglena gracilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, roč. 39, č. 5, AN: 133. DOI: 10.1007/s11274-023-03585-5.
- [16] KRAJČOVIČ, J.; VESTEG, M. a SCHWARTZBACH, D. S., (2015). Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, roč. 202, s. 135–145. ISSN 0168-1656.
- [17] CRAMER, M. a MYERS, J., (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Archiv für Mikrobiologie*, roč. 17, s. 384–402. DOI: 10.1007/BF00410835
- [18] BUETOW, D. E. a PADILLA, G. M., (1963). Growth of *Astasia longa* on ethanol. I. Effects of ethanol on generation time, population density and biochemical profile. *The Journal of Protozoology*, roč. 10, s. 121–123. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1963.tb01646.x.
- [19] REHÁKOVÁ, R., (2019). Vplyv nových derivátov fluorochinolónov na chloroplasty bičíkovca *Euglena gracilis*. *Diplomová práca*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 66 s.
- [20] YI, C. a kol., (2025). Distribution and risk characteristics of antibiotics in China surface water from 2013 to 2024. *Chemosphere*, roč. 375, AN: 144197. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2025.144197.
- [21] VILCA, F. Z. a kol., (2021). Occurrence of residues of veterinary antibiotics in water, sediment and trout tissue (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern area of Lake Titicaca, Peru. *Journal of Great Lakes Research*, roč. 47, č. 4, s. 1219–1227. ISSN 0380-1330. DOI: 10.1016/j.jglr.2021.04.012.
- [22] WEI, R.; GE, F.; CHEN, M. a WANG, R., (2012). Occurrence of Ciprofloxacin, Enrofloxacin, and Florfenicol in Animal Wastewater and Water Resources. *Journal of Environmental Quality*, roč. 41, s. 1481–1486. ISSN 0047-2425. DOI: 10.2134/jeq2012.0014.
- [23] IKEM, A.; LIN, C. H.; BROZ, B.; KERLEY, M. a THI, H. L., (2017). Occurrence of enrofloxacin in overflows from animal lot and residential sewage lagoons and a receiving-stream. *Heliyon*, roč. 3, č. 10, AN: e00409. ISSN 2405-8440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2017.e00409.

SEKCIA

CHÉMIA



Využitie termochemickej konverzie na zhodnotenie trusu exotických zvierat

Thermochemical conversion for the valorization of exotic animal dung

Simona Ďurišová¹ - Vladimír Frišták¹

¹Katedra chémie, Pedagogická fakulta TRUNI, Priemyselná 4, 918 43 Trnava
simona.durisova@tvu.sk

Abstrakt

Vzorky pripravené pomalou pyrolýzou trusu slona afrického (BC_{ED}), ťavy dvojhrebnej (BC_{CD}), zebry bezhrubej (BC_{ZD}), antilopy vranej (BC_{AD}) a pakoňa modrého (BC_{WD}) pri teplote 550 °C preukázali výrazne zásaditejšie hodnoty pH v porovnaní so vstupným materiálom, ktoré sa zvyšovali v poradí: BC_{ZD} (10,67) < BC_{AD} (10,85) < BC_{WD} (10,91) < BC_{ED} (10,97) < BC_{CD} (11,10). Prvková analýza vzoriek nám potvrdila zvýšené koncentrácie Zn 469,00 mg/kg vo vzorke BC_{AD} a 195,00 mg/kg vo vzorke BC_{WD}. Sekvenčný extrakčný protokol s využitím H₂O, NaHCO₃, NaOH a HCl ako extraktantov poukázal na rozdielne zastúpenie frakcií viazaného P. Na základe výsledkov sme potvrdili, že počas pyrolýzy dochádza k čiastočnej transformácii mobilných, ľahko extrahovateľných foriem P vo frakciách P_{H₂O} a P_{NaHCO₃} na stabilnejšie formy extrahovateľné roztokmi NaOH a HCl. Celková koncentrácia PAH bola vo vzorke BC_{ED} 1,5037 mg/kg a v BC_{CD} 1,971 mg/kg, pričom naftalén tvoril 59,19 % a 65,96 % celkovej koncentrácie PAH. Klíčivostný test s využitím žeruchy siatej (*Lepidium sativum*) potvrdil, že biouhlie nemá negatívny vplyv na rýchlosť klíčenia semien. Štruktúra povrchu pyrolýznych materiálov preukázala výrazný nárast povrchovej plochy v porovnaní so vstupným lignocelulózovým materiálom, čo sa pripisuje ich termochemickej degradácii. Vo vzorkách trusu BM_{ED}, BM_{WD}, BM_{AD}, BM_{ZD}, BM_{CD} sme potvrdili prítomnosť aeróbnych baktérií, pričom ich počet stúpal v poradí: BM_{ED} (4,4 x 10⁷ CFU/g) < BM_{ZD} (8 x 10⁶ CFU/g) < BM_{AD} (4,4 x 10⁶ CFU/g) < BM_{WD} (8 x 10⁴ CFU/g) < BM_{CD} (8 x 10³ CFU/g).

Kľúčové slová: exkrementy, biouhlie, pyrolýza, pôdne aditívum

Abstract

Samples prepared by slow pyrolysis of African elephant dung (BC_{ED}), two-humped camel dung (BC_{CD}), roan

zebra dung (BC_{ZD}), black antelope dung (BC_{AD}) and blue wildebeest dung (BC_{WD}) at a temperature of 550 °C showed significantly more alkaline pH values compared to the input material, which increased in the following order: BC_{ZD} (10.67) < BC_{AD} (10.85) < BC_{WD} (10.91) < BC_{ED} (10.97) < BC_{CD} (11.10). Elemental analysis of the samples confirmed increased concentrations of Zn 469.00 mg/kg in the BC_{AD} sample and 195.00 mg/kg in the BC_{WD} sample. A sequential extraction protocol using H₂O, NaHCO₃, NaOH, and HCl as extractants revealed different proportions of bound P fractions. Based on the results, we confirmed that during pyrolysis, mobile, easily extractable forms of P in the P_{H₂O} and P_{NaHCO₃} fractions are partially transformed into more stable forms extractable with NaOH and HCl solutions. The total PAH concentration was 1.5037 mg/kg in the BC_{ED} sample and 1.971 mg/kg in the BC_{CD} sample, with naphthalene accounting for 59.19% and 65.96% of the total PAH concentration, respectively. A germination test using cress (*Lepidium sativum*) confirmed that biochar has no negative effect on seed germination rate. The surface structure of pyrolysis materials showed a significant increase in surface area compared to the input lignocellulosic material, which is attributed to their thermochemical degradation. In the BM_{ED}, BM_{WD}, BM_{AD}, BM_{ZD}, and BM_{CD} manure samples, we confirmed the presence of aerobic bacteria, with their numbers increasing in the following order: BM_{ED} (4.4 x 10⁷ CFU/g) < BM_{ZD} (8 x 10⁶ CFU/g) < BM_{AD} (4.4 x 10⁶ CFU/g) < BM_{WD} (8 x 10⁴ CFU/g) < BM_{CD} (8 x 10³ CFU/g).

Key Words: excrements, biochar, pyrolysis, soil additive

Úvod

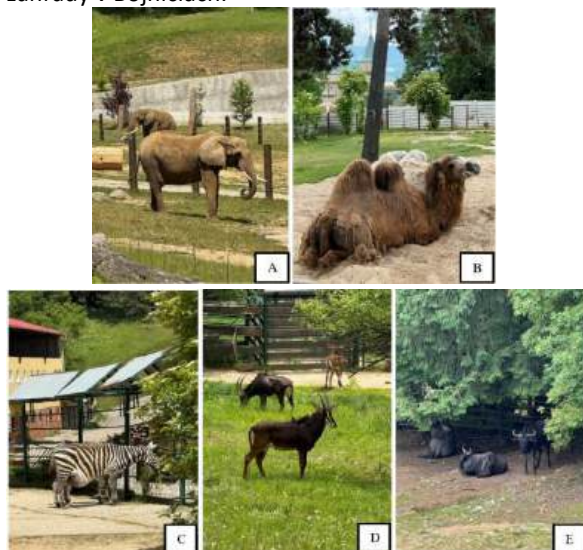
Poľnohospodárske využitie nespracovaného trusu exotických zvierat so sebou prináša viacero rizík. Keďže napr. trus slona afrického predstavuje 60 – 65 % nestrávenej potravy, väčšina semien rastlín, ktoré do

trávacieho traktu zvierat vstupujú, nie sú v truse nijak inaktivované. Rovnako sa ako problém ukazuje mikrobiálna kontaminácia pôdy, ktorú môže aplikovaný trus exotických zvierat spôsobiť. Preto sa ako vhodné spracovanie tohto odpadového materiálu aj z pohľadu eliminácie množstva javí termochemická konverzia. V priebehu procesu pyrolýzy (350°C-800°C) dochádza jednak k hygienizácii trusu (eliminácii patogénnych mikroorganizmov vplyvom teploty), ako aj multiplifikácii nutrične dôležitých prvkov (C, P, K, Zn). Výsledný tuhý produkt - biouhlie sa vyznačuje rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami ako samotný vstupný prekurzor. Pyrolýzovaný trus môže slúžiť ako pôdne aditívum, ktoré dokáže postupne uvoľňovať minerálne látky a organický uhlík do pôdy. Pripravený pyrolýzny produkt na báze trusu exotických zvierat prináša značný benefit a najmä reprezentuje príspevok k riešeniu otázok odpadového hospodárstva zoológických záhrad, keďže biouhlie na báze trusu môže predstavovať efektívny zdroj nutrične dôležitých látok pre rastliny pestované vo výbehoch zvierat alebo okrasných a odpočinkových častiach záhrad. [1, 2].

1 Materiály a metódy

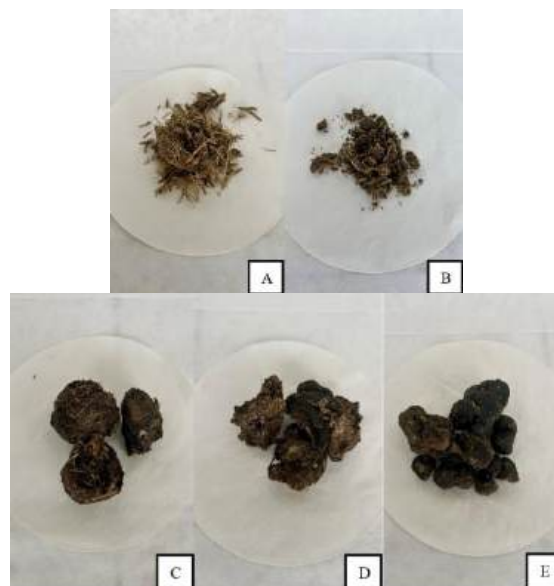
1.1 Príprava pyrolýznych produktov

Ako vstupný materiál pre termochemickú konverziu bol použitý trus afrického slona (*Loxodonta africana*), ťavy dvojhrbej (*Camelus ferus*), zebry bezhrivej (*Equus quagga borensis*), antilopy vranej (*Hippotragus niger*) a pakoňa modrého (*Connochaetes taurinus taurinus*) (Obr.1, 2). Odber a identifikácia exkrementov prebehli v spolupráci s ošetrovateľmi z Národnej zoológickej záhrady v Bojniciach.



Obr.1 Fotografie exotických zvierat v NZOO Bojnice: Slon africký (A), Ťava dvojhrbá (B), Zebra bezhrivá (C), Antilopa vraná (D), Pakoň modrý (E)

Zdroj: Autor



Obr.2 Vstupný materiál (trus) slona afrického (A), ťavy dvojhrbej (B), zebry bezhrivej (C), antilopy vranej (D) a pakoňa modrého (E)

Zdroj: Autor

Vysušenie odobratých vzoriek do konštantnej hmotnosti bolo realizované v laboratórnej sušiarňi (Binder, Nemecko) pri teplote 60 °C po dobu 48 hodín. Sušina bola po vysušení zhomogenizovaná a reprezentatívna vzorka bola získaná kvartovacou metódou. Biomasa trusu slúžila ako vstupný prekurzor vstupujúci do procesu pomalej pyrolýzy, ktorý prebiehal pri teplote 550 °C za anoxických podmienok s kontinuálnym prietokom dusíka 2 l/min. Pyrolýza trvala po dobu 1 hodiny a bola realizovaná v modifikovanej muflovej peci. Výsledné biouhlie slonieho (BC_{ED}), ťavieho (BC_{CD}), zebrieho (BC_{ZD}), antilopieho (BC_{AD}) a pakoňieho trusu (BC_{WD}) bolo po pyrolýze opätovne homogenizované a preosiate pre získanie frakcie častíc < 0,5 mm. Táto frakcia pyrolýzneho materiálu, ako aj samotný vstupný prekurzor (< 0,5 mm), boli následne uskladnené a použité na základnú fyzikálno-chemickú charakterizáciu, mikrobiologickú a kľúčivostný test.

1.2 Fyzikálno-chemická charakterizácia pyrolýznych produktov

Biouhlie pripravené z piatich druhov trusu, ako aj samotný trus, boli podrobené fyzikálno-chemickej

charakterizácii, a to stanoveniu aktívneho pH, elektrickej vodivosti (EC), koncentrácií celkového C, H a N pomocou CHN-S elementárneho analyzátoru, obsahu popola a vlhkosti, ako aj koncentrácií potenciálne toxických kovov stanovených pomocou ICP-OES a koncentrácia Hg bola stanovená jednoučelovým atómovým absorpčným spektrometrom (CV-AAS). Ďalej bola vykonaná FT-IR analýza na spektrometri Cary 630 (Agilent, USA) vybavenom ATR príslušenstvom s Ge kryštálom. Pre stanovenie obsahu 16 štruktúr PAHs bola použitá metóda izotopového zriedovania s použitím HRGC-HRMS. Stanovenie 7 štruktúr PCBs a 17 štruktúr PCDD/F prebiehalo s použitím HRGC-HRMS a HRGC-MS/MS. Charakterizácia povrchovej morfológie a štruktúry vzoriek bola uskutočnená pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM).

1.3 Ekotoxikologické testy

Pre posúdenie ekotoxicity vstupných prekurzorov, ako aj pyrolýzných produktov na báze trusu exotických zvierat, bol zrealizovaný kľúčivostný test so žeruchou siatou. Testované výluhy boli pripravené v pomere 1:10 (biouhlie/trus: deionizovaná voda). Doba expozície bola 72 h. Na mikrobiologickú analýzu prítomných celkových aeróbných a koliformných baktérií v pyrolýznom materiáli a živočíšnom truse sme pripravili suspenzie obsahujúce 0,5 g analyzovanej vzorky v 40 ml sterilnej deionizovanej vody. Suspenzie boli inkubované po dobu 24 h pri 45 rpm a 24 °C. Na stanovenie celkového počtu prítomných aeróbných/koliformných baktérií sme využili lopatkový tester (ponorné médium – Hach, USA s kultiváciou pri teplote 35 – 37 °C po dobu 48 h.

2 Výsledky a diskusia

Na základe zistených fyzikálno-chemických charakteristík vstupnej biomasy (Tab.1), ako aj pyrolýzných materiálov pripravených pri teplote 550 °C (Tab.2), môžeme usúdiť, že po pyrolýze došlo k výraznému nárastu hodnôt aktívneho pH vo všetkých pyrolýzných produktoch. Najvyššiu hodnotu aktívneho pH preukázala vzorka biouhlia pripraveného z ťavieho trusu (BC_{CD}), pričom hodnoty sa zvyšovali v poradí: BC_{ZD} < BC_{AD} < BC_{WD} < BC_{ED} < BC_{CD}. Na podobné zistenia prišli aj Zhang a kol. [3], pričom po pyrolýznom spracovaní kravského trusu pri teplote 600 °C sa hodnota pH zvýšila zo 7,25 na 9,99 v pripravenom biouhli. Vplyvom termochemickej konverzie sa všeobecne zvyšuje hodnota pH materiálu v dôsledku

formovania alkalických solí a redukcie kyslých povrchových funkčných skupín, čo korešponduje s našimi výsledkami [4]. Fyzikálno-chemická charakterizácia vzoriek potvrdila, že vplyvom pyrolýzy došlo k zvýšeniu hodnôt elektrickej vodivosti (EC) produktov, pričom tieto sa pohybovali v rozpätí 1,23 – 1,88 mS/cm. V porovnaní so vstupným materiálom došlo k zvýšeniu EC vzorky BC_{ED} o 149,02 %, BC_{CD} o 79,84 %, BC_{ZD} o 125,07 %, BC_{AD} o 28,89 % a BC_{WD} o 39,34 %. Cantrell a kol. [5] vo svojej práci uvádzajú, že pyrolýzou kravského hnoja sa zvýšila hodnota EC z 0,56 mS/cm na 0,70 mS/cm, čo podporuje naše zistenia. Vysoké hodnoty EC sú spojené s vysokou salinitou, ktorá súvisí s uvoľňovaním zásaditých katiónov [6].

Počas termochemickej konverzie trusu exotických zvierat došlo k zvýšeniu obsahu C vo všetkých vzorkách a súčasne k zníženiu obsahu N pri vzorke BC_{AD}. Podobné výsledky uvádzajú aj Zeng a kol. [7], ktorí pri pyrolýze hnoja ošipovaných pri teplote 500 °C zaznamenali výrazný nárast obsahu C z 33,67 % vo vstupnom materiáli na 38,66 % v pripravenom biouhli. Cely a kol. [8] poukazujú na fakt, že v priebehu procesu pyrolýzy dochádza so zvyšujúcou sa teplotou k transformácii mobilného N na stabilnejšie formy. Vyprodukované biouhlie obsahuje pomerne nízke koncentrácie N viazané predovšetkým v heterocyklických zlúčeninách [9].

Obsah H sa vo všetkých pyrolýzných produktoch znížil, pričom rástli pri biouhli v poradí: BC_{AD} < BC_{CD}, BC_{WD} < BC_{ED} < BC_{ZD}. Tento pokles bol pravdepodobne spôsobený zánikom hydroxylových (–OH) a karboxylových (–COOH) funkčných skupín, ako aj hydratovaných štruktúr [7].

Tab.1 Základná fyzikálno-chemická charakteristika slonieho (BM_{ED}), ťavieho (BM_{CD}), zebrieho (BM_{ZD}), antilopieho (BM_{AD}) a pakonieho trusu (BM_{WD}). Priemerná hodnota z dvoch meraní ± SD

	BM _{ED}	BM _{CD}	BM _{ZD}	BM _{AD}	BM _{WD}
pH _{H₂O}	7,23 ± 0,03	8,71 ± 0,03	7,49 ± 0,02	8,11 ± 0,04	7,65 ± 0,04
EC (μS/cm)	562,20 ± 4,95	683,95 ± 18,60	835,30 ± 16,69	1319 ± 2,83	976,05 ± 5,87
C _{total} (%)	44,86 ± 0,13	43,61 ± 0,19	43,75 ± 0,04	40,91 ± 0,04	41,36 ± 0,02
N (%)	1,13 ± 0,04	1,42 ± 0,02	1,25 ± 0,05	1,89 ± 0,05	1,57 ± 0,05
H (%)	6,21 ± 0,01	6,14 ± 0,07	6,20 ± 0,03	5,69 ± 0,11	5,99 ± 0,06
Obsah popola (%)	11,81	19,44	13,91	20,20	18,28
Obsah vlhkosti (%)	4,63	5,58	4,40	4,99	4,94

Tab.2 Základná fyzikálno-chemická charakteristika biouhlia na báze slonieho (BC_{ED}), ľavieho (BC_{CD}), zebrieho (BC_{ZD}), antilopieho (BC_{AD}) a pakonieho trusu (BC_{WD}) pripraveného pri 550 °C. Priemerná hodnota z dvoch meraní ± SD

	BC _{ED}	BC _{CD}	BC _{ZD}	BC _{AD}	BC _{WD}
pH _{H2O}	10,97 ± 0,01	11,10 ± 0,02	10,67 ± 0,01	10,85 ± 0,01	10,91 ± 0,04
EC (mS/cm)	1,40 ± 0,02	1,23 ± 0,03	1,88 ± 0,02	1,70 ± 0,02	1,36 ± 0,01
C _{total} (%)	69,32 ± 0,04	56,90 ± 2,96	60,80 ± 0,48	46,99 ± 0,16	50,01 ± 0,13
N (%)	1,46 ± 0,21	1,60 ± 0,11	1,52 ± 0,03	1,62 ± 0,01	1,86 ± 0,14
H (%)	1,87 ± 0,06	1,64 ± 0,07	2,00 ± 0,03	1,42 ± 0,05	1,64 ± 0,09
Obsah popola (%)	64,30	64,99	56,54	67,08	61,02
Obsah vlhkosti (%)	2,24	1,19	3,08	2,46	2,63

Naše výsledky poukazujú na fakt, že nie všetky hmotnostné koncentrácie vybraných PTE vo vzorkách pyrolýznych materiálov spĺňajú maximálne povolené limity podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady EÚ [10]. Koncentrácia Cr presiahla povolený limit (2 mg/kg sušiny) vo vzorke BC_{ED} o 83,5 %, BC_{CD} o 319 %, BC_{ZD} o 47,5 %, BC_{AD} o 460 % a BC_{WD} o 318,5 % (Tab.3).

Tab.3 Celkové koncentrácie As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn a Hg (mg/kg) vo vzorke biouhlia na báze slonieho (BC_{ED}), ľavieho (BC_{CD}), zebrieho (BC_{ZD}), antilopieho (BC_{AD}) a pakonieho trusu (BC_{WD}) pripraveného pri 550 °C.

	BC _{ED}	BC _{CD}	BC _{ZD}	BC _{AD}	BC _{WD}
As (mg/kg)	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*
Hg (mg/kg)	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*
Cd (mg/kg)	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*
Cr (mg/kg)	3,67	8,38	2,95	11,20	8,37
Cu (mg/kg)	8,37	16,10	15,40	71,40	37,10
Ni (mg/kg)	20,30	27,10	3,58	7,89	8,28
Pb (mg/kg)	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*	<LOQ*
Zn (mg/kg)	66,40	114,00	110,00	469,00	195,00

*LOQ – medza stanovenia pre As – 5,00 mg/kg, Hg – 0,30 mg/kg, Cd – 0,40 mg/kg, Pb – 5,00 mg/kg

















Zvyšné hodnoty koncentrácií PTE, ako sú Cu, Ni a Zn, vyhovovali stanoveným limitom vo všetkých pyrolýznych materiáloch, pričom hmotnostné koncentrácie Ni vo vzorkách stúpali v poradí: BC_{ZD} < BC_{AD} < BC_{WD} < BC_{ED} < BC_{CD}. Koncentrácie As, Hg, Cd a Pb boli v nami skúmaných materiáloch pod medzou stanovenia danej analytickej metódy.

Extrahovaním živočíšneho trusu a biouhlia pomocou jednotlivých extrakčných činidiel sme zistili, že P sa vo vzorkách nachádza viazaný v rôznych chemických formách a koncentráciách. V živočíšnom truse bol P_{H2O} prítomný v najvyšších koncentráciách (1,35 – 2,03 mg/g), pričom v rámci vstupných prekursorov stúpali v poradí: BM_{AD} < BM_{ED} < BM_{WD} < BM_{ZD} < BM_{CD}. Fosfor extrahovaný extrakčným činidlom NaHCO₃ bol zistený v koncentráciách 0,48 – 2,37 mg/g, pričom najvyššiu koncentráciu P v danom extrakčnom činidle preukázala vzorka BM_{AD}. Roztoky NaOH a HCl extrahovali zo vzoriek trusu najnižšie koncentrácie P: roztok NaOH 0,13 – 0,59 mg/g a roztok HCl 0 – 0,90 mg/g. Naopak, v pyrolýznom materiáli na báze živočíšneho trusu sme pozorovali najvyššie koncentrácie P extrahované roztokom HCl (1,95 – 4,74 mg/g), pričom hodnoty stúpali vo vzorkách v poradí: BC_{WD} > BC_{ED} > BC_{ZD} > BC_{AD} > BC_{CD}. Pomerne vysoké zastúpenie mal v biouhlí aj P_{NaHCO3}, a to 2,07 – 3,59 mg/g. Nižšie koncentrácie P predstavovala frakcia P_{NaOH} (1,33 – 1,91 mg/g) a vo frakcii P_{H2O} bol P zastúpený najmenej (0,06 – 2,29 mg/g). Na základe výsledkov usudzujeme, že počas pyrolýzy dochádza k čiastočnej transformácii mobilných a ľahko extrahovateľných foriem P vo frakciách P_{H2O} a P_{NaHCO3} na stabilnejšie formy P extrahovateľné roztokmi NaOH a HCl. Na podobné zistenia prišli aj Jiang a kol. [11], pričom uvádzajú, že P sa v živočíšnom hnoji vyskytuje prevažne v podobe organických fosforečnanov, rozpustných fosforečnanov obsahujúcich Na, K a rozpustných foriem fosforečnanov obsahujúce Ca. Po pyrolýze dochádza k čiastočnej transformácii organického P na ortofosforečnan a pyrofosforečnan. Transformácia P_{H2O}, P_{NaHCO3} a P_{NaOH} na stabilnejší P_{HCl} počas pyrolýzy je závislá od teploty. Zvýšenie teploty vedie ku kryštalizácii zlúčenín obsahujúcich P a tvorbe minerálov.

V nami analyzovaných vzorkách pyrolýznych materiálov tvoril naftalén 59,19 % z celkovej koncentrácie PAH prítomných vo vzorke BC_{ED} a 65,96 % vo vzorke BC_{CD}. Celková koncentrácia PAH v BC_{ED} dosiahla hodnotu 1,5037 mg/kg a v BC_{CD} 1,971 mg/kg, pričom v oboch analyzovaných vzorkách sme potvrdili prítomnosť naftalénu, acenaftylénu, acenafténu,

fluorénu, fenantrénu, antracénu, fluoranténu, pyrénu a chryzénu (Tab.4).

Tab.4 Koncentrácie polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAH) v pyrolýznom materiáli zo slonieho (BC_{ED}) a ťavieho trusu (BC_{CD})

Názov PAH	Štruktúra	BC _{ED} [mg/kg]	BC _{CD} [mg/kg]
naftalén		0,890	1,300
acenaftylén		0,150	0,090
acenaftén		0,081	0,240
fluorén		0,099	0,120
fenantrén		0,180	0,130
antracén		0,016	0,027
fluorantén		0,049	0,035
pyrén		0,030	0,024
benzo(a)antracén		<LOQ*	<LOQ**
chryzén		0,0087	0,0050
benzo(b)fluorantén		<LOQ*	<LOQ**
benzo(k)fluorantén		<LOQ*	<LOQ**
benzo(a)pyrén		<LOQ*	<LOQ**
ideno(1,2,3-c,d)pyrén		<LOQ*	<LOQ**
dibenzo(a,h)antracén		<LOQ*	<LOQ**
benzo(g,h,i)perylén		<LOQ*	<LOQ**
Σ TEQ – dolná hranica	-	1,50	2,00
Σ TEQ – horná hranica	-	1,50	2,00

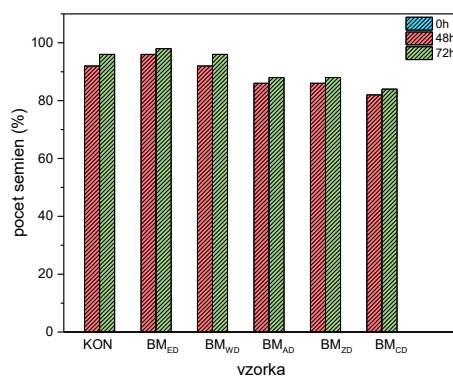
*LOQ – medza stanovenia pre benzo(a)antracén, benzo(b)fluorantén, benzo(k)fluorantén, ideno(1,2,3-c,d)pyrén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(g,h,i)perylén – 0,00048 mg/kg

**LOQ – medza stanovenia pre benzo(a)antracén, benzo(b)fluorantén, benzo(k)fluorantén, ideno(1,2,3-c,d)pyrén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(g,h,i)perylén – 0,00045 mg/kg

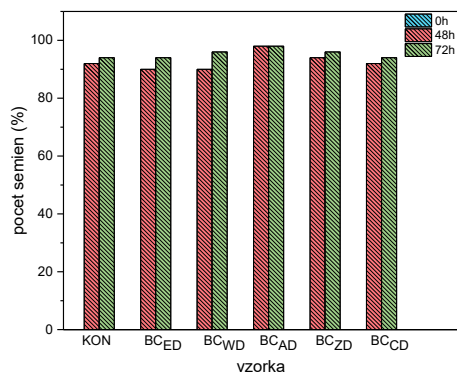
Obsah PCDD a PCDF vo vzorkách BC_{ED} a BC_{CD} neprekročil limity maximálnych povolených koncentrácií 2×10^{-5} mg/kg sušiny uvedených v nariadení Komisie (EÚ) 2021/2088 [12]. Hodnoty koncentrácií PCDD/F pre BC_{ED} ako aj BC_{CD} boli pod medzou stanovenia (LOQ) danej analytickej metódy, pričom podobné výsledky uvádzajú aj Wystalska a kol. [13]. Tvorbu dioxínov v priebehu termochemickej konverzie podľa autorov ovplyvňuje prítomnosť chlóru a organických látok vo vstupnom prekurzore, ako aj teplota pyrolýzy.

Všetky koncentrácie PCB vo vzorkách BC_{ED} a BC_{CD} boli nižšie ako medza stanovenia použitej analytickej metódy, a preto neprekročili limitnú hodnotu 0,8 mg/kg stanovenú nariadením Komisie (EÚ) 2021/2088 [12].

Realizáciou kľúčivostného testu sme zistili, že najrýchlejšiu kľúčivosť dosiahli semená v kontakte s vodným výluhom BC_{AD}, kde po 48 h vykličilo 98 % semien, avšak po 72 h sa ich počet nezmenil (Obr. 4). Naopak, najmenej semien vykličilo aplikáciou výluhu MB_{CD}, kde po 48 h vykličilo 82 % semien a po 72 h vykličilo 84 % semien (Obr. 3). Celkový počet vykličenených semien rástol po 48 h v poradí: MB_{CD} < MB_{ZD}, MB_{AD} < BC_{ED}, BC_{WD} < MB_{WD}, KON, BC_{CD} < BC_{ZD} < BM_{ED} < BC_{AD}. Po 72 h experimentu došlo k čiastočnej zmene počtu vykličenených semien, a to v poradí: MB_{CD} < MB_{ZD}, MB_{AD} < BC_{ED} < BC_{CD} < KON < BC_{ZD}, BC_{WD}, BM_{WD} < BC_{AD}. Výsledky potvrdzujú, že biouhlie nemá negatívny vplyv na kľúčivosť modelového organizmu.



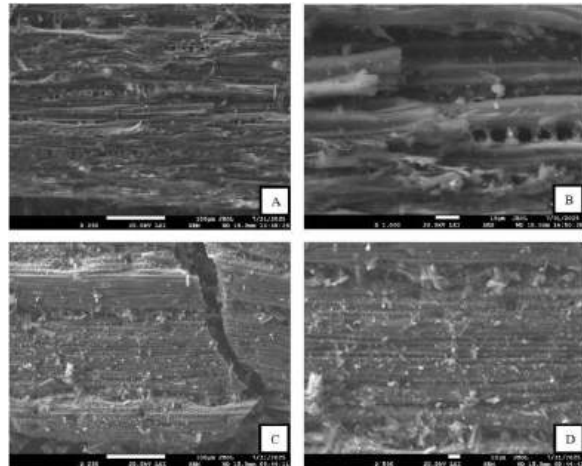
Obr. 3 Kľúčivostný test semien Žeruchy siatej (*Lepidium sativum*) vo vodných výluhoch mBM:mH₂O, kde KON = kontrolná vzorka, BM_{ED} = sloní trus, BM_{WD} = pakoní trus, BM_{AD} = antilipí trus, BM_{ZD} = zebří trus a BM_{CD} = ťaví trus. Test prebiehal 72 hodín s počtom semien 25 ks, pri laboratórnej teplote 25,7 °C, vlhkosti 33 %



Obr. 4 Klíčivostný test semien Žeruchy siatej (*Lepidium sativum*) vo vodných výluhoch mBC:mH₂O v pomere 1:10, kde KON = kontrolná vzorka, BC_{ED} = biouhlie zo slonieho trusu, BC_{WD} = biouhlie z pakonieho trusu, BC_{AD} = biouhlie z antilopieho trusu, BC_{ZD} = biouhlie zo zebrieho trusu a BC_{CD} = biouhlie z ťavieho trusu. Test prebiehal 72 hodín s počtom semien 25 ks, pri laboratórnej teplote 25,7 °C, vlhkosti 33 %

Skenovacia elektrónová mikroskopia (Obr. 5) potvrdila heterogénnosť a vlákňitý charakter povrchu, čo je typické pre rastlinné štruktúry. Povrch je miestami kompaktný, na iných miestach rozrušený a pórovitý, čo naznačuje rôznu stupeň biologického rozkladu. Na Obr. 5 – A, B sú viditeľné oválne až kruhové póry usporiadané v radoch, ktoré sú podobné cievnym zväzkom alebo parenchymatickým bunkám. Zmena štruktúry povrchu biouhlia pripraveného pri 550 °C je znázornená na obrázku 5 – C, D. Všeobecná morfológia vzoriek BC_{ED}, BC_{WD}, BC_{AD}, BC_{ZD} a BC_{CD} preukázala výrazný nárast povrchovej plochy v porovnaní so vstupným lignocelulózovým materiálom, čo sa pripisuje jeho termochemickej degradácii. Podľa Stylianou a kol. [14] vznikajú pyrolýzou prchavé organické zlúčeniny, ktoré ovplyvňujú pórovitú štruktúru pripraveného biouhlia. Autori tiež uvádzajú, že pyrolýzou hnoja dobytka pri 550 °C, dochádza k tvorbe makropórov (> 50 nm), ktoré môžu pôsobiť ako transportné kanály k adsorpčným miestam pre veľké molekuly. Teplota pyrolýzy ovplyvňuje štruktúru biouhlia tým, že ho transformuje do usporiadanejšej formy, pričom sa mení pórovitosť. Štruktúra veľkých pórov môže byť výhodnou vlastnosťou biouhlia používaného ako pôdne aditívum, pretože poskytuje vhodné rastové prostredie pre symbiotické mikroorganizmy. Zhang a kol. [15] uvádzajú, že existencia pórov na povrchu biouhlia naznačuje aj potenciál pre zlepšenie vlastností pôdy,

pretože môže zohrávať dôležitú úlohu pri uľahčovaní rastu koreňov v pôde, zadržiavaní živín, prevzdušnení a zlepšovaní schopnosti zadržiavať vodu.



Obr. 5 SEM snímky vzorky trusu BM_{ED} (A - zväčšenie 250x, B - zväčšenie 1000x) a vzorky biouhlia BC_{ED} (C - zväčšenie 250x, D - zväčšenie 1000x)

Prostredníctvom lopatkových testerov sme stanovili mieru mikrobiálnej kontaminácie analyzovaných vzoriek aeróbnymi a koliformnými baktériami. Vzorky pyrolýznych materiálov nepreukázali kontamináciu celkovými aeróbnymi baktériami, rovnako ako kontrolná vzorka (KON). Vo vzorkách trusu BM_{ED}, BM_{WD}, BM_{AD}, BM_{ZD}, BM_{CD} sme potvrdili prítomnosť aeróbnych baktérií, pričom ich počet stúpal v poradí: BM_{ED} ($4,4 \times 10^7$ CFU/g) < BM_{ZD} (8×10^6 CFU/g) < BM_{AD} ($4,4 \times 10^6$ CFU/g) < BM_{WD} (8×10^4 CFU/g) < BM_{CD} (8×10^3 CFU/g). Vzorky BM_{ED}, BM_{ZD}, BM_{AD} preukázali vysokú mieru kontaminácie, strednú kontamináciu preukázala vzorka BM_{WD}, zatiaľ čo najnižšiu mieru kontaminácie vzorka BM_{CD}.

Prítomnosť koliformných baktérií sme potvrdili len vo vzorke zebrieho trusu (BM_{ZD}), ktorých počet bol $4,4 \times 10^5$ CFU/g. Ostatné vzorky trusu, ako aj pyrolýzne materiály preukázali negatívne výsledky na prítomnosť baktérií fekálneho pôvodu. Získané výsledky potvrdili hygienizáciu a mikrobiologickú bezpečnosť pyrolýznych materiálov na báze trusu exotických zvierat.

Záver

Pyrolýza predstavuje alternatívnu možnosť spracovania živočíšnych exkrementov pre produkciu pôdnych aditív. Termochemická konverzia trusu exotických zvierat preukázala zvýšenie obsahu C ako aj iných nutrične dôležitých prvkov a rovnako prispela k hygienizácii trusu. Sekvenčný extrakčný protokol

viazaného P potvrdil zmeny v chemickom zastúpení P v truse po pyrolýznom spracovaní. Získané výsledky poukazujú na možnosť aplikácie pyrolýzy ako alternatívnej technológie spracovania veľkoobjemných živočíšnych odpadov v zoológických záhradách za cieľom produkcie inovatívnych pôdnych aditív.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom v rámci schémy INTERREG SK-CZ (projekt č. 403201DSQ4 s názvom Ekologicky akceptovateľné spracovanie trusu exotických zvierat zoológických záhrad).

- [1] MENG, J. et al. (2022). Comparative study on the characteristics and environmental risk of potentially toxic elements in biochar obtained via pyrolysis of swine manure at lab and pilot scales. *Science of The Total Environment*, vol. 825, no. 1. ISSN 1879-1026.
- [2] SUBEDI, R. et al. (2016). Chemically and biologically-mediated fertilizing value of manure-derived biochar. *Science of the Total Environment*, vol. 550, no. 1, pp. 924-933. ISSN 0048-9697.
- [3] ZHANG, C. et al. (2024). Dark side of biochar in the aquatic environment: environmental risks and ecotoxicological aspects. *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 21, no. 1, pp. 3705–3718. ISSN 1735-2630.
- [4] ZORNOZA, R. et al. (2016). Stability, nutrient availability and hydrophobicity of biochars derived from manure, crop residues, and municipal solid waste for their use as soil amendments. *Chemosphere*, vol. 144, no. 1, pp. 122-130. ISSN 1879-1298.
- [5] CANTRELL, K. et al. (2012). Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresource Technology*, vol. 107, no. 1, pp. 419-428. ISSN 1873-2976.
- [6] KIZITO, S. et al. (2019). Role of Nutrient-Enriched Biochar as a Soil Amendment during Maize Growth: Exploring Practical Alternatives to Recycle Agricultural Residuals and to Reduce Chemical Fertilizer Demand. *Sustainability*, vol. 11, no. 11. ISSN 2071-1050.
- [7] ZENG, X. et al. (2018). Speciation and bioavailability of heavy metals in pyrolytic biochar of swine and goat manures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 132, no. 1, pp. 82-93. ISSN 1873-250X.
- [8] CELY, P. et al. (2015). Agronomic properties of biochars from different manure wastes. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 111, no. 1, pp. 173-182. ISSN 1873-250X.
- [9] PAIVA, I. O. et al. (2024). Biochar N Content, Pools and Aromaticity as Affected by Feedstock and Pyrolysis Temperature. *Waste and Biomass Valorization*, vol. 15, no. 1, pp. 3599–3619. ISSN 1877-265X.
- [10] EURÓPSKY PARLAMENT A RADA. (2019). Nariadenie (EÚ) 2019/1009 zo 16. júla 2019, ktorým sa stanovujú pravidlá na uvádzanie EÚ produktov na hnojenie na trh a ktorým sa zrušuje nariadenie (ES) č. 2003/2003. Úradný vestník Európskej únie, L 170, s. 1–114.
- [11] JIANG, R. Q. et al. (2024). Migration of phosphorus in pig manure during pyrolysis process and slow-release mechanism of biochar in hydroponic application. *Science of The Total Environment*, vol. 915, no. 1. ISSN 1879-1026.
- [12] EURÓPSKA KOMISIA. (2021). Delegované nariadenie Komisie (EÚ) 2021/2088 zo 7. júla 2021, ktorým sa dopĺňa nariadenie (EÚ) 2019/1009, pokiaľ ide o kategórie komponentných materiálov CMC 14: pyrolytické a gasifikačné materiály. Úradný vestník Európskej únie, L 442, 30. 12. 2021, s. 1–7.
- [13] WISTALSKA, K. et al. (2023). Properties of Poultry-Manure-Derived Biochar for Peat Substitution in Growing Media. *Materials*, vol. 16, no. 19. ISSN 1996-1944.
- [14] STYLIANOU, M. et al. (2020). Physicochemical and structural characterization of biochar derived from the pyrolysis of biosolids, cattle manure and spent coffee grounds. *Journal of the Energy Institute*, vol. 93, no. 5, pp. 2063-2073. ISSN 1746-0220.
- [15] ZHANG, J. et al. (2018). Characteristics of biochar produced from yak manure at different pyrolysis temperatures and its effects on the yield and growth of highland barley. *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 30, no. 1, pp. 57-67. ISSN 2047-6523.

Štúdium derivátov chinolínu ako látok s potenciálnym antimikrobiálnym účinkom

Study of quinoline derivatives as substances with potential antimicrobial activity

Adriana Humajová¹ – Mária Maliarová² – Tibor Maliar³

^{1,2}Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Námestie J. Herdu 577/2, 917 01 Trnava

¹humajova1@ucm.sk, ²maria.maliarova@ucm.sk, ³tibor.maliar@ucm.sk

Abstrakt

Práca sa zameriava na syntézu a charakterizáciu nových solí 2-amino-8-hydroxychinolínu s vybranými fenolovými kyselinami ako potenciálnych biologicky aktívnych látok. Východisková báza bola kombinovaná s kyselinou rozmarínovou, galovou, kávovou a vanilovou za rôznych reakčných podmienok. Najúspešnejšia bola príprava soli s kyselinou rozmarínovou, ktorej vznik bol potvrdený pomocou FT-IR spektrometrie analýzou charakteristických vibračných pásov funkčných skupín. Separácia a správanie zlúčenín boli sledované metódou HPLC. Antibakteriálna aktivita bola testovaná na šiestich klinických bakteriálnych kmeňoch. Výsledky ukázali, že pripravená soľ si zachováva antibakteriálnu aktivitu voči vybraným mikroorganizmom, hoci nižšiu než samotný 2-amino-8-hydroxychinolín. Práca poukazuje na perspektívnosť tvorby solí chinolínových derivátov ako možnej cesty k novým antimikrobiálnym látkam.

Kľúčové slová: chinolínové deriváty, fenolové kyseliny, antibakteriálna aktivita, FT-IR, kvapalinová chromatografia

Abstract

The work focuses on the synthesis and characterization of new salts of 2-amino-8-hydroxyquinoline with selected phenolic acids as potential biologically active substances. The starting base was combined with rosmarinic, gallic, caffeic and vanillic acids under different reaction conditions. The most successful was the preparation of the salt with rosmarinic acid, the formation of which was confirmed by FT-IR spectrometry by analyzing the characteristic vibrational bands of the functional groups. The separation and behavior of the compounds were monitored by HPLC. The antibacterial activity was tested on six clinical bacterial strains. The results showed that the prepared salt retains antibacterial activity against selected microorganisms, although lower than 2-amino-8-hydroxyquinoline itself. The

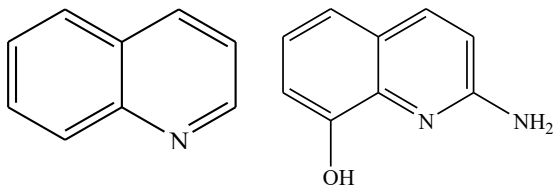
work points to the prospect of the formation of salts of quinoline derivatives as a possible route to new antimicrobial agents.

Key Words: quinoline derivatives, phenolic acids, antibacterial activity, FT-IR, liquid chromatography

Úvod

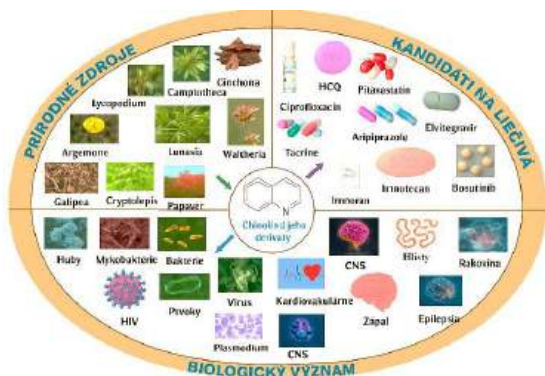
Rastúca rezistencia baktérií voči existujúcim antibiotikám predstavuje závažný globálny zdravotnícky problém, ktorý stimuluje vývoj nových antibakteriálnych látok s vyššou účinnosťou a širším spektrom biologických účinkov. Súčasný výskum sa zameriava nielen na samotnú antimikrobiálnu aktivitu, ale aj na zlúčeniny vykazujúce ďalšie priaznivé vlastnosti, ako sú antioxidačné a chelatačné účinky, ktoré môžu prispievať k zvýšeniu ich biologickej efektivity a stability.

Perspektívnu skupinu predstavujú deriváty chinolínu. Chinolín (1-azanaftalén, benzo[*b*]pyridín) je planárna heteroaromatická zlúčenina s delokalizovaným 10π -elektrónovým systémom, tvorená kondenzáciou benzénového a pyridínového kruhu (Obr. 1). Táto štruktúra predstavuje významný farmakofór v medicínskej chémii [1]. Vďaka prítomnosti terciárneho dusíka má slabý bázičný charakter ($pK_a \approx 4,85$) a je schopná tvoriť soli s kyselinami, čo umožňuje modifikáciu jeho fyzikálno-chemických aj biologických vlastností. Štruktúrne úpravy chinolínového skeletu vedú k širokému spektru biologických účinkov vrátane antibakteriálnej, antifungálnej, protizápalovej či antimalarickej aktivity. Význam chinolínového jadra potvrdzuje aj klinicky používané antibiotikum bedachilín, ktoré spôsobuje inhibíciu enzýmu ATP-syntázy baktérie *Mycobacterium tuberculosis*. Toto antibiotikum je účinné na multirezistentné kmene [2].



Obr. 1 Chemická štruktúra chinolínu a 2-amino-8-hydroxychinolínu

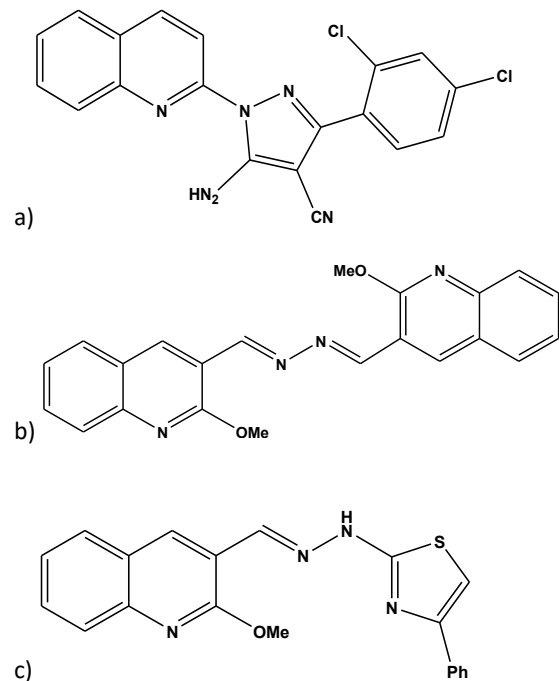
Najznámejšími chinolínovými derivátmi sú chinolínové alkaloidy, ktoré predstavujú významnú skupinu prírodných sekundárnych metabolitov, vyskytujúcich sa najmä v rastlinách tropických a subtropických oblastí. Vyznačujú výraznou štruktúrnou diverzitou a širokým spektrom biologických účinkov. Mnohé prírodné chinolínové deriváty vykazujú antimalarickú, antiprotozoálnu, antituberkulóznou, antifungálnu, protinádorovú či neuroprotektívnu aktivitu; významným príkladom je kampoecín izolovaný z *Camptotheca acuminata*, ktorý sa stal východiskovou štruktúrou pre vývoj klinicky využívaných cytostatík. Perspektívne sú aj zlúčeniny ako huperzín A z *Huperzia serrata* s inhibičným účinkom na acetylcholinesterázu alebo fotoaktívne furochinolínové deriváty s potenciálom v antimikrobiálnej terapii, pričom ich charakterizácia a kontrola kvality si vyžaduje aplikáciu moderných separačných analytických techník (Obr. 2) [2].



Obr. 2 Využitie látok z prírodných zdrojov [2]

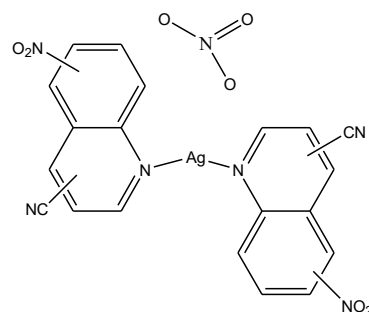
Chinolínové deriváty predstavujú významnú triedu heterocyklických zlúčenín, ktoré nachádzajú široké uplatnenie vo farmaceutickom výskume, najmä v oblasti vývoja nových antimikrobiálnych látok. Hybridné chinolín-pyrazolové molekuly pripravené hybridizáciou chinolínového skeletu s pyrazolovým fragmentom vykazovali výraznú antibakteriálnu aktivitu (MIC 0,12–0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$) voči patogénom ako *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* a *Proteus vulgaris*, pričom ich účinnosť bola porovnateľná so štandardnými antibiotikami. Podobne Schiffove bázy a hydrazidové

deriváty chinolínu dosahovali lepšiu antibakteriálnu aktivitu než referenčný ampicilín, čo poukazuje na význam modifikácií v polohe 3 chinolínového jadra (Obr. 3) [3,4].



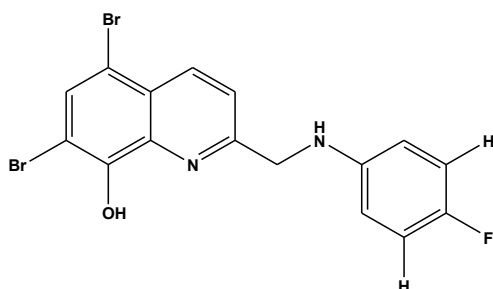
Obr. 3 Chemické štruktúry chinolínových derivátov: a) hybridný chinolín-pyrazolový derivát b), c) deriváty chinolínu so Schiffovými bázami a hydrazidovými zlúčeninami

Významnú skupinu predstavujú aj kovové komplexy chinolínových ligandov, najmä Ag(I) komplexy, ktoré preukázali vysokú účinnosť proti multirezistentným bakteriálnym kmeňom izolovaným z diabetických ulcerácií; komplex $[\text{Ag}(\text{8-nitrochinolín})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dosahoval porovnateľnú alebo vyššiu aktivitu než klinicky používaný sulfadiazín strieborný [5].



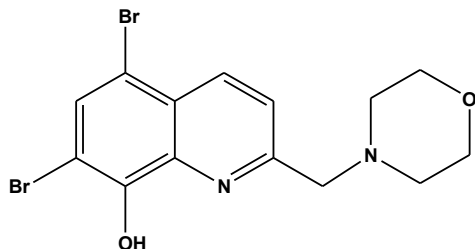
Obr. 4 Chemická štruktúra $[\text{Ag}(\text{8-nitrochinolín})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Intenzívne skúmané sú aj halogénované deriváty 8-hydroxychinolínu, ktorých minimálne inhibičné koncentrácie sa pohybovali v submikromolárnom rozmedzí (0,39–0,78 μM) voči MRSA, MRSE a VRE, pričom niektoré zlúčeniny boli niekoľkonásobne účinnejšie než vankomycín a vykazovali nízku hemolytickú toxicitu [6].



Obr. 5 Chemická štruktúra halogénovaných derivátov 8-hydroxychinolínu

Ďalšie štruktúrne modifikácie, vrátane C2- a C3-substitúcie 8-hydroxychinolínu či zavedenia morfolínovej skupiny, viedli k zvýšeniu antibakteriálnej účinnosti (MIC až 0,10–0,15 μM proti MRSE) a zlepšeniu fyzikálno-chemických vlastností, najmä rozpustnosti a aktivity proti bakteriálnym biofilmom (MBEC 2,35 μM). Uvedené výsledky potvrdzujú, že cieľená štruktúrna optimalizácia chinolínového skeletu predstavuje perspektívnu stratégiu pri vývoji nových látok účinných proti multirezistentným mikroorganizmom [7,8].



Obr. 6 Derivát 8-hydroxychinolínu s morfolínovou skupinou

Osobitnú pozornosť si zasluhuje 2-amino-8-hydroxychinolín, ktorý vďaka prítomnosti donorových atómov vykazuje výraznú schopnosť chelatacie kovových iónov a zároveň antimikrobiálnu aktivitu (Obr. 1).

Cieľom práce je preto zamerať sa na prípravu a charakterizáciu solí 2-amino-8-hydroxychinolínu s vybranými fenolovými kyselinami a zhodnotiť ich potenciál ako nových biologicky aktívnych zlúčenín v kontexte narastajúcej antibiotickej rezistencie.

1 Materiály a metódy

1.1 Chemikálie

Všetky použité chemikálie boli komerčne dostupné. Na prípravu solí 2-amino-8-hydroxychinolínu sa použili 2-amino-8-hydroxychinolín a fenolové kyseliny – kyselina rozmarínová, galová, kávová a vanilová. Použité rozpúšťadlá boli acetonitril, metanol, etanol a izopropylalkohol. Pri HPLC analýze bola použitá mobilná fáza v zložení – A- ultračistá voda; B- acetonitril HPLC Grade.

1.2 Použité prístroje

Získané soli sa definovali pomocou IČ spektrometrie na prístroji infračervený spektrometer Shimadzu IRAffinity-1 s použitím nastavca ATR, ďalej sa uskutočnila HPLC analýza pomocou prístroja vysokoúčinného kvapalinového chromatografu od firmy WATERS so zabudovaným čerpadlom, termostatom, autosamplerom a s detektorom s polom diód (DAD detektor) a software – Empower 3. Nakoniec sa sledovala antimikrobiálna aktivita *in vivo* na pracovisku Mikrobiologického ústavu lekárskej fakulty univerzity Komenského Bratislava, nakoľko toto pracovisko disponuje „Biohazard safety level 3“. Táto aktivita bola meraná na vybraných 6 kmeňov spôsobujúcich nozokomiálne nákazy, a to konkrétne *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacterium cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*.

1.3 Výber vhodných podmienok syntézy

Pre syntézu solí 2-amino-8-hydroxychinolínu bol zvolený 2-amino-8-hydroxychinolín (reaktant 1) ako báza, pričom voľbu kyselinovej zložky možno varíovať. Dôvodom je to, že reaktant 1 sa ukázal ako druhý najúčinnejší derivát 8-hydroxychinolínu, hneď po nitroxolíne™ v zmysle antibakteriálnej aktivity voči problematickým klinickým infekciám [9]. Reaktant 1 má publikovanú len jednu soľ, a to s kyselinou mandľovou [10]. Táto skutočnosť determinuje voľný priestor pri tvorbe solí tejto bázy.

V úvodnej fáze experimentov boli do syntézy solí s reaktantom 1 vybrané štyri fenolové kyseliny. Výber týchto kyselín vychádzal z ich dostupnosti a známej biologickej aktivity. Dve kyseliny sú odvodené od kyseliny benzoovej – kyselina vanilová (reaktant 2a) a kyselina galová (reaktant 2b) a ďalej dve kyseliny odvodené od kyseliny škoricovej – kyselina rozmarínová (reaktant 3a) a kyselina kávová (reaktant 3b). Proces prípravy solí 2-amino-8-hydroxychinolínu s vybranými fenolovými kyselinami bol optimalizovaný testovaním troch odlišných reakčných podmienok s cieľom dosiahnuť spontánnu kryštalizáciu a vysokú

čistotu produktov.

1. Syntéza pri laboratórnej teplote

V úvodnej fáze bola sledovaná reaktivita v izomolárnych roztokoch (10 mmol) v pomere 1:1. Po zmiešaní zložiek a expozícii v tieni došlo v priebehu 48 hodín vo všetkých prípadoch k vyzrážaniu tuhých fáz. Vznik jemných kryštálov, resp. amorfných nánosov, indikoval tvorbu nových molekulových interakcií medzi bázou a kyselinami už za miernych podmienok.

2. Syntéza za podmienok refluxu (82,6°C)

Pre zefektívnenie výťažnosti a podporu kinetiky vzniku solí pri kyselinách kávovej, rozmarínovej a galovej sa pristúpilo k termicky aktivovanej syntéze. Reakcia prebiehala v izopropanole počas jednej hodiny pri teplote refluxu. Použitie vodného kúpeľa zabezpečilo izotermické prostredie a minimalizovalo degradáciu prítomných polyfenolov. Produkty boli izolované voľným odparovaním rozpúšťadla pri laboratórnej teplote.

3. Inkubácia pri fyziologickej teplote (37°C)

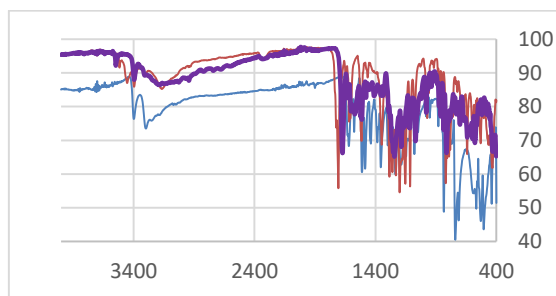
Špecifický prístup bol zvolený pri syntéze soli kyseliny rozmarínovej v prostredí acetonitrilu. Dlhodobá inkubácia (4 dni) pri 37°C mala za cieľ simulovať podmienky blízke biologickému prostrediu a zároveň poskytnúť dostatočnú energiu pre usporiadanie kryštálovej mriežky bez rizika tepelného rozkladu reaktantov. Tento postup viedol k úspešnej precipitácii produktu (označený ako **5a**) na stenách reakčnej nádoby.

Všetky získané pevné podiely boli separované dekantáciou a uskladnené pri nízkych teplotách pre následnú fyzikálno-chemickú charakterizáciu.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Výsledky

Štruktúrna charakterizácia pripraveného produktu **5a** bola realizovaná pomocou FT-IR spektrometrie. Získané spektrum bolo podrobené komparatívnej analýze s infračervenými spektrami východiskových prekursorov – 2-amino-8-hydroxychinolínu (**1**) a kyseliny rozmarínovej (**3a**). Cieľom porovnania bola identifikácia kľúčových spektrálnych zmien, ktoré potvrdzujú úspešnú tvorbu soli a vznik nových intermolekulových interakcií (Obr. 7).



Obr. 7 Porovnanie IČ spektier •2-amino-8-hydroxychinolínu, •kyseliny rozmarínovej a •produktu **5a**

IČ spektrum produktu **5a** preukazuje viaceré absorpčné pásy, ktoré potvrdzujú prítomnosť funkčných skupín zodpovedajúcich soli kyseliny rozmarínovej a 2-amino-8-hydroxychinolínu (**5a**). V oblasti 3547 cm⁻¹ a 3182 cm⁻¹ sa nachádzajú široké absorpčné pásy charakteristické pre valenčné vibrácie O–H väzieb, ktoré sú výrazne ovplyvnené vodíkovou väzbou. Tieto pásy sú dôkazom viacerých hydroxylových skupín prítomných v štruktúre oboch východiskových zlúčenín.

Pás pri 3026 cm⁻¹ zodpovedá valenčným vibráciám C–H väzieb aromatických systémov (sp² hybridizácia), čo potvrdzuje prítomnosť substituovaného aromatického jadra. Charakteristická vibrácia karbonylovej skupiny (C=O) sa nachádza pri 1672 cm⁻¹ a je prítomná v štruktúre kyseliny rozmarínovej. Absorpčný pás pri 1602 cm⁻¹ je typický pre aromatické C=C väzby a súvisí s konjugovaným π-elektrónovým systémom oboch komponentov.

V oblasti 1242 cm⁻¹ sa pozoruje výrazný pás prislúchajúci k valenčným vibráciám C–O väzieb, zatiaľ čo pásy pri 1186 cm⁻¹ a 1068 cm⁻¹ potvrdzujú prítomnosť C–N väzieb, ktoré pochádzajú z aminoskupiny 2-amino-8-hydroxychinolínu.

V nízkofrekvenčnej oblasti spektra (860, 812 a 640 cm⁻¹) sa nachádzajú pásy ohybových vibrácií mimo rovinu C–H väzieb v aromatickom systéme. Ich charakter je typický pre mono- a disubstituované aromatické kruhy, ktoré sú prítomné v oboch zlúčeninách.

Na základe identifikovaných vibrácií možno konštatovať, že IR spektrum potvrdzuje prítomnosť všetkých hlavných funkčných skupín typických pre soľ kyseliny rozmarínovej a 2-amino-8-hydroxychinolínu, čím podporuje úspešnú syntézu požadovaného produktu.

Na presnejšie sledovanie možného vzniku soli medzi 2-amino-8-hydroxychinolínolom a kyselinou rozmarínovou bola použitá analytická technika HPLC. Táto metóda umožňuje presné oddelenie jednotlivých zložiek v zmesi a je vhodná na monitorovanie reakčných

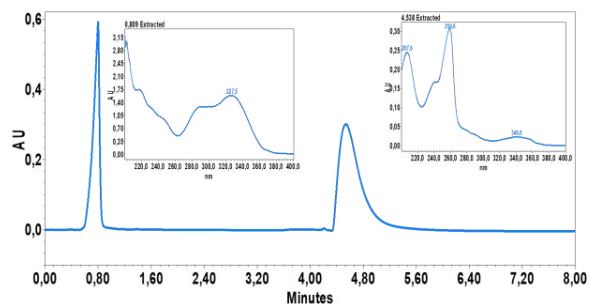
zmien v systéme. Testovanou kolónou bola kolóna ARION Polar, typu C18, vhodná aj pre 100% vodnú mobilnú fázu. Chromatografické podmienky sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1 Chromatografické podmienky pre kolónu ARION Polar

Kolóna	ARION® Polar C18 HPLC column, 3,0µm 100 mm x 4,6 mm
Výrobca	Chromservis s.r.o
Prietok	1mL/min
Objem nástreku	10µL
Detekcia UV	210, 260, 325 nm
Mobilná fáza	A – ultračistá voda B - acetonitril
Elúcia	Skokový gradient 0-2 min. – 50% B 2-10 min. – 100%
Teplota	25°C

Bol otestovaný skokový gradient, kde do 2 minút bola mobilná fáza 50 % B a následne sa od 2 do 10 minút koncentrácia B zvýšila na 100 %.

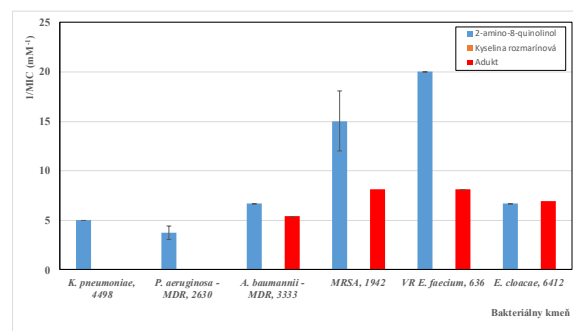
V chromatograme (Obr. 8) sú prítomné dva hlavné píky – prvý eluujúci približne v čase kyseliny rozmarínovej (0,9 min) a druhý v čase zodpovedajúcom 2-amino-8-hydroxychinolínu (okolo 4,8 min). Vložené UV spektrá sa zhodujú s východiskovými látkami. Táto soľ sa na kolóne pravdepodobne rozpadá, preto vidíme dva píky východiskových látok. Soľ 5a bola pripravovaná v termostate.



Obr. 8 Chromatogram elúcie soli 5a na kolóne ARION Polar

Nakoľko je 2-amino-8-hydroxychinolínom známy svojou antibakteriálnou aktivitou, zo spektra možných biologických testov bolo zvolené stanovenie

antibakteriálnej aktivity. Antibakteriálna aktivita bola stanovená na malej kolekcii mikroorganizmov. Bolo vybraných 6 klinických izolátov zo superinfekcií, s jasne definovaným mechanizmom rezistencie. Výsledky antibakteriálnej aktivity 3 vzoriek: 2-amino-8-hydroxychinolínom, kyselina rozmarínová, a pripravená soľ prezentuje graf na nasledujúcom obrázku 9.



Obr. 9 Antibakteriálna aktivita troch látok: 2-amino-8-hydroxychinolínom, kyselina rozmarínová, a pripravená soľ, vyjadrená parametrom 1/MIC v mmol⁻¹

Graf na obrázku 9 využíva **obrätenu hodnotu** minimálnej inhibičnej koncentrácie (1/MIC), čím vizuálne zvýrazňuje vyššiu antibakteriálnu účinnosť testovaných látok

To znamená vyšší stĺpec predstavuje vyššiu mieru antibakteriálnej aktivity. Výsledok je prezentovaný ako priemer z 3 paraleliiek s príslušnými, chybovými úsečkami.

Z grafu je evidentný účinok 2-amino-8-hydroxychinolínom na všetkých 6 kmeňov, čomu hovoríme **plošný účinok**. To znamená, že je to účinok aj na G⁻ a G⁺ baktérie, čo je veľmi hodnotný poznatok. Výsledky antibakteriálnej aktivity kyseliny rozmarínovej tento graf neprezentuje, nakoľko nebola pozorovaná antibakteriálna aktivita ani na jeden kmeň v prípade tejto látky. Vzniknutý produkt, ktorý je predmetom tejto práce, vykázal **antibakteriálnu aktivitu na 4 bakteriálne kmene**, avšak s nižšou mierou intenzity ako 2-amino-8-hydroxychinolínom. Možno to chápať tak, že vzniknutý produkt oboch reaktantov - soľ je svojou účinnosťou niekde medzi oboma reaktantami. Síce antibakteriálna aktivita soli mierne klesla v porovnaní s 2-amino-8-hydroxychinolínom, treba si však uvedomiť, že sa jedná o látku novú, nepublikovanú, čo znemožňuje možnosť diskusie k tejto látke z iných zdrojov. Príprava soli 2-amino-8-hydroxychinolínom a kyseliny rozmarínovej má metodický potenciál, ako pripravovať podobné látky tohto typu.

2.2 Diskusia

Dosiahnuté výsledky potvrdzujú, že cieľená modifikácia chinolínového skeletu formou tvorby solí s fenolovými kyselinami predstavuje perspektívnu cestu k novým biologicky aktívnym látkam. Úspešná syntéza produktu **5a** bola primárne potvrdená FT-IR spektrometriou, kde kľúčovým indikátorom interakcie boli posuny absorpčných pásov hydroxylových, amínových a karboxylových skupín. Tieto zmeny v oblasti 3547 – 3182 cm⁻¹ jednoznačne poukazujú na vytvorenie systému nových vodíkových väzieb medzi 2-amino-8-hydroxychinolínom a kyselinou rozmarínovou.

Pri chromatografickej analýze na kolóne ARION Polar bol pozorovaný rozpad soli na pôvodné prekursor, čo sa prejavilo prítomnosťou dvoch separátnych píkov v časoch 0,9 min (kyselina rozmarínová) a 4,8 min (báza). Tento jav je v reverznej fáze HPLC bežný, nakoľko mobilná fáza a podmienky separácie narúšajú iónové a nekovalentné interakcie v molekule soli. Z hľadiska tvaru píkovo bolo identifikované chvostovanie (tailing) pri 2-amino-8-hydroxychinolíne a frontovanie pri kyseline rozmarínovej, čo indikuje potrebu ďalšej optimalizácie pH mobilnej fázy pre potlačenie nežiaducich sekundárnych interakcií so sorbentom.

Z hľadiska biologickej efektivity prinieslo testovanie antibakteriálnej aktivity dôležité zistenia:

- **Plošný účinok:** 2-amino-8-hydroxychinolín vykazoval inhibičný účinok voči všetkým šiestim testovaným klinickým kmeňom (G⁺ aj G⁻), čo potvrdzuje jeho vysoký farmakologický potenciál.
- **Aktivita soli 5a:** Pripravený produkt si zachoval antibakteriálnu aktivitu voči štyrom kmeňom. Hoci bola nameraná miera aktivity (vyjadrená ako 1/MIC) nižšia v porovnaní s čistou bázou, ide o významný výsledok, nakoľko samotná kyselina rozmarínová nevykazovala v daných testoch žiadnu aktivitu.

Napriek tomu možno konštatovať, že kombinácia bázičného chinolínového derivátu s antioxidantne pôsobiacou kyselinou rozmarínovou vytvára unikátnu substanciu s novými fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktorá rozširuje doteraz málo preskúmané spektrum solí 2-amino-8-hydroxychinolínu.

Záver

Predložená práca sa zameriavala na syntézu a charakterizáciu nových solí 2-amino-8-hydroxychinolínu s vybranými fenolovými kyselinami. V rámci experimentov boli optimalizované podmienky prípravy, pričom ako najefektívnejšie sa javili metódy využívajúce zvýšenú teplotu ako je dlhodobá inkubácia v termostate pri 37°C. Úspešný vznik soli **5a**

(s kyselinou rozmarínovou) bol potvrdený pomocou FT-IR spektrometrie, ktorá identifikovala kľúčové interakcie funkčných skupín oboch reaktantov. Výsledky biologických testov priniesli nasledovné kľúčové zistenia:

2-amino-8-hydroxychinolín preukázal plošnú antibakteriálnu aktivitu voči všetkým šiestim testovaným klinickým kmeňom.

Pripravená soľ **5a** vykazovala inhibičný účinok na štyri bakteriálne kmene. Aj keď miera aktivity soli mierne poklesla v porovnaní s čistou bázou, produkt predstavuje významný progres, nakoľko samotná kyselina rozmarínová nevykazovala žiadnu antibakteriálnu aktivitu.

Kombinácia 2-amino-8-hydroxychinolínu s prírodnými fenolovými kyselinami predstavuje perspektívny prístup k príprave nových, doteraz nepublikovaných látok. Metodika vyvinutá v tejto práci má potenciál pri príprave ďalších derivátov s upravenými fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré môžu prispieť k riešeniu problematiky narastajúcej antibiotickej rezistencie.

Poďakovanie

Práca vznikla vďaka podpore **projektu APVV-24-0180**. Zároveň patrí moje poďakovanie mojej školiteľke doktorke Márii Maliarovej za jej odborné a cenné rady a pomoc pri spísaní tohto článku. Taktiež by som chcela poďakovať pani doktorke Zuzane Bielkovej za pomoc pri meraní IČ spektier a pani docentke Zite Tokárovej za pomoc pri ich riešení. A moja vďaka patrí aj docentovi Tiborovi Maliarovi za uskutočnenie testov antimikrobiálnej aktivity vzniknutých solí.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] YADAV, Pratibha a SHAH, Kamal. (2021). Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, roč. 109. ISSN 00452068.
- [2] MATADA, Suliphuldevara Basavarajaiah, PATTANASHETTAR, Raviraj, & YERNALE, Gunavanthrao Nagesh. (2020). A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 32, 115973. ISSN 0968-0896
- [3] EL SHEHRY MF, GHORAB MM, ABBAS SY, FAYED EA, SHEDID SA, AMMAR YA. (2018). Quinolinederivatives bearing pyrazole moiety: synthesis and biological evaluation as possible antibacterial and antifungal agents. *Eur J Med Chem*. Vol. 143. s. 1463–1473.
- [4] HAMAMA, Waffa S., IBRAHIM, Mona E., GOODA, Aya A., & ZOOROB, Hanafi H. (2018).

- Efficient synthesis, antimicrobial, antioxidant assessments and geometric optimization calculations of AZoEs- incorporating quinoline moiety. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, Vol. 55, No.11, s. 2623–2634. ISSN 1943-5193.
- [5] MASSOUD, Alshima'a A., a kol. (2013). Effects of different substituents on the crystal structures and antimicrobial activities of six Ag(I) quinoline compounds. *Inorganic Chemistry*, Vol. 52, No. 7, s. 4046–4060. ISSN 0020-1669.
- [6] BASAK, Akash., ABOUELHASSAN, Y., a kol. (2016). Synthetically tuning the 2-Position of halogenated quinolines: optimizing antibacterial and biofilm eradication activities via alkylation and reductive amination pathways. *Chemistry - a European Journal*. Vol. 22, No. 27, s. 9181–9189. ISSN 1521-3765
- [7] GARRISON, Aaron. T., a kol. (2016). Microwave-enhanced Friedländer synthesis for the rapid assembly of halogenated quinolines with antibacterial and biofilm eradication activities against drug resistant and tolerant bacteria. *MedChemComm*. Vol. 8, No. 4, s. 720–724. ISSN 2040-2511
- [8] BASAK, Akash., a kol. (2018). Halogenated quinolines bearing polar functionality at the 2-position: Identification of new antibacterial agents with enhanced activity against *Staphylococcus epidermidis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 155, s. 705–713. ISSN 0223-5234
- [9] JOAQUIM, Angélica Rocha; GIONBELLI, Mariana Pies; GOSMANN, Grace a kol. (2021). Novel Antimicrobial 8-Hydroxyquinoline-Based Agents: Current Development, Structure–Activity Relationships, and Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, roč. 64, č. 22, s. 16349-16379. ISSN 0022-2623.
- [10] IVANOVA, B. B. a SPITELLER, M. (2010). Organic mandelates as promising materials with non-linear optical application. *Structural Chemistry*. 2010, roč. 21, č. 5, s. 989-993. ISSN 1040-0400.

Štúdium syntézy a vlastností komplexov železa s vybranými aminokyselinami

Study of the synthesis and properties of iron complexes with selected amino acids

Patrik Krajčo¹

Školiteľ: Beata Vranovičová²

^{1,2}Oddelenie chémie ÚCHEV, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹krajco1@ucm.sk, ²beata.vranovicova@ucm.sk

Abstrakt

Práca sa zaoberá syntézou a charakterizáciou koordinačných zlúčenín železa s vybranými aminokyselinami L-arginínom, L-histidínom a L-tryptofánom. Ligandy boli zvolené pre svoje silné antioxidantné vlastnosti [1] a schopnosť koordinácie prostredníctvom donorových atómov dusíka a kyslíka. Ako zdroj kovu bol použitý heptahydrát síranu železnatého a hexahydrát síranu amónno-železnatého (Mohrova soľ). Syntézy prebiehali vo vodnom prostredí, pričom sa sledoval vplyv molárneho pomeru reagujúcich látok a času reakcie na charakter vznikajúcich produktov. Pripravené komplexy boli charakterizované infračervenou spektroskopiou (FTIR) v oblasti 4000 – 400 cm⁻¹ a porovnané so spektrami čistých aminokyselín. Posuny pásov karboxylových skupín a aminoskupín poukazujú na ich zapojenie do koordinácie. Výsledky vytvárajú experimentálny základ pre ďalší výskum štruktúrnych a potenciálnych biologických vlastností komplexov železa.

Kľúčové slová: železo, aminokyseliny, koordinačné zlúčeniny, FTIR spektroskopia, antioxidanty

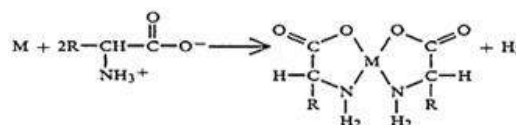
Abstract

This work focuses on the synthesis and characterization of iron coordination compounds with selected amino acids, namely L-arginine, L-histidine, and L-tryptophan. The ligands were chosen due to their strong antioxidant properties [1] and their ability to coordinate through nitrogen- and oxygen-donor atoms. Ferrous sulfate heptahydrate and ammonium iron(II) sulfate hexahydrate (Mohr's salt) were used as iron sources. The syntheses were carried out in an aqueous reaction medium, and the influence of the molar ratio of reactants and reaction time on the nature of the resulting products was investigated. The prepared complexes were characterized by infrared spectroscopy (FTIR) in the range 4000 – 400 cm⁻¹ and compared with the spectra of the corresponding free amino acids. Shifts in the characteristic bands of carboxyl and amino groups indicate their involvement in coordination. The obtained results provide an experimental basis for further studies of the structural and potential biological properties of iron complexes.

Key Words: iron, amino acids, coordination compounds, FTIR spectroscopy, antioxidants

Úvod

Železo ako prvok existuje vo viacerých oxidačných stavoch, pričom najčastejšie sa vyskytuje v oxidačných stavoch Fe²⁺ a Fe³⁺. Tieto dve formy sú zásadné pre jeho chemické správanie a schopnosť interakcie s inými látkami. Železo má schopnosť tvoriť komplexy s rôznymi ligandmi, čo je typické pre mnohé prechodné kovy. Tento proces sa týka tvorby koordinačných zlúčenín, kde železo pôsobí ako centrálné kovové jadro a ligandy sa viažu na železo cez svoje voľné elektrónové páry. Tvorba komplexov železa závisí od jeho oxidačného stavu, ako aj od typu a počtu ligandov, ktoré sa naň viažu. [2] Z pohľadu organickej chémie hrá železo dôležitú úlohu aj vo väzbe s aminokyselinami, ktoré slúžia ako ligandy v mnohých biologických procesoch. Železo v kombinácii s rôznymi aminokyselinami umožňuje katalytické procesy, ako sú prenos elektrónov, detoxikácia reaktívnych foriem kyslíka a prenos kyslíka. [3] Železo má tak v čistej a komplexnej forme zásadnú úlohu v chemickom a biologickom svete. Jeho schopnosť tvoriť stabilné komplexy s organickými molekulami ako sú aminokyseliny z neho robí kľúčový prvok pre anorganickú, organickú chémiu a biochémiu. V súvislosti s komplexami železa s aminokyselinami a ich syntézou sme sa inšpirovali patentom z roku 1989. V tomto patente sú popísané spôsoby syntéz a typy zlúčenín v ktorých kovové ióny, v našom prípade katióny Fe³⁺ a Fe²⁺, dokážu tvoriť komplexy. Spoločnou podmienkou všetkých metód je, aby dané aminokyseliny vystupovali ako kyseliny. Protón aminokyseliny sa odstráni pričom vzniká voda alebo vodík a voľný elektrónový pár na α-aminokyselinovom atóme dusíka, spoločne s karboxylovým iónom sa naviažu na vybraný kov. [4]



Obr. 1 Schémy syntéz komplexov kovu s aminokyselinou. [4]

1 Materiál a metódy

1.1 Chemikálie

Všetky použité chemikálie boli komerčne dostupné a použité bez predchádzajúcej purifikácie. Ako organické ligandy boli použité aminokyseliny L-arginín (SERVA, $\geq 98,0\%$), L-histidín (Thermo Fisher Scientific, $\geq 98,0\%$) a L-tryptofán (Centralchem, $99,0\%$). Zdrojom centrálného kovového atómu boli anorganické soli železa, konkrétne $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Centralchem, $99,0\%$) a $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, p.a.), pričom na úpravu reakčného prostredia sa použil NaOH (Centralchem, p.a.). Použité rozpúšťadlá denaturovaný etanol (p.a.) a dietyléter (Ph. Eur.) boli dodané firmou Mikrochem.

1.2 Meracie techniky

Vzhľadom na to, že produkty boli získané v mikrokryštalickej (práškovej) forme, ich charakterizácia prebehla pomocou vibračnej spektroskopie a elementárnej analýzy. Infračervené spektrá pripravených komplexov boli zaznamenané na spektrofotometri Shimadzu IRAffinity-1 v rozsahu vlnočtov $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR). Elementárna analýza (obsah C, H, N) bola vykonaná na prístroji Flash 2000 Organic Elemental Analyzer s tepelne vodivostným detektorom (TCD).

1.3 Syntéza komplexov so síranom železnatým

Pri syntéze komplexov sme použili dva zdroje železa heptahydrát síranu železnatého a Mohrovú soľ. Ako prvý popisujeme syntézu použitím heptahydrátu síranu železnatého. Pri príprave produktov sme použili vypočítané množstvo heptahydrátu síranu železnatého, ktorý sme rozpustili v 2 ml destilovanej vody. K takto pripravenému vodnému roztoku heptahydrátu síranu železnatého sme za stáleho miešania na magnetickej miešačke pridali vypočítané množstvo aminokyseliny (L-Arg, L-His alebo L-Trp) rozpustenej v 5 ml destilovanej vody. Pri príprave vzoriek sme menili pomer látkových množstiev reaktantov ako je uvedené v tabuľke 1. Takto pripravenú reakčnú zmes sme následne nechali refluxovať pri 100°C . Pre jednotlivé vzorky komplexov železa sme menili reakčné podmienky zmenou doby refluxu 40 min., 120 min. a 150 min.. Skúmali sme ako vplyva čas a zmena látkového množstva na tvorbu komplexov. Po ukončení procesu refluxu sme jednotlivé produkty prefiltrovali cez sklenenú fritu pri zníženom tlaku a premyli schladeným etanolom (4°C) a následne dietyléterom. Takto získané produkty sme dosušili voľne na vzduchu a nakoniec stanovili ich výťažok.

Tabuľka 1 uvádza jednotlivé množstvá použitých reaktantov a výťažok pripravených produktov.

Vzorka	Ligand	Pomer (M : L)	Čas [min]	Výťažok [g]
PK-A1	L-Arg	1:2	120	0,164
PK-A2	L-Arg	2:2	120	0,251
PK-A3	L-Arg	1:4	120	0,102
PK-H1	L-His	1:2	120	0,123
PK-H2	L-His	1:5	150	0,180
PK-H3	L-His	2:3	120	0,157
PK-T1	L-Trp	10:20	40	1,783

Tab. 1 Spôsob prípravy komplexov železa pomocou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a aminokyselín L-Arg, L-His a L-Trp

1.4 Syntéza komplexov s Mohrovou soľou

Pri príprave komplexov železa s použitým Mohrovej soli a aminokyselín L-Arg, L-His a L-Trp sme použili obdobný postup ako pri príprave komplexov železa pomocou heptahydrátu síranu železnatého. Pripravené vzorky PK-HM2 a PK-AM2 boli následne analyzované pod mikroskopom, keďže vykazovali prítomnosť drobných kryštálov so schopnosťou lomu svetla. Po preskúmaní vzoriek pod mikroskopom sme usúdili, že prítomné kryštály môžu signalizovať prítomnosť nezreagovanej Mohrovej soli. Tabuľka 2 uvádza jednotlivé množstvá látok použitých na prípravu komplexov železa s aminokyselinami spolu s výsledným výťažkom pripravených produktov.

Vzorka	Ligand	Pomer (M : L)	Čas [min]	Výťažok [g]
PK-AM	L-Arg	1:2	120	0,139
PK-AM2	L-Arg	10:20	120	0,221
PK-HM	L-His	1:2	120	0,126
PK-HM2	L-His	10:20	120	0,379
PK-TM	L-Trp	10:20	40	1,646

Tab. 2 Spôsob prípravy komplexov železa pomocou $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a aminokyselín L-Arg, L-His, L-Trp

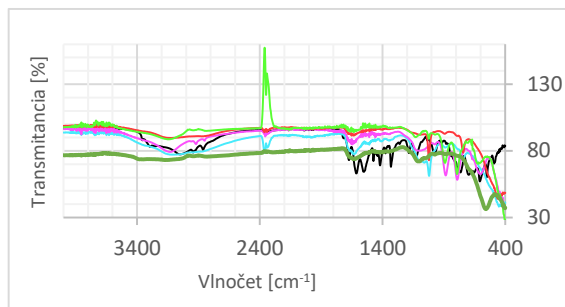
2 Výsledky a diskusia

2.1 Výsledky IČ a EA analýz

V rámci tejto práce boli syntetizované komplexy železa s vybranými aminokyselinami – L-arginínom, L-histidínom a L-tryptofánom – charakterizované infračervenou spektroskopiou (IČ) s cieľom identifikovať zmeny vo vibračných pásmach funkčných skupín ligandov po koordinácii na kovové centrum. Zloženie vybraných produktov bolo následne overené elementárnou analýzou (C, H, N), ktorá umožnila porovnanie experimentálnych hodnôt s teoreticky predpokladanými hodnotami komplexov typu $[\text{Fe}(\text{L})_2]$. Kombinácia týchto analytických metód umožnila posúdiť mieru koordinácie, pravdepodobný spôsob koordinácie jednotlivých aminokyselín a zároveň zhodnotiť čistotu a homogenitu pripravených produktov.

2.1.1 IČ spektrá komplexov s L-arginínom

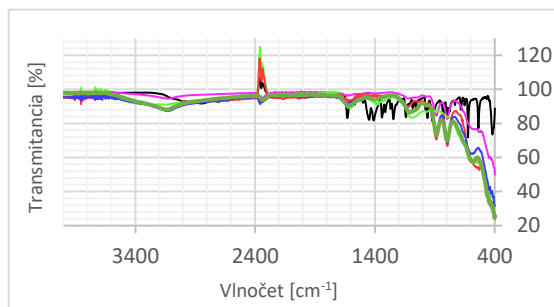
Porovnanie infračervených spektier čistého L-arginínu a vzoriek PK-A1, PK-A2, PK-A3, PK-AM a PK-AM2 (obr. 2) preukázalo výrazné zmeny v oblastiach charakteristických pre karboxylovú a amínovú časť molekuly. V oblasti medzi 1600 a 1700 cm^{-1} sú prítomné pásy, ktoré zodpovedajú vibráciám C=O a ich posun či zmena intenzity vo vzorkách môže byť dôkazom interakcie medzi guanidínovou skupinou arginínu a iónmi železa. [5] Vo vzorkách PK-A1, PK-A2, PK-A3 je možné pozorovať posuny a zmeny intenzity týchto pásov, čo naznačuje pravdepodobnú interakciu guanidínovej skupiny s kovovými iónmi. Posun pásu C=O na nižšie vlnové hodnoty môže indikovať zníženie väzby v dôsledku komplexácie, zatiaľ čo zmeny v intenzite pásu C=N môžu byť spojené s delokalizáciou elektrónovej hustoty pri interakcii s iónmi železa. [6] V spektrách vzoriek PK-AM a PK-AM2 sú tieto pásy posunuté a do určitej miery aj rozdelené, čo naznačuje zmenu väzby v karboxylovej skupiny, pričom posun môže indikovať koordináciu tejto skupiny so železom (Fe–O väzba). V oblasti okolo 900 cm^{-1} , ktorá je významná pre detekciu väzieb medzi kovmi a ligandmi, možno v spektrách vzoriek pozorovať nové absorpčné pásy prípadne ich posuny v porovnaní s čistým arginínom. Prítomnosť nového intenzívneho pásu v tejto oblasti v spektre vzorky PK-AM2 môže detekovať stabilnejší alebo inak usporiadaný komplex než v prípade ostatných vzoriek.



Obr. 2 Porovnanie IČ spektier čistého L-arginínu so vzorkami PK-A1 – PK-AM2 (• L-arginín, • PK-A1, • PK-A2, • PK-A3, • PK-AM, • PK-AM2)

2.1.2 IČ spektrá komplexov s L-histidínom

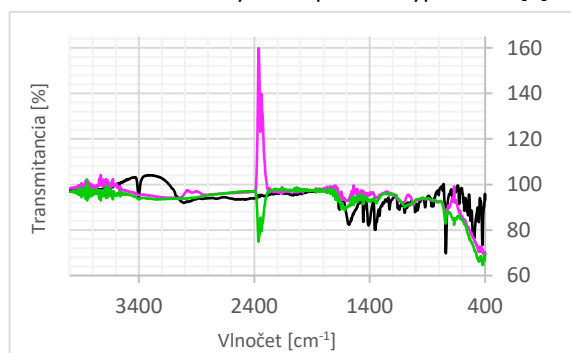
Pri porovnaní spektra čistého L-histidínu so vzorkami PK-H1, PK-H2, PK-H3, PK-HM a PK-HM2 (obr. 3) boli pozorované systematické zmeny v oblasti $1000 - 1500\text{ cm}^{-1}$, kde sa nachádzajú vibrácie C–N a ďalších funkčných skupín. V prípade čistého histidínu sú v tomto rozsahu dobre definované pásy, ktoré sa pripisujú deformáciám C-H, ohybovým vibráciám N-H a vibráciám väzieb C-N v imidazolovom kruhu. Pri vzorkách sú viditeľné posuny v polohách týchto pásov, ako aj zmeny ich intenzity, čo naznačuje interakciu medzi histidínom a železom. V prípade PK-H2 a PK-H3 sú niektoré absorpčné pásy mierne posunuté k nižším frekvenciám, čo môže súvisieť so zmenou v hybridizácii atómov dusíka alebo kyslíka v dôsledku koordinácie s kovem. V oblasti pod 900 cm^{-1} , sú v spektre čistého L-histidínu prítomné vibrácie imidazolového kruhu a ohybové vibrácie C-H, pričom v spektrách vzoriek možno pozorovať nové absorpčné pásy alebo ich posuny. Tieto zmeny môžu naznačovať tvorbu komplexov. [7] Najvýraznejšie rozdiely v tejto oblasti sú viditeľné pri vzorkách PK-H3, PK-HM a PK-HM2, kde sa objavujú intenzívnejšie absorpčné pásy v porovnaní s ostatnými vzorkami, čo by mohlo naznačovať silnejšiu väzbu medzi histidínom a kovovým centrom.



Obr. 3 Porovnanie IČ spektier čistého L-histidínu so vzorkami PK-H1 – PK-HM2 (• L-histidín, • PK-H1, • PK-H2, • PK-H3, • PK-HM, • PK-HM2)

2.1.3 IČ spektrá komplexov s L-tryptofánom

Pri porovnávaní infračervených spektier čistého L-tryptofánu a vzorkami PK-T1 a PK-TM (obr. 3) možno pozorovať viaceré rozdiely, ktoré poukazujú na zmenu chemického prostredia funkčných skupín po reakcii so železnými iónmi. V oblasti 3300 – 3000 cm^{-1} , kde sa typicky vyskytujú valenčné vibrácie N–H väzieb z aminoskupiny a indolového kruhu, je pás u čistého L-tryptofánu pomerne dobre definovaný. V prípade oboch komplexov je však táto oblasť rozšírená, menej výrazná a s nižšou transmitanciou, čo naznačuje vznik vodíkových väzieb alebo priamu koordináciu dusíka na ión železa. V oblasti približne 1600 – 1500 cm^{-1} , ktorá zodpovedá deformáciám N–H väzby a zároveň asymetrickým vibráciám karboxylovej skupiny (COO^-), dochádza pri komplexoch k miernemu posunu a rozšíreniu pásov. Tento jav svedčí o zmene elektrónovej hustoty v okolí funkčných skupín, čo je typické pre tvorbu koordináčnych väzieb. [8] V oblasti pod 600 cm^{-1} , konkrétne medzi 500 a 400 cm^{-1} , možno pozorovať pri vzorke PK-TM výskyt nových pásov. Táto časť spektra býva spájaná s vibráciami kov – dusík alebo kov – kyslík, čo poskytuje priamy dôkaz o tvorbe komplexu medzi iónmi železa a funkčnými skupinami tryptofánu. [9]



Obr. 4 Porovnanie IČ spektier čistého L-tryptofánu so vzorkami PK-T1 a PK-TM (• L-tryptofán, • PK-T1, • PK-TM)

2.1.4 Prvková analýza

Hmotnostný percentuálny obsah jednotlivých prvkov pre vybrané komplexy železa s aminokyselinami sú uvedené v tabuľke 3. Na základe získaných výsledkov vyplýva, že obsah prvkov sa medzi vzorkami líši v závislosti od zloženia použitých ligandov vo forme aminokyselín a zdrojov železa. Pri syntézach vzoriek sme sa inšpirovali patentom. [4] Nevýhoda v prípade patentov je v tom, že pre zabezpečenie patentovej ochrany obsahujú iba základné údaje bez podrobnejších údajov o postupe a zložení. Pri syntéze vzoriek komplexov železa s aminokyselinami sme využili aj poznatky z vedeckej práce Ghasemi a kol. v ktorej bol analyzovaný vplyv chelátov

železa na hydroponicky pestované paradajky. Avšak ani v tejto práci východiskové cheláty nemajú uvedené výsledky EA. [10] Pri vyhodnocovaní zloženia pripravených vzoriek sme využili aj závery z bakalárskych a diplomových prác riešených na Ústave chémie a environmentálnych vied univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave, ktoré sa zaoberali syntézami komplexov železa s aminokyselinami. Zo záverov prác vyplynulo, že v uskutočnených experimentoch, sú v produktoch okrem komplexov železa s aminokyselinami prítomné aj anorganické časti, ktoré znížovali obsah organických látok, aminokyselín. [11, 12]

Vzorka	Elementárna analýza			
	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]
PK-A1	7,16	9,07	2,64	0,97
PK-A2	3,97	4,25	1,26	0
PK-H2	3,35	4,78	0,96	0
PK-T1	11,35	51,77	4,75	0
PK-HM	3,42	4,23	1,65	0
PK-TM	8,10	33,27	3,71	0

Tab. 3 Získané výsledky elementárnej analýzy vybraných komplexov železa s aminokyselinami

Výsledky zistené elementárnou analýzou poukazujú na malý obsah tzv. organickej časti produktu. Preto je nutné zisťovať zloženie zvyšného obsahu zmesnej vzorky, a to vyžaduje ďalšie napr. difrakčné meranie, ktoré však v predkladanej práci nebolo uskutočnené. V tabuľke 4 sú uvedené vypočítané teoretické hodnoty obsahu jednotlivých prvkov v syntetizovaných komplexoch, ktoré vychádzajú z predpokladu tvorby komplexov typu $[\text{Fe}(\text{Arg})_2]$, $[\text{Fe}(\text{His})_2]$ a $[\text{Fe}(\text{Trp})_2]$. Vzorka PK-T1 vykazuje najlepšiu zhodu s vypočítanými hodnotami. Nízke hodnoty obsahu dusíka pri vzorke PK-HM naznačujú, že výsledný produkt môže obsahovať podiel nezreagovaného anorganického zložky (napr. zvyšky soli), čo znižuje zastúpenie organickej zložky (aminokyseliny) v konečnom komplexe. [11, 12]

Vzorka	Elementárna analýza			
	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]
PK-A1	27,86	35,83	6,52	0
PK-A2	27,86	35,83	6,52	0
PK-H2	23,07	39,85	4,43	0
PK-T1	12,12	57,16	4,79	0
PK-HM	23,07	39,85	4,43	0
PK-TM	12,12	57,16	4,79	0

Tab. 4 Teoreticky vypočítané hodnoty zastúpenia jednotlivých prvkov v pripravených komplexoch železa s aminokyselinami

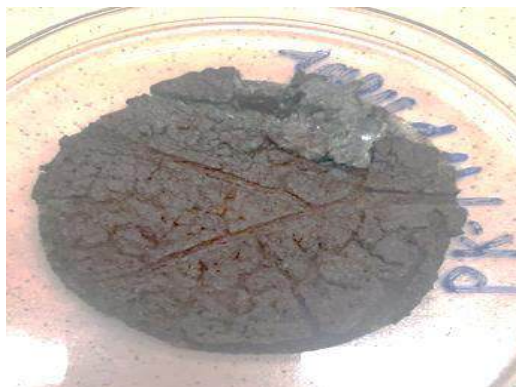
2.2 Diskusia

Infračervená spektroskopia potvrdila, že vo všetkých pripravených systémoch dochádza k interakcii medzi iónmi železa a funkčnými skupinami aminokyselín. Najvýraznejšie zmeny boli pozorované v oblasti vibrácií karboxylovej skupiny, kde posuny pásov naznačujú jej zapojenie do koordinácie a vznik väzieb typu Fe–O. Pri komplexoch s L-arginínom sa prejavili zmeny pásov v oblasti 1600 – 1700 cm^{-1} , ktoré možno pripísať koordinácii karboxylovej skupiny, pričom modifikácie pásov C=N poukazujú na zmenu elektrónovej hustoty guanidíniovej skupiny po komplexácii. V prípade L-histidínu boli zaznamenané posuny pásov imidazolového kruhu a väzieb C–N, čo naznačuje možnú účasť dusíka heterocyklu na koordinácii. Najvýraznejšie dôkazy tvorby koordinačných väzieb boli pozorované pri L-tryptofáne, kde sa okrem zmien pásov COO^- objavili nové absorpcie v oblasti 500 – 400 cm^{-1} , ktoré možno priradiť vibráciám Fe–O alebo Fe–N. Elementárna analýza ukázala, že experimentálne hodnoty obsahu C, H a N sú vo viacerých prípadoch nižšie než teoretické hodnoty vypočítané pre modelové komplexy typu $[\text{Fe}(\text{L})_2]$, čo naznačuje kombinovaný charakter produktov alebo prítomnosť anorganických zložiek. Najlepšiu zhodu s teoretickým zložením vykazovala vzorka PK-T1, čo poukazuje na význam optimalizácie reakčných podmienok. Získané výsledky potvrdzujú schopnosť L-arginínu, L-histidínu a L-tryptofánu koordinovať železo prostredníctvom svojich funkčných skupín. Súčasne však naznačujú, že čistota a presná stechiometria pripravených komplexov je výrazne ovplyvnená reakčnými podmienkami a použitým zdrojom železa.

Záver

V práci boli pripravené komplexy železa s L-arginínom, L-histidínom a L-tryptofánom za rôznych reakčných podmienok a s použitím dvoch zdrojov železa. Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou preukázala zmeny vibračných pásov karboxylovej skupiny a aminoskupiny, čo potvrdzuje ich zapojenie do koordinácie s kovovým centrom. Najvýraznejšie spektrálne zmeny boli pozorované pri komplexoch s L-tryptofánom, kde sa objavili aj nové pásy v oblasti nízkych vlnočtov charakteristické pre väzby kov–ligand. Elementárna analýza poukázala na rozdiel medzi experimentálnym a teoretickým zložením modelových komplexov typu $[\text{Fe}(\text{L})_2]$, čo naznačuje, že pripravené produkty majú pravdepodobne kombinovaný charakter alebo obsahujú podiel anorganických zložiek. Najlepšiu zhodu s predpokladanou stechiometriou vykazovala vzorka PK-T1 (obr. 4), pripravená v molárnom pomere 1:2 pri kratšom čase zahrievania.

Výsledky potvrdzujú schopnosť vybraných aminokyselín koordinovať železo prostredníctvom kyslíka z karboxylovej skupiny a dusíka z aminoskupiny. Pre jednoznačné určenie štruktúry a čistoty pripravených komplexov by bolo vhodné doplniť ďalšie štruktúrne analytické metódy.



Obr. 4 Vzorka PK-T1

Podakovanie

RNDr. Zuzane Biolkovej, PhD. za riešenie štruktúr pomocou infračervenej spektrometrie s Fourierovou transformáciou, ako aj školiteľke RNDr. Beate Vranovičovej, PhD. za odborné vedenie.

Použitá literatúra

- [1] XU, Naijin; CHEN, GUANQUN and LIU, Hui, (2017). Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation. *Molecules*, vol. 22, no. 12, pp. 1-8, Article 2066. ISSN 1420-3049.
- [2] CRICHTON, R. Robert, (2008). *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*. Amsterdam: Elsevier, 383 s. ISBN 978-0-444-52740-0.
- [3] NELSON, L. David and COX, M. Michael, (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. vyd. New York: W. H. Freeman and Company. 1120 s. ISBN 978-0716743392.
- [4] ALBION INTERNATIONAL, Inc., (1989). *Preparation of pharmaceutical grade amino acid chelates*. Pôvodca: Harvey H. ASHMEAD. Americký patent. Prihl.: 1986-07-03. Udel.: 1989-05-16. US 4830716.
- [5] TUCKER, F. William; ASPLUND, R. Owen and SMITH, L. Holt, (1975). Preparation and properties of Fe^{3+} -amino acid complexes: Crystalline complexes with aliphatic amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 166, no. 2, pp. 433-438. ISSN 1096-0384.
- [6] MILATA, V. a kol. (2008). Molekulová absorpčná spektrometria v infračervenej oblasti. In: Milata, Viktor a kol. *Aplikovaná molekulová spektroskopia*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, s. 253-318. ISBN 978-80-227-2960-4.

- [7] ALBADA, H. Bauke; SOULIMANI, Fouad; WECKHUYSEN, M. Bert and LISKAMP, M. J. Rob, (2007). Scaffolded amino acids as a close structural mimic of type-3 copper binding sites. *Chemical Communications*, no. 46, pp. 4895-4897. ISSN 1364-548X.
- [8] SHEVCHENKO, L. L., (1963). Infrared spectra of salts and complexes of carboxylic acids and some of their derivatives. *Russ. Chem. Rev.*, vol. 32, no. 4, pp. 201-207. ISSN 1468-4837.
- [9] FAKHERI, Hamideh; TAYYARI, Sayyed Faramarz; HERAVI, Mohammad Momen and MORSALI, Ali, (2017). Low frequency vibrational spectra and the nature of metal-oxygen bond of alkaline earth metal acetylacetonates. *Journal of Molecular Structure*, vol. 1150, pp. 340-348. ISSN 1872-8014.
- [10] GHASEMI, Somayeh; KHOSHGOFTARMANESH, H. Amir; HADADZADEH, Hassan, (2012). Synthesis of Iron-Amino Acid Chelates and Evaluation of Their Efficacy as Iron Source and Growth Stimulator for Tomato in Nutrient Solution Culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 31, no. 4, pp. 498 – 508. ISSN 1435-8107.
- [11] VESELOVSKÁ, B. (2020). *Komplexy železa s malými biomolekulami a ich vzťah k biomineralizácii*. Diplomová práca. Trnava: UCM v Trnave, 70 s.
- [12] ĎUREJOVÁ, M. (2022). *Príprava komplexov železa s histidínom, ich vlastnosti a využitie*. Bakalárska práca. Trnava: UCM v Trnave, 56 s.

Syntéza štruktúrnych analógov Donepezilu® kondenzačnými reakciami *N*-benzylpiperidónu

Synthesis of structural analogues of Donepezil® via condensation reactions of *N*-benzylpiperidone

Viktória Kvietková¹ – Zita Tokárová²

¹Oddelenie Chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J.

Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko

¹ kvietkova1@ucm.sk, ² zita.tokarova@ucm.sk

Abstrakt

Donepezil® je piperidínový derivát, ktorý je schopný reverzibilne a nekompetitívne blokovat' centrálnu aktívnu acetylcholinesterázu. O Donepezil® sme sa začali zaujímať z dôvodu neustáleho nárastu počtu pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou, najmä vo vyššom tzv. geriatrickom veku. Keďže samotné liečivo je pomerne drahé, neustále sa hľadajú cenovo dostupnejšie alternatívy [1].

Pre skupinu derivátov so štruktúrou 3-arylmetylidén-*N*-benzylpiperidónu, ktoré sú produktom mono-kondenzácie *N*-benzylpiperidín-ónu s aromatickými alebo heterocyklickými aldehydmi bolo pozorované zhodné geometrické usporiadanie v tvare zodpovedajúcej konformácii deformovanej stoličky, čo je kľúčové, prečo tieto typy mono-substituovaných derivátov predstavujú perspektívnu skupinu s potenciálom Donepezilu-podobnému účinku. Zároveň, syntetická dostupnosť zvyšuje ich potenciál byť lacnejšou alternatívou Donepezilu® [2].

V tomto článku sú prezentované syntézy 3-arylmetylidén-*N*-benzylpiperidónov s využitím Knoevenagelovej kondenzácie.

Kľúčové slová: Donepezil®, kondenzačná reakcia, klasická Knoevenagelova reakcia, *N*-benzylpiperidín-4-ón.

Abstract

Donepezil® is a piperidine derivative capable of reversibly and noncompetitively inhibiting centrally active acetylcholinesterase. We became interested in Donepezil® due to the continuous increase in the number of patients suffering from Alzheimer's disease, especially in the higher, so-called geriatric age. Since the drug itself is relatively expensive, more affordable alternatives are constantly being sought [1].

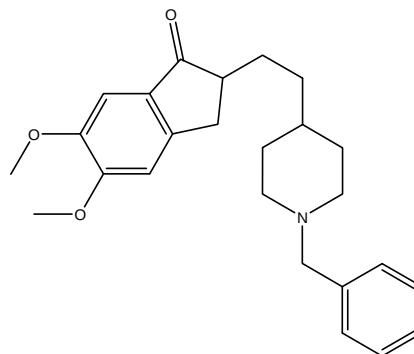
For the group of derivatives with the structure of 3-arylmethylidene-*N*-benzylpiperidone, which are products of the mono-condensation of *N*-benzylpiperidinone with aromatic or heterocyclic aldehydes, a consistent geometric arrangement in the form corresponding to a distorted chair conformation

has been observed. This is a key reason why these types of mono-substituted derivatives represent a promising group with potential Donepezil-like activity. At the same time, their synthetic accessibility increases their potential to be a cheaper alternative to Donepezil® [2]. This article presents the syntheses of 3-arylmethylidene-*N*-benzylpiperidones using the Knoevenagel condensation.

Keywords: Donepezil®, condensation reaction, classical Knoevenagel reaction, *N*-benzylpiperidine-4-one

Úvod

Donepezil® (Obrázok 1), ktorý sa používa vo forme Donepezil Hydrochloridu, je inhibítorom, ktorý pôsobí reverzibilne a nekompetitívne na enzým acetylcholinesteráza (AChE). Liečivo sa od roku 1996 používa na zmiernenie príznakov ako aj samotnú medikamentóznou liečbu Alzheimerovej choroby mierneho až stredného typu na zlepšenie pamäte [3]. Alzheimerova choroba patrí do skupiny neurodegeneratívnych ochorení, ktoré je popisované príznakmi ako zhoršovanie pamäte a kognitívnych funkcií. Spomedzi inhibítorov acetylcholinesterázy patrí k jedným z najvýznamnejších liekov. Donepezil hydrochlorid bol prvýkrát predložený farmaceutickou firmou, sídliacou v Japonsku- Eisai [4].

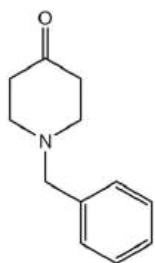


Obr. 1 Štruktúra Donepezilu®

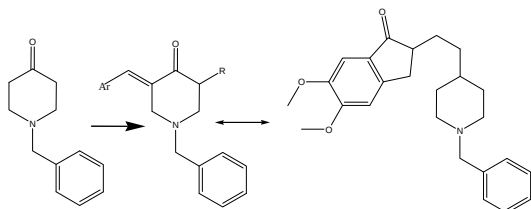
N-Benzylpiperidín-4-ón (Obrázok 2) patrí medzi základné *N*-heterocyklické zlúčeniny. Spolu s derivátmi benzimidazolu, piperazínu a piperidínu sa radí do kategórie zlúčenín s významnými farmaceutickými účinkami. Z toho dôvodu patrí do skupiny látok, ktoré môžu byť použité pri syntéze liekov [2].

Molekula *N*-benzylpiperidín-4-ónu obsahuje viacero reakčných centier, čo umožňuje realizovať rôzne typy chemických reakcií, ako sú nukleofilné adície, reakcie s kyselinami, aldolové adície, kondenzácie či halogenácie [5].

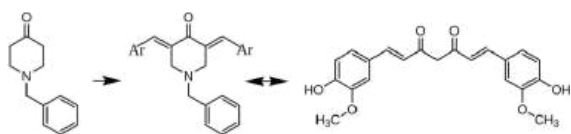
Mono-substitúciou *N*-benzylpiperidín-4-ónu v polohe C α je možné získať analógy Donepezilu® (Obrázok 3), čo predstavuje hlavné experimentálne zameranie, zatiaľ čo bis-substitúcia v oboch C α polohách vedie k syntéze analógov kurkumínu (Obrázok 4).



Obr. 2 Štruktúra *N*-benzylpiperidín-4-ónu



Obr. 3 Monosubstitúcia *N*-benzylpiperidín-4-ónu so štruktúrou podobnosťou k Donepezilu®



Obr. 4 Bis-substitúcia *N*-benzylpiperidín-4-ónu štruktúrou podobnosťou ku kurkumínu

Cieľom tejto práce je syntéza a charakterizácia nových derivátov *N*-benzylpiperidónu, vrátane modifikácie reakčných podmienok, izolácie a čistenia produktov, a ich následná štruktúrna analýza pomocou spektroskopických metód.

Cieľom nie je priamo príprava hotového liečiva alternatívy Donepezilu®, ale návrh syntézy nových typov derivátov získaných pomocou klasickej Knoevenagelovej reakcie s výraznou štruktúrnou

podobnosťou k liečivu. Očakávame, že získané zlúčeniny prispievajú k rozšíreniu poznatkov o chemických vlastnostiach a farmakologickom potenciáli tejto triedy látok.

1 Metódy a postupy

Substráty a činidlá: *N*-benzylpiperidín-4-ón (1 ekvív.; 0,01 mol; 2 g), *p*-*N,N*-dimetylamino-benzaldehyd (1,2 ekvív.; 0,012 mol; 1,8 g), 3 % roztok NaOH, *p*-nitrobenzaldehyd (1,2 ekvív.; 0,012 mol; 1,8 g), roztok tiofén-2-karbaldehyd (1,2 ekvív.; 0,006 mol; 0,48 g). Rozpúšťadlá: etanol, chloroform, voda. Reakcie boli monitorované pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) na platniach so silikagélom a vizualizovali sa pomocou UV ručnej lampy pracujúcej pri vlnovej dĺžke 254/365 nm.

Pomocou klasickej Knoevenagelovej kondenzácie v zásaditom prostredí účinkom hydroxidu sodného v etanole sa primárne dajú očakávať *bis*-substituované produkty. Tieto sú však štruktúrnymi analógmi kurkumínu, čo nás v aktuálnych výskumných snahách zaujíma len okrajovo. Snahy sú preto sústredené na výber takých substrátov- aromatických a heterocyklických karbaldehydov, ktoré poskytujú aj vznik mono-substituovaných derivátov, ideálne ako hlavný produkt, prípadne v zmesi s *bis*-substituovanými derivátmi.

1.1 Všeobecný postup syntézy

Klasickej Knoevenagelovej kondenzácii podľa schémy 1:

K roztoku *N*-benzylpiperidín-4-ónu (1 ekvív.; 0,01 mol; 2 g) v etanole (5 ml) sa pridá roztok príslušného aldehydu (1,2 ekvív.; 0,012 mol) v etanole (15 ml). Nakoniec sa pridá 3 % roztok NaOH v deionizovanej vode (0,006 mol; 0,02 g) v 0,6 ml vody. Reakčná zmes sa zahrieva pri teplote varu etanolu (78 °C) po dobu 2-16 hodín, pričom priebeh reakcie sa kontroluje TLC (tenkovrstvová chromatografia, eluent: *n*-hexán: etylacetát = 9/1, 8/2, 6/4 alebo v 30% THF v *n*-hexáne, alebo inom vhodnom elutente). Podľa toho, či vzniká produkt, sa reakcia odstaví, nechá miešať navyše 16 hodín. Po skončení sa reakčná zmes nechá ochladiť na laboratórnu teplotu. Surový produkt sa odsaje a premyje ľadovým etanolom (5 °C). Podľa potreby sa produkt čistí kryštalizáciou alebo stĺpcovou kolónovou chromatografiou.

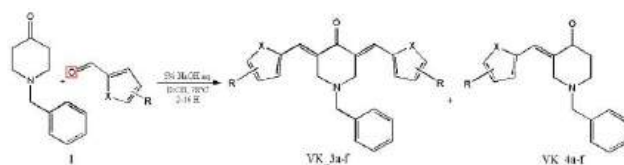

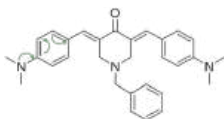
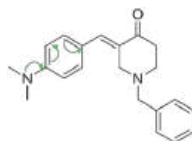

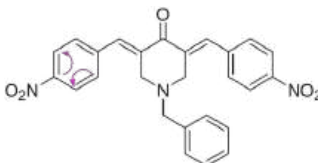
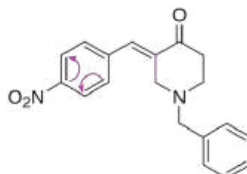
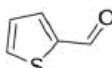
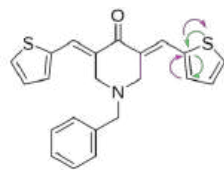
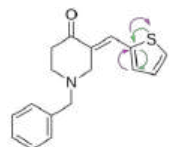


Schéma 1. Všeobecná schéma reakcie

Substrát	(3,5)-Bis-substituovaný produkt	(3) Mono-substituovaný produkt
 <p>$C_9H_{11}NO$ / 149,19 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p><i>p</i>-N,N-dimetylamino-benzaldehyd VK_2a</p>	 <p>$C_{30}H_{33}N_3O$ / 451,60 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3,5-bis-(<i>p</i>-N,N-dimetylamino-benzylidén)-piperidín-4-ón VK_3a</p>	 <p>$C_{21}H_{24}N_2O$ / 320,43 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3-(<i>p</i>-N,N-dimetylamino-benzylidén)-piperidín-4-ón VK_4a</p>
 <p>$C_7H_5NO_3$ / 151,12 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p><i>p</i>-nitrobenzaldehyd VK_2b</p>	 <p>$C_{26}H_{21}N_3O_5$ / 455,46 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3,5-bis-(<i>p</i>-nitro-benzylidén)-piperidín-4-ón VK_3b</p>	 <p>$C_{19}H_{18}N_2O_3$ / 322,36 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3-(<i>p</i>-nitro-benzylidén)-piperidín-4-ón VK_4b</p>
 <p>C_5H_4OS / 112,15 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>Tiofén-2-karbaldehyd VK_2c</p>	 <p>$C_{22}H_{19}NOS_2$ / 377,52 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3,5-bis-tiofén-2-ylmetylen-piperidín-4-ón VK_3c</p>	 <p>$C_{17}H_{17}NOS$ / 283,39 $g\text{mol}^{-1}$</p> <p>N-Benzyl-3-tiofén-2-ylmetylen-piperidín-4-ón VK_4c</p>

Tabuľka 1 Výber substrátov **VK_2a-c** pre klasickú Knoevenagelovu kondenzáciu N-benzylpiperidín-4-ónu a štruktúra očakávaných produktov

2 Výsledky a diskusia

Pri syntézach sme použili 3 typy derivátov (**Tabuľka 1**). V prvej syntéze sme použili *p*-*N,N*-dimetylamino-benzaldehyd (**VK_2a**), s elektrónovo-donorným substituentom v *para*-polohe benzénového jadra. Pre deriváty s obsahom EDG substitúcie sú doteraz známe len bis-substituované deriváty, a teda sme očakávali vznik štruktúrnych analógov skôr kurkumínu ako donepezilu. V druhej syntéze sme ako substrát použili *p*-nitrobenzaldehyd (**VK_2b**). Nitro skupina v *para* polohe benzénového jadra je silný elektrónovo-akceptorný substituent. Pre tento derivát je zatiaľ ako jediný v literatúre popísaná klasická Knoevenagelova kondenzácia *N*-benzylpiperidín-4-ónu so vznikom monosubstituovaného derivátu a teda, cieľného štruktúrneho analógu liečiva Donepezil. Práve preto je v našich výskumných cieľoch kľúčovým pre overenie jeho vzniku. Zároveň, nitro skupina je ľahko modifikovateľná v prospech zavedenia vhodnej substitúcie ovplyvňujúcej biokompatibilitu derivátu= rozpustnosť a aktivita. Modifikácii -NO₂ skupiny sa však budeme venovať v nadväznosti na tento výskum, po jeho ukončení.

V tretej syntéze sme použili heterocyklický aldehyd, konkrétne tiofén-2-karbaldehyd s hybridným charakterom. Môže vystupovať aj ako elektrónovo-akceptorný, pričom prevažuje ako elektrónovo-donorný substituent, označovaný ako π -mostík. V tomto prípade očakávame vznik zmesi produktov aj bis-substituovaného derivátu **VK_3c** aj monosubstituovaného **VK_4c**.

Monosubstituované deriváty ako analógy Donepezilu® sú náročnejšie na syntézu, a preto ich príprava bola prezentovaná len v dvoch publikáciách. Zatiaľ čo bis-substituované deriváty ako analógy kurkumínu reprezentujú deriváty jednoduchšie na syntézu, preto sú vo vedeckej databáze týkajúcej sa derivátov *N*-benzylpiperidín-4-ónu známe a rozšírené. Treba však upozorniť, že aj naše experimentálne snahy vedú k vzniku bis-kondenzátov a nie cieľných mono-derivátov. Avšak substitúcia na aldehyde dokáže výrazne ovplyvniť priebeh reakcie.

Prvá reakcia, pri ktorej sme ako substrát použili *p*-*N,N*-dimetylbenzaldehyd bežala 5 dní. Po piatich dňoch použitím TLC metódy, sme zistili, že reakcia neposkytla úplnú konverziu substrátu. Ďalším významným záverom je, že sme pozorovali vznik zmesi dvoch produktov, pričom pre jeden z nich sa dá predpokladať štruktúra zhodná s mono-substituovaným derivátom **4a**. Látku sme naniesli na tenkú vrstvu pokrytú silikagélom a ako reakčnú zmes sme použili zmes chloroform a etanol v pomere 9:1.

V druhej syntéze sme použili elektrónovo-akceptorný substituent, a čas potrebný na úplnú konverziu sa

skrátil na jeden deň. Nanesením produktu na TLC platňu sme zistili, že nám vznikol nový produkt a UV svetlom sa potvrdilo, že látka fluoreskovala. Fluorescencia bola spôsobená tým, že pri Knoevenagelovej kondenzácii vzniká konjugovaný π -systém obsahujúci dvojité väzby, C=C väzbu. To spôsobilo delokalizáciu π -elektrónov a taktiež absorpciu UV-žiarenia.

Pri syntéze použitím substrátu **VK_2c** zmes zreagovala v časovom intervale asi 5 minút. Úplná konverzia bola pozorovaná okamžite, pretože z oboch kvapalných substrátov vznikol tuhý produkt tmavožltej farby. Tento produkt bolo potrebné odsať.

Záver

V tomto článku sme sa zamerali na syntézu a charakterizáciu nových derivátov *N*-benzylpiperidín-4-ónu so štruktúrnou podobnosťou k liečivu Donepezil. Cieľom bola príprava skupiny mono-substituovaných 3-arylmetylidénových derivátov, a teda nadväznosť na článok mojej školiteľky, ktorá sa venovala syntetickým prístupom tejto skupiny látok. Na základe predbežných výsledkov sa ukázalo, že v prvej reakcii došlo k vzniku zmesi dvoch produktov. Pri druhej a tretej reakcii sme zaznamenali vznik jedného produktu. Jednotlivé štruktúry týchto derivátov budú potvrdené pomocou spektroskopických metód (NMR, IČ). Úplná izolácia a charakterizácia jednotlivých látok bude pokračovať v rámci bakalárskej práce.

Podakovanie

Tento článok je finančne podporovaný projektom KEGA:009UCM-4/2024. (Inovácia vzdelávacieho procesu na bakalárskom a magisterskom študijnom programe Biomedicínska chémia) a projektom "Spoločnosť v zrkadle vody - WATCH, NFP401101C229".

Zoznam bibliografických odkazov

[1] WANG, Chengwu; JIANG, Xuelian; SUN, Xiumei; GUO, Wenlu; WANG, Fen a ZHU, Defa, (2024). Effects of donepezil on emotion, cognitive function, and inflammatory factors in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Precision Medication*, roč. 1, č. 29, s. 100019, ISSN 2950-5232.

[2] TOKÁROVÁ, Zita; KABAŇOVÁ, Natália; KORCOVÁ, Júlia; GALLOVÁ, Lenka; TOKÁR, Kamil a VĚGH, Daniel, (2025). Diverse synthetic

approaches to 3-arylmethylidene- and bis-3,5-arylmethylidene-N-benzylpiperidin-4-ones with thiophene scaffolds: The comparative experimental study. *Journal of Molecular Structure*, roč. 2025, č. zväzku 1336, s. 1–12. ISSN 0022-2860.

[3] THOE, Ewen Se *et al.*, (2021). A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, č. zväzku 276, s. 119129. ISSN 0024-3205.

[4]] RAO, R. Janaki; RAO, A. K. S. Bhujanga a MURTHY, Y. L. N., (2007). Efficient and Industrially Viable Synthesis of Donepezil. *Synthetic Communications*, roč. 37, č. zväzku 17, s. 2847–2853. ISSN 0039-7911.

[5] KORCOVÁ, Júlia, (2017). *Syntetické využitie N-benzylpiperidín-4-ónu na prípravu nových biologicky aktívnych látok, elektroaktívnych molekulárnych materiálov a tenkovrstvových solárnych článkov*. Diplomová práca. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, 102.

Návrh a príprava hemi- a ftalokyanínov s obsahom tiofénu pre využitie vo fotodynamickej terapii

Design and Synthesis of Thiophene-Containing Hemi- and Phthalocyanines for Application in Photodynamic Therapy

Natália Málíková¹ – Zita Tokárová²

^{1,2} Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Námestie J. Herdu 577/2, 917
01 Trnava,

¹ malikova3@ucm.sk, ² zita.tokarova@ucm.sk

Abstrakt

Fotodynamická terapia (PDT) predstavuje moderný terapeutický prístup založený na využití fotosenzibilátora (PS), ktorý po aktivácii svetlom generuje reaktívne formy kyslíka (ROS) schopné indukovať smrť nádorových buniek. Ftalokyaníny (Pc) sa v rôznych oblastiach výskumu osvedčili ako perspektívne PS vďaka svojim priaznivým fotofyzikálnym vlastnostiam. Predkladaná práca sa preto zameriava na syntetický návrh a prípravu hemiftalokyanínov, resp. Pc so zabudovaným tiofénovým jadrom a vhodne zvolenými substituentmi zabezpečujúcimi výrazné optoelektrónové vlastnosti nevyhnutné pre efektívny priebeh danej liečebnej metódy. V závere výskumu bol navrhnutý syntetický postup vedúci k príprave hemiftalokyanínov spĺňajúcich požadované charakteristiky, čím sa vytvoril predpoklad pre ich ďalšie využitie pri syntéze finálneho derivátu ftalokyanínového typu.

Kľúčové slová: ftalokyaníny, hemiftalokyaníny, nádorové ochorenia, biologické testy

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a modern therapeutic strategy based on the application of a photosensitizer (PS) that, upon light activation, produces reactive oxygen species (ROS) capable of inducing tumor cell death. Phthalocyanines (Pc) have emerged as promising PS in various research areas owing to their advantageous photophysical properties. Accordingly, the present study is focused on the synthetic design and preparation of hemiphthalocyanines or Pc incorporating a thiophene core along with appropriately selected substituents ensuring pronounced optoelectronic properties essential for the efficient performance of this therapeutic approach. In the concluding phase of the study, a synthetic pathway

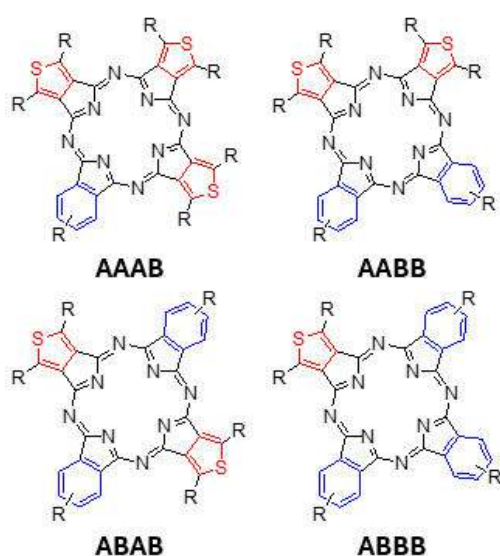
for the preparation of hemiphthalocyanines meeting the required characteristics was developed, thereby creating a foundation for their subsequent utilization in the synthesis of a final phthalocyanine-type derivative.

Key Words: phthalocyanines, hemiphthalocyanines, cancer diseases, biological assays

Úvod

V posledných desaťročiach dochádza k intenzívnemu zameraniu medicínskeho výskumu na vývoj inovatívnych terapeutických prístupov ako aj na zdokonaľovanie už existujúcich liečebných postupov v terapii nádorových ochorení, ktoré sa radia medzi jedny z najrozšírenejších zdravotných problémov súčasnej populácie [1]. Kládne za dôraz na využívanie neinvazívnych metód, ktorých cieľom je usmrcovanie chorých buniek za súčasného zachovania všetkých ostatných zdravých tkanív. K takýmto moderným metódam zaraďujeme jednoznačne nami skúmanú fotodynamickú terapiu (PDT), ktorej účinok je podmienený 2 špecifikami: prítomnosťou vhodného fotosenzibilátora (PS) a jeho schopnosťou absorpcie žiarenia vo viditeľnej prípadne blízkej infračervenej oblasti v rozmedzí ideálnych vlnových dĺžok 750-900 nm [2]. Primárnou podstatou PDT je vo všeobecnosti usmrcovanie postihnutých buniek pomocou rôznych reaktívnych foriem kyslíka (ROS) po prvotnom ožiení naakumulovaného fotosenzibilátora v takto infikovaných bunkách [3]. Preto pri využití tejto šetrnej liečby je veľmi podstatná samotná štruktúrna povaha PS úzko spojená s jeho vlastnosťami. V našej práci sa venujeme práve vývoju syntetického postupu prípravy PS na báze azamakrocyclických zlúčenín s dôrazom na štruktúru ftalokyanínov (Pc) prípadne ich prekurzorov s obsahom tiofénových jednotiek (**Obr.1**), ktoré podporujú požadovaný intramolekulový prenos náboja a tým prispievajú k zníženiu energetickej medzery

hraničných molekulových orbitálov označovaných ako HOMO-LUMO. Takéto zníženie energetickej medzery sa neskôr prejavuje výrazným batochrómny posunom v UV-Vis absorpčných spektrách. V prípade PS je tento jav mimoriadne významný, nakoľko umožňuje lepší prienik excitačného žiarenia do cieľových biologických tkanív a tým zvyšuje celkovú účinnosť fotodynamickej aktivity. Súčasne podporuje vznik stabilného tripletového excitovaného stavu, ktorý predstavuje dôležitý atribút pre efektívny prenos energie a tvorbu ROS s prevahou $O_2^{\bullet-}$ (superoxid anión radikálu) a HO^{\bullet} (hydroxylového radikálu) zabezpečujúcich finálny bunkový zánik [4,5].



Obr.1 Rôzne geometrické usporiadanie pre nami navrhnuté PS ftalokyanínového typu s obsahom tiofénového jadra; A: tiofén, B: benzén
Zdroj: [6]

1 Metódy a postupy

V syntetickej časti našej práce sme sa venovali vývoju a optimalizácii jednotlivých medzistupňov reakčnej schémy v prospech tvorby Pc so zabudovaným tiofénovým jadrom, pričom sme súčasne uplatňovali mechanizmus postupnej cyklizácie do finálnej podoby zlúčeniny ftalokyanínového typu [6] (**Schéma 1**). Pre overenie priebehov uskutočnených reakcií sme vykonávali tenkovrstvovú chromatografiu (TLC), izoláciu a čistenie pomocou preparatívnej stĺpcovej kolónovej chromatografie, na ktorú nadväzovalo konečné zistenie štruktúry pomocou jadrovej magnetickej rezonancie (NMR) spojené v prípade zlúčeniny **NM4** aj s meraním biologických testov pre jednoznačné zistenie schopnosti danej látky usmrcovať nádorové bunky.

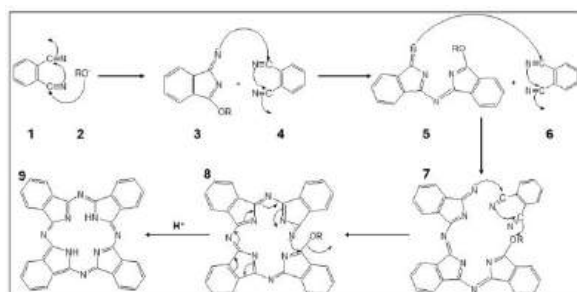


Schéma 1: Mechanizmus postupnej cyklizácie Pc
Zdroj: [6]

1.1 Syntéza Pc s tiofénovým kruhom

Ako už bolo spomenuté, tvorba Pc s požadovanými substituentami a tým aj vlastnosťami pozostávala zo sledu niekoľkých medzistupňových reakcií opierajúcich sa vo veľkej miere o mechanizmus postupnej cyklizácie.

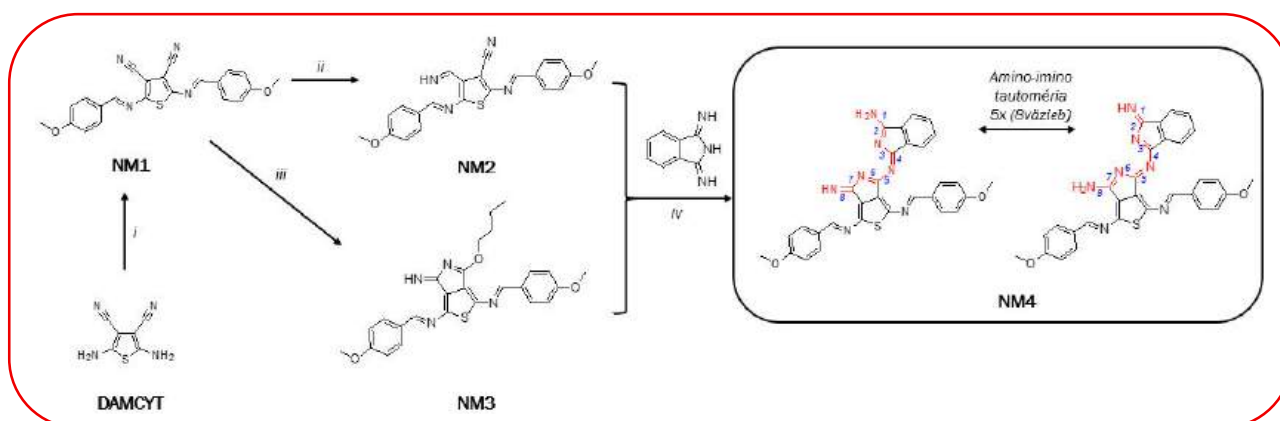


Schéma 2: Úplná syntéza hemifthalokyanínu **NM4** s obsahom tiofénového jadra metódou syntézy Pc.

Východiskovou látkou v 1. kroku syntézy označovanému pod pojmom Schiffova kondenzácia bola látka **DAMCYT** (2,5-diaminotiofén-3,4-dikyanonitril), ktorá reagovala s **anizaldehydom** za vzniku **NM1**. V ďalšej časti experimentu zreagovala látka **NM1** s BCl_3 za vzniku **NM2**. Nasledovala príprava **NM3** reakciou **NM1** s **DBU** (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-én). Oba vzniknuté produkty 2. a 3. syntetického kroku **NM2** a **NM3** sme v poslednej časti práce vedeli využiť pri tvorbe diméru **NM4**, ktorý sa vyskytoval v amino-imino tautomérskej forme, pričom obe zlúčeniny nebolo možné dostupnými metódami od seba adekvátne odseparovať.

Výsledný dimér **NM4** bol za účelom konečnej identifikácie poslaný na meranie NMR (^1H NMR) ako aj biologických testov.

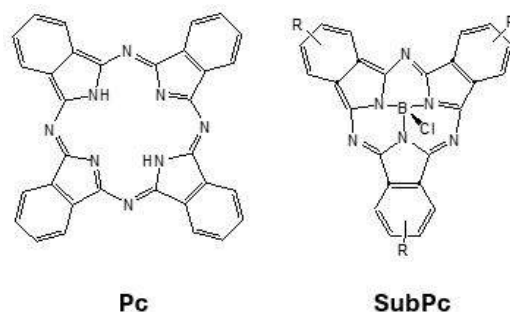
2 Výsledky a diskusia

Hlavným zameraním celej experimentálnej časti bol návrh syntézy Pc obsahujúceho tiofénové jadro spolu s požadovanými substituentami vhodnými pre ďalšie využitie takto pripravenej zlúčeniny na syntézu látky ftalokyanínovej štruktúry v podobe kompletného uzavretého makrocyklu. Nami navrhnutý postup bol zložený zo 4 syntetických krokov, pričom výnimkou boli kroky *ii* a *iii* nakoľko produkty oboch týchto krokov možno v rovnakej miere využiť v ďalšej časti postupu a teda ich vznik nebol podmienený existenciou 1 z nich. Môžeme teda povedať, že s využitím 2 syntetických krokov vznikali 2 nezávislé medziprodukty (**Schéma 2**).

Prvým krokom syntetickej časti bola v organickej chémii jediná kyslo katalyzovaná reakcia známa pod označením Schiffova kondenzácia, v ktorej reagovala látka **DAMCYT** s vybraným činidlom za vzniku **NM1**. Práve vďaka vhodne zvolenému substrátu spolu s výberom optimálnych reakčných podmienok sa nám podarilo získať zlúčeninu obsahujúcu vo svojej štruktúre tiofénové jadro a pre nás ešte dôležitejšiu dobrú polohu oboch prítomných kyano skupín, ktoré sú zásadné pre dodržanie mechanizmu postupnej cyklizácie pre potreby získania látok so štruktúrou kompletného Pc (**Schéma 1**). Ďalšou časťou experimentu bola syntéza látky **NM2**, pri ktorej reagoval produkt prvého kroku s BCl_3 , kedy bol očakávaný vznik subftalokyanínu (SubPc), keďže sme vychádzali z dostupných vedeckých štúdií zaoberajúcich sa touto problematikou [7,8] (**Obr. 2**). V nadväznosti na syntézu **NM2** sme pristúpili k 3. kroku a to reakcii **NM1** s **DBU** za vzniku **NM3**. V tomto prípade sme jednoznačne preukázali dodržanie mechanizmu postupnej cyklizácie, a teda očakávali vznik výsledného produktu so štruktúrou finálneho Pc (**Obr. 2**). Nami zvolenými podmienkami reakcie ako aj

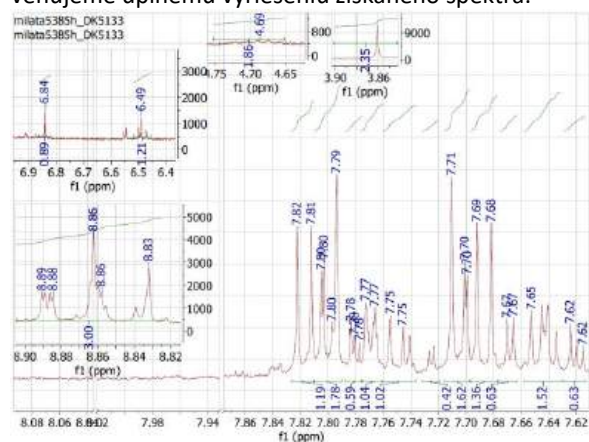
výberom činidla sa nám však podarilo získať len látku **NM3**, ktorá v spomenutom mechanizme reprezentuje zlúčeninu 3 (**Schéma 1**).

Finálnym krokom navrhnutého postupu bola syntéza látky **NM4**, ktorá pozostávala z reakcie **NM2** prípadne **NM3** s **izoindol-1,3-diimínom**, pričom sa nám podarilo získať zmes 2 látok v amino-imino tautomérskej forme. Pozitívom bol aj fakt, že samotný vznik tejto zmesi bol opäť podmienený mechanizmom cyklizácie, kedy získaná zmes látok **NM4** prislúchala zlúčenine 4 (**Schéma 1**). Rovnako ako pri 3. kroku aj v 4. sme očakávali vznik uceleného makrocyklu vo forme Pc, pričom výsledný produkt bol v našom prípade dimérom resp. hemiftalokyanínom.



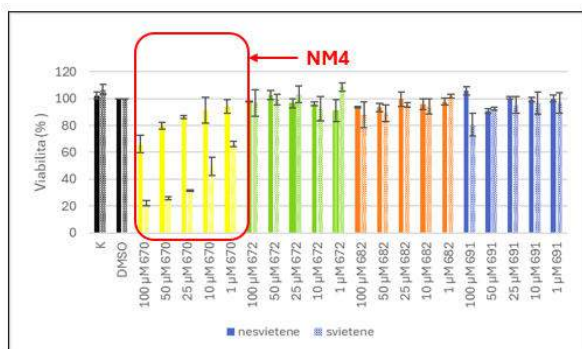
Obr. 2: Základná štruktúra Pc spolu so SubPc

Zisťovanie definitívnej štruktúry **NM4** bolo v ďalšej časti výskumu uskutočnené využitím ^1H NMR spektroskopie, kedy sme mali k dispozícii dáta z ^1H NMR meranej pre rovnakú zlúčeninu syntetizovanú v predchádzajúcich prácach mojej školiteľky (**Obr. 3**). Na základe porovnania oboch týchto spektier sme dospeli k záveru, že nami nasyntetizovaná zlúčenina predstavuje požadovanú látku **NM4**, avšak pre konečné dokázanie jej definitívnej štruktúry sa momentálne venujeme úplnému vyriešeniu získaného spektra.



Obr. 3: ^1H NMR spektrum látky **NM4**

Vzhľadom na predpokladané využitie nami syntetizovaných zlúčenín v terapii nádorových ochorení bola zlúčenina **NM4** podrobená biologickému testovaniu zameranému na hodnotenie cytotoxickej aktivity voči nádorovým bunkám. Experimentálne štúdie boli realizované na bunkovej línii ľudskej akútnej myeloidnej leukémie. Získané výsledky jednoznačne potvrdzujú, že zlúčenina **NM4** vykazuje spomedzi testovaných látok najvyššiu mieru cytotoxicity, pričom dosahuje približne 80% mortalitu malígnych buniek (**Obr. 4**). Uvedené zistenia predstavujú najkľúčovejší výsledok našich experimentálnych snáh, ktoré naznačujú, že pre cytotoxickú aktivitu mechanizmom PDT nie je nevyhnutná izolácia ftalokyanínov alebo ich kovom-koordinovaných zlúčenín, ale práve štruktúra so zachovaním vhodných optoelektrónových a fyzikálno-chemických vlastností s dôrazom na absorpciu žiarenia vo viditeľnej oblasti (pre fotopenetráciu do tkanív), fluorescenciu alebo inú formu emisie žiarenia (pre indukciu vzniku ROS). Tieto závery sú dôležité pre ďalšiu optimalizáciu štruktúry v prospech rozpustnosti, biokompatibility a neškodnosti PS voči zdravým tkanivám, čím sa aktuálne náš syntetický vývoj nových typov PS zaoberá.



Obr. 4: Výsledný graf biologických testov meranej látky **NM4**

Záver

Cieľom celého výskumu bolo navrhnúť syntetickú stratégiu vedúcu k tvorbe Pc v podobe kompletného makrociklu s požadovanými optoelektrónovými vlastnosťami a súčasou schopnosťou účinne likvidovať malígne bunky. V priebehu štúdia sme realizovali sériu reakcií, ktorých výsledkom boli ako medziprodukty, tak aj finálny produkt **NM4**. Tento derivát preukázal v biologických testoch cytotoxicity významnú aktivitu s hodnotou mortality približne 80%. Na základe získaných dát je možné s istotou predpokladať, že **NM4** predstavuje vhodný prekurzor pre nasledujúce syntetické kroky vedúce k získaniu kompletného Pc

využiteľného v skúmanej fotodynamickej terapii.

PodĎakovanie

Celá práca vznikla vďaka podpore grantu **KEGA:009UCM-4/2024**. (Inovácia vzdelávacieho procesu na bakalárskom a magisterskom študijnom programe Biomedicínska chémia) a projektu **WATCH, NFP401101C229** (Spoločnosť v zrkadle vody). Osobitné poďakovanie patrí mojej školiteľke docentke Zite Tokárovej za jej mimoriadnu odbornú pomoc a cenné rady pri príprave celého článku.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] HAK, Arshadul; RAVASAHEB SHINDE, Vinod a RENGAN, Aravind Kumar. A review of advanced nanoformulations in phototherapy for cancer therapeutics. Online. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2021, vol. 33, s. 102205. ISSN 1572-1000. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102205>.
- [2] XING, Peipei; WU, Xinyue a ZHU, Mengliang. Molecular design and excited state dynamics regulation in phototheranostics. Online. *Biophysics Reports*. 2025, roč. 11, č. 5, s. 315. ISSN 2364-3439. Dostupné z: <https://doi.org/10.52601/bpr.2025.250004>.
- [3] ZHENG, B., YE, J., kol. 2021. Recent advances in supramolecular activatable phthalocyanine-based photosensitizers for anti-cancer therapy. In *Coordination Chemistry Reviews*. [online]. 2021, roč. 447. ISSN 00108545. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214155>.
- [4] FLAMMINI, Soraia; DI SANTE, Manuele; COSTANTINI, Paolo Emidio; MATTIOLI, Edoardo Jun; MARCONI, Alessia et al. Oligothiophene-based photosensitizers with tunable push-pull architectures: design, synthesis and characterization. Online. *Journal of Materials Chemistry B*. 2025, vol. 13, no. 39, s. 12536-12545. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d5tb01076d>.
- [5] KENDROVÁ, D., kol. 2025. Influence of the Isosteric Exchange of Benzene by Thiophene-Core of Phthalocyanine: The Synthesis, Structure and Opto-Electronic Behavior of π -Conjugated Unit Blocks in

Materials. In *Journal of Heterocyclic Chemistry*. [online]. 2025, roč. 62, č. 1, s. 13-24. ISSN 0022-152X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jhet.4921>.

- [6] MÁLIKOVÁ, N., 2025. *Nové metódy syntézy fotoaktívnych ftalokyanínov s aplikačným potenciálom vo fotodynamickej terapii*: bakalárska práca. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 64 s.
- [7] CLAESSENS, Christian G.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, David; RODRÍGUEZ-MORGADE, M. Salomé; MEDINA, Anaïs a TORRES, Tomás. Subphthalocyanines, Subporphyrazines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems. Online. *Chemical Reviews*. 2013, vol. 114, no. 4, s. 2192-2277. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr400088w>.
- [8] CLAESSENS, Christian G.; TORRES, Tomás; TORRE, Gema de la. 2000. Phthalocyanines: The Need for Selective Synthetic Approaches. In *European Journal of Organic Chemistry*. roč. 2000, č. 16, s. 2821-2830. Dostupné z: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-0690%28200008%292000%3A16%3C2821%3A%3A%3AID-EJOC2821%3E3.0.CO%3B2-2>

Syntéza a charakterizácia nových solubilizovaných N-heterocyklov s potenciálnym využitím vo fotodynamickej terapii

Synthesis and characterisation of novel solubilised N-heterocycles with potential use in photodynamic therapy

Alex Ondruška¹ – Dušan Bortňák²

^{1,2}Oddelenie organickej chémie, FCHPT STU, Radlinského 9, 811 07 Bratislava

¹xondruskaa@stuba.sk, ² dusan.bortnak@stuba.sk

Abstrakt

Hlavným cieľom predkladanej práce je návrh a syntéza nových N-heterocyklických zlúčenín s potenciálnym využitím vo fotodynamickej terapii (PDT) s dôrazom na prekonanie nízkej rozpustnosti tradičných organických farbív vo vodnom prostredí. Výskum sa primárne zameriava na deriváty bór-dipyrrrometénu (BODIPY) a koordinačné zlúčeniny dipyrrrometénových ligandov s centrálnymi atómami medi a zinku. Na prekonanie limitujúcej hydrofobicity bola zvolená inovatívna syntetická stratégia vychádzajúca priamo zo solubilizovaných prekursorov, čím sa zásadne uľahčuje potenciálny transport látok v organizme pri uvažovanej intravenózne administrácii. Štruktúra, čistota a spektroskopické vlastnosti celej knižnice novopripravených látok boli jednoznačne potvrdené pomocou analytických metód (NMR, UV-Vis a IR spektroskopie). Biologické *in-vitro* testovanie preukázalo, že dve zosyntetizované látky, ktoré neboli doposiaľ v literatúre popísané (konkrétne látky **8b** a **9b**) vykazujú významnú cytotoxickú aktivitu voči viacerým myším bunkovým líniam. Dosažené výsledky potvrdzujú, že racionálny dizajn solubilizovaných N-heterocyklov a ich komplexov predstavuje efektívnu stratégiu pre vývoj nových antineoplastík.

Kľúčové slová: fotodynamická terapia, fotosenzibilizátor, solubilizácia, BODIPY, cytotoxicita

Abstract

The main objective of the presented work is the design and synthesis of novel N-heterocyclic compounds with potential application in photodynamic therapy (PDT), with an emphasis on overcoming the low aqueous solubility of traditional organic dyes. The research primarily focuses on boron-dipyrrromethene (BODIPY) derivatives and coordination compounds of dipyrrromethene ligands with central copper and zinc atoms. To overcome the limiting hydrophobicity, an innovative synthetic strategy starting directly from solubilized precursors was chosen, which fundamentally facilitates the potential transport of these substances in the organism during the considered intravenous administration. The structure, purity, and spectroscopic

properties of the entire library of newly prepared compounds were unambiguously confirmed using analytical methods (NMR, UV-Vis, and IR spectroscopy). Biological *in-vitro* testing demonstrated that two of the synthesized compounds, which have not been previously described in the literature (specifically compounds **8b** and **9b**), exhibit significant cytotoxic activity against multiple mouse cell lines. The obtained results confirm that the rational design of solubilized N-heterocycles and their complexes represents an effective strategy for the development of novel antineoplastic agents.

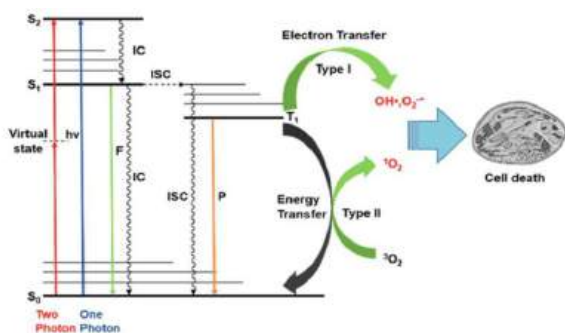
Key Words: photodynamic therapy, photosensitizer, solubilisation, BODIPY, cytotoxicity

Úvod

Liečba nádorových ochorení predstavuje jednu z najväčších výziev súčasnej medicíny. Hoci konvenčné metódy liečby, akými sú chirurgický zákrok, chemoterapia a rádioterapia, zaznamenali významný pokrok, často sú sprevádzané závažnými vedľajšími účinkami a toxicitou voči zdravým bunkám tkanív. V tomto kontexte predstavuje fotodynamická terapia (PDT) inovatívny a moderný prístup. Predstavuje veľmi sľubnú alternatívu najmä vďaka svojej neinvazívnej povahe, vysokej miere vyliečenia a minimálnym vedľajším účinkom na organizmus pacienta. [2]

Základný princíp fotodynamickej terapie je postavený na súčasnom pôsobení troch kľúčových zložiek: svetla vhodnej vlnovej dĺžky, tkanivového molekulového kyslíka a svetlom aktivovanej chemickej látky – fotosenzibilizátora. Samotný fotosenzibilizátor v základnom stave vykazuje len nižšiu toxicitu. Po ožiarení svetlom vhodnej vlnovej dĺžky však dokáže produkovať aktívne formy kyslíka (ROS), ktoré sú zodpovedné za hlavnú cytotoxickú aktivitu fotosenzibilizátora v PDT. Mechanizmus účinku fotosenzibilizátora po ožiarení možno popísať pomocou Jablonského diagramu (Obrázok 1). Po absorpcii kvanta svetelného žiarenia prechádza molekula fotosenzibilizátora zo základného singletového stavu S_0 do excitovaného singletového stavu S_2 . Odtiaľ môže relaxovať do základného stavu S_0 vyžiarovaním fluorescenčného

žiarenia alebo sa prostredníctvom medzisystémového priechodu (ISC) dostáva do excitovaného tripletového stavu (T_1), ktorý má dlhšiu dobu života. V tomto stave molekula fotosenzibilizátora interaguje s molekulami okolitého molekulového kyslíka, čím generuje vysoko reaktívne formy kyslíka (ROS). Generovanie ROS môže prebiehať dvomi rôznymi mechanizmami. Reakcia typu I: Dochádza ku prenosu elektrónu z tripletového excitovaného stavu na biomolekulu, v dôsledku čoho vznikajú radikály, ako je superoxidový anión alebo hydroxylový radikál. Reakcia typu II: Dochádza ku prenosu energie z tripletového excitovaného stavu priamo na molekulový kyslík, v dôsledku čoho vzniká vysoko reaktívny singletový kyslík. Práve singletový kyslík sa považuje za hlavnú cytotoxicky aktívnu časticu vo väčšine PDT aplikácii. Tieto reaktívne častice následne lokálne spôsobujú masívne oxidačné poškodenie proteínov, lipidov a bunkových organel, čo nevyhnutne vedie k apoptóze alebo nekróze nádorového tkaniva. [3]



Obr.1 Jablonského diagram
Zdroj [2]

Napriek obrovskému potenciálu PDT je jej rozsiahlejšie klinické využitie často limitované fyzikálno-chemickými vlastnosťami doposiaľ dostupných fotosenzibilizátorov. Významným problémom mnohých tradičných organických farbív je ich vysoká hydrofobita. Nedostatočná rozpustnosť vo vodnom prostredí vedie k agregácii molekúl a predstavuje vážnu prekážku pri transporte látky v organizme, čo zásadne komplikuje jej intravenóznú administráciu a distribúciu k cieľovým bunkám. Z tohto dôvodu sa naša práca zameriava na dizajn a syntézu nových, vo vode rozpustných fotosenzibilizátorov na báze N-heterocyklických zlúčenín s potenciálnym využitím v PDT. Významnou skupinou látok, ktorú v práci študujeme, sú deriváty bór-dipyrrrometénu (BODIPY) [4] a príslušné komplexy s prechodnými kovmi. [5] BODIPY farbivá sú mimoriadne atraktívnymi kandidátmi vďaka ich vysokej fotostabilite a schopnosti fluorescencie. Aby sme definitívne prekonali problém s hydrofobitou, zvolili sme syntetickú stratégiu, pri ktorej vychádzame priamo zo solubilizovaných prekursorov. Tento inovatívny prístup zabezpečuje výrazné zvýšenie rozpustnosti produktov vo vodnom

prostredí, čím sa otvára cesta k ich budúcemu úspešnému biologickému testovaniu a potenciálnemu využitiu v klinickej praxi.

1 Experimentálna časť

Zvýšenie rozpustnosti syntetizovaných zlúčenín sa dosiahne solubilizáciou, teda cieľovým zavedením polárnych funkčných skupín do molekuly N-heterocyklu. Týmto spôsobom sa získajú aj solubilizované prekursory.

1.1 Solubilizácia aromatických hydroxyderivátov

V prípade hydroxylzlučenín **1** sa solubilizované prekursory získavali dvojstupňovou syntetickou sekvenciou. (Schéma 1) V prvom kroku prebiehala monosubstitúcia hydroxyskupiny dibrometánom, čím vznikal príslušný monobromderivát **2**. Reakcia sa realizovala v acetonitrile pri teplote refluxu počas 24 hodín, pričom sa využil 5-násobný molárny nadbytok dibrometánu a uhličitanu draselného. V druhom kroku bol pripravený monobromderivát **2** transformovaný na sodnú soľ kyseliny sírovej **3**. Tento krok sa uskutočnil reakciou s bezvodým siričitanom sodným za katalýzy medeným práškom (5 mol. %) v zmesi rozpúšťadiel etanol a voda v pomere 5:1. Reakčná zmes sa refluxovala 24 hodín.

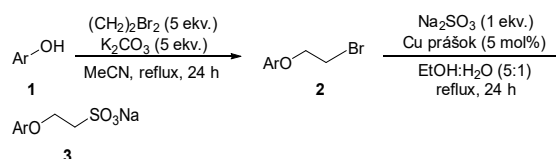


Schéma 1: Solubilizácia aromatických hydroxyderivátov

V tabuľke 1 uvádzame zoznam všetkých východiskových aromatických hydroxyderivátov, ktoré sme podrobili popísanej dvojstupňovej solubilizácii ako aj výťažky dosiahnuté v jednotlivých krokoch.

Ar-OH	Výťažok (%)		Ar-OH	Výťažok (%)	
	I. Stupň	II. Stupň		I. Stupň	II. Stupň
	91	89		51	77
	55	31		59	-
	70	69		67	89

Tabuľka 1: Solubilizácia aromatických hydroxyderivátov

1.2 Solubilizácia aromatických amínov

Aromatické amíny **4** sa solubilizujú vytvorením N-glykozidu **5** s polárnou molekulou komerčne dostupného monosacharidu. (Schéma 2) V našom prípade sa ako solubilizačné sacharidy použili glukóza, manóza a galaktóza. Reakcia prebiehala v metanole pri teplote refluxu v prítomnosti síranu amónneho a hydrogenuhličitanu sodného.

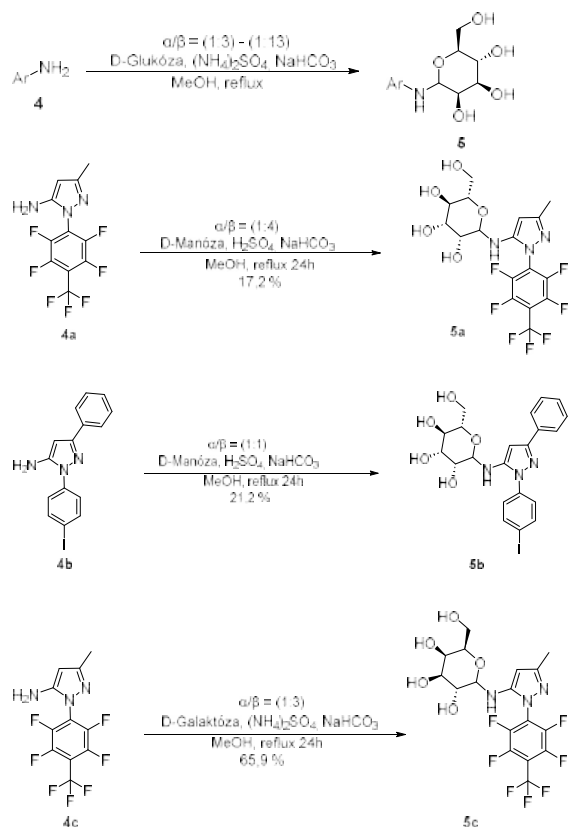


Schéma 2: Solubilizácia aromatických aminorov

Výsledky solubilizačnej stratégie aplikovanej na vybranú skupinu aromatických aminorov sú detailne sumarizované v Tabuľke 2. Táto tabuľka okrem samotných východiskových štruktúr prezentuje aj finálne izolované výťažky reakcií, pri ktorých bola ako polárna sacharidová zložka na tvorbu N-glykozidu **5** využitá D-glukóza.

Ar-NH ₂	Výťažok (%)	Ar-NH ₂	Výťažok (%)
	29		23
	26		19
	18		36
	24		21

Tabuľka 2: Syntéza vybraných N-glykozidov

1.3 BODIPY farbivá

Prvá významná skupina látok na ktorú sa náš výskum zameriava ako na potenciálne fotosenzibilizátory sú deriváty BODIPY (bór-dipyrometény). BODIPY

farbivá sú atraktívnymi kandidátmi pre fotosenzibilizátory vďaka ich vysokej fotostabilite a schopnosti fluorescencie. Syntéza sa realizuje ako trojkroková one-pot reakcia, ktorá v prvom kroku kyslou kondenzáciou solubilizovaného aldehydu **6** s pyrrolom poskytuje dipyrometán **7**. Ten je následne priamo v reakčnej zmesi oxidovaný pomocou DDQ na dipyrometén a finálnou komplexáciou s éterátom fluoridu boritého za prítomnosti trietylamínu ako bázy sa získa cieľové BODIPY farbivo **8**. (Schéma 3)

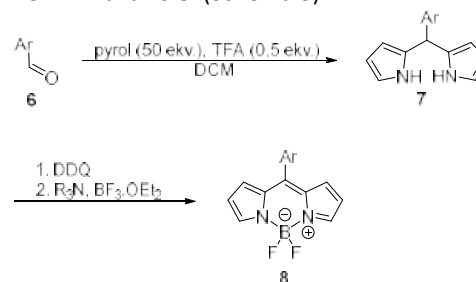


Schéma 3 Syntéza BODIPY derivátov

Výsledky tejto syntetickej metódy prehľadne sumarizuje tabuľka 3, v ktorej sú uvedené konkrétne východiskové aldehydy **6** a finálne výťažky pripravených BODIPY derivátov **8**.

Ar-CHO	Výťažok (%)	Ar-CHO	Výťažok (%)
	26		34
	15		7

Tabuľka 3: Syntéza BODIPY derivátov

1.4 Komplexy prechodných kovov

Ďalšou významnou skupinou potenciálnych fotosenzibilizátorov, ktorej sme sa v predkladanej práci venovali, sú komplexy N-heterocyclických ligandov s prechodnými kovmi. Zaradenie tejto skupiny zlúčenín do nášho výskumu vychádza z dôležitého farmakokinetického predpokladu. Hoci deriváty BODIPY **8** vykazujú vynikajúce fotofyzikálne vlastnosti, ich potenciálnou nevýhodou z hľadiska bunkového príjmu môže byť ich náboj. Keďže ide o nabitú časticu, ich transport pasívnou difúziou cez hydrofóbnu fosfolipidovú dvojvrstvu bunkových membrán môže byť do značnej miery limitovaný. S cieľom prekonať túto bariéru sme navrhli štruktúry so zabudovaným centrálnym atómom prechodného kovu. Tento racionálny dizajn stavia na predpoklade, že prítomnosť kovu v štruktúre umožní komplexom prechádzať cez bunkovú membránu alternatívnou cestou, a to s využitím endogénnych metalotransportérov. Tento mechanizmus uľahčeného či aktívneho transportu je v bunkách prirodzene prítomný a úspešne sa uplatňuje aj pri iných, už v minulosti testovaných metaloterapeutikách.

Ich syntéza sa realizuje analogicky k príprave BODIPY farbív **8**. V prvom kroku dochádza ku kyslo katalyzovanej kondenzácii aromatického aldehydu **6** s pyrrolom za vzniku dipyrometánu, ktorý je v druhom kroku oxidovaný pomocou DDQ, čím vzniká dipyrometénový ligand. V treťom kroku sa na komplexáciu využíva octan príslušného prechodného kovu, čím vzniká komplex **9**. (Schéma 3) Konkrétne sme sa v tejto časti zamerali na syntézu a charakterizáciu komplexov s centrálnym atómom medi a zinku, pretože v literatúre už boli popísané fotosenzibilizátory na báze komplexov s centrálnymi atómami medi a zinku. Navyše zinok má výhodu, že ide o diamagnetický atóm a teda môže byť sledovaný pomocou NMR.

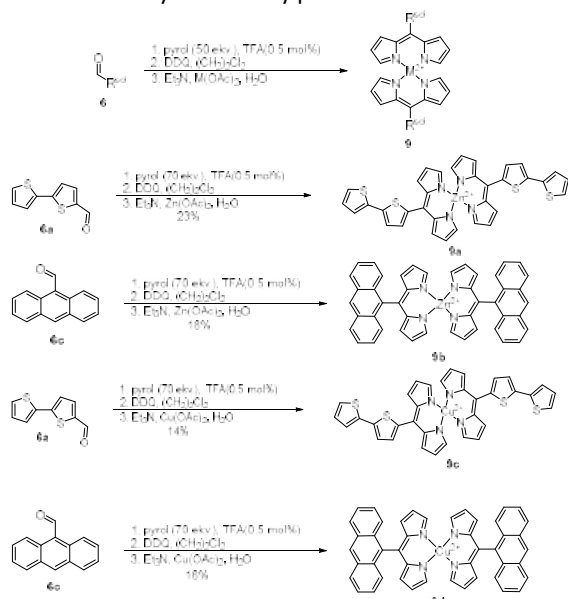


Schéma 3 Syntéza komplexov prechodných kovov

2 Výsledky a diskusia

V rámci experimentálnej časti bola úspešne navrhnutá, pripravená a charakterizovaná početná knižnica doposiaľ nepublikovaných N-heterocyklických zlúčenín, ktoré sú vzhľadom na ich štruktúru potenciálne bioaktívne a sú sľubnými kandidátmi pre použitie v PDT ako fotosenzibilizátory pre ich schopnosť absorbovať elektromagnetické žiarenie najmä vo viditeľnej oblasti spektra. Kľúčovým krokom a prvým dosiahnutým výsledkom bolo úspešné nájdenie reakčných podmienok pre solubilizáciu nepolárnych organických farbív zavedením polárnej funkčnej skupiny, čím sa podarilo vyriešiť problém ich silnej hydrofobicity a nízkej rozpustnosti vo vodnom prostredí. Účinnosť tejto stratégie potvrdili vizuálne skúšky rozpustnosti: cieľené zavedenie polárnych skupín viedlo k úplnému rozpusteniu látok vo vode za vzniku čírych roztokov. Týmto sa výrazne uľahčí potenciálny transport týchto látok do organizmu pri uvažovanej intravenózne administrácii. S využitím týchto solubilizovaných prekurzorov sa následne

úspešne zosyntetizovali samotné cieľové fotosenzibilizátory. Bola pripravená séria derivátov BODIPY pomocou trojkrokovej one-pot reakcie. Rovnako úspešne bola pripravená aj druhá dôležitá skupina látok, a to koordinačné zlúčeniny dipyrometénových ligandov s centrálnymi atómami medi a zinku. Vysoká modularita navrhnutých syntetických prístupov umožní v budúcnosti plynulú prípravu veľkého množstva nových zlúčenín. Štruktúra a čistota každej jednej novozosyntetizovanej látky z pripravenej knižnice bola jednoznačne potvrdená a charakterizovaná pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie. V prípade komplexných zlúčenín sa potvrdila výhoda použitia diamagnetického zinku, ktorý umožnil priame a bezproblémové sledovanie štruktúry komplexov touto spektroskopickou metódou. Ďalej boli vzorky všetkých zosyntetizovaných látok poskytnuté na in-vitro testovanie biologickej aktivity v rámci medziodborovej spolupráce. Skrining sa zameriaval na interakciu zlúčenín s vybranými bunkovými líniami rakoviny. Vzhľadom na prebiehajúci charakter výskumu a plánované publikovanie ucelených výsledkov v medzinárodnom karentovanom časopise, zatiaľ zámerné neuvádzame detailné metodiky syntéz, spektrálne charakteristiky, ani presné parametre biologického testovania.

3 Záver

V predkladanej práci sme úspešne navrhli a realizovali syntézu početnej knižnice nových, v literatúre doposiaľ nepopísaných N-heterocyklických zlúčenín a ich komplexov s prechodnými kovmi. Hlavným prínosom tejto časti výskumu je úspešné prekonanie limitujúcej hydrofobicity tradičných organických farbív, ktorá často bráni ich širšiemu klinickému využitiu. Využitím inovatívnej stratégie cieľeného zavádzania polárnych skupín sa nám podarilo pripraviť látky s výrazne zvýšenou rozpustnosťou vo vodnom prostredí. Tento krok je kľúčový pre zabezpečenie ich optimálnej biodostupnosti a bezproblémového transportu v organizme pri uvažovanej intravenózne administrácii. Molekulová štruktúra, ako aj čistota všetkých zosyntetizovaných finálnych produktov bola jednoznačne potvrdená metódami nukleárnej magnetickej rezonancie. Predbežné výsledky biologických in-vitro testov sa ukazujú byť mimoriadne perspektívne. Významným mýlnikom predkladaného výskumu je zistenie, že konkrétne u dvoch pripravených zlúčenín, menovite **8b** a **9b**, bola už preukázaná signifikantná cytotoxická aktivita voči bunkovým líniam **AML12**, reprezentujúcim bežne používaný model myšíc pečenej buniek a **L1210**, reprezentujúcim myšacie leukemické bunky. Tieto zistenia jasne potvrdzujú, že racionálny dizajn nových solubilizovaných N-heterocyklov a ich koordinačných zlúčenín predstavuje funkčnú a efektívnu stratégiu. Dosiahnuté výsledky tak nielenže prispievajú k základnému výskumu v oblasti

medicínskej chémie a chémie liečiv, ale otvárajú aj nové možnosti pre vývoj nových progresívnych antineoplastík [6] cielených na zefektívnenie liečby onkologických ochorení prostredníctvom PDT.

PodĎakovanie

V prvom rade by som chcel poďakovať môjmu školiteľovi Ing. Dušanovi Bortňákovi, PhD. Za odborné vedenie, trpezlivosť a cenné rady v procese realizácie výskumu.

Táto práca bola vypracovaná s podporou projektu VEGA 1/0385/25.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C. and GOLAB, J., (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, no. 4, pp. 250-281. ISSN 1542-4863.
- [2] PHAM, T. C.; NGUYEN, V. N.; CHOI, Y.; LEE, S. and YOON, J., (2021). Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, vol. 121, no. 21, pp. 13454-13619. ISSN 1520-6890.
- [3] HALLIWELL, B., (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 32, no. 3, pp. 125-130. ISSN 0165-6147.
- [4] ZOU, J.; YIN, Z.; DING, K.; TANG, Q.; LI, J.; SI, W.; SHAO, J.; ZHANG, Q.; HUANG, W. and DONG, X., (2017). BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 38, pp. 32475-32481. ISSN 1944-8244.
- [5] MCKENZIE, Luke; BRYANT, Helen and WEINSTEIN, Julia, (2018). Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 379, pp. 2-29. ISSN 0010-8545.
- [6] SOFRANKOVA, L.; SPALDOVA, J.; STEFIK, P.; PAVILEK, B.; BORTNAK, D.; PAVLIKOVA, L.; ZIDEKOVA, I.; VEGH, D.; MILATA, V.; BREIER, A. and SULOVA, Z., (2025). P-glycoprotein-independent cytotoxic effects of 5-aminopyrazole in L1210 leukemia cells. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, vol. 13, pp. 100145. ISSN 2772-4174.

Sorpčná separácia Li z nízkoobsahových roztokov pomocou prírodných materiálov

Sorption separation of Li from low-concentration solutions using natural materials

Viktória Pócssová¹ – Lenka Vavrinčová² – Vanda Adamcová³ – Martin Valica⁴ –
Monika Šutáková⁵ – Miroslav Horník⁶

^{1,2,3,4,5,6}Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2,
917 01 Trnava

¹pocsova1@ucm.sk, ²vavrincova4@ucm.sk, ³vanda.adamcova@ucm.sk, ⁴martin.valica@ucm.sk,
⁵monika.bardacova@ucm.sk, ⁶hornik@ucm.sk

Abstrakt

Cieľom práce bolo zhodnotiť potenciál rôznych prírodných materiálov pri sorpčnej separácii Li z modelových, nízkoobsahových roztokov. Medzi testovanými materiálmi boli: bentonit, klinoptilolit o dvoch frakciách (< 200 µm a 500 – 1 000 µm), metabentonit kalcinačne pripravený pri 700 °C a 800 °C, a práškové geopolyméry pripravené zmiešaním metakaolínu alebo metabentonitu s NaOH ako aktivátorom (10 %-hmot. a 20 %-hmot.). Najvyššie hodnoty účinnosti sorpcie Li, 76,1 % a 71,5 %, sa zistili pri geopolyméroch pripravených na báze metakaolínu (GK700-10), resp. metabentonitu (GB700-10), ktoré sa pripravili pri 700 °C a 10 %-hmot. NaOH. V rámci experimentov hodnotiacich vplyv aplikovanej koncentrácie sorbentu na sorpčnú separáciu Li sme pri geopolyméroch GK700-10 a GB700-10 dosiahli sorpčné kapacity na úrovni 0,3 – 1,4 mg/g, resp. 0,2 – 1,0 mg/g. Taktiež sme zistili, že účinnosť sorpcie Li stúpala nelineárne so zvyšujúcou sa koncentráciou sorbentu v rozmedzí 2 až 32 g/dm³, ale sorpčná kapacita klesala exponenciálne v tomto porovnaní.

Kľúčové slová: lítium, sorpčná separácia, klinoptilolit, bentonit, kaolín

Abstract

The aim of the work was to evaluate the potential of various natural materials for the sorption separation of Li from model, low-concentration solutions. The materials tested included: bentonite, clinoptilolite of two fractions (< 200 µm and 500 – 1,000 µm), metabentonite calcined at 700 °C and 800 °C, and powdered geopolymers prepared by mixing metakaolin or metabentonite with NaOH as an activator (10 % by weight and 20 % by weight). The highest Li sorption efficiencies, 76.1 % and 71.5 %, were observed for geopolymers prepared from

metakaolin (GK700-10) and metabentonite (GB700-10), respectively, which were synthesized at 700 °C and 10 wt% NaOH. In experiments evaluating the effect of the applied sorbent concentration on Li sorption separation, we achieved sorption capacities of 0.3 – 1.4 mg/g and 0.2 – 1.0 mg/g for geopolymers GK700-10 and GB700-10, respectively. We also found that the Li sorption efficiency increased nonlinearly with increasing sorbent concentration in the range of 2 to 32 g/dm³, but the sorption capacity decreased exponentially in this comparison.

Key Words: lithium, sorption separation, clinoptilolite, bentonite, kaolin

1 Úvod

Lítium (Li) v súčasnosti predstavuje kľúčovú surovinu, a to najmä vďaka svojej vysokej mernej tepelnej kapacite a elektrochemickej aktivite, čo má za následok, že tento prvok sa široko používa v energetických, hutníckych, chemických, leteckých a iných odvetviach priemyslu [1]. V kľúčovom období transformácie energetiky vzbudil veľkú pozornosť vývoj lítium-iónových batérií, ktoré sa široko uplatňujú v elektromobilovom priemysle, elektronike, ako aj pri skladovaní energie z obnoviteľných zdrojov [2]. Každoročne sa na ich výrobu využíva približne 87 % dodávaného Li [3]. Zároveň dopyt po Li neustále stúpa, keďže elektromobilita sa stala nielen v Európe nástrojom na znižovanie emisií CO₂. Medzinárodná energetická agentúra (International Energy Agency) predpokladá, že spotreba Li dosiahne do roku 2030 úroveň 5 miliónov ton, čo predstavuje 15-násobný nárast oproti roku 2020 [4]. Globálne zásoby tohto prvku však zostávajú rovnaké, preto Komisia Európskeho parlamentu už v roku 2020 klasifikovala Li ako kritickú surovinu [5].

Li v prírode nie je možné nájsť v čistej chemickej

forme, a to z dôvodu jeho vysokej reaktivity. V prírode sa zásoby Li nachádzajú prevažne v rudách (napr. v podobe minerálov lepidolit a spodumen) a soľných jazerách, pričom soľné jazerá tvoria približne 60 % celosvetových zdrojov Li vďaka svojim obrovským zásobám [6]. Ďalšími kvapalnými zdrojmi Li sú morská voda a geotermálne vody. Napriek tomu, že soľné jazerá predstavujú najvýznamnejší a najdostupnejší zdroj Li, prítomnosť vysokých koncentrácií interferujúcich iónov, najmä horčíka (Mg) predstavuje pri získavaní Li značný problém [7]. Hoci celkové množstvo Li v morskej vode je značné, jeho relatívny výskyt je pomerne nízky, zvyčajne okolo 0,1 – 0,2 mg/dm³ [8]. Naproti tomu, geotermálne vody bývajú relatívne bohatšie na Li (20 – 50 mg/dm³), čo z nich robí sľubný a environmentálne akceptovateľný zdroj pre získavanie Li. Navyše, v porovnaní so slanými jazerami sa v tomto zdroji vyskytujú nižšie koncentrácie interferujúcich iónov [9, 10].

Bežný spôsob získavania Li zo soľných jazier predstavuje metóda odparovania v odparovacích nádržiach a následné zakoncentrovanie Li⁺ iónov postupným odparovaním vody (výťažnosť býva menej ako 60 %) [11]. Avšak, v posledných rokoch sa čoraz viac presadzujú metódy extrakcie Li zo slaných jazier a iných nízkoobsahových kvapalných zdrojov (napr. geotermálnych vôd) zahŕňajúce adsorpciu [12], elektrochemické procesy [13], membránovú separáciu [14], precipitáciu alebo extrakciu rozpúšťadlom [15, 16], ktoré umožňujú dosiahnuť vyššiu výťažnosť (okolo až 80 %), skrátiť čas spracovania, ako aj minimalizovať negatívne environmentálne dopady [11, 17].

Z vyššie uvedených metód má najväčšie technické a prevádzkové výhody práve adsorpcia. Je relatívne finančne výhodná, nemá obmedzenú chemickú odolnosť ako membránové procesy (upchávanie membrán), nemá obmedzenú selektivitu a aplikovateľnosť v priemyselnom meradle v porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom, ani významné energetické požiadavky ako elektrochemické techniky [17]. Je to univerzálna metóda, najmä pre kvapalné zdroje s nízkym obsahom Li a vysokým pomerom Mg a vápnika (Ca). Technológia extrakcie Li adsorpčnou metódou zahŕňa kyslé premývanie sorbentu obsahujúceho Li, nahradenie Li v ňom a opätovné získanie daného sorbentu [2]. Avšak, efektívnosť tejto metódy výrazne závisí od použitého typu sorbentu [18]. Selektivita sorbentov je kľúčovou charakteristikou k uplatneniu adsorpcie pri extrakcii Li z kvapalných zdrojov [10].

Cieľom práce bolo zhodnotiť potenciál rôznych typov prírodných materiálov, najmä slovenskej proveniencie, pri sorpčnej separácii Li z modelových,

nízkoobsahových roztokov. Taktiež sme sa zamerali na štúdium vplyvu množstva sorbentu na proces sorpcie Li, a to pri sorbente vykazujúcom najvyššiu sorpčnú efektívnosť, resp. sorpčnú kapacitu v zmysle separácie Li z vodných roztokov.

2 Materiál a metódy

2.1 Prírodné materiály a roztoky

Pre hodnotenie sorpčnej separácie Li prírodnými materiálmi sa obstaralo a pripravilo 11 vzoriek sorbentov vychádzajúcich z prírodných materiálov, najmä slovenskej proveniencie. Konkrétne išlo o sorbenty s pracovným označením: K500 – klinoptilolit o frakcii častíc 500 – 1 000 μm; K200 – klinoptilolit o frakcii častíc < 200 μm; bentonit – bentonit s komerčným označením P 030; MB700 a MB800 – metabentonit pripravený kalcináciou pri teplote 700 °C, resp. 800 °C; GB700-10 a GB700-20 – práškový geopolymér pripravený z MB700 a alkalicky aktivovaný prídavkom 10 %-hmot. NaOH, resp. 20 %-hmot. NaOH; GB800-10 a GB800-20 – práškový geopolymér pripravený z MB800 a alkalicky aktivovaný prídavkom 10 %-hmot. NaOH, resp. 20 %-hmot. NaOH; GK700-10 a GK700-20 – práškový geopolymér pripravený z metakaolínu (kalcinácia pri 700 °C) a alkalicky aktivovaný prídavkom 10 %-hmot. NaOH, resp. 20 %-hmot. NaOH.

Klinoptilolit o dvoch frakciách (500 – 1 000 μm a < 200 μm) sa získal zo spoločnosti ZEOCEM s.r.o. (Slovenská republika), pričom pochádzal z ich ťažobného lomu umiestneného v lokalite Nižný Hrabovec (Slovenská republika).

Pri príprave metakaolínu, metabentonitu a ich geopolymérov sa ako primárne materiály použili kaolín OT 76 (Sedlecký kaolín, a.s., Božičany, Česká republika) a bentonit P 030 (ENVIGEO, a.s., Banská Bystrica, Slovenská republika). Zastúpenie oxidov v týchto primárnych surovinách bolo nasledovné (v %-hmot.): Kaolín OT 76: SiO₂ – 45,80 %; Al₂O₃ – 37,31 %; CaO – 0,58 %; Fe₂O₃ – 0,98 %; MgO – 0,46 %; K₂O – 1,17 %; Na₂O – 0,58 %; TiO₂ – 0,17 %; Bentonit P 030: SiO₂ – 71,10 %; Al₂O₃ – 9,94 %; CaO – 3,46 %; Fe₂O₃ – 2,33 %; MgO – 1,65 %; K₂O – 0,00 %; Na₂O – 0,00 %; TiO₂ – 0,00 %. Kalcinačný proces vedúci k tvorbe metakaolínu a metabentonitu sa realizoval pri teplote 700 °C alebo 800 °C za využitia muflovej pece (rýchlosť nábehu teploty 12 °C/min, čas zotrvania 3 h). Práškové geopolyméry sa pripravili zmiešaním metakaolínu alebo metabentonitu s NaOH ako aktivátorom v dvoch hmotnostných zastúpeniach, a to 10 %-hmot. a 20 %-hmot. Samotný proces prípravy geopolymérov, resp. geopolymizačnej reakcie sa uskutočnil podľa práce

[19].

Pri príprave roztokov obsahujúcich Li, ktoré boli aplikované v sorpčných experimentoch, sa vychádzalo zo zásobných roztokov LiNO_3 (bezvodý; 99 % čistoty; $M = 68,95 \text{ g/mol}$; CAS 7790-69-4; Thermo Scientific, USA) zarobených v deionizovanej vode o vodivosti $0,054 \mu\text{S/cm}$, ktorých hmotnostná koncentrácia bola nastavená z pohľadu Li^+ iónov v roztoku.

2.2 Sorpčné experimenty

Presne definované množstvo daného sorbentu sa kvantitatívne prenieslo do 15 cm^3 plastovej skúmavky obsahujúcej 10 cm^3 roztoku LiNO_3 o známej koncentrácii Li^+ iónov v deionizovanej vode, pričom pH tohto roztoku sa upravilo na hodnotu pH 6,1 pomocou roztokov 1 mol/dm^3 HCl alebo 1 mol/dm^3 NaOH. Následne sa skúmavky preniesli na rotačnú trepačku, kde sa nechali exponovať počas vopred určenej doby pri 150 min^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Na konci experimentu sa suspenzia odstredila pri 4500 min^{-1} , počas 5 min a získaný supernatant sa ešte prefiltraval cez striekačkové filtre (priemer 25 mm ; priepustnosť $0,45 \mu\text{m}$). Koncentrácia Li v roztoku na začiatku experimentu, ako aj v supernatante sa stanovila prostredníctvom atómového absorpčného spektrometra pracujúceho v emisnom móde. Zo získaných koncentrácií Li sa vypočítala účinnosť sorpcie $Q\%$, resp. špecifická sorpcia Li Q , a to za využitia nižšie uvedených rovníc (1 a 2):

$$Q\% = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) * 100 \quad (1)$$

$$Q = \frac{(C_0 - C_t) * V}{m_s} \quad (2)$$

kde $Q\%$ je účinnosť sorpcie Li [%]; C_0 a C_t reprezentujú počiatočnú koncentráciu Li v roztoku a koncentráciu Li v supernatante na konci experimentu [mg/dm^3]; Q je špecifická sorpcia Li [mg/g]; V predstavuje objem roztoku aplikovaného v experimente [dm^3]; a m_s reprezentuje vnesenú hmotnosť sorbentu do experimentu [g].

S cieľom eliminovania možného vplyvu uvoľňovania Li z aplikovaných sorbentov na určenie účinnosti sorpcie alebo špecifickej sorpcie Li sa uskutočnili paralelne experimenty v prostredí deionizovanej vody, teda vo vodných roztokoch bez prítomnosti Li. Stanovená koncentrácia Li po expozícii daného sorbentu v deionizovanej vode a za totožných podmienok, ako je uvedené vyššie, sa odpočítala od hmotnostnej koncentrácie Li stanovenej v roztokoch pochádzajúcich zo sorpčných experimentov.

2.3 Atómová emisná spektrometria

Pre stanovenie Li vo vzorkách roztokov pochádzajúcich zo sorpčných experimentov sa využil atómový absorpčný spektrometer (ICE 3000, Thermo Fisher Scientific, USA) pracujúci v emisnom móde. Atomizácia vzorky prebiehala v plameni zabezpečenom spaľovaním zmesi acetylénu (prietok $1,1 \text{ dm}^3/\text{min}$) a vzduchu a prostredníctvom titánového horáka o šírke 100 mm . Kalibračná krivka pre výpočet koncentrácie Li v analyzovaných vzorkách sa pripravila za využitia štandardných roztokov LiNO_3 v koncentračnom rozmedzí Li^+ iónov $0,4 - 4,0 \text{ mg/dm}^3$ alebo $0,1 - 1,0 \text{ mg/dm}^3$. Samotné stanovenie Li prebiehalo pri špecifickej vlnovej dĺžke $670,784 \text{ nm}$, pričom neistota merania nepresiahla 10% . Vzhľadom na intenzitu odozvy signálu sa vzorky roztokov podrobili príslušnému riedeniu pomocou deionizovanej vody.

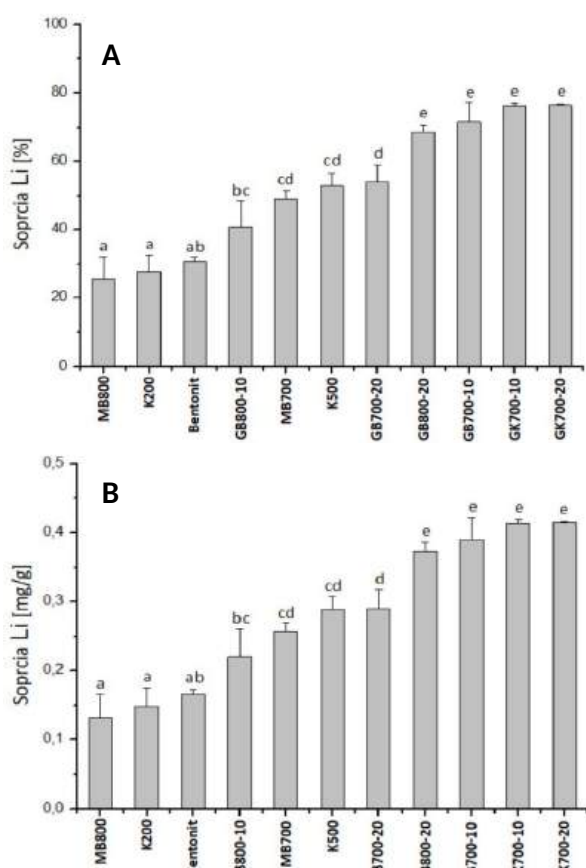
2.4 Grafické a štatistické vyhodnotenie údajov

Výsledky získané zo sorpčných experimentov sa podrobili štatistickému a grafickému vyhodnoteniu za využitia programov OriginPro2016 (OriginLab Corp., USA) a MS Excel 2016 (Microsoft Corp., USA). Štatisticky významné rozdiely v sorpčnej účinnosti alebo sorpčných kapacitách jednotlivých pripravených sorbentov z pohľadu sorpčnej separácie Li boli podrobené analýze rozptylu (ANOVA) a zároveň hodnotené pomocou Tukeyho HSD post hoc testu ($P \leq 0,05$), a to za využitia softvéru Statgraphics Centurion ver. 19.5.01, Statgraphics Technologies Inc. (USA).

3 Výsledky a diskusia

V rámci porovnania získaných, resp. pripravených sorbentov z pohľadu ich schopnosti sorpčne separovať Li sme uskutočnili sériu experimentov za podmienok vsádzkových systémov a v prostredí modelového, nízkoobsahového roztoku LiNO_3 obsahujúceho $4,4 \text{ mg/dm}^3$ Li^+ iónov, $\text{pH} = 6,1$. Na Grafe 1 sú znázornené dosiahnuté výsledky v tomto smere, ktoré sa zároveň podrobili štatistickej analýze hodnotiacej štatisticky významné rozdiely v dosiahnutých hodnotách účinnosti sorpcie, resp. špecifickej sorpcie pri hladine významnosti $P \leq 0,05$. Ako je vidieť, signifikantne najnižšie hodnoty sorpcie Li za daných podmienok sa ukázali pri aplikácii sorbentov MB800, K200 a Bentonit. Uvedené sorbenty nedosiahli účinnosť sorpcie Li vyššiu ako 30% . Naopak, najvyššiu účinnosť sorpcie Li, viac ako 70% , sme pozorovali pri aplikácii sorbentov GB700-10, GK700-10 a GK700-20. Celkovo môžeme zhodnotiť, že najvyššie hodnoty účinnosti sorpcie Li, resp. špecifickej sorpcie Li sa zistili pri sorbente GK700-20, pričom sorpčná separácia Li z tohto hľadiska klesala v poradí: GK700-20 - $76,4 \%$ ($0,415 \pm 0,002 \text{ mg/g}$) > GK700-10 - $76,1 \%$

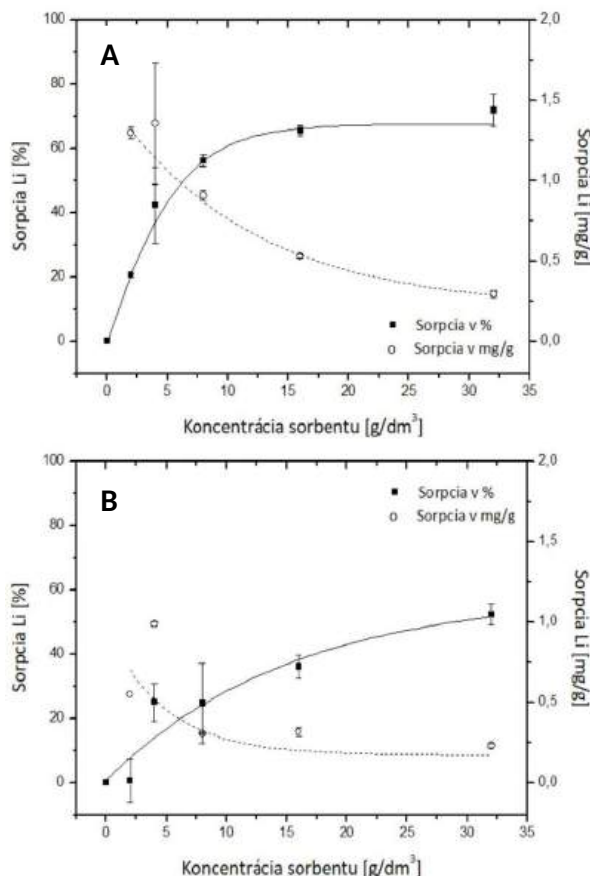
(0,414±0,005 mg/g)	>	GB700-10	-	71,5	%
(0,390±0,031 mg/g)	>	GB800-20	-	68,5	%
(0,374±0,012 mg/g)	>	GB700-20	-	54,0	%
(0,290±0,028 mg/g)	>	K500	-	52,9	%
(0,289±0,020 mg/g)	>	MB700	-	49,0	%
(0,257±0,013 mg/g)	>	GB800-10	-	40,8	%
(0,220±0,041 mg/g)	>	Bentonit	-	30,7	%
(0,166±0,007 mg/g)	>	K200	-	27,7	%
(0,149±0,027 mg/g)	>	MB800	-	25,6	%
(0,132±0,035 mg/g)					



Graf 1 Porovnanie sorpčnej separácie Li pripravenými sorbentmi (koncentrácia sorbentu $C_B = 8,0 \text{ g/dm}^3$) z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $4,4 \text{ mg/dm}^3$ Li, $\text{pH} = 6,1$. Expozícia prebiehala na rotačnej trepačke (150 ot./min) počas 2 h a pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Účinnosť sorpcie Li vyjadrená v %-tách z celkového množstva Li v roztoku (A) a špecifická sorpcia v mg/g (B). Rôzne písmená nad chybovými úsečkami reprezentujúcimi smerodajné odchýlky aritmetického priemeru výsledkov troch nezávislých experimentov ($\pm\text{SD}$; $n = 3$) indikujú štatisticky významné rozdiely pri hladine významnosti $P \leq 0,05$.

Zo získaných výsledkov môžeme povedať, že

klinoptilolit ako druh zeolitu vykazuje celkovo priemernú až nízku schopnosť sorpčnej separácie Li. Zaujímavým poznatkom je, že vyššia aplikovaná frakcia (500 – 1000 μm) dosiahla skoro 2-násobne vyššiu účinnosť sorpcie Li v porovnaní s nižšou frakciou častíc (< 200 μm). Na tomto mieste treba zdôrazniť, že vo všeobecnosti platí, že nižšia frakcia častíc by mala vykazovať vyšší špecifický povrch, a tým aj vyššiu sorpčnú schopnosť v porovnaní s vyššou frakciou častíc. Naše výsledky to však nepotvrdili, resp. poukázali na existenciu opačného javu. Vysvetliť by sa to dalo tým, že pri aplikovanom množstve sorbentu 8 g/dm^3 dochádza pri jemnejšej frakcii klinoptilolitu k tvorbe zhlukov častíc, čo vedie k celkovému nižšiemu špecifickému povrchu, ako aj k nižšej sorpčnej kapacite. Taktiež relatívne nízka sorpčná separácia Li sa potvrdila pri bentonite a metabentonitoch kalcinačne pripravených pri $700 \text{ }^\circ\text{C}$, resp. $800 \text{ }^\circ\text{C}$ (MB700 a MB800).



Graf 2 Vplyv koncentrácie sorbentu – práškového geopolyméru GK700-10 (A) a GB700-10 (B) na sorpčnú separáciu Li z prostredia deionizovanej vody obsahujúcej $13,5 \text{ mg/dm}^3$ Li, $\text{pH} = 6,1$. Expozícia prebiehala na rotačnej trepačke (150 ot./min) počas 2 h a pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Účinnosť sorpcie Li vyjadrená v %-tách

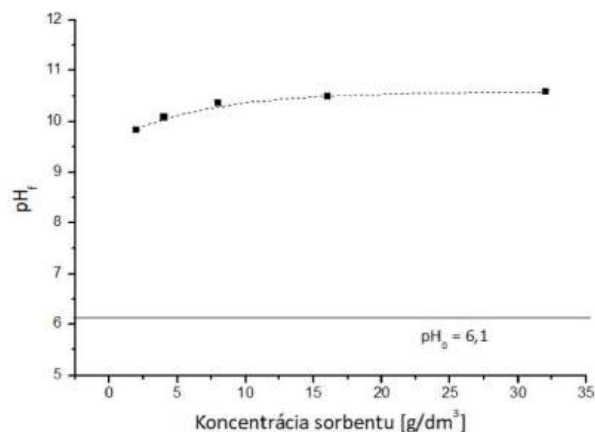
z celkového množstva Li v roztoku a špecifická sorpcia v mg/g.

Slovensko patrí medzi významných producentov bentonitu v EÚ s ročnou produkciou okolo 300 tisíc ton. Bentonit slovenskej proveniencie (najmä v Žiarskej kotline) sa vyznačuje vysokým obsahom montmorillonitu [20], ktorý z neho robí svetový unikát. Vyznačuje sa vysokou kvalitou a čistotou. Hlavné rozdiely medzi metakaolínom a metabentonitom vyplývajú z ich chemického zloženia a atómovej štruktúry, ktoré sú dané ich dominantnými materskými minerálmi. Metakaolín sa pripravuje tepelným spracovaním zdrojovej pôdy, kaolínu, ktorý sa skladá hlavne z kaolinitového ílu. Kaolinit patrí medzi vrstevnaté ílovité minerály 1:1, v ktorých je každá vrstva tvorená jednou tetraédrickou (SiO_4) a jednou oktaédrickou (AlO_6) vrstvou. Naopak, metabentonit sa získava zahrievaním bentonitu, ktorého hlavným minerálom je montmorillonit (v závislosti od zdrojov spolu s illitom alebo kaolínovými ílmi). Tento ílový minerál v pomere 2:1 sa skladá z vrstiev obsahujúcich jednu oktaédrickú vrstvu vloženú medzi dve tetraédrické vrstvy [19, 21].

Ako sme už uviedli, najvyššie sorpčné kapacity pre separovanie Li^+ iónov sa zistili pri pripravených práškových geopolyméroch pozostávajúcich z metakaolínu a metabentonitu, ktoré boli alkalicky aktivované prídavkom NaOH v dvoch hmotnostných zastúpeniach, a to 10 %-hmot. a 20 %-hmot. Realizované sorpčné experimenty nám ukázali, že vyššia kalcinačná teplota (800 °C) viedla v prípade geopolyméru pripraveného na báze bentonitu k nižším sorpčným kapacitám, ako nižšia kalcinačná teplota (700 °C). Taktiež v prípade metabentonitového geopolyméru vyšší prídavok NaOH (20 %-hmot.) pri alkalickej aktivácii viedol k signifikantne nižšej sorpčnej separácii Li v porovnaní s nižším zastúpením NaOH (10 %-hmot.). V prípade geopolyméru pripraveného na báze metakaolínu sa dosiahli najvyššie sorpčné kapacity k viazaniu Li^+ iónov, pričom sa nezistil štatisticky významný rozdiel v sorpcii Li medzi geopolymérom s prídavkom 10 %-hmot. a 20 %-hmot. NaOH ako alkalickým aktivátorom. Avšak, na základe štatistickej významnosti môžeme povedať, že sorbenty GB800-20, GB700-10, GK700-10 a GK700-20 vykazovali prakticky totožne najvyššie sorpčné kapacity pre Li.

Pre účely ďalšieho testovania sme si vybrali sorbenty GB700-10 a GK700-10, ktoré dosiahli najvyššiu sorpčnú kapacitu k separovaniu Li a zároveň sa pri nich uplatnil nižší hmotnostný prídavok NaOH (10 %-hmot.) ako alkalického aktivátora. Tento fakt je dôležitý z ekonomického hľadiska prípravy daných geopolymérov.

V ďalšom kroku sme hodnotili vplyv množstva, resp. hmotnostnej koncentrácie sorbentu aplikovaného do roztoku obsahujúceho $13,5 \text{ mg/dm}^3$ Li (pH 6,1) na účinnosť sorpcie Li a sorpčnú kapacitu sorbentov GK700-10 a GB700-10. Z Grafu 2A je vidieť, že účinnosť sorpcie Li stúpala nelineárne z hodnoty 21 % na hodnotu 72 % z celkového množstva Li v roztoku, a to so zvyšujúcou sa koncentráciou sorbentu GK700-10 v rozmedzí 2 až 32 g/dm^3 . Na druhej strane sorpčná kapacita klesala exponenciálne v tomto porovnaní. Pri najnižšej aplikovanej koncentrácii sorbentu $C_B = 2 \text{ g/dm}^3$ sme dosiahli sorpčnú kapacitu na úrovni $1,295 \pm 0,037 \text{ mg/g}$ a pri najvyššej dávke sorbentu 32 g/dm^3 sorpčnú kapacitu len $0,292 \pm 0,021 \text{ mg/g}$. Obdobné závislosti sme potvrdili aj pri sorbente GB700-10 (Graf 2B). Účinnosť sorpcie Li sa zvyšovala z úrovne 0,6 % na 52 % a špecifická sorpcia klesala z hodnoty $0,548 \pm 0,001 \text{ mg/g}$ na $0,228 \pm 0,015 \text{ mg/g}$, a to so zvyšujúcou sa koncentráciou aplikovaného sorbentu v rozmedzí 2 až 32 g/dm^3 . Podobný výsledok sledovali aj autori práce [22] pri štúdiu vplyvu množstva aplikovaného sorbentu – oxidu grafénu na účinnosť sorpcie, resp. špecifickú sorpciu Li. Mnohí autori tento fenomén vysvetľujú tým, že pri vyšších koncentráciách sorbentu dochádza k agregácii častíc sorbentu, ktorá následne vedie k zníženiu celkového špecifického povrchu sorbentu [23].



Graf 3 Závislosť finálnej hodnoty pH_f roztokov od koncentrácie sorbentu GK700-10. Podmienky experimentu sú detailne opísané v popise Grafu 2.

Pri realizácii vyššie opísaných experimentov sme si všimli, že došlo počas expozície sorbentov GK700-10 a GB700-10 v modelovom, nízkoobsahovom roztoku LiNO_3 k zmene hodnoty pH roztoku, kedy z počiatočnej hodnoty $\text{pH}_0 = 6,1$ sme na konci 2 h expozície pripravených sorbentov merali hodnoty pH v rozmedzí 9,8 až 10,6. Ako je zrejme z Grafu 3, zvyšovanie aplikovanej koncentrácie sorbentu GK700-10 viedlo

k miernemu zvyšovaniu tejto finálnej hodnoty pH_f roztoku.

Tab. 1 Porovnanie sorpčných kapacít Q rôznych sorbentov pre separovanie Li.

Sorbent	C ₀ Li [mg/dm ³]	C _B [g/dm ³]	Q [mg/g]	Citácia
Zeolit X	20	5	0,3	[24]
Hydroxidy Li-Al	350	0,1	0,6	[25]
GB700-10	13,5	2 - 32	0,2 - 1,0	Táto práca
GK700-10	13,5	2 - 32	0,3 - 1,4	Táto práca
Mn oxidy	15	0,5	10,9	[26]
Modifikovaná celulóza	140	20	16,0	[27]

Pozn.: C₀ - reprezentuje počiatočnú koncentráciu Li v roztoku;
C_B - reprezentuje aplikovanú koncentráciu sorbentu v experimentoch.

V Tab. 1 uvádzame porovnanie výsledkov získaných v tejto práci s výsledkami, ktoré boli publikované v oblasti sorpčnej separácie Li pomocou podobných materiálov ako sorbentov. Ako je možné vidieť v tejto tabuľke, hodnoty sorpčnej kapacity v tejto práci pripravených sorbentov - geopolymérov dosahujú relevantné a zaujímavé hodnoty v porovnaní s ostatnými sorpčnými materiálmi.

4 Záver

V práci bolo testovaných 11 rôznych sorbentov odvodených od klinoptilolitu, bentonitu a kaolínu z pohľadu ich schopnosti sorpčne separovať Li z modelových, nízkoobsahových roztokov (4,4 mg/dm³, resp. 13,5 mg/dm³).

Najvyššie sorpčné kapacity pre separovanie Li⁺ iónov sa dosiahli pri geopolyméroch pozostávajúcich z metabentonitu a metakaolínu kalcinačne pripravených pri teplote 700 °C. Naopak, signifikantne najnižšia účinnosť sorpcie Li sa zistila pri aplikácii metabentonitu kalcinačne pripraveného pri 800 °C, klinoptilolitu o frakcii častíc < 200 μm a bentonitu.

Pri experimentoch zameraných na hodnotenie vplyvu aplikovanej koncentrácie sorbentu v rozmedzí 2 - 32 g/dm³ na sorpčnú kapacitu pripravených sorbentov - geopolymérov GK700-10 a GB700-10 sme dosiahli sorpčné kapacity pre Li na úrovni 0,3 - 1,4 mg/g, resp. 0,2 - 1,0 mg/g.

Záverom môžeme konštatovať, že najmä pripravené geopolyméry na báze metabentonitu a metakaolínu dosahujú relevantné a zaujímavé hodnoty sorpčných kapacít pre účinné separovanie Li⁺ iónov z nízkoobsahových roztokov v porovnaní s inými sorpčnými materiálmi opísanými vo vedeckých databázach. V ďalšom pokračovaní práce plánujeme

hodnotiť aj iné parametre a faktory (čas, pH, koncentrácia Li a iné) na účinnosť sorpcie Li, ako aj aplikovať pripravené geopolyméry pre reálne vzorky nízkoobsahových roztokov, akými sú aj na Slovensku dostupné geotermálne vody. Finálnych krokom separácie Li⁺ iónov by mala byť ich účinná desorpcia z aplikovaného sorbentu pomocou desorpčných činidiel (roztoky kyselín, solí fyzikálno-chemických analógov alebo kompetitívnych iónov k Li⁺ iónom, alebo roztoky chelatačných činidiel) alebo elektrochemických metód.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená agentúrou APVV v rámci riešenia projektu APVV-24-0133. Taktiež by autori chceli poďakovať Ing. Michalovi Slanému, PhD. a jeho kolektívu za poskytnutie vzoriek bentonitu, kaolínu, a z nich pripraveného metabentonitu a metakaolínu, resp. ich geopolymérov.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] LONG, Xin; LIU, Cheng; YANG, Yan; DONG, Bin; CHEN, Hangchao; ZHANG, Lei; PAN, Jinhe a ZHOU, Changchun, (2024). Microwave-assisted hydrothermal synthesis of lithium ion-sieve for adsorption of lithium ion in coal gangue leaching solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 682, 132819. ISSN 0927-7757.
- [2] DU, Jinjing; MA, Jiayi; CUI, Xinxin; LIU, Xun; WANG, Dongbo; WANG, Bin; ZHANG, Xuan; ZHAI, Ruitong; ZHU, Jun; ZUO, Heng; LI, Qian a HE, Xihong, (2025). Zr and F co-modified Li₂TiO₃ with obviously enhanced Li⁺ adsorption performances. *Separation and Purification Technology*, vol. 392, 137043. ISSN 1873-3794.
- [3] DISU, Bamidele; RAFATI, Reza; HADDAD, Ahmad S.; ROCA, Jose A.M.; CLAR, Maria I.I. a BAKHTIARI, S.S.E., (2024). Review of recent advances in lithium extraction from subsurface brines. *Geoenergy Science and Engineering*, vol. 241, 213189. ISSN 2949-8929.
- [4] JIANG, Zhenzhen; LIU, Gaoling; MA, Chi; SUN, Kangrui; LI, Mingli a DENG, Tianlong, (2025). Construction of a high hydrophilic 3D network structure based on cellulose acetate for loading H₂TiO₃ in lithium extraction from geothermal water. *Chemical Engineering Journal*, vol. 522, 168004. ISSN 1385-8947.
- [5] EURÓPSKA KOMISIA, (2020). Oznámenie komisie európskemu parlamentu, rade, európskemu hospodárskemu a sociálnemu výboru a výboru regiónov: Odolnosť v oblasti kritických surovín: zmapovanie cesty k väčšej bezpečnosti

- a udržateľnosti. Dokument COM(2020) 474 final. Brusel : Európska komisia, 24 s.
- [6] ZENG, Yiwen; LI, Wanpeng; WAN, Zhixin; QIN, Shaoyi; HUANG, Qinlin; CAI, Wenlong; WANG, Qian; YAO, Meng a ZHANG, Yun, (2024). Electrochemically mediated lithium extraction for energy and environmental sustainability. *Advanced Functional Materials*, vol. 34, no. 33, 2400416. ISSN 1616-3028.
- [7] ZORZAL, Camila B.; DA SILVA, João M.; JAQUES, Diego S. a SANTOS, Renata D.C.P., (2025). An overview of lithium mining in Brazil: From artisanal extraction to large-scale production. *Resources Policy*, vol. 100, 105440. ISSN 1873-7641.
- [8] WANG, Shulei; ZHANG, Min; ZHANG, Ying; ZHANG, Yang; QIAO, Shan a ZHENG, Shili, (2019). Application of citric acid as eluting medium for titanium type lithium ion sieve. *Hydrometallurgy*, vol. 183, pp. 166-174. ISSN 1879-1158.
- [9] KUMAR, Amit; FUKUDA, Hiroki; HATTON, T. Alan a LIENHARD V, John H., (2019). Lithium recovery from oil and gas produced water: A need for a growing energy industry. *ACS Energy Letters*, vol. 4, no. 6, pp. 1471-1474. ISSN 2380-8195.
- [10] LI, Haoran; QIN, Jiayu; ZHAO, Kaiyu; GUO, Yafei; TONG, Bojia; SAMADIY, Murodjon; ALIMOV, Umarbek a DENG, Tianlong, (2024). Novel lithium ion-sieve spinning fiber composite of PVDF-HMO for lithium recovery from geothermal water. *Journal of Cleaner Production*, vol. 434, 139997. ISSN 1879-1786.
- [11] WANG, Rui; HAN, Yifan; LI, Yang; ZHANG, Feng; DANG, Chao; YUAN, Zhen a LIU, Junjie, (2025). Global sustainable pathway for lithium metal production: A critical review and best practice guide. *Chemical Engineering Journal*, vol. 523, 168850. ISSN 1385-8947.
- [12] HU, Hui; LI, Hongqiang; ZHENG, Ruoxuan; BEN, Haijie; BAI, Peidi; LIANG, Zaixu a CHEN, Wei, (2025). Fiber-supported lithium adsorbent with engineered interlayers for enhanced lithium adsorption and selectivity from high Mg/Li ratio salt lakes. *Separation and Purification Technology*, vol. 379, 135094. ISSN 1873-3794.
- [13] TAN, Guangcai; WAN, Shun; CHEN, Jie-Jie; YU, Han-Qing a YU, Yan, (2024). Reduced lattice constant in Al-doped LiMn₂O₄ nanoparticles for boosted electrochemical lithium extraction. *Advanced Materials*, vol. 36, no. 14, 2310657. ISSN 1521-4095.
- [14] ZHAO, Chen; FEMG, Fan; HOU, Jue; HU, Jian; SU, Yuyu; LIU, Jefferson Zhe; HILL, Matthew; FREEMAN, Benny D.; WANG, Huanting a ZHANG, Huacheng, (2024). Unlocking direct lithium extraction in harsh conditions through thiol-functionalized Metal-Organic Framework subnanofluidic membranes. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 146, no. 20, pp. 14058-14066. ISSN 1520-5126.
- [15] HAN, Yu; YANG, Yan; MA, Yuling; LIANG, Daxin; WEN, Liping; MA, Jun a WANG, Wei, (2024). Selective ion channel adsorbents facilitate efficient and low environmental impact extraction of liquid lithium resources. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 480, 136335. ISSN 1873-3336.
- [16] LI, Enze; LI, Zelong; XIA, Qiancheng; ZHANG, Feiyu; LIANG, Zhangqi; XU, Zhaozan; GAO, Guandao; LI, Hu a CHENG, Fangqin, (2025). Lithium extraction by extractant confined in Pickering emulsion. *Nature Communications*, vol. 16, 7572. ISSN 2041-1723.
- [17] IGHALO, Joshua O.; AMAKU, John F.; OLISAH, Chinedu; ADEOLA, Ayodeji O.; IWUOZOR, Kelechi O.; AKPOMIE, Kingsley G.; CONRADIE, Jeanet; ADEGOKE, Kehinde A. a OYEDOTUN, Kolawole O., (2022). Utilisation of adsorption as a resource recovery technique for lithium in geothermal water. *Journal of Molecular Liquids*, vol. 365, 120107. ISSN 0167-7322.
- [18] ZHANG, Lei; ZHANG, Tao; LV, Shuang; SONG, Shanshan; GALVÁN, Héctor J.O.; QUINTANA, Manuel a ZHAO, Yong, (2024). Adsorbents for lithium extraction from salt lake brine with high magnesium/lithium ratio: From structure-performance relationship to industrial applications. *Desalination*, vol. 579, 117480. ISSN 1873-4464.
- [19] SLÁVÝ, Michal; KUZIELOVÁ, Eva; ŽEMLIČKA, Matúš; MATEJDES, Marián; STRUHÁROVÁ, Alena a PALOU, Martin T., (2023). Metabentonite and metakaolin-based geopolymers/zeolites: relation between kind of clay, calcination temperature and concentration of alkaline activator. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 148, pp. 10531-10547. ISSN 1588-2926.
- [20] SLÁVIK, Ján; HRUŠKOVIČ, Samuel; OČENÁŠ, Daniel; ZUBEREC Ján, (1971). Ložiská bentonitov na Slovensku. *Mineralia Slovaca*, vol. 3, no. 12-13, pp. 561-573. ISSN 1338-3523.
- [21] KHALIFA, Ahmed Z.; CIZER, Özlem; PONTIKES, Yiannis; HEATH, Andrew; PATUREAU, Pascaline; BERNAL, Susan A. a Marsh, Alastair T.M., (2020). Advances in alkali-activation of clay minerals. *Cement and Concrete Research*, vol. 132, 106050, ISSN 1873-3948.
- [22] ABU-NADA, Abdulrahman; ABDALA, Ahmed; MCKAY, Gordon a ZUHARA, Shifa, (2025). Lithium

adsorption using graphene oxide: Modeling, regeneration, and mechanistic insights. *Materials*, vol. 18, no. 14, 3211. ISSN 1996-1944.

- [23] YALCUK, Arda a OKCU, Gamze Dogdu, (2017). Biosorption of Indigo and Acid Yellow 2G (Y2G) dyes from aqueous solutions using a commercial powder form of ecologically pure Hawaiian *Spirulina pacifica* (HSP). *Desalination and Water Treatment*, vol. 79, pp. 386-399. ISSN 1944-3986.
- [24] DÍEZ, Eduardo; REDONDO, Cinthya; GÓMEZ, José María; MIRANDA, Ruben a RODRÍGUEZ, Araceli, (2023). Zeolite adsorbents for selective removal of Co(II) and Li(I) from aqueous solutions. *Water*, vol. 15, no. 2, 270. ISSN 2073-4441.
- [25] JIANG, Huixiong; YANG, Ying; SUN, Shuying a YU, Jianguo, (2020). Adsorption of lithium ions on lithium-aluminum hydroxides: Equilibrium and kinetics *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 98, no. 2, pp. 544-555. ISSN 1939-019X.
- [26] WAJIMA, Takaaki; MUNAKATA, Kenzo a UDA, Tatsuhiko, (2012). Adsorption behavior of lithium from seawater using manganese oxide adsorbent. *Plasma and Fusion Research*, vol. 7, 2405021. ISSN 1880-6821.
- [27] XU, Chenxi; YU, Tianlin; PENG, Jing; ZHAO, Long; LI, Jiuqiang a ZHAI, Maolin, (2020). Efficient adsorption performance of lithium ion onto cellulose microspheres with sulfonic acid groups. *Quantum Beam Science*, vol. 4, no. 1, 6. ISSN 2412-382X.

Syntéza jednojadrových Co(II) a Cu(II) komplexov s použitím asymetrických acetylacetonátov

Synthesis of mononuclear Co(II) and Cu(II) complexes using asymmetric acetylacetonates

Jerguš Rosík¹ – Cyril Rajnák² – Franz Renz³

^{1,2}Oddelenie chémie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

³Inštitút koordinačnej chémie, Leibniz University Hannover, Callinstrasse 1, 30167 Hannover

¹rosik1@ucm.sk, ²cyril.rajnak@ucm.sk, ³Franz.renz@kci.uni-hannover.de

Abstrakt

Pripravených bolo osem nových doposiaľ nepublikovaných komplexov Co(II) a Cu(II), so všeobecným vzorcom $[\text{Co}(\text{TFDMH})_2(L^1)_2]$ (**1**), $[\text{Co}(\text{TFACAC})_2(L^1)_2]$ (**2**), $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(L^1)_2]$ (**3**), $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(L^2)_2]$ (**4**), $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(L^1)]$ (**5**), $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(L^3)]$ (**6**), $[\text{Cu}(\text{TFDMH})_2(L^3)_2]$ (**7**), $[\text{Cu}(\text{TFACAC})_2(L^4)_2]$ (**8**), {kde $L^1 = (\text{E})\text{-N-(4-etylphenyl)-1-(pyridín-4-yl)metánimín}$; $L^2 = (\text{E})\text{-N-(4-benzylphenyl)-1-(pyridín-4-yl)metánimín}$; $L^3 = (\text{E})\text{-N-(4-etoxyphenyl)-1-(pyridín-4-yl)metánimín}$; $L^4 = (\text{E})\text{-N-(4-chlorofenyl)-1-(pyridín-4-yl)metánimín}$; TFACAC = etyl 4,4,4-trifluoroacetoacetát; TFDMH = 1,1,1-trifluoro-5,5-dimetyl-2,4-hexándión; TFFB = 4,4,4-trifluoro-1-fenyl-1,3-butándión}. Použité Schiffove bázy boli pripravené in-situ kondenzačnými reakciami 4-pyridínkarboxyaldehydu so substituovanými anilínmi v polohe para. Štruktúry komplexov boli definované pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie. Geometria koordinačného polyédra komplexov bola detailne študovaná pomocou programu SHAPE, D_{str} parametra a Addisonovho geometrického indexu τ . Pripravené zlúčeniny boli charakterizované pomocou infračervenej a UV-VIS spektroskopie.

Kľúčové slová: jednojadrové komplexy, kobalt(II), meď(II), *N*- a *O*-donorové ligandy.

Abstract

Three new previously unpublished Co(II) and Cu(II) complexes were prepared with the general formula $[\text{Co}(\text{TFDMH})_2(L^1)_2]$ (**1**), $[\text{Co}(\text{TFACAC})_2(L^1)_2]$ (**2**), $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(L^1)_2]$ (**3**), $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(L^2)_2]$ (**4**), $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(L^1)]$ (**5**), $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(L^3)]$ (**6**), $[\text{Cu}(\text{TFDMH})_2(L^3)_2]$ (**7**), $[\text{Cu}(\text{TFACAC})_2(L^4)_2]$ (**8**), where $L^1 = (\text{E})\text{-N-(4-ethylphenyl)-1-(pyridine-4-yl)methanimine}$; $L^2 = (\text{E})\text{-N-(4-benzylphenyl)-1-(pyridine-4-yl)methanimine}$; $L^3 = (\text{E})\text{-N-(4-ethoxyphenyl)-1-(pyridine-4-yl)methanimine}$; $L^4 = (\text{E})\text{-N-(4-chlorophenyl)-1-(pyridine-4-yl)methanimine}$; TFACAC = ethyl 4,4,4-

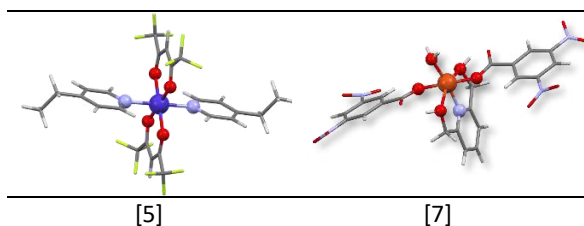
trifluoroacetoacetate; TFDMH = 1,1,1-trifluoro-5,5-dimethyl-2,4-hexandione; TFFB = 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butandione}. The used Schiff bases were prepared in-situ by condensation reaction of pyridin-4-carboxyaldehyde and substituted anilines in para position. The structures of the complexes were defined using single crystal X-ray diffractometry. The geometry of the coordination polyhedron of the complexes was studied in detail using the SHAPE program, D_{str} parameter and Addison geometry index τ . The prepared compounds were characterized using infrared and UV-VIS spectroscopy.

Key Words: mononuclear complexes, cobalt(II), Cu(II), *N*- and *O*- donor ligands.

Úvod

Jednojadrové Co(II) a Cu(II) komplexy patria medzi často študované [1,2]. Pri týchto systémoch evidujeme rôzne formy koordinácie. Jednou z najčastejších je hexakoordinácia, pri ktorej sa autori zameriavajú na identifikáciu statických a dynamických magnetických vlastností [3,4]. Jedným z príkladov je hexakoordinovaný Co(II) komplex. Tento komplex $[\text{Co}(\text{hfac})_2(\text{etpy})_2]$ je typický vysokospinový so spinom $S = 3/2$ a vykazuje pomalú magnetickú relaxáciu podporovanú magnetickým poľom, konkrétne $\tau_{\text{HF}} = 20$ ms pri teplote $T = 2.0$ K a $B = 0.15$ T [5].

V posledných rokoch je pozorovaný záujem aj o štúdium pomalej magnetickej relaxácie v jednojadrových Cu(II) komplexoch, tieto komplexy boli dlho prehliadané predovšetkým z dôvodu nízkeho spinu $S = 1/2$ [6]. Príkladom je jednojadrový hexakoordinovaný Cu(II) komplex s chromofórom $\{\text{CuO}_5\text{N}\}$. DC magnetické merania pri nízkych teplotách sú v súlade s Curieho zákonom. Tento komplex je unikátny v tom, že vykazuje pomalú magnetickú relaxáciu podporovanú magnetickým poľom $\tau = 0,23$ ms pri teplote $T = 2$ K a $B = 0,2$ T. Relaxačný čas sa predlžuje na $\tau = 2,9$ ms pri $B_{\text{DC}} = 0,6$ T [7].



Obr.1. Vybrané komplexy $[\text{Co}(\text{hfac})_2(\text{etpy})_2]$; $[\text{CuL}'_2(\text{H}_2\text{O})]$.

1 Materiál a metódy

1.1 Chemikálie

Všetky použité chemikálie boli komerčne dostupné. Na prípravu organických ligandov sa použili 4-pyridínkarboxyaldehyd, 4-etylanilín, 4-benzylanilín, 4-etoxyanilín, 4-jodoanilín a 4-chloroanilín. Zdrojom centrálného atómu boli anorganické soli kobaltu a medi: CoCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Použité rozpúšťadlá: etanol, acetonitril, metanol, dichlórmetán. $\text{Co}(\text{TFFB})_2$, $\text{Co}(\text{TFDMH})_2$, $\text{Co}(\text{TFACAC})_2$ boli pripravené substitučnou reakciou asymetrického acetylacetonátu rozpusteného v rozpúšťadle s NaOH rozpusteným v destilovanej vode a CoCl_2 alebo $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. 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 zrkadlovou kolimovaným $\text{CuK}\alpha$ žiarením ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) a pomocou programu Superflipprogram a spresnené metódou najmenších štvorcov Independent AtomModel (IAM) v Shelxl (ver. 2018/3).

1.3 Príprava komplexov $[\text{Co}(\text{TFDMH})_2(\text{L}^1)_2]$ (1); $[\text{Co}(\text{TFACAC})_2(\text{L}^1)_2]$ (2); $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(\text{L}^1)_2]$ (3)

Na prípravu komplexov **1-3** sa 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 etanol (15 ml). Reakcia sa intenzívne miešala pod spätným chladičom pri teplote 70°C jednu hodinu v olejovom kúpeli. Počas miešania reakcie sa pripravila reakčná zmes asymetrického acetylacetonátu kobaltnatého. Do kadičky sa pridal 5 ml etanolu, do ktorého sa pridal 1,1,1-trifluoro-5,5-dimetyl-2,4-hexándión (49,15 μl) (**1**), etyl 4,4,4-trifluoroacetoacetát (33,8 μl) (**2**) alebo 4,4,4-trifluoro-1-fenyl-1,3-butándión (49,43 mg) (**3**). Následne sa pridal NaOH (9,24 mg) rozpustené v destilovanej vode a nakoniec bola pridaná

anorganická soľ CoCl_2 (14,45 mg). Takto pripravená reakčná zmes sa následne pridala do prebiehajúcej reakcie po jednej hodine. Reakcia sa intenzívne miešala pri teplote 70°C celú noc. Zmesi roztokov sa prefiltrovali cez skladaný filtračný papier a nechali sa voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote jeden týždeň. Výťažok 30 % (**1**), 41 % (**2**), 42 % (**3**). Vo všetkých troch prípadoch sa izolovali kryštály oranžovej farby.

1.4 Príprava komplexu $[\text{Co}(\text{TFFB})_2(\text{L}^2)_2]$ (4)

V prvom kroku sa opäť pripravila Schiffova báza. Do 50 ml varnej banky sa pridal 4-pyridínkarboxyaldehyd (65,6 μl) a 4-benzylanilín (127,1 mg), ako rozpúšťadlo sa použil acetonitril (15 ml). Reakcia prípravy Schiffovej bázy prebiehala in-situ pod spätným chladičom po dobu jednej hodiny pri 70°C na olejovom kúpeli. Následne sa pridal reakčná zmes 4,4,4-trifluoro-1-fenyl-1,3-butándiónu (49,43 mg), NaOH (9,24 mg) a CoCl_2 (14,45 mg) v acetonitrile. Reakcia sa intenzívne miešala pri 70°C celú. Zmes pripraveného roztoku sa prefiltrovala cez skladaný filtračný papier a nechala voľne kryštalizovať jeden týždeň pri laboratórnej teplote. Výťažok komplexu (**4**) v podobe oranžových kryštálov bol 57 %.

1.5 Príprava komplexu $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(\text{L}^1)]$ (5)

Schiffova báza L^1 bola pripravená tak isto, ako v prípade komplexov **1-3** až na to, že ako rozpúšťadlo bol použitý metanol. Po jednej hodine sa k Schiffovej báze pridala reakčná zmes, ktorá sa pripravila v kadičke. Do kadičky sa pridal 5 ml metanolu, v ktorom sa rozpustil 4,4,4-trifluoro-1-fenyl-1,3-butándión (49,43 mg). Následne sa pridal NaOH (9,24) rozpustené v destilovanej vode a na záver $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (26,96 mg). Reakcia sa intenzívne miešala celú noc pri 70°C . Zmes sa následne prefiltrovala cez skladaný filtračný papier a nechala voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote jeden týždeň. Výťažok komplexu **5** bol 48 %, pričom sa jednalo o zelené kryštály.

1.6 Príprava komplexov $[\text{Cu}(\text{TFFB})_2(\text{L}^3)]$ (6); $[\text{Cu}(\text{TFDMH})_2(\text{L}^3)_2]$ (7)

V prvom kroku sa opäť pripravila Schiffova báza in situ. Do 50 ml varnej banky sa pridal 4-pyridínkarboxyaldehyd (65,6 μl), 4-etoxyanilín (89,26 μl) a ako rozpúšťadlo sa použil opäť metanol. Reakcie sa intenzívne miešali pod spätným chladičom, pri teplote $T = 70^\circ\text{C}$ a v olejovom kúpeli. Počas miešania

reakčných zmesí sa pripravili zmesi asymetrického acetylacetonátu meďnatého. Do kadičky sa pridalo 5 ml metanolu. V prípade komplexu **6** sa v metanole rozpustil 4,4,4-trifluoro-1-fenyl-1,3-butándión (49,93 mg) a v prípade komplexu **7** 1,1,1-trifluoro-5,5-dimetyl-2,4-hexándión (49,15 µl). Následne sa do obidvoch zmesí pridal NaOH (9,24 mg) rozpustený v destilovanej vode a na záver sa pridala anorganická soľ $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (26,96 mg). Takto pripravené zmesi sa pridali do reakčných zmesí, ktoré sa následne intenzívne miešali celú noc pod spätným chladičom v olejovom kúpeli a teplote $T = 70^\circ \text{C}$. Po ukončení reakcií sa zmesi pripravených roztokov prefiltrovali cez skladané filtračné papiere a nechali voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote jeden týždeň. V prípade komplexu (**6**) bol výťažok 28 % a v prípade komplexu (**7**) bol výťažok 63 %. V obidvoch prípadoch sa izolovali zelené kryštály.

1.7 Príprava komplexu $[\text{Cu}(\text{TFACAC})_2(\text{L}^4)_2]$ (**8**)

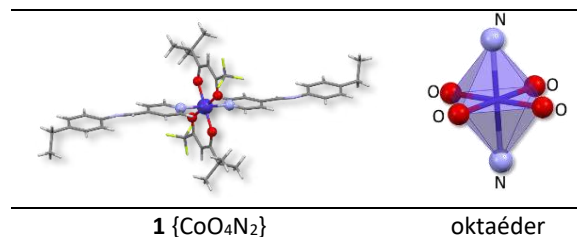
Na prípravu komplexu **8** sa najskôr pripravila in-situ Schiffova báza. Do 50 ml varnej banky sa pridala 4-pyridínkarboxylaldehyd (65,6 µl) a 4-chloroanilín (88,41 mg), pričom ako rozpúšťadlo sa použil metanol (15 ml). Reakcia sa intenzívne miešala pod spätným chladičom pri teplote 70°C jednu hodinu v olejovom kúpeli. Po jednej hodine sa k reakčnej zmesi pridal roztok 5 ml metanolu, etyl 4,4,4-trifluoroacetoacetátu (33,8 µl), NaOH rozpusteného v destilovanej vode (9,24 mg) a anorganické soli $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (26,96 mg). Reakcia sa následne intenzívne miešala celú noc pri teplote 70°C . Po ukončení reakcie sa zmes prefiltrovala cez skladaný filtračný papier a nechala voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote jeden týždeň. Výťažok komplexu **8** bol 27 %. Izolovali sa kryštály zelenej farby.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Výsledky

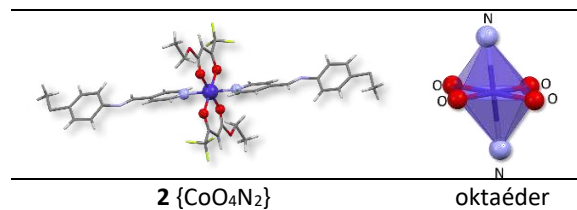
Komplexy **1-8** boli pripravené reakciou sodného prekurzora s príslušnými soľami Co(II) respektíve Cu(II) . Z izolovaných produktov vyplýva, že kation Na^+ bol nahradený iónmi Co(II) , respektíve Cu(II) . Komplexy **1-4** sú hexakoordinované jednojadrové Co(II) , ktorých štruktúra bola potvrdená monokryštálovou röntgenovou analýzou. Komplex **1** bol pripravený použitím prekurzora $\text{Co}(\text{TFDMH})_2$, TFDMH sa v danom systéme správa ako chelatačný ligand. Pre jednoznačné

určenie obsadenia koordinačných polôh, sme molekulu orientovali tak, že najdlhšie väzby Co-N ležia pozdĺž pomyslenej osi z. V tejto orientácii pripravený chelatačný ligand obsadil ekvatoriálnu polohu cez O -donorové atómy a zároveň Schiffova báza L^1 obsadila koordinačné miesta v axiálnych polohách cez N -donorové atómy. Kryštalografické údaje pre komplex **1** sú uvedené v Tab. 1.



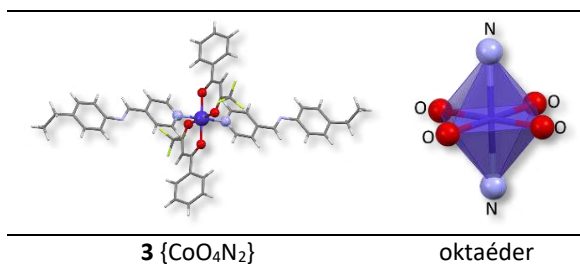
Obr. 2. Štruktúra komplexu **1** s vyňatým koordinačným polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8]. Farebný kód: šedá - uhlík, červená - kyslík, svetlo modrá - dusík, žltá - fluór, tmavo modrá - kobalt.

V prípade komplexu **2** bol ako zdroj centrálného atómu použitý pripravený komplex $\text{Co}(\text{TFACAC})_2$ obsahujúci chelatujujúci ligand TFACAC. Tento chelatujujúci ligand taktiež obsadil koordinačné miesta v ekvatoriálnych polohách cez O -donorové atómy. Tento komplex je zaujímavý, že tvorí viacero dizordérov. Pri jednom z nich dochádza k výraznejšej deformácii geometrie koordinačného polyédra, čo bolo potvrdené aj softvérom SHAPE. Kryštalografické údaje pre komplex **2** sú uvedené v Tab. 2.



Obr. 3. Štruktúra komplexu **2** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordinačným polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8].

Komplex **3** sa od prvých dvoch líši použitím chelatujujúcim ligandom. Ako centrálny atóm bol použitý pripravený chelatujujúci ligand TFFB. Ako N -donorový ligand bola použitá opäť Schiffova báza L^1 . Kryštalografické údaje pre komplex **3** sú uvedené v Tab. 3.

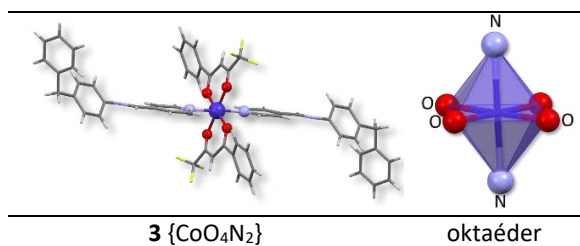


3 {CoO₄N₂}

oktaéder

Obr. 4. Štruktúra komplexu **3** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8].

Monokryštálová röntgenová analýza navyše potvrdila uskutočnenie substitučnej reakcie Co(TFFB)₂ pri príprave komplexu **4**. Tento Co(II) komplex je jednojadrový hexakoordinovaný s koordináčnym číslom $N_k = 6$. Od komplexu **3** sa líši použitím Schiffovej bázy L^2 ako N -donorového ligandu, ktorý sa naviazal v axiálnych polohách. Kryštalografické údaje pre komplex **4** sú uvedené v Tab. 4

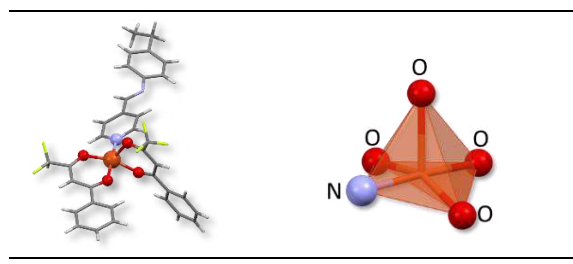


3 {CoO₄N₂}

oktaéder

Obr. 5. Štruktúra komplexu **4** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8].

Monokryštálová röntgenová analýza nám potvrdila, že štruktúry **5-8** sú jednojadrové Cu(II) komplexy. V prípade komplexu **5** monokryštálová röntgenová analýza odhalila, že sa jedná o pentakoordinovaný Cu(II) komplex aj napriek tomu, že bol zarábaný v pomere 2:2. Zdrojom centrálného atómu bol pripravený komplex Cu(TFFB)₂, ktorý obsahoval TFFB. Tento chelatujúci ligand obsadil koordináčne miesta v ekvatoriálnych polohách, aj v axiálnej cez O -donorové atómy. Ligand L^1 obsadil koordináčne miesto v ekvatoriálnej polohe cez N -donorový atóm pochádzajúci z pyridínu. Keďže sa jedná o pentakoordinovaný jednojadrový komplex na detailnejšiu štruktúrnú analýzu sme miesto D_{str} parametra použili Addisonov geometrický index τ . Kryštalografické údaje pre komplex **5** sú uvedené v Tab. 5.

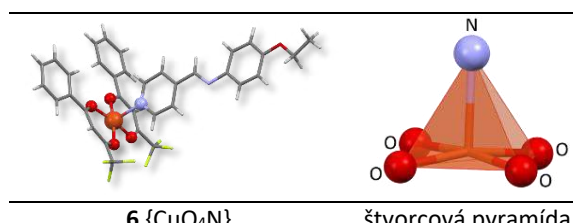


5 {CuO₄N}

štvorcová pyramída

Obr. 6. Štruktúra Cu(II) komplexu **5** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8]. Farebný kód: šedá - uhlík, červená - kyslík, svetlo modrá - dusík, žltá - fluór, oranžová - meď.

Komplex **6** a komplex **7** boli pripravené takmer identicky, líšia sa len použitým chelatujúcim ligandom. V prípade komplexu **6** bol použitý pripravený komplex Cu(TFFB)₂, kedy TFFB obsadil ekvatoriálne polohy cez O -donorové atómy. Monokryštálová röntgenová analýza odhalila, že sa opäť jedná o pentakoordinovaný Cu(II) komplex, pričom v axiálnej polohe sa nachádza Schiffova báza L^3 . Kryštalografické údaje pre komplex **6** sú uvedené v Tab. 6.

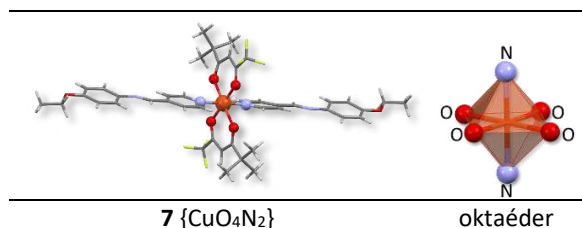


6 {CuO₄N}

štvorcová pyramída

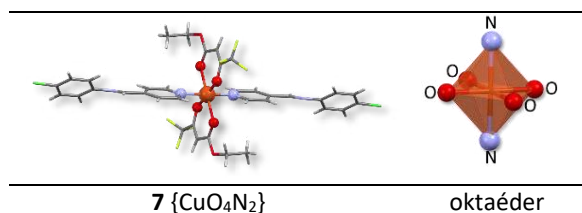
Obr. 7. Štruktúra komplexu **6** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8].

V prípade komplexu **7** bol ako centrálny atóm použitý pripravený komplex Cu(TFDMH)₂. Tento komplex bol pripravený úplne identicky ako komplex **6**, no aj napriek tomu sa líšia naviazaním N -donorového ligandu L^3 . Monokryštálová röntgenová analýza potvrdila predpoklad, že sa jedná o hexakoordinovaný jednojadrový Cu(II) komplex. V ekvatoriálnej polohe sú naviazané O -donorové atómy chelatujúceho ligandu asymetrického acetylacetonátu a v axiálnych polohách sú naviazané N -donorové atómy pochádzajúce zo Schiffových báz. Kryštalografické údaje pre komplex **7** sú uvedené v Tab. 7.



Obr. 8. Štruktúra komplexu **7** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8].

Komplex **8** bol pripravený reakciou $\text{Cu}(\text{TFACAC})_2$ so Schiffovou bázou L^4 . Monokryštálová röntgenová analýza nám potvrdila, že sa jedná o jednojadrový hexakoordinovaný $\text{Cu}(\text{II})$ komplex. Pripravený chelatujúci ligand obsadil koordináčne miesta v ekvatoriálnych polohách cez O -donorové atómy. Schiffova báza L^4 obsadila koordináčne miesta v axiálnych polohách cez N -donorové atómy tak, ako sme predpokladali. Kryštalografické údaje pre komplex **8** sú uvedené v Tab. 8.



Obr. 9. Štruktúra komplexu **8** s vyznačeným chromofórom a vyňatým koordináčnym polyédrom bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0 [8]. Farebný kód: šedá - uhlík, červená - kyslík, svetlo modrá - dusík, žltá - fluór, zelená - chlór, oranžová - meď.

Kryštalografické parametre	1
Stechiometrický vzorec	$\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{CoF}_6\text{N}_4\text{O}_4$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	869.79
Kryštalová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	$P 2_1/c$
Teplota /K	94.9
Veľkosť kryštálu /mm	$0.18 \times 0.14 \times 0.08$
Z	2
$a / \text{Å}$	9.9043(2)
$b / \text{Å}$	13.8029(3)
$c / \text{Å}$	15.9266(4)
$\alpha / ^\circ$	90
$\beta / ^\circ$	94.899(2)
$\gamma / ^\circ$	90
$V / \text{Å}^3$	2169.34(8)

$\rho_{\text{calc}} / \text{g cm}^{-3}$	1.332
Farba	Žltá

Tab. 1 Kryštalografické dáta pre komplex **1**
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	2
Stechiometrický vzorec	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{CoO}_{0.5}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	422.9
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová grupa	$P 1$
Teplota /K	100
Veľkosť kryštálu /mm	$0.227 \times 0.1 \times 0.066$
Z	2
$a / \text{Å}$	7.0055(17)
$b / \text{Å}$	10.1547(2)
$c / \text{Å}$	15.1647(4)
$\alpha / ^\circ$	102.366(2)
$\beta / ^\circ$	100.537(2)
$\gamma / ^\circ$	104.739(2)
$V / \text{Å}^3$	986.41(4)
$\rho_{\text{calc}} / \text{g cm}^{-3}$	1.4127
Farba	Žltá

Tab. 2 Kryštalografické dáta komplexu **2**
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	3
Stechiometrický vzorec	$\text{C}_{48}\text{H}_{40}\text{CoF}_6\text{N}_4\text{O}_4$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	909.77
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová grupa	$P 1$
Teplota /K	100.01(10)
Veľkosť kryštálu /mm	$0.102 \times 0.061 \times 0.03$
Z	1
$a / \text{Å}$	6.7066(6)
$b / \text{Å}$	12.4455(10)
$c / \text{Å}$	13.6753(7)
$\alpha / ^\circ$	72.979(6)
$\beta / ^\circ$	83.621(6)
$\gamma / ^\circ$	77.734(7)
$V / \text{Å}^3$	1065.07(15)
$\rho_{\text{calc}} / \text{g cm}^{-3}$	1.418
Farba	Žltá

Tab. 3 Kryštalografické dáta komplexu **3**
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	4
Stechiometrický vzorec	$\text{C}_{58}\text{H}_{44}\text{CoF}_6\text{N}_4\text{O}_4$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	1033.9

Kryštalová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	P 2 ₁ /n
Teplota /K	100.01(10)
Veľkosť kryštálu /mm	0.102 × 0.096 × 0.04
Z	2
a / Å	9.10620(12)
b / Å	9.40657(16)
c / Å	28.6215(5)
α /°	90
β /°	95.3197(14)
γ /°	90
V /Å ³	2441.10(7)
ρ _{calc} /g cm ⁻³	1.407
Farba	Oranžová

Tab. 4 Kryštalografické dáta komplexu 4

Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	5
Stechiometrický vzorec	C ₃₄ H ₂₆ CuF ₆ N ₂ O ₄
Molárna hmotnosť / g mol ⁻¹	704.11
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová grupa	P 1
Teplota /K	120.00(10)
Veľkosť kryštálu /mm	0.497 × 0.029 × 0.02
Z	2
a / Å	7.6243(3)
b / Å	13.0835(4)
c / Å	15.4950(5)
α /°	88.238(3)
β /°	81.884(3)
γ /°	87.105(3)
V /Å ³	1527.80(9)
ρ _{calc} /g cm ⁻³	1.531
Farba	Zelená

Tab. 5 Kryštalografické dáta komplexu 5

Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	6
Stechiometrický vzorec	C ₃₄ H ₂₆ CuF ₆ N ₂ O ₅
Molárna hmotnosť / g mol ⁻¹	720.11
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová grupa	P 1
Teplota /K	120.15
Veľkosť kryštálu /mm	0.137 × 0.045 × 0.02
Z	2
a / Å	8.4596(4)
b / Å	12.9421(6)
c / Å	15.3887(10)
α /°	82.219(5)

β /°	75.604(5)
γ /°	77.743(4)
V /Å ³	1588.64
ρ _{calc} /g cm ⁻³	1.505
Farba	Zelená

Tab. 6 Kryštalografické dáta komplexu 6

Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	7
Stechiometrický vzorec	C ₄₄ H ₄₈ CuF ₆ N ₄ O ₆
Molárna hmotnosť / g mol ⁻¹	906.40
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová grupa	P 1
Teplota /K	99.97(13)
Veľkosť kryštálu /mm	0.29 × 0.14 × 0.1
Z	2
a / Å	11.3993(6)
b / Å	12.9227(6)
c / Å	15.5832(6)
α /°	94.956(4)
β /°	93.214(4)
γ /°	105.870(4)
V /Å ³	2192.2
ρ _{calc} /g cm ⁻³	1.373
Farba	Zelená

Tab. 7 Kryštalografické dáta komplexu 7

Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	8
Stechiometrický vzorec	C ₁₈ H ₁₅ Cu _{0.5} F ₃ N ₂ O ₃
Molárna hmotnosť / g mol ⁻¹	431.5
Kryštalová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	P 2 ₁ /n
Teplota /K	100.01
Veľkosť kryštálu /mm	0.104 × 0.07 × 0.034
Z	4
a / Å	8.0374(2)
b / Å	14.0585(3)
c / Å	16.2947(3)
α /°	90
β /°	101.421(2)
γ /°	90
V /Å ³	1804.75(7)
ρ _{calc} /g cm ⁻³	1.5883
Farba	Zelená

Tab. 8 Kryštalografické dáta komplexu 8

Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

2.2 Diskusia

Pripravené komplexy **1-4** sú typickými predstaviteľmi jednojadrových kobaltnatých komplexov s koordinačným číslom $N_k = 6$. Hexakoordinované komplexy **1** a **4** kryštalizujú v monoklinickej kryštálovej sústave. Komplexy **2** a **3** kryštalizujú v triklinickej kryštálovej sústave. Chromofóry komplexov **1-4** $\{\text{CoO}_4\text{N}_2\}$ sú v axiálnych polohách tvorené dvomi atómami dusíka, ktoré poskytli Schiffove bázy L^1 (**1-3**) a L^2 (**4**) a štyrmi atómami kyslíka, ktoré do koordinácie dodali chelatujúce ligandy asymetrických acetylacetonátov.

Geometria koordinačných polyédrov bola detailnejšie študovaná pomocou softvéru SHAPE. V prípade komplexu **1** je hodnota OC-6 = 0,045. Pre komplex **2** je hodnota OC-6 = 0,080 a pre jeho dizorder OC-6 = 0,458. Pre komplex **3** a **4** sú hodnoty OC-6 = 0,086; 0,111 resp. Z týchto zistených údajov vyplýva, že komplexy **1-4** majú tvar geometrie koordinačného polyédra blízky tvaru ideálneho oktaédra. 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 pri komplexoch **1-4** sa geometria koordinačného polyédra deformuje z oktaédra na predĺženú tetragonálnu bipyramídu. Táto deformácia koordinačného polyédra bola potvrdená aj D_{str} parametrom [9].

Komplex	SHAPE-OC-6	D_{str} [pm]
1	0.045	1,55
2	0.080	1,2
2 dizorder	0,458	2,75
3	0.086	1,9
4	0.111	1,7

Tab. 9 Geometria koordinačných polyédrov komplexov **1-4** pomocou softvéru SHAPE a D_{str} parametra.

Komplexy **5** a **6** sú zástupcami jednojadrových pentakoordinovaných Cu(II) komplexov s koordinačným číslom $N_k = 5$. Tieto pentakoordinované komplexy kryštalizovali v triklinickej kryštálovej sústave. Chromofór komplexu **5** $\{\text{CuO}_4\text{N}\}$ je v ekvatoriálnej polohe tvorený atómom dusíka, ktorý poskytla Schiffova báza L^1 a tromi atómami kyslíka pochádzajúce z chelatujúceho ligandu asymetrického acetylacetonátu. V axiálnej polohe je naviazaný ostávajúci kyslík z O-donorového ligandu. Chromofór komplexu **6** je totožný s chromofórom komplexu **5** a teda $\{\text{CuO}_4\text{N}\}$. Rozdiel je v obsadení koordinačných miest príslušnými ligandmi. Príslušný chromofór je tvorený jedným atómom dusíka v axiálnej polohe,

ktorý poskytla Schiffova báza L^3 a štyrmi atómami kyslíka v ekvatoriálnych polohách, ktoré do koordinácie dodal ligand asymetrického acetylacetonátu.

Geometria koordinačných polyédrov bola ďalej detailnejšie študovaná softvérom SHAPE a pomocou Addisonovho geometrického indexu, keďže sa jedná o pentakoordinované Cu(II) komplexy. Pomocou softvéru SHAPE sa identifikovalo, že geometrie koordinačných polyédrov komplexov **5** a **6** sú blízke štvorcovej pyramíde. Vypočítaná hodnota pre komplex **5** je SPY-5 = 1,831 a pre komplex **6** je SPY-5 = 0,515. Následne sa koordinačné polyédre študovali pomocou Addisonovho geometrického indexu τ , ktorý sa vypočíta ako $\tau_5 = \beta - \alpha / 60^\circ$. V prípade komplexu **5** nadobudol geometrický index hodnotu $\tau_5 = 0,355$ a pre komplex **6** $\tau_5 = 0,06$. Keď je výsledná hodnota bližšie k 0, jedná sa o geometriu blízku štvorcovej pyramíde. Keď je hodnota bližšie k 1, geometria koordinačného polyédra je blízka trigonálnej bipyramíde. V tomto prípade majú obidva koordinačné polyédre tvar geometrie blízky ideálnej štvorcovej pyramídy.

Komplexy **7** a **8** sú predstaviteľmi jednojadrových hexakoordinovaných Cu(II) komplexov, ktorých koordinačné číslo je $N_k = 6$. Komplex **7** kryštalizuje v triklinickej kryštálovej sústave, zatiaľ čo komplex **8** kryštalizuje v monoklinickej sústave. Chromofóry komplexov **7** a **8** $\{\text{CoO}_4\text{N}_2\}$ sú v axiálnych polohách tvorené dvomi atómami dusíka, ktoré pochádzajú zo Schiffovej bázy L^3 (**7**) a L^4 (**8**) a v ekvatoriálnych polohách tvorené štyrmi atómami kyslíka, ktoré do koordinácie dodali pripravené chelatujúce ligandy asymetrických acetylacetonátov. Geometrie koordinačných polyédrov komplexov **7** a **8** boli ďalej študované pomocou softvéru SHAPE. Na základe vypočítaných hodnôt sa identifikovalo, že sa jedná o oktaédrické geometrie. V prípade komplexu **7** je hodnota OC-6 = 0,396 a v prípade komplexu **8** je hodnota OC-6 = 0,466.

Záver

Boli pripravených 6 nových dosiaľ nepublikovaných hexakoordinovaných komplexov Co(II) a Cu(II) a 2 pentakoordinované Cu(II) komplexy, ktoré sa charakterizovali metódami molekulovej spektroskopie.

Pri koordinačných polyédroch komplexov **1-4** možno pozorovať výraznejšiu deformáciu koordinačného polyédra typickú pre predĺženú tetragonálnu bipyramídu. Koordinačné polyédre komplexov **5** a **6** nadobúdajú tvar blízky štvorcovej pyramídy, pričom pri komplexe **5** pozorujeme výraznejšiu deformáciu

geomtrie. Komplexy **7** a **8** sú typické jednojadrové hexakoordinované Cu(II) komplexy, ktorých štruktúrna geometria bola potvrdená softvérom SHAPE a geometrie oboch komplexov sú blízke ideálnemu oktaédru. Tieto deformácie koordinačných polyédrov boli potvrdené štruktúrnym D_{str} parametrom a Addisonovym geometrickým indexom τ . Komplexy obsahujúce asymetrické acetylacetonáty predstavujú pomerne zriedkavú triedu koordinačných zlúčenín a existuje len obmedzené množstvo štúdií a publikovaných štruktúr tohto typu. Syntéza a detailná štruktúrna analýza predstavujú prvý krok v štúdiu magnetoštruktúrnych korelácií pripravených komplexov. Magnetické správanie pripravených komplexov bude študované v blízkej dobe.

PodĎakovanie

Autori ďakujú projektu VEGA 1/0191/22 a grantu: DAAD (Magnetoactive and photoactive compounds basen on 3d-4f complexes). Taktiež Mgr. Erike Samoľovej, PhD. za riešenie štruktúr pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie, ako aj pánovi doc. Lukášovi Kalinovi a pánovi Ing. Matějovi Březinovi, PhD. za poskytnutie laboratória a mikroskopu počas Erasmus štúdia na VUT Brno.

Použitá literatúra

- [1] DAWID MARCINOWSKI, ARIEL ADAMSKI, MACIEJ KUBICKI, GIUSEPPE CONSIGLIO, VIOLETTA PATRONIAK, TOMASZ ŚLUSARSKI, MUHAMMED ACIKGÖZ, DARINA SZELIGA, NAHIR VADRA, MIROSLAW KARBOWIAK, IRENEUSZ STEFANIUK, CZESLAW RUDOWICZ, ADAM GORCZYŃSKI, MARIA KORABIK. (2022). Understanding the effect of structural changes on slow magnetic relaxation in mononuclear octahedral copper(II) complexes. *Dalton Trans.*, 2022, **51**, 12055.
- [2] JIANJUN ZHOU, JINBO SONG, AIHUA YUAN, ZHENXING WANG, LEI CHEN, ZHONG-WEN OUYANG. (2018). Slow magnetic relaxation in two octahedral cobalt(II) complexes with positive axial anisotropy. *Inorganica Chimica Acta*. 2018, **479**, 119.
- [3] DONG SHAO, SHI-YUAN SHE, LIN -FENG SHEN, XIAODONG YANG, ZHENG FANG TIAN. (2022) Field-induced single-ion magnet behavior in a hydrogen-bonded supramolecular cobalt(II) complex. *Polyhedron*. 2022, **213**, 115614.

- [4] CYRIL RAJNÁK, JÁN TITIŠ, JÁN MONCOL, FRANZ RENZ, ROMAN BOČA. (2017) Field-Supported Slow Magnetic Relaxation in Hexacoordinate Co^{II} Complexes with Easy Plane Anisotropy. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2017, **11**, 1525.
- [5] ROMANA MIČOVÁ, CYRIL RAJNÁK, JÁN TITIŠ, ALINA BIEŇKO, JÁN MONCOL, ERIKA SAMOĽOVÁ, ROMAN BOČA. (2023) Easy-axis magnetic anisotropy in tetragonally elongated cobalt(II) complexes beyond the spin-Hamiltonian formalism. *Dalton Trans.*, 2023, **52** 7885.
- [6] ROMAN BOČA, RAJNÁK CYRIL, JÁN TITIŠ, DUŠAN VALIGURA. (2017). Field Supported Slow Magnetic Relaxation in a Mononuclear Cu(II) Complex. *Inorg. Chem.* 2017, **56**, 1482.
- [7] DUŠAN VALIGURA, CYRIL RAJNÁK, JÁN TITIŠ, JÁN MONCOL, ALINA BIEŇKO, ROMAN BOČA. (2022). Unusual slow magnetic relaxation in mononuclear copper(II) complex. *Dalton Trans.* 2022, **51**, 5612.
- [8] 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.
- [9] JÁN TITIŠ, ROMAN BOČA. (2011) Magnetostructural D Correlations in Hexacoordinated Cobalt(II) Complexes. *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11838.

Usporiadanie 1,3-diiminoizoindolových stavebných jednotiek v štruktúre nesymetrických ftalokyanínov

Arrangement of 1,3-diiminoisoindole building blocks in asymmetric phthalocyanines

Samuel Skalický – Zita Tokárová

Ústav chémie a environmentálnych vied (ÚChEV), FPV UCM v Trnave, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, e-mail: skalicky1@ucm.sk; samuelskalicky222@gmail.com

Abstrakt

Príspevok sa zaoberá vlastnosťami, syntézou a potenciálnym využitím asymetrických ftalokyanínov. Ftalokyaníny patria medzi intenzívne študované makrocyclické zlúčeniny, najmä z hľadiska ich fyzikálno-chemických vlastností, štruktúry a aplikačného potenciálu. Napriek tomu zostáva oblasť zaoberajúca sa usporiadaním stavebných izoindolových jednotiek v štruktúre ftalokyanínov ako aj ich symetrie a jej vplyvu na výsledné vlastnosti relatívne menej preskúmaná, čo predstavuje významný priestor pre ďalší výskum. Symetria týchto zlúčenín vychádza z usporiadania z minimálne dvoch rozdielnych izoindolových jadier, ktoré tvoria základ makrocyclického systému a zároveň, je podmienená využitím dvoch rôzne substituovaných (hetero)aromatických dinitrilov. Ak sa izoindolové jadrá označia ako A a B vznikajú možné štruktúrne typy ABAB, AABB, A₃B, B₃A, A₄ alebo B₄ ftalokyanínov. Každé z týchto usporiadaní môže viesť k odlišným elektronickým, optickým či koordinačným vlastnostiam. Súčasťou práce je aj štúdium ich prípravy, predovšetkým metódou krížovej cyklokondenzácie dinitrilov, ktorá patrí medzi najefektívnejšie syntetické prístupy v oblasti ftalokyanínovej chémie.

Kľúčové slová: ftalokyaníny; asymetria; symetria makrocyclického systému; 1,3-diiminoizoindolové jadrá; dinitrilové prekursor; krížová cyklokondenzácia

Abstract

The contribution deals with the properties, synthesis, and potential applications of asymmetric phthalocyanines. Phthalocyanines belong to intensively studied macrocyclic compounds, particularly from the perspective of their physicochemical properties, structure, and application potential. Despite this, the area concerning the arrangement of the constituent isoindole units within the structure of phthalocyanines, as well as their symmetry and its influence on the resulting properties, remains relatively less explored, which represents significant scope for further research. The symmetry of

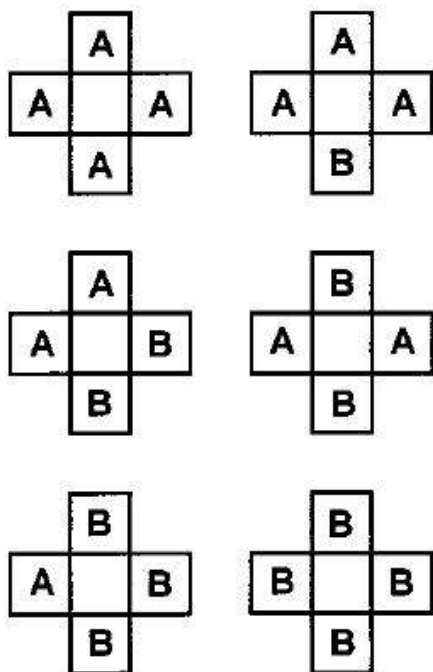
these compounds arises from the arrangement of at least two different isoindole cores that form the basis of the macrocyclic system and, at the same time, is conditioned by the use of two differently substituted (hetero)aromatic dinitriles. If the isoindole cores are denoted as A and B, possible structural types of phthalocyanines such as ABAB, AABB, A₃B, B₃A, A₄, or B₄ may be formed. Each of these arrangements may lead to distinct electronic, optical, or coordination properties. The work also includes the study of their preparation, primarily by the method of cross-cyclocondensation of dinitriles, which is among the most effective synthetic approaches in the field of phthalocyanine chemistry.

Keywords: phthalocyanines; asymmetry; macrocycle symmetry, 1,3-diiminoisoindoles; dinitrile precursors; cross-cyclocondensation

Úvod

Ftalokyaníny predstavujú významnú triedu makrocyclických organických zlúčenín. Ide o aromatické, vysoko konjugované systémy tvorené štyrmi izoindolovými jednotkami prepojenými prostredníctvom dusíkových atómov do rozsiahleho 18 π -elektrónového makrocyclického systému. Táto rozsiahla delokalizácia π -elektrónov je zodpovedná za ich typické intenzívne sfarbenie, výrazné absorpčné pásy v oblasti viditeľného a blízkeho infračerveného žiarenia a vysokú tepelnú odolnosť a inertnú povahu voči ďalším substrátom [1]. V centrálnom cykle dominuje prítomnosť dusíkových atómov, z ktorých štyri sú zároveň schopné koordinovať kovový ión, čím vznikajú metalftalokyaníny s rôznorodými elektronickými, katalytickými či fotofyzikálnymi vlastnosťami. Ďalšie štyri dusíkové atómy sa podieľajú na stabilizácii štruktúry vo forme N-mostíkových prepojení jednotlivých 1,3-diiminoizoindolových jadier [2]. Napriek rozsiahlemu výskumu vlastností a aplikácií ftalokyanínov oblasť nesymetrických derivátov výrazne zaostáva. Z veľkého množstva vedeckých výstupov sme v rámci našej rešerše zaznamenali len päťicu vedeckých prác venujúcich sa problematike nesymetrických ftalokyanínov (Obrázok 1) [3-7], pričom jedna z týchto

existujúcich prác je z našej vedeckej skupiny publikovaná v roku 2025 [7]. V nasledujúcej práci sa preto zameriavame práve na štúdium tejto málo preskúmanej symetrie a jej vplyvu na vlastnosti výsledných zlúčenín.



Obr. 1. Schématické znázornenie štruktúry nesymetrických ftalokyanínov podľa Torresa a kol. [3]

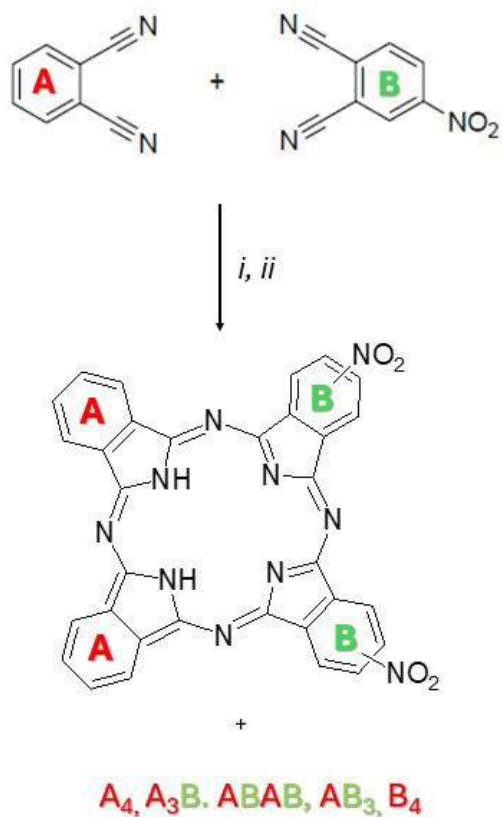


Schéma 1. Syntéza nesymetrických ftalokyanínov z dvoch rozdielnych ftalodinitrilov: nesubstituovaného ftalodinitrilu - A a *m*-nitroftalodinitrilu-B.

1 Materiály a metódy

Na prípravu boli použité modifikované postupy na syntézu ftalokyanínov podľa Cooka a Jafari-Finiho [5] a Dilbera a kol. [6] (podkapitola 1.1). Chemikálie: ftalonitril, 4-nitroftalonitril, *n*-hexán, dichlórmetán, dietyléter, chlorid sodný, etanol, izobutanol, *n*-butanol, sodík, ľadová kyselina octová.

Zariadenia: magnetická miešačka Heidolph, váhy RADWAG, duálna UV lampa CAMAG 254/366 nm, TLC 254F, silikagél 50 mesh, vákuová rotačná odparka HeiVac, prístroj na stanovenie teploty topenia BIOBASE.

1.1 Všeobecný postup syntézy nesymetrických ftalokyanínov

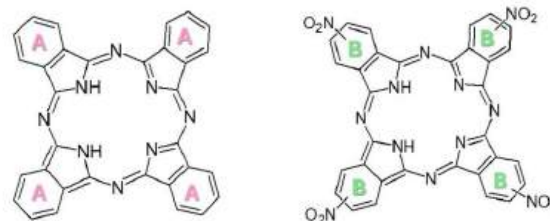
Reakcia (Schéma 1) ftalonitrilu ($2 \cdot 10^{-3}$ mol; 256 mg) a 4-nitroftalonitrilu ($2 \cdot 10^{-3}$ mol; 350 mg) prebiehala za chladenia v ľadovom kúpeli. Ako rozpúšťadlo sa použil *n*-butanol (15 ml). Do takto vychladenej reakčnej zmesi sa postupne pridával sodík (60 mg) za intenzívneho miešania a chladenia. Reakcia sa mala ešte miešať pri teplote 140 °C avšak nám už po 30 minútach sústavného chladenia reakčná zmes zmenila zafarbenie na hnedé a preto sme ďalej zmes neohrievali ale vyliali na 10 ml ľadovej kyseliny octovej (na zbavenie zvyškov nedoreagovaného sodíka). Extrakcia bola uskutočnená v *n*-hexáne, dichlórmetáne a dietylétere. Avšak ani touto variáciou rozpúšťadiel sa nepodarilo oddeliť 2 vrstvy. Do extrakčného lievika bolo nutné pridať chlorid sodný, ktorý umožnil oddeliť vodnú fázu od organickej. Vo vodnej fáze bol tiež náznak sfarbenia, a tak nasledovala druhá extrakcia vodnej fázy s chloridom sodným. Produkt z druhej extrakcie bol čistý, a tak sa odparil do sucha a nechal sa voľne kryštalizovať. Organická fáza bola čistená stĺpcovou kolónovou chromatografiou, využitím elučnej zmesi *n*-hexán : etanol / 8:2, z ktorej sme získali 7 frakcií.

2 Výsledky a diskusia

Symetria ftalokyanínov vyplýva zo spôsobu usporiadania štyroch stavebných jednotiek - 1,3-diiminoizoindolov, ktoré vytvárajú makrocyclický systém (Obrázok 2). Každá z týchto jednotiek vzniká z dinitrilového substrátu a počas skríženej cyklokondenzácie a následnej cyklotetramerizácie sa spoja do finálneho makrocyclického 18- π elektrónovo-konjugovaného systému [8].

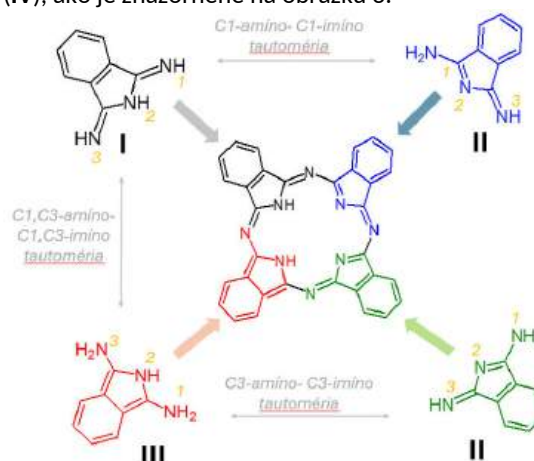
Ak sú všetky štyri použité prekurzory rovnaké, vzniká symetrická štruktúra typu A_4 resp. B_4 (Schéma 1, Obrázok 1). V takom prípade je molekula z hľadiska substitúcie rovnomerná a jej elektrónové rozloženie je relatívne homogénne. V našom prípade štruktúru symetrického ftalokyanínu A_4 reprezentuje štruktúra základného ftalokyanínu s obsahom 4 nesubstituovaných 1,3-diiminoizoindolových jednotiek (Obrázok 2a) zatiaľ čo druhá hraničná symetrická

štruktúra B_4 je vytvorená 4krát nitro-substituovanými stavebnými podjednotkami (Obrázok 2b).



Obr. 2a (vľavo): symetrický ftalokyanín typu A_4 so štyrmi nesubstituovanými 1,3-diiminoizoindolovými podjednotkami v cykle. Obr. 2b (vpravo): symetrický ftalokyanín B_4 s nitro-substitúciou.

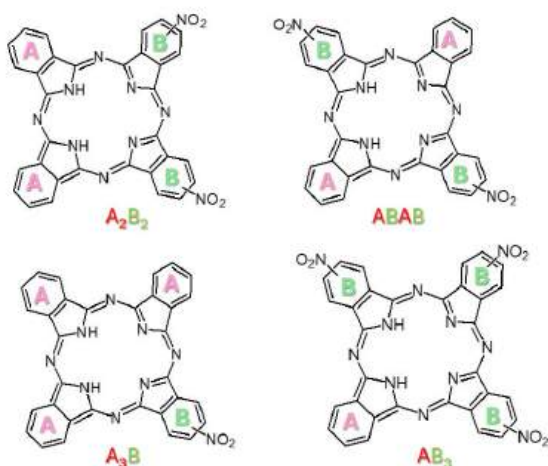
Pri nesymetrickom deriváte s obsahom nitrosubstituovaných jednotiek je potrebné zdôrazniť, že ešte aj v rámci molekuly výsledného ftalokyanínu môže mať rozdielnu symetriu z hľadiska pozície nitro skupiny (pozn. preto je $-NO_2$ skupiny formálne umiestnená medzi dva možné aromatické uhlíky, obr. 2b). Tento fakt však nateraz ostáva v našich prístupoch prehliadaný a budeme sa mu venovať až po úspešnom vyriešení syntézy a analýzy štruktúry získanej zo všetkých siedmich frakcií získaných čistením využitím kolónovej chromatografie. Aktuálne je potrebné zdôrazniť, že aj tvar 1,3-diiminoizoindolových podjednotiek v štruktúre ako symetrických tak aj nesymetrických ftalokyanínov je rozdielny. V dôsledku nevyhnutnosti vytvorenia aktívneho 18 π -elektrónového makrocyclického systému sa v stavebných fragmentoch uplatňuje aktívna amíno-imino tautómia a výsledný makrocyclický systém je kombináciou 1,3-diiminoizoindolu (I); 3-imino-3H-izoindol-1-ylamínu (II a III) a 2H-izoindol-1,3-diamínu (IV), ako je znázornené na obrázku 3.



Obr. 3. Konštrukcia ftalokyanínového skeletu ako kombinácia 1,3-diiminoizoindolových podjednotiek v roznej tautomérajnej forme vďaka prítomnosti $-NH_2 \rightleftharpoons NH$ substitúcie na C1 a C3 atónoch.

Asymetria ftalokyanínového derivátu vzniká vtedy, keď sa pri syntéze použijú dva rôzne typy prekurzorov

(označené ako A a B). Ich kombináciou počas reakcie môže dôjsť k vytvoreniu rôznych usporiadaní, napríklad ABAB, AABB, A₃B alebo B₃A (Obrázok 4). Rozdielne rozmiestnenie substituentov na makrocycly vedie k zmene lokálnej elektronickej hustoty, polarite molekuly či schopnosti agregácie. Aj keď je základný makrocyclický skelet rovnaký, už samotné poradie jednotiek v kruhu môže ovplyvniť výsledné fyzikálno-chemické vlastnosti. Z tohto dôvodu je mimoriadne dôležité skúmanie a jednoznačný popis štruktúry ftalokyanínov.



Obr. 4. Možné kombinácie štruktúry pre nesymetrické ftalokyaníny získané skříženou cyklokondenzáciou ftalodinitrilu a nitro-substituovaného ftalonitrilu (podľa schémy 1).

Takéto štúdium, napriek existencii nespočítateľného množstva publikácií a významu ftalokyanínov v oblasti materiálnej chémie, medicíny ale aj základnej organickej chémii doteraz chýba. Preto je našim aktuálnym cieľom priniesť ucelené poznatky o štruktúre nesymetrických ftalokyanínov z hľadiska usporiadania ich stavebných podjednotiek, syntetickej dostupnosti a výskumu fyzikálno-chemických vlastností. Výber substrátov, predovšetkým nitrosubstituovaného ftalonitrilu (označeného ako B) nie je náhodný. Nitroskupina je vhodným substrátom na ďalšiu substitúciu v prospech zavedenia alkylového zvyšku, malej biomolekuly ako napríklad aminokyseliny, monosacharidového zvyšku alebo inej biorganickej zlúčeniny v prospech lepšej rozpustnosti a biokompatibility. Vzhľadom na to, že aktuálna práca je súčasťou a pokračovaním výskumu intenzívne venovanému dizajnu a príprave práve ftalokyanínových derivátov s potenciálom účinku ako fotosenzibilátorov vo fotodynamickej terapii, zvýšenie biokompatibility je cieľené. V predchádzajúcich prácach bol však význam ako nitro-substitúcie tak aj symetrie ftalokyanínov málo preštudovaný, aj napriek tomu, že sa podarilo pripraviť niekoľko potenciálnych

zlúčenín pre potreby fotodynamickej terapie [9-11] s pozitívnym in-vitro testovaním na vybrané kmene malígnych buniek [12].

Záver

Práca sa zaoberá chemickou podstatou ftalokyanínov so zameraním na ich štruktúru, syntézu a najmä symetriu makrocyclického systému. Ukázali sme, že rozdielne usporiadanie stavebných jednotiek vedie k vzniku symetrických a asymetrických štruktúr, ktoré môžu vykazovať odlišné vlastnosti. Práca sa odvíjala od predošlých výsledkov členov skupiny mojej školiteľky. Aktuálne sú naše experimentálne snahy smerované k modifikácii syntetických postupov v prospech izolácie takej reakčnej zmesi, z ktorej by boli izolovateľné všetky možné štruktúrne modifikácie a pomer ich zastúpenia v reakčnej zmesi. Cieľom je úplná charakterizácia štruktúry pre izolované regioizoméry ftalokyanínov znázornených na Obr. 2 a 4. Dosiachnutie plánovaných výsledkov je predpokladaný v horizonte roka, kedy sa stanú súčasťou záverečnej bakalárskej práce.

Poďakovanie

Práca vzniká s finančnou podporou projektu KEGA: 009UCM-4/2024.(Inovácia vzdelávacieho procesu na bakalárskom a magisterskom študijnom programe Biomedicínska chémie) a projektu WATCH, NFP401101C229 (Spoločnosť v zrkadle vody).

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] INABE, Tamotsu a TAJIMA, Hiroyuki (2006). Phthalocyanines – Versatile Components of Molecular Conductors. *Chemical Reviews*, roč. 2006, č. 104, s. 5503-5533. DOI: 10.1021/cr030649x.
- [2] WU, Yongzhong a kol. (1998). Synthesis and Properties of Soluble Metal-free Phthalocyanines Containing Tetra- or Octa-alkyloxy Substituents. *Dyes and Pigments*, roč. 1998, č. 37, s. 317-325. doi: 10.1016/S0143-7208(97)00070-3.
- [3] de la TORRE, Gemma – CLAESENS, Christian G. – TORRES, T (2000). Phthalocyanines: The need for selective synthetic approach. *European Journal of Organic Chemistry*, roč. 2000, č. -, s. 2821-2830. DOI:10.1002/1099-0690(200008)2000:16<2821.
- [4] NEMYKIN, Víctor N. a kol., (2014). Synthetic approaches to asymmetric phthalocyanines and their analogues. *Arkivoc*, roč. 2014, č. 1, s. 142-204. DOI: 10.3998/ark.5550190.p008.412.
- [5] COOK, M. J. a JAFARI-FINI, A. (2000) Phthalocyanine-related macrocycles: Cross-cyclotetramerisation products from 3,4-dicyanothiophenes, 2,3-dicyanothiophenes and 3,6-dialkylphthalonitriles. *Tetrahedron*, roč. 2000, č. 56, s. 4085-4094. DOI: 10.1016/S0040-

4020(00)00323-9.

- [6] DILBER, G. a kol. (2022). Asymmetrically tetra-substituted phthalocyanine derivatives: synthesis, photophysical and photochemical properties. *Transition Metal Chemistry*, roč. 2022, č. 47, s. 157-168- DOI: 10.1007/s11243-022-00499-3.
- [7] KENDROVÁ, Dominika a kol., (2024). The Influence of the Isosteric Exchange of Benzene by Thiophene-Core of Phthalocyanine: The Synthesis, Structure and Opto-Electronic Behavior of π -Conjugated Unit Blocks in Materials. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, roč. 2024, č. 62, s. 13-24. DOI: 10.1002/jhet.4954.
- [8] OLIVER, S. W a SMITH, T. D. (1987). Oligomeric cyclization of dinitriles in the synthesis of phthalocyanines and related compounds: The role of alkoxide anion. *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction II*, roč. 1987, č. -, s. 1579-1582. DOI: 10.1039/P29870001579
- [9] KENDROVÁ, Dominika (2022). *Organická chémia ako nástroj pre dizajn a syntézu fotoaktívnych zlúčenín pre potreby fotodynamickéj terapie*. Bakalárska práca. FPV UCM v Trnave, 83 s.
- [10] KENDROVÁ, Dominika (2024). Vývoj nových typov mono-/di-/tri- a tetrapyrolov s perspektívou výskumu/aplikácie vo fotodynamickéj terapii a príbuzných oblastiach. Diplomová práca FPV UCM v Trnave, 112 s.
- [11] MÁLIKOVÁ, Natália (2025). Nové metódy syntézy fotoaktívnych ftalokyanínov s aplikačným potenciálom vo fotodynamickéj terapii. Bakalárska práca FPV UCM v Trnave, 74 s.
- [12] MÁLIKOVÁ, Natália (2026). In-vitro testovania proradikálovej aktivity hemiftalokyanínu. Nepublikované výsledky.

Jednojadrové hexakoordinované komplexy Fe(III) so Schiffovými bázami obsahujúcimi tetrahydrofuranový kruh

Mononuclear hexacoordinate Fe(III) complexes with Schiff bases containing a tetrahydrofuran ring

Vanessa Šušuková¹ – Cyril Rajnák² – Erika Samoľová³ – Ján Moncol⁴ – Franz Renz⁵

^{1,2}Oddelenie chémie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

³Fyzikálny ústav, AV ČR v Prahe, Cukrovarnická 10, 162 00 Praha,

⁴Inštitút anorganickej chémie, technológií a materiálov, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

⁵Inštitút koordinačnej chémie, Leibniz University Hannover, Callinstrasse 1, 30167 Hannover

¹ susukova1@ucm.sk, ² cyril.rajnak@ucm.sk, ³ samolova@fzu.cz, ⁴ jan.moncol@stuba.sk, ⁵ franz.renz@kci.uni-hannover.de

Abstrakt

Práca sa zameriava na syntézu a charakterizáciu jednojadrových Fe(III) komplexov so Schiffovými bázami odvodenými od salicylaldehydu a jeho derivátov obsahujúcich tetrahydrofuranový heterocyklus viazaný cez imínovú skupinu. Pripravených bolo šesť komplexov (1-6) s ligandmi L¹-L⁵. Molekulová štruktúra a kryštalografické parametre všetkých zlúčenín boli určené monokryštálovou röntgenovou difraktometriou, ktorá potvrdila vznik hexakoordinovaných oktaedrických komplexov. Koordináčnne prostredie tvorili donorové atómy O,N Schiffovej bázy doplnené o halogenidy, respektíve molekulu vody. Na rozdiel od pentakoordinovaných Fe(III) komplexov s furfurylamínom, popísaných v literatúre, použitie tetrahydrofurfurylamínu viedlo výhradne k hexakoordinovaným komplexom.

Kľúčové slová: Schiffove bázy, jednojadrové, Fe³⁺ komplexy

Abstract

The work focuses on the synthesis and characterization of mononuclear Fe (III) complexes with Schiff bases derived from salicylaldehyde and its derivatives containing a tetrahydrofuran heterocycle linked via an imine group. Six complexes (1-6) with ligands L¹-L⁵ were prepared. The molecular structure and crystallographic parameters of all compounds were determined by single crystal X-ray diffractometry, which confirmed the formation of hexacoordinated octahedral complexes. The coordination environment was formed by donor atoms O, N of the Schiff base and

supplemented with halides or a water molecule, respectively. In contrast to the pentacoordinated Fe(III) complexes with furfurylamine described in the literature, the use of tetrahydrofurfurylamine led exclusively to hexacoordinated complexes.

Key Words: Schiff base, mononuclear, Fe³⁺ complexes

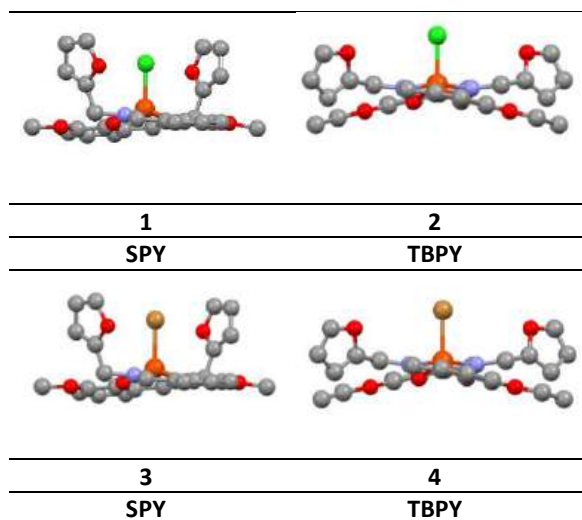
Úvod

Schiffove bázy odvodené od furfurylamínu a salicylaldehydu, resp. jeho substituovaných derivátov, tvoria s iónmi prechodných kovov jednojadrové až trojjadrové komplexy s rôznymi koordináčnymi číslami a geometriami čo sa následne odráža v ich rozmanitých fyzikálno-chemických vlastnostiach [1-7].

Osobitnú pozornosť si zasluhujú železité komplexy. V závislosti od charakteru ligandového poľa a sterických faktorov dochádza prednostne k formovaniu pentakoordinovaných štruktúr. Takéto komplexy môžu vykazovať zaujímavé magnetické javy. Medzi príklady patria zlúčeniny [Fe^{III}(L^{MeO})₂Cl] a [Fe^{III}(L^{MeO})₂Br], pri ktorých bola pozorovaná pomalá magnetická relaxácia (Tab. 1). Použitý ligand bol L^{MeO} = 2-[(furan-2-ylmetylimino)-metyl]-6-metoxi-fenol. V komplexe [Fe^{III}(L^{MeO})₂Cl], boli identifikované tri odlišné kanály pomalej magnetickej relaxácie s rozdielnymi relaxačnými časmi: $\tau_{LF} = 0,47$; $\tau_F = 13$ ms a $\tau_{HF} = 26$ μ s pri statickom magnetickom poli $B_{DC} = 0,2$ T a teplote $T = 1,9$ K. V komplexe [Fe^{III}(L^{MeO})₂Br], boli pozorované dva relaxačné kanály, $\tau_{LF} = 0,30$ ms a $\tau_{HF} = 139$ μ s pri $B_{DC} = 0,15$ T a $T = 1,9$ K. V komplexe [Fe(L⁵)(NCSe)], kde L⁵ = 3-EtO-salpet, bola potvrdená pomalá magnetická relaxácia spolu s javom spinového prechodu

sprevádzaný termochromizmom [8-10].

V prípade použitia ligandov, odvodených od tetrahydrofurfurylamínu, sa preferenčne formujú hexakoordinované Fe(III) komplexy s oktaedrickým usporiadaním. Táto oblasť zostáva relatívne málo preskúmaná a predstavuje perspektívny smer ďalšieho výskumu, pretože doterajšie štúdie sa sústreďujú najmä na komplexy medi, skúmané z hľadiska biologických účinkov, pričom železité komplexy by mohli potenciálne prejavovať zaujímavé magnetické vlastnosti podobne ako ich pentakoordinované analógy s furfurylamínom.



Tab. 1 Vybrané komplexy Fe(III) [8, 9]. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené.

1 Materiály a metódy

1.1 Chemikálie

Všetky zakúpené reaktanty a rozpúšťadlá boli použité bez ďalšej purifikácie a sušenia. Konkrétne: salicylaldehyd (98 %); 5-bromosalicylaldehyd (99 %); 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (97 %); 3,5-dichlorosalicylaldehyd (99 %); 4-metoxysalicylaldehyd (99 %); tetrahydrofurfurylamín (97 %); FeCl₂·4H₂O (98 %); FeCl₃·4H₂O (98 %); FeBr₂ (98 %); acetonitril (99,5 %) a DMF (99 %) Manipulácia s chemikáliami, ako aj reakcie prebiehali za prítomnosti vzduchu. Produkty sa získali odparením rozpúšťadla.

1.2 Meracie techniky

Izolované kryštály pripravených komplexov **1-6** boli skúmané metódami molekulovej spektroskopie (UV - VIS, FTR - IČ). Zber údajov pre štruktúry **1-6**, sa

prebiehal pomocou difraktometra SuperNova s použitím CCD detektora Atlas S2 so zrkadlovo kolimovaným CuK α žiarením ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$). Štruktúry boli vyriešené pomocou programu Superflipprogram a spresnené pomocou metódy štvorcov Independent AtomModel (IAM) v Shelxl (ver. 2018/3). Prvková analýza bola realizovaná na prístroji Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific). Teploty topenia boli stanovené termomikroskopickou metódou na Koeflerovom bloku - Biobase (Melting Point Apparatus). Geometrie chromofórov boli vypočítané pomocou programu SHAPE 2.1. Na analýzu deformácie koordinačného polyédra hexakoordinovaných komplexov bol použitý program OctaDist, pričom boli stanovené parametre ζ , Δ , Σ a θ kvantifikujúce odchýlky od ideálneho oktaédra.

1.3 Príprava komplexov 1-4

Ligand **L**¹ bol pripravený v prostredí acetonitrilu (10 ml), reakciou 5-bromosalicylaldehydu (1 mmol) s tetrahydrofurfurylamínom (1 mmol), pričom pre ligand **L**² bol 5-bromosalicylaldehyd nahradený salicylaldehydom (1 mmol). Reakčné zmesi sa miešali 30 min pri 90 °C, následne k nim bola pridaná príslušná soľ: FeBr₂ (0,5 mmol; **1, 3**) resp. FeCl₂·4H₂O (0,5 mmol (**2**)). Po pridaní soli sa farba zmesi zmenila zo žltej na čiernu a zmes sa ďalej miešala 180 minút.

Rovnakým spôsobom bol pripravený aj komplex **4**, ktorého ligand **L**³ bol tvorený 4-metoxysalicylaldehydom (1 mmol) a tetrahydrofurfurylamínom (1 mmol). Zdrojom centrálného atómu bola soľ FeCl₃·4H₂O (0,5 mmol). Pripravené reakčné zmesi sa prefiltrovali a nechali voľne kryštalizovať. Po 5 dňoch vznikli kryštály čiernej farby, ktoré boli ďalej charakterizované.

1.4 Príprava komplexu 5

Ligand **L**⁴ bol pripravený kondenzačnou reakciou 5-bromo-3-metoxysalicylaldehydu (1 mmol) s tetrahydrofurfurylamínom (1 mmol), v prostredí acetonitrilu (10 ml). Reakčná zmes sa miešala po dobu 30 min pri teplote 90 °C. Zdrojom centrálného atómu bola soľ FeBr₂ (0,5 mmol). Po pridaní soli sa zmes miešala 12h. Po ukončení reakcie sa zmes prefiltrovala a nechala voľne odpariť. Po dvoch dňoch vznikli kryštály čiernej farby, ktoré boli ďalej charakterizované.

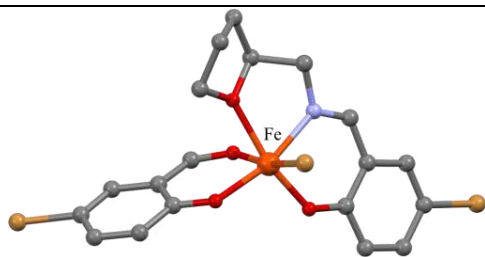
1.5 Príprava komplexu 6

Komplex **6** bol pripravený Schiffovou kondenzačnou reakciou 3,5-dichlorosalicylaldehydu (1 mmol) s tetrahydrofurfurylamínom (1 mmol) v prostredí DMF (10 ml). Reakčná zmes sa miešala po dobu 30 min pri

teplote 90 °C. Zdrojom centrálného atómu bola soľ $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mmol). Po pridaní soli sa zmes miešala 180 min. Po ukončení reakcie sa zmes prefiltrovala a nechala voľne odpariť. Po približne mesiaci, vznikli kryštály čiernej farby, ktoré boli ďalej charakterizované.

2 Výsledky

Komplex **1** s chromoforom $\{\text{FeNO}_4\text{Br}\}$, kryštalizoval v monoklinickej kryštálovej sústave. Atóm Fe(III) je v ekvatoriálnej polohe koordinovaný tromi atómami kyslíka a jedným atómom dusíka. Axiálne polohy obsadzujú atóm kyslíka a atóm brómu uzatvárajúci koordináciu. Priemerná dĺžka väzby medzi centrálnym atómom železa a atómami kyslíka je 2,015 Å. Najdlhšia väzba sa nachádza medzi Fe-Br, s dĺžkou 2,473 Å, zatiaľ čo najkratšia väzba, s dĺžkou 1,89 Å, patrí väzbe Fe-O, kde kyslík pochádza z hydroxylovej funkčnej skupiny voľne naviazaného salicylaldehydu. Prvková analýza teo.: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Br}_3\text{FeNO}_4$ ($M = 310,15$ g/mol): C, 34,87; H, 2,62; N, 2,14; exp.: C, 35,43; H, 2,67; N, 2,46 %. Štruktúra a príslušné štruktúrne parametre sú uvedené v tabuľke 2.

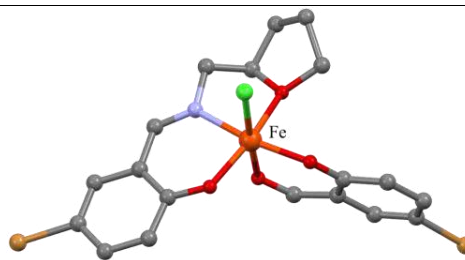


Štruktúrne parametre	1
Sumárny vzorec	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Br}_3\text{FeNO}_4$
Molárna hmotnosť g/mol)	618.9
Veľkosť kryštálu (mm)	$0.21 \times 0.14 \times 0.08$
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová mriežka	C2/c
Teplota (K)	95
a, b, c (Å)	18.5688 (3), 19.4877 (4), 14.5566 (3)
α, β, γ (°)	129.616 (3)
V (Å ³)	4057.8 (2)
Z	8
μ (mm ⁻¹)	13.11

Tab. 2 Štruktúrne parametre komplexu **1**. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené.

Zdroj: [11]

Komplex **2** s chromoforom $\{\text{FeNO}_4\text{Cl}\}$, kryštalizoval v triklinickej kryštálovej sústave. V základnej bunke sa nachádzali dve komplexné jednotky (FeA a FeB), ktoré sú značne dizordované. Centrálny atóm Fe(III) je v ekvatoriálnej polohe koordinovaný trojicou atómov kyslíka a atómom dusíka pochádzajúcim z imínovej väzby. Axiálnu polohu obsadzujú kyslík z aldehydovej funkčnej skupiny a atóm chlóru z anorganickej soli. Komplex je štruktúrne podobný s komplexom **1**, líšiaci sa typom halogenidového ligandu. Priemerná dĺžka väzieb Fe-O bola 2,028 Å (FeA), 2,023 Å (FeB), čo naznačuje, že obe jednotky sú si veľmi podobné, ale nie identické. Najdlhšia väzba sa nachádza medzi centrálnym atómom železa a atómom chlóru, s hodnotou 2,303 Å pre FeA a 2,285 Å pre FeB. Prvková analýza teo.: $\text{C}_{38}\text{H}_{32}\text{Br}_4\text{Cl}_2\text{Fe}_2\text{N}_2\text{O}_8$, ($M = 1147,58$ g/mol): C, 39,80; H, 2,81; N, 2,44; exp.: C, 39,76; H, 2,97; N, 2,60 %. Štruktúra a príslušné štruktúrne parametre sú uvedené v tabuľke 3.

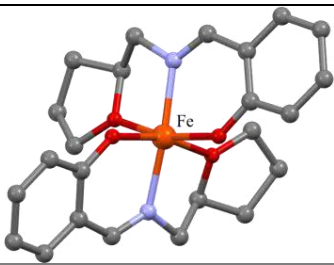


Štruktúrne parametre	2
Sumárny vzorec	$\text{C}_{38.06}\text{H}_{31.90}\text{Br}_4\text{Cl}_2\text{Fe}_2\text{N}_2\text{O}_8$
Molárna hmotnosť g/mol)	1147.58
Veľkosť kryštálu (mm)	$0.22 \times 0.16 \times 0.14$
Kryštálová sústava	triklinická
Priestorová mriežka	P-1
Teplota (K)	95
a, b, c (Å)	12.70745 (13), 12.83864 (14), 14.40749 (15)
α, β, γ (°)	111.7031 (10), 105.0858 (9), 94.8404 (9)
V (Å ³)	2065.46 (4)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	11.80

Tab. 3 Štruktúrne parametre komplexu **2**. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené.

Zdroj: [11]

Komplex **3** s chromoforom {FeN₂O₄}, kryštalizoval v triklinickej kryštálovej sústave. V základnej bunke sa nachádzajú dve komplexné jednotky a oxo-dimér Fe(III). Dimér nie je súčasťou koordinačnej sféry komplexu, ale slúži na vyrovnanie náboja. Centrálny atóm komplexného katiónu Fe(III) je koordinovaný dvomi tridentátnymi ligandmi, pričom ekvatoriálna poloha je obsadená štvoricou atómov kyslíka, z ktorých dva pochádzajú z furánového heterocyklu a dva z hydroxylových funkčných skupín. V axiálnej polohe sa koordinuje dvojicou atómov dusíka pochádzajúcich z imínovej väzby príslušnej Schiffovej bázy. Priemerná dĺžka väzieb Fe-O dosahuje 2,012 Å pre komplexnú jednotku Fe1 a 2,009 Å pre jednotku Fe2. Priemerná hodnota väzby Fe-N je v oboch prípadoch totožná s hodnotou 2,083 Å. Štruktúra a vybrané štruktúrne parametre komplexu **3** sú uvedené v tabuľke 4.

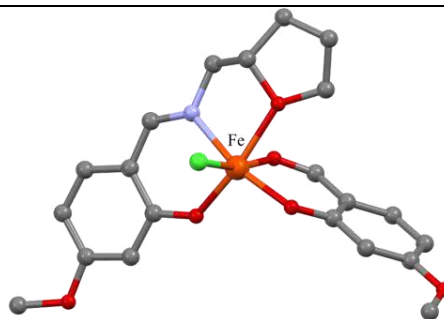


Štruktúrne parametre	3
Sumárny vzorec	C ₄₈ H ₅₅ Br ₆ Fe ₄ N ₄ O ₉
Molárna hmotnosť (g/mol)	1534.82
Veľkosť kryštálu (mm)	0.12 × 0.10 × 0.08
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová mriežka	P-1
Teplota (K)	100
a, b, c (Å)	11.6134 (4), 16.0499 (5), 16.2046 (4)
α, β, γ (°)	104.277 (2), 103.470 (3), 101.536 (3)
V (Å ³)	2738.38 (14)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	13.92

Tab. 4 Štruktúrne parametre komplexu **3**. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka a oxo-dimér boli pre prehľadnosť odstránené.

Zdroj: [11]

Komplex **4** s chromoforom {FeNO₄Cl}, kryštalizoval v triklinickej kryštálovej sústave. Štruktúra komplexu vykazuje čiastočnú distorziu, pričom centrálny atóm Fe(III) je v ekvatoriálnej rovine koordinovaný tromi atómami kyslíka a jedným atómom dusíka pochádzajúcim z imínovej väzby. Axiálne pozície sú obsadené atómom chlóru z príslušnej anorganickej soli a atómom kyslíka z aldehydovej skupiny. Najväčšia dĺžka väzby bola pozorovaná pre väzbu Fe-Cl s hodnotou 2,315 Å, zatiaľ čo najkratšia zodpovedá väzbe Fe-O pochádzajúcej z hydroxylovej skupiny voľne viazaného salicylaldehydu. Priemerná hodnota väzieb Fe-O dosahuje 2,012 Å. Kryštalová štruktúra spolu s vybranými štruktúrnymi parametrami je uvedená v tabuľke 5.



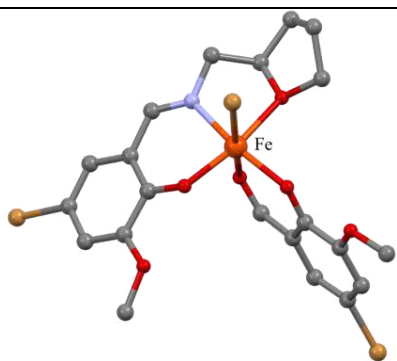
Štruktúrne parametre	4
Sumárny vzorec	C ₂₁ H ₂₃ ClFeNO ₆
Molárna hmotnosť (g/mol)	476.72
Veľkosť kryštálu (mm)	0.14 × 0.08 × 0.02
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová mriežka	P-1
Teplota (K)	100
a, b, c (Å)	8.5571 (2), 9.5949 (3), 14.4711 (4)
α, β, γ (°)	92.891 (2), 105.650 (2), 115.036 (3)
V (Å ³)	1017.98 (6)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	7.49

Tab. 5 Štruktúrne parametre komplexu **4**. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené.

Zdroj: [11]

Komplex **5** s chromoforom {FeNO₄Br}, kryštalizoval v ortorombickej kryštálovej sústave. Komplex je

hexakoordinovaný $N_k = 6$ a centrálny atóm železa sa koordinuje štyrmi atómami kyslíka, jedným atómom dusíka pochádzajúci z imínovej väzby a koordináciu uzatvára atóm brómu pochádzajúci z príslušnej anorganickej soli. Najväčšia hodnota dĺžky väzby bola zaznamenaná pre väzbu Fe-Cl s hodnotou 2,4589 Å. Najkratšia dĺžka 1,902 Å prislúcha väzbe Fe-O, pričom koordinovaný atóm kyslíka pochádza z hydroxylovej skupiny príslušného salicylaldehydu. Priemerná dĺžka väzby medzi Fe-O bola 2,029 Å. Väzba Fe-N mala dĺžku 2,107 Å. Štruktúra komplexu ako aj príslušné štruktúrne parametre sú uvedené v tabuľke 6.

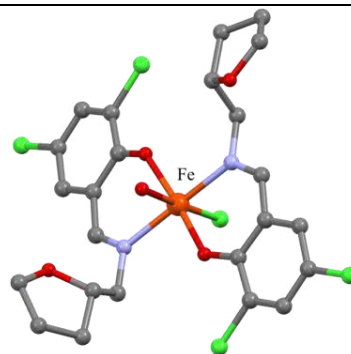


Štruktúrne parametre	5
Sumárny vzorec	$C_{21}H_{21}Br_3FeNO_6$
Molárna hmotnosť (g/mol)	678,95
Veľkosť kryštálu (mm)	$0.49 \times 0.04 \times 0.03$
Kryštalová sústava	ortorombická
Priestorová mriežka	Pbca
Teplota (K)	100
a, b, c (Å)	20.2862 (2), 8.1240 (1), 27.6200 (3)
α, β, γ (°)	90, 90, 90
V (Å ³)	4551.91 (9)
Z	8
μ (mm ⁻¹)	11.83

Tab. 6 Štruktúrne parametre komplexu 5. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené. Zdroj: [11]

Komplex 6 s chromoforom $\{FeN_2O_3Cl\}$ kryštalizoval v triklinickej kryštálovej sústave. V bunke sa nachádzajú dve komplexné jednotky. Na rozdiel od komplexov 1-5 sa spôsob väzby centrálnemu atómu v tomto prípade odlišuje. Koordináčny polyéder je tvorený dvomi

atómami kyslíka a dvomi atómami dusíka pochádzajúcimi z príslušnej Schiffovej zásady. Piatym donorovým atómom je atóm chlóru, ktorý pochádza z použitej anorganickej soli. Koordináčnú sféru uzatvára tretí atóm kyslíka z molekuly vody. Voda môže pochádzať z hydrátu použitej soli, alebo zo vzdušnej vlhkosti. V jednotke Fe1 je najkratšia väzba Fe-O 1,916 Å, ktorá patrí kyslíku z hydroxylovej funkčnej skupiny voľne viazaného salicylaldehydu, zatiaľ čo najdlhšia Fe-Cl dosahuje 2,346 Å. Priemerná dĺžka väzieb medzi železom a atómami kyslíka je 2,018 Å. V prípade Fe2 je najkratšia Fe-O väzba 1,924 Å, taktiež pochádzajúca z hydroxylovej skupiny voľne viazaného salicylaldehydu, pričom najdlhšia Fe-Cl dosahuje 2,340 Å. Priemerná vzdialenosť medzi centrálnym atómom a kyslíkovými donorovými atómami je 2,021 Å. Štruktúra ako aj príslušné štruktúrne parametre pre komplex 6 sú uvedené v tabuľke 7.



Štruktúrne parametre	6
Sumárny vzorec	$C_{24}H_{26}Cl_5FeN_2O_5$
Molárna hmotnosť (g/mol)	686.36
Veľkosť kryštálu (mm)	$0.28 \times 0.25 \times 0.18 \times 0.40$
Kryštalová sústava	triklinická
Priestorová mriežka	P-1
Teplota (K)	100
a, b, c (Å)	13.5616 (3), 14.3336 (3), 16.9118 (3)
α, β, γ (°)	108.3789 (17), 98.3468 (17), 99.7737 (16)
V (Å ³)	3004.27 (11)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	8.46

Tab. 7 Štruktúrne parametre komplexu 6. Štruktúra bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0. Atómy vodíka boli pre prehľadnosť odstránené. Zdroj: [11]

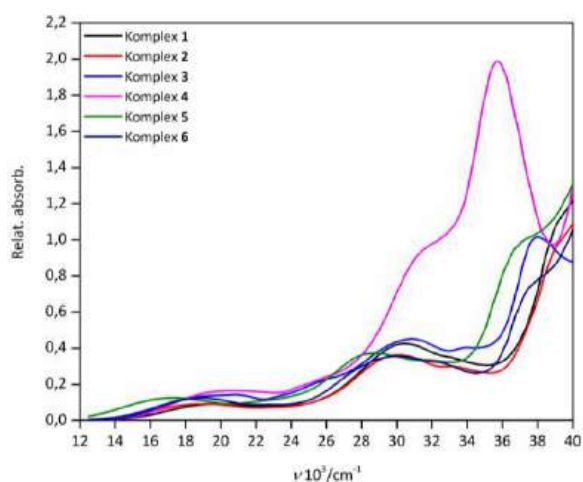
{FeNO ₄ Br}	{FeNO ₄ Cl}	{FeN ₂ O ₄ }
1,436 (OC-6)	1,186 (OC-6); 1,345 (OC-6)	1,417 (OC-6); 1,136 (OC-6)
1	2	3
{FeNO ₄ Cl}	{FeNO ₄ Br}	{FeN ₂ O ₃ Cl}
0,917 (OC-6)	1,489 (OC-6)	0,713 (OC-6); 0,729 (OC-6)
4	5	6

Tab. 8 Vyňaté koordinačné polyédre komplexov **1-6**. Koordinačné polyédre boli vykreslené pomocou programu Mercury 4.2.0.
Zdroj: [11]

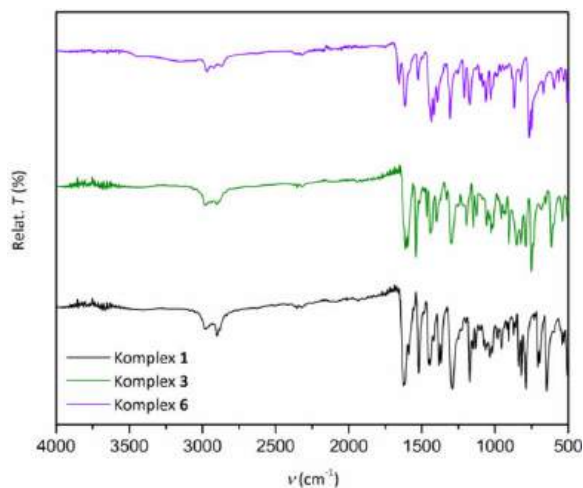
	ζ [Å]	Δ	Σ [°]	Θ [°]	V [Å ³]
1	0,8324	0,0082	72,5944	168,1932	12,13
2	0,6898	0,0042	85,3330	196,4333	11,59
	0,7208	0,0044	76,8482	206,6669	11,77
	0,7260	0,0047	72,6573	162,2196	11,75
	0,7091	0,0046	78,1921	178,5523	11,63
3	0,5836	0,0027	82,6166	248,4083	10,86
4	0,6763	0,0045	65,7785	150,0597	11,66
	0,7004	0,0046	70,7118	159,1743	11,74
5	0,8484	0,0074	78,8987	176,2935	12,30
6	0,6726	0,0047	32,0674	109,2533	12,09
	0,6621	0,0045	34,2198	113,0714	12,13
$\zeta = \sum_{i=1}^6 d_i - d_{mean} $			$\Sigma = \sum_{i=1}^{12} 90^\circ - \phi_i $		
$\Delta = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 \left(\frac{d_i - d_{mean}}{d_{mean}} \right)^2$			$\Theta = \sum_{i=1}^{24} 60^\circ - \theta_i $		

Tab. 9 Vybrané distorzné parametre komplexov **1-6** a prehľad vzorcov používaných programom OctaDist. Vysvetlivky: d_{mean} – priemerná vzdialenosť M-L; ϕ_i – cis uhol; θ_i – uhol medzi vektormi dvoch twisting faces.

Zdroj [12]



Graf 1 UV-VIS spektrum komplexov **1-6**. Koncentrácia pripravených roztokov komplexov bola $\approx 10^{-6}$ mol/dm³.



Graf 2 Infračervené spektrum komplexov **1, 3 a 6**.

2.1 Diskusia

Vypočítané kladné hodnoty D_{str} parametra naznačujú predĺženie väzieb Fe-L v axiálnych polohách, čo odráža mierne deformáciu koordinačného polyédra smerom k natihnutej oktaedrickej geometrii. Pomocou programu OctaDist boli vypočítané distorzné parametre ζ , Δ , Σ , Θ a objem oktaédra, ktoré kvantifikujú geometriu a odchýlky pripravených komplexov od ideálnej oktaedrickej geometrie (Tab. 9). Analýza výsledkov pre komplexy **1-6** ukazuje, že deformácie oktaedrickej geometrie sú relatívne malé. Parameter ζ sa pohybuje od 0,5836 Å (**3**) po 0,8484 Å (**5**), čo naznačuje mierne predĺženie väzieb M-L oproti

ideálnej hodnote. Hodnoty Δ , charakterizujúce rozptyl dĺžok väzieb, sú nízke a blízke nule, čo svedčí o symetricnosti koordinačných polyédrov a ich blízkosti k ideálnemu oktaédru ($\Delta = 0$). Parameter Σ kolíše približne od 32° do 85°, zatiaľ čo Θ dosahuje hodnoty od 109,25° do 248,41°, čo naznačuje rôzne uhlové a torzné deformácie.

Komplexy **1-6**, boli charakterizované infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou využitím ATR nadstavca. V spektrách boli identifikované absorpčné pásy zodpovedajúce vibráciám imínovej skupiny C=N, typicky vyskytujúce sa v oblasti vlnočtov $\approx 1600\text{ cm}^{-1}$. Ďalej boli zaznamenané vibrácie väzieb C-Br a C-Cl, v oblasti $\approx 530\text{ cm}^{-1}$, čím sa potvrdila prítomnosť príslušných substituentov na aromatickom jadre (Graf 2). Okrem FTIR-ATR meraní boli komplexy podrobené aj spektroskopii v UV-VIS oblasti. Spektrá ukázali typické d-d prechody lokalizované v oblasti približne $20\,000\text{ cm}^{-1}$. Nad touto oblasťou, pri vlnočtoch presahujúcich $25\,000\text{ cm}^{-1}$, boli detegované prechody spojené s prenosom náboja. Práškovou röntgenovou difraktometriou bola overená fázová čistota izolovaného produktu a monokryštálov. Na základe dobrej zhody experimentálnych a teoretických difrakčných záznamov možno konštatovať, že získané produkty komplexov **1-6** sú fázovo čisté.

Zaujímavé je, že štruktúra komplexu **4** závisí od polohy substituenta na aromatickom kruhu salicylaldehydu. Pri reakcii 3-metoxysalicylaldehydu s tetrahydrofurfurylamínom vznikol jednojadrový, pentakoordinovaný Fe(III) komplex, zatiaľ čo pri použití 4-metoxysalicylaldehydu sa vytvoril hexakoordinovaný komplex, v ktorom centrálny atóm železa nadobúda oktaedrickú geometriu [13]. Rozdiel pravdepodobne súvisí s polohou metoxyskupiny a ovplyvňuje výslednú geometriu komplexu. Zaujímavé je to práve v porovnaní týchto dvoch štruktúrne podobných komplexov, pretože aj malé zmeny v štruktúre ligandu (meta vs para), môžu viesť k odlišným koordinačným číslam a geometriám. Výsledky tiež ukázali, že použitie tetrahydrofurfurylamínu vedie prednostne k tvorbe hexakoordinovaných Fe(III) komplexov, na rozdiel od analógov s furfurylamínom, pri ktorých boli opísané pentakoordinované štruktúry.

Záver

Nasyntetizovaných bolo šesť hexakoordinovaných, železitých, jednojadrových komplexov so Schiffovými bázami typu ON a ONO, odvodenými od salicylaldehydu a jeho substituovaných derivátov, obsahujúcich tetrahydrofuranový heterocyklus viazaný cez imínovú

skupinu. Ligandy sa líšili typom a polohou substituentov na aromatickom jadre (Br, Cl, OCH₃), čo umožňovalo sledovať ich vplyv na koordinačné správanie a výslednú geometriu komplexov. Pre všetky komplexy boli stanovené Shape a distorzné parametre, ktoré kvantifikujú odchýlky od ideálnej oktaedrickej symetrie. V blízkej budúcnosti plánujeme pripravené komplexy skúmať v magnetickom poli s cieľom definovať ich magnetoštruktúrne parametre.

Podakovanie

Tento príspevok vznikol s podporou VEGA 1/0191/22 a DAAD (Magnetoactive and photoactive compounds based on 3d-4f complexes). Poďakovanie patrí môjmu školiteľovi doc. RNDr. Cyrilovi Rajnákovi, PhD. et PhD. za jeho cenné rady. Taktiež ďakujem Mgr. Erike Samoľovej, PhD. a prof. Ing. Jánovi Moncoľovi, 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. ISSN 0004-9425.
- [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. ISSN 0044-2313.
- [3] ZHAO-WEN, Yu et al. 2010. Syntheses and Crystal Structures of 3-Carboxylsalicylidene-furfurylimine And Its Trinuclear Nickle(II) Complex. In *Jiegou Huaxue*, vol. 29, no. 9, pp. 1301-1308. ISSN 0254-5861.
- [4] GRIVANI, G. et al. 2012. Polynuclear oxovanadium(IV) Schiff base complex [VOL₂]_n (L = (5-bromo-2-hydroxybenzyl-2-furylmethyl)imine): Synthesis, characterization, crystal structure, catalytic properties and thermal decomposition into V₂O₅ nanoparticles. In *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 27, pp. 82-87. ISSN 1387-7003.
- [5] Mandal, S. et al. 2009. Synthesis, structure and antibacterial activity of manganese(III) complexes of a Schiff base derived from furfurylamine. In *Polyhedron*, vol. 28, iss. 17, pp. 3858-3862. ISSN 0277-5387.
- [6] SERGIENKO, V. S.; ABRAMENKO, V. L.; GORBUNOVA, YU. E. 2017. Crystal Structure of Two Polymorphs of Molybdenyl Salicylidene-2-furfuryliminate (HL1) [MoO₂(L1)₂]. In *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 62, no. 7, pp. 900-904. ISSN 1531-8613.
- [7] Khalaji et al. 2011. Cobalt(III) Complex [CoL3]

Derived from an Asymmetric Bidentate Schiff Base Ligand L (L=(5-Bromo-2-hydroxybenzyl-2-furylmethyl)-imine): Synthesis, Characterization and Crystal Structure. In *Chin. J. Chem.*, vol. 29, iss. 8, pp. 1613-1616. ISSN 1001-604X.

[8] 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. ISSN 1359-7345.

[9] 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. ISSN 0020-1669.

[10] BRIDOVÁ, Terézia. et al. 2024. A mononuclear Fe(III) complex showing thermally induced spin crossover and slow magnetic relaxation with reciprocating thermal behaviour. In *Dalton Trans.*, vol. 53, iss. 26, pp. 10824-10828. ISSN 1477-9226.

[11] MACRAE, C. F. 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. ISSN 1600-5767.

[12] Ketkaew, R. et al. 2021. OctaDist. OctaDist: A Tool for Calculating Distortion Parameters in Spin Crossover and Coordination Complexes. In *Dalton Trans.*, vol. 50, no. 3, pp. 1086-1096. ISSN 1477-9226.

[13] ŠUŠUKOVÁ, V. Komplexy založené na tvrdých a prechodných Lewisových kyselinách. Bakalárska práca. Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Trnava, Slovensko, 2024.

Iminobenzofuranóny: pokus o prípravu nových analógov známych fotoprepínačov

Iminobenzofuranones: an attempt at synthesis of new analogues of well-known photoswitches

Jakub Urbanovič¹

Školiteľ: Jela Nociarová²

^{1,2} Katedra chémie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ jakub.urbanovic@student.umb.sk, ² jela.nociarova@umb.sk

Abstrakt

Fotoprepínače predstavujú zaujímavú triedu chemických zlúčenín, ktorých výskum je na vzostupe pre ich rozmanité potenciálne využitie vo farmakológii, katalýze, mikroskopii, ukladaní energie, výrobe funkčných materiálov a ďalších oblastiach. Iminothiaindoxyly (ITI) patria medzi najperspektívnejšie zlúčeniny tohto typu, najmä vo farmakologickom výskume, ktorý sa v súčasnosti zameriava na lepšiu kontrolu ich vlastností, predovšetkým polčasu termálnej relaxácie, prostredníctvom substitúcií v tejto molekule. V tejto práci sme uskutočnili niekoľko pokusov o prípravu iminobenzofuranónov (IBF), analógov k ITI, ktoré by podľa nášho predpokladu mali vykazovať dlhšie polčasy tepelnej relaxácie. Syntéza bola realizovaná na základe viacerých literárnych postupov. Popísali sme niekoľko nových zlúčenín, najmä *N*-hydroxyderivát IBF, ktorý doposiaľ nebol v literatúre popísaný. Údaje o niekoľkých reakciách boli zhromaždené, analyzované a vyhodnotené.

Kľúčové slová: iminobenzofuranóny, fotoprepínače, molekulové prepínače

Abstract

Photoswitches belong to a very interesting class of chemicals, which are widely researched for their diverse potential uses in pharmacology, catalysis, microscopy, energy storage, material science and other fields of applications. Iminothiaindoxyly (ITI) are one of most promising compounds of this kind, mainly in pharmacological research, which is now focusing on greater control over its properties, most notably relaxation half-life, by substitutions in this molecule. In this work, several attempt at preparation of iminobenzofuranones (IBF), analogues to iminothiaindoxyly (ITI) which, as we assume, should have longer thermal relaxation half-lives, was conducted, based on several literature procedures. In

process several new compounds were described, notably a *N*-hydroxyderivate of IBF, which was not yet described in literature. Data on several reactions and reaction conditions were collected, analysed and evaluated.

Key Words: Iminobenzofuranones, photoswitches, molecular switches

Úvod

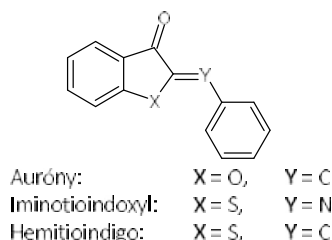
Molekulové prepínače sú trieda látok, ktoré sú schopné na základe vonkajšieho podnetu vratne meniť svoju štruktúru (napr. zmena konfigurácie na násobnej väzbe alebo vznik/zánik väzby vedúci k vzniku/zániku cyklického systému v molekulách). Túto zmenu môžu vyvolať mnohé podnety, napríklad zmena pH (medzi molekulové prepínače v podstate patria aj pH indikátory), redoxné deje vyvolané zmenou elektrochemického potenciálu aplikáciou elektród, príp. použitím oxidačných/redukčných činidiel, alebo svetlo vhodnej vlnovej dĺžky.

Fotoprepínače, teda molekulové prepínače, ktoré sa prepínajú práve pomocou svetla, sú štruktúrne rôznorodou, no intenzívne skúmanou skupinou látok, keďže majú široké potenciálne využitie v mnohých oblastiach. Prepínanie svetlom je výhodné napríklad v medicínskych aplikáciách, kde by napr. redoxné prepínače vyžadovali zavádzanie elektród, alebo iné invazívne zákroky. Svetlo je schopné preniknúť do tela bez invazívnych zákrokov, preto je pre farmakologické použitie vhodnejšie.

Neinvazívnosť však zďaleka nie je jediná požiadavka na fotoprepínače vo farmakologickom použití. Je zrejmé, že tieto látky musia byť v prvom rade málo toxické, aby mohli byť vpravené do tela, existuje však mnoho ďalších parametrov, ktoré musia byť vyladené, aby mohol byť fotoprepínač v tejto oblasti použitý.

Zo známych skeletov pre fotoprepínače sa práve v tejto oblasti skúmajú 3 príbuzné skupiny látok, a to sú hemitiaindigá, auróny a iminothiaindoxyly. Auróny sú

špecificky zaujímavé tým, že sa jedná o konštitučný izomér flavónu, častého prírodného skeletu, základu flavonoidov. Auróny, ITI aj hemitioindigá majú veľmi podobnú štruktúru (obr. 1).



Obr. 1 Všeobecná štruktúra fotoprepínačov s exocyklickou C=C alebo C=N väzbou

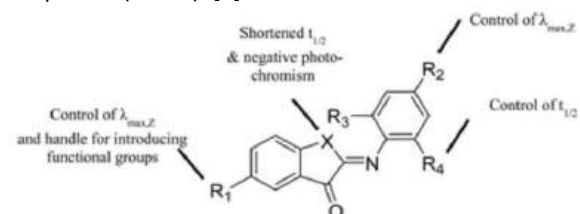
Mechanizmus ich prepínania je založený na zmene konfigurácie dvojitej väzby ($Z \rightarrow E$ izomerizácia) po ožiarení svetlom vhodnej vlnovej dĺžky. Stabilnejší Z izomér (Obr. 1) sa po absorpcii svetla mení na E formu, ktorá sa môže spontánne (termicky) alebo pôsobením svetla inej vlnovej dĺžky (fotochemicky) premeniť naspäť na formu Z.

Doba života molekuly v menej stabilnej E konfigurácii závisí od konkrétneho typu fotoprepínačov: zatiaľ čo v prípade derivátov hemitioindiga a aurónov môže byť rádovo aj v rokoch, [1][2][3] u derivátov s CN väzbou je spätná izomerizácia (termálna relaxácia) obvykle veľmi rýchla. Konkrétne iminotioindoxyl neboli sprvu vôbec považované za molekulové prepínače, keďže sa prepínanie aj spätná termická relaxácia diali tak rýchlo, že nemohli byť pozorované bežnými UV-VIS spektrometrami. Až keď boli ich fotofyzikálne vlastnosti zmerané podrobnejšími technikami, potvrdilo sa, že tieto molekuly vykazujú fotochrómne vlastnosti. Hoci je počas spätnej termickej reakcie veľmi krátky, oba izoméry absorbujú vo viditeľnej oblasti svetla, čo je vhodná vlnová dĺžka pre ovplyvňovanie procesov aj v živých organizmoch (nedochádza k ožarovaniu tkanív škodlivým UV-žiarením), no pre fotoprepínače vo všeobecnosti to nie je obvyklé.[4]

Nízka stabilita fotochemicky vznikajúcej E formy však predstavuje pre farmakologické použitie ďalšie problémy. Ak majú tieto látky riadiť alebo ovplyvňovať procesy v tele, musia sa v aktívnej forme vyskytovať aspoň nejaký čas. Pre farmakologické použitie je nutné, aby sa fotoprepínač termálne nevrátil z metastabilného stavu príliš rýchlo, a teda počas relaxácie by mal byť okolo 0,1 až 10 sekúnd.[5] Je teda zaujímavé skúmať

rôzne spôsoby spomaľovania ich termálnej relaxácie (spätnej izomerizácie na základný stav).

Jednou z možností ovplyvniť rýchlosť termálnej relaxácie je substitúcia základného skeletu ITI rôznymi skupinami (obr. 2). [5]

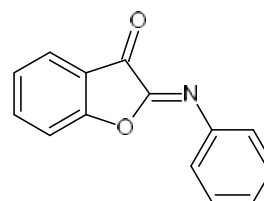


Obr. 2 Vplyv substituentov na absorpčné maximá a počas spätnej termickej relaxácie v prípade fotoprepínačov odvodených od ITI

Zdroj: [5]

Ďalším zo spôsobov, ktorý bol vyskúšaný, je nahradiť atóm síry v iminotioindoxylom kruhu za selén. To však viedlo k ešte kratším dobám života energeticky menej stabilného E izoméru. [5] Je teda opodstatnené sa domnievať, že posun v periodickej tabuľke opačným smerom, teda zámena atómu síry za atóm kyslíka by mohla termickú stabilitu E izoméru naopak zlepšiť.

Takéto látky sa nazývajú iminobenzofuranóny, IBFs (obr. 3). Hoci sa objavitelia ITIs pokúšali o ich prípravu, nepodarilo sa im ich izolovať, čo pripisujú ich nestabilite. V staršej literatúre je však niekoľko syntetických postupov, ktoré by mohli viesť k žiadaným produktom. Cieľom našej práce je preto prieskum možností prípravy iminobenzofuranónov, O-analógov iminotioindoxyl, o ktorých predpokladáme, že by mohli vykazovať fotochrómne vlastnosti a potenciálne zvýšenú termickú stabilitu E izoméru.



Obr. 3 Štruktúra iminobenzofuranónu, IBF

1 Syntetické postupy vedúce k príprave IBFs

IBFs sa kedysi skúmali ako farbivá, a preto existuje niekoľko článkov a patentov, kde autori popisujú ich prípravu.[6][7] To, či sa však skutočne jedná o iminobenzofuranóny, nie je jednoznačné, keďže ide o publikácie z čias pred dostupnosťou moderných

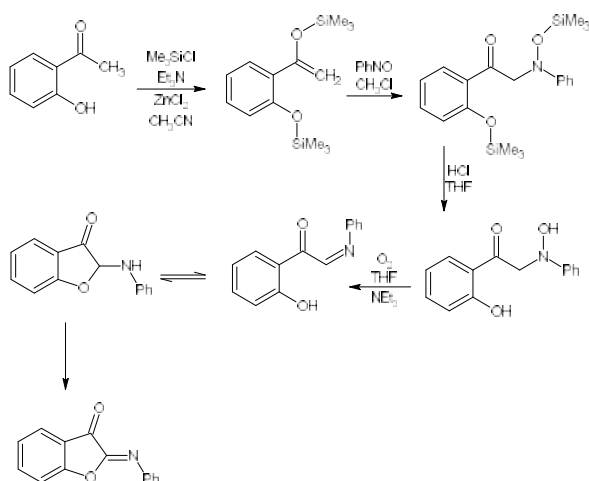
analytických metód (NMR alebo IR spektrometria), a jediné potvrdenie štruktúry popisovaných látok je založené na zhode výsledkov elementárnej analýzy s vypočítanými hmotnostnými zlomkami prvkov. Autori týchto článkov používajú väčšinou syntézu založenú na kondenzácii kumaranónu a nitrózobenzénu v zásaditom prostredí.



Obr. 4 Príprava IBF z kumaranónu a nitrózobenzénu všeobecne opísaná v článkoch [6][7][8]

Túto reakciu skúšal vo svojej práci aj Mark Hoorens (jeden z autorov prác o ITI), uvádza však, že produkt je nestabilný a nevenuje sa ďalšiemu skúmaniu jeho štruktúry a vlastností.[9]

Existujú však aj novšie publikácie, ktoré obsahujú už aj NMR a IČ dáta z látok s podobnou štruktúrou.[10] Ich syntéza vychádza z 2-hydroxyacetofenónu a prebieha podľa reakčnej schémy na obr. 5.



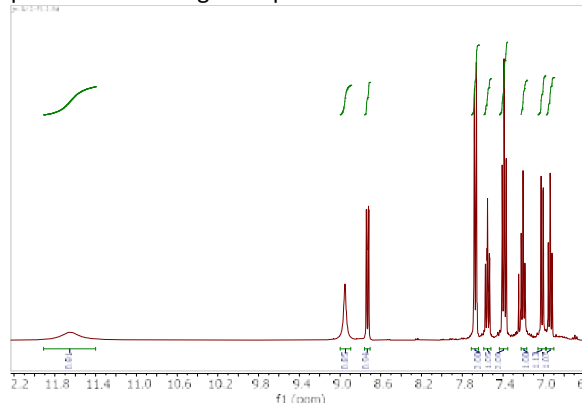
Obr. 5 Syntéza IBF podľa Ohna
Zdroj: [10]

Ide o viackrokovú syntézu, ktorej časť musí prebiehať v bezvodnom prostredí, pretože silylovaný derivát je citlivý na vlhkosť, a teda syntéza vyžaduje úplne bezvodé podmienky. Ohno pripravil nielen základný nesubstituovaný IBF, ale aj niektoré jeho deriváty, a všetky boli charakterizované pomocou ^1H NMR spektrometrie. V prípade nesubstituovaného IBF boli signály pre všetkých 9 atómov vodíka pozorované v oblasti 7,2 – 7,9 ppm.

2 Výsledky a diskusia

Náš prvý pokus o syntézu IBF bol inšpirovaný publikáciami [6] a [7], teda išlo o kondenzáciu kumaranónu a nitrózobenzénu v etanole pri laboratórnej teplote s použitím hydroxidu sodného ako katalyzátora. V ^1H NMR spektre surového produktu sme však pozorovali veľké množstvo ťažko interpretovateľných signálov v aromatickej oblasti, ktoré navyše nekorešpondovali so spektrom IBF v publikácii [10]. Z tohto dôvodu táto reakčná zmes nebola ďalej skúmaná.

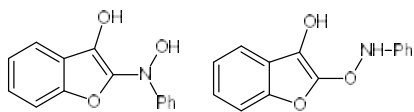
Ďalší pokus o syntézu IBF sme uskutočnili podľa postupu na syntézu iminotioindoxylových fotoprepínačov, ktorý uvádza Hoorens [9], akurát namiesto východiskového indoxylu bol použitý jeho analóg s kyslíkom, kumaranón. Benzén, použitý ako rozpúšťadlo v pôvodnej práci, sme z dôvodu bezpečnosti nahradili toluénom. Ako katalyzátor bol použitý piperidín. Po chromatografii surovej reakčnej zmesi sme získali žltu-oranžovú tuhú látku, ktorá má v ^1H NMR spektre 9 signálov pre 11 atómov H (obr. 6, v oblasti pod 6 ppm neboli pozorované žiadne signály), čo však nie je v súlade so štruktúrou očakávaného produktu IBF, pre ktorý by sa v ^1H NMR spektre malo pozorovať len 7 signálov pre 9 atómov H.



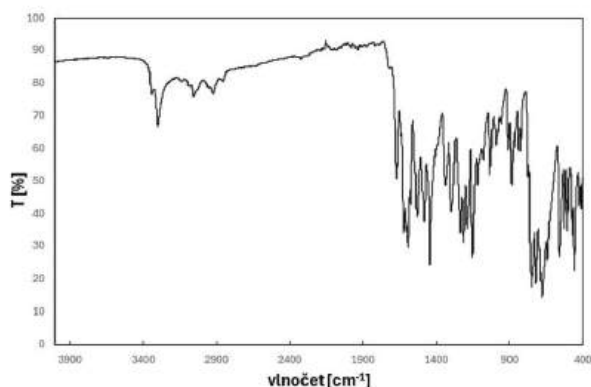
Obr. 6 ^1H NMR spektrum produktu reakcie kumaranónu a nitrózobenzénu v toluéne

Na základe ^1H NMR spektra sme pre túto látku navrhli dve možné štruktúry (obr. 7). Z pripravenej látky sme taktiež zmerali aj infračervené spektrum (obr. 8). Píky v oblasti od 3200 po 3400 cm^{-1} ukazujú buď dve rozdielne OH skupiny, alebo OH a NH. Podľa teoretických výpočtov sa však zdá, že OH a NH

stretching by bol od seba ďalej, správnejšia sa zdá byť štruktúra 1.



Obr. 7 Navrhovaná štruktúra produktov vznikajúcich kondenzáciou kumaránónu a nitrozobenzénu v toluéne za katalýzy piperidínom



Obr. 8 IČ spektrum produktu reakcie kumaránónu a nitrozobenzénu v toluéne

Kedže je táto nová látka veľmi podobná na IBF, rozhodli sme sa skúsiť túto molekulu dehydratovať pomocou molekulových sít za katalýzy kyselinou *p*-toluénsulfónovou. Kyslá katalýza mala napomôcť protonizácii OH skupiny, čím by mohla odstúpiť ako voda, zatiaľ čo molekulové sitá mali fungovať ako dehydratačné činidlo. Ani po dvoch dňoch sme však nepozorovali žiadne zmeny na TLC ani v IČ spektrách. Je možné, že molekulové sitá nie sú dosť silné dehydratačné činidlo a je nutné využiť drsnejšie podmienky, ako napríklad koncentrovanú kyselinu sírovú. V takých podmienkach by však mohlo dôjsť k rozloženiu produktu, alebo mnohým ďalším vedľajším reakciám.

Po neúspešných pokusoch pripraviť IBF kondenzáciou kumaránónu a nitrozobenzénu sme sa zamerali na metódu podľa Ohna [10]. Prvotné experimenty zlyhali, pretože silylovaný derivát je veľmi citlivý na vlhkosť v reaktantoch aj rozpúšťadlách. Reakciu sme preto zopakovali s použitím rozpúšťadiel vysušených molekulovými sitami. Po zmeraní ¹H NMR sme však zistili, že pripravená látka sa zhoduje s hydroxyderivátom, pripraveným v predošlom postupe, teda vznik produktu sa bohužiaľ nepotvrdil ani v tomto prípade.

Hydroxylovaná forma je teda častým produktom syntéz. Je možné, že stabilita tejto tautoménej formy je spôsobená aromaticitou benzofuranónového kruhu, v porovnaní s tautomérom obsahujúcim C=O väzbu. Zaujímavosťou je, že samotný kumaránón sa aj napriek možnosti vytvoriť analogický OH-tautomér s aromatickým charakterom zvyčajne vyskytuje v oxo forme, čo je potvrdené aj na základe NMR spektrometrie. V prípade nami izolovaného derivátu však novo-naviazaný atóm dusíka môže spôsobiť elektrónový posun napomáhajúci stabilite aromatickej enol formy a zabraňujúci vzniku C=N dvojitej väzby.

Pri všetkých pokusoch o prípravu IBF môže úlohu hrať aj fakt, že NMR spektrá neboli zmerané hneď po príprave látok, ale až o niekoľko hodín, niekedy dní. Ak by látka bola skutočne nestabilná aj v roztoku pri izbovej teplote, mohla sa rozložiť skôr, ako bola identifikovaná.

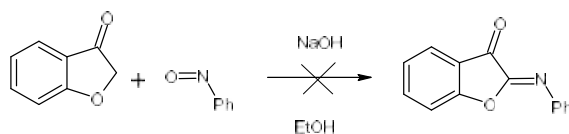
3 Experimentálna časť

Potrebné chemikálie (kumaránón, nitrozobenzén a 2-hydroxyacetofenón) boli zakúpené od firmy Fluorochem. Rozpúšťadlá boli zakúpené od firmy Centralchem. Rozpúšťadlá potrebné na reakciu podľa postupu [10] boli vysušené s použitím molekulových sít (4Å, Fluorochem).

NMR spektrá boli merané na prístroji Bruker Ascend™ 400 (400 MHz pre ¹H a 101 MHz pre ¹³C NMR meranie) alebo Varian NMR System 600 (600 MHz pre ¹H a 151 MHz pre ¹³C NMR meranie) s použitím deuterovaného chloroformu alebo dimetylsulfoxidu a spracované v programe MNova.

Infračervené spektrá sme zaznamenali pomocou techniky ATR, prístrojom Nicolet iS50 so softvérom OMNIC. Pri každom meraní sme uskutočnili 32 skenov, rozlíšenie výsledného spektra bolo 4 cm⁻¹ v rozsahu vlnocetov 4000-400 cm⁻¹.

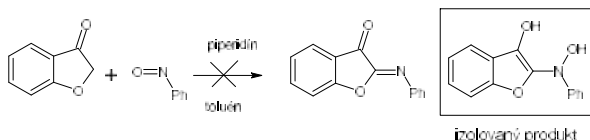
3.1 Pokus o prípravu IBF kondenzáciou kumaránónu a nitrozobenzotiazolu v etanole



Do 100 ml etanolu sme pridali 250 mg (2,33 mmol) nitrozobenzénu, 313 mg (2,33 mmol) kumaránónu a 93 mg NaOH. Zmes sme nechali miešať pri izbovej teplote

po dobu 24 hodín. Po tomto čase sme odparili etanol na rotačnej vákuovej odparke, čím sme získali tmavočervený olejovitý produkt o hmotnosti 1,18 g. Surový produkt sme analyzovali pomocou ^1H NMR v CDCl_3 .

3.2 Pokus o prípravu IBF kondenzáciou kumaránónu a nitrózobenzotiazolu v toluéne

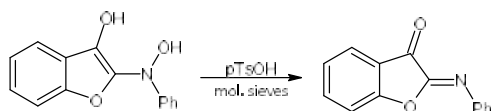


Do varnej banky obsahujúcej 100 ml toluénu sme pridali 250 mg (2,33 mmol) nitrózobenzénu a 313 mg (2,33 mmol, 1 ekv.) kumaránónu. K reakčnej zmesi sme pridali 100 mg piperidínu. Zmes sme nechali miešať pri izbovej teplote po dobu 24 hodín. Produkt reakcie sme ďalej chromatografovali na silikagéli. Ako eluent sme použili zmes hexánu a etylacetátu v pomere 6:1 (hex:ea). Zachytili sme druhú, tretiu a štvrtú frakciu, ktoré sme ďalej analyzovali pomocou infračervenej spektroskopie a NMR, opäť v CDCl_3 . Tretia frakcia obsahovala *N*-hydroxylovaný derivát, s výťažkom 312 mg.

Namerané ^1H NMR spektrum:

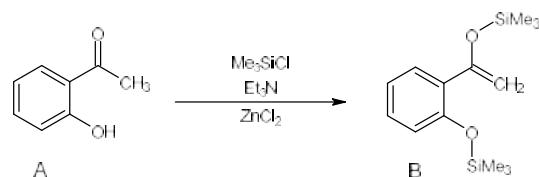
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 11.65 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.73 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.71-7.63 (m, 2H), 7.59-7.50 (m, 1H), 7.43-7.34 (m, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 1H), 7.01 (dd, $J = 8.5, 1.2$ Hz, 1H), 6.97-6.89 (m, 1H).

3.3 Pokus o dehydratáciu hydroxyderivátu IBF

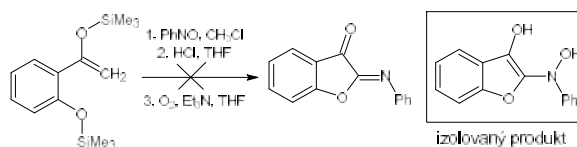


N-hydroxylovaný derivát sme rozpustili v 70 ml toluénu, pridali sme 60 mg (0,34 mmol) kyseliny *p*-toluénsulfónovej a molekulové sitá, približne do jednej tretiny objemu. Zmes sme nechali miešať po dobu 24 hodín. Sitá sme odfiltrovali, toluén odparili na rotačnej vákuovej odparke. Získali sme 282 mg látky, ktorú sme analyzovali pomocou infračervenej spektroskopie, avšak sme nepozorovali žiadne zmeny v porovnaní s východiskovou látkou.

3.4 Pokus o prípravu IBF podľa Ohna[10]



Všetky použité rozpúšťadlá sme vopred vysušili s použitím molekulových síť. Do 15 ml acetonitrilu sme rozpustili 2 g 2-hydroxyacetofenónu, 0,146 chloridu zinočnatého, pridali sme 5,3 ml Me_3SiCl a 6,4 ml Et_3N . Zmes sme miešali po dobu niekoľko hodín, potom sme rozpúšťadlo oddestilovali pomocou vákuovej destilácie. Úspešnosť silylácie bola potvrdená pomocou ^1H NMR spektra. Produkt sme použili do nasledovnej reakcie bez ďalšieho čistenia.



Silylovanú látku B sme rozpustili v chloroforme, pridali sme 650 mg nitrózobenzénu a miešali pri izbovej teplote po dobu 12 hodín. Chloroform sme odparili a produkt rozpustili v THF. Pridali sme 2,33 ml 2 M kyseliny chlorovodíkovej a nechali reagovať po dobu 10 min. Pridali sme 1,3 ml Et_3N . Potom sme cez roztok začali prebubľávať kyslík, následne sme celú reakčnú zmes nechali pod kyslíkom po dobu 12 hodín. Zmes sme zriedili s Et_2O a odparili. Reakčnú zmes sme ďalej chromatografovali eluentom hexán : etylacetát v pomere 10:1. Frakcie obsahujúce produkt sme odparili, dosiahli sme výťažok 514 mg. Produkt sme analyzovali pomocou infračervenej spektroskopie a NMR, opäť v CDCl_3 . Namerané ^1H NMR spektrum je totožné so spektrom hore popísaného hydroxyderivátu (obr. 6).

Záver

Cieľom tejto práce bola syntéza IBF pomocou viacerých syntetických prístupov. V priebehu experimentálnej časti bolo realizovaných niekoľko pokusov využívajúcich odlišné reakčné podmienky a metodiky s cieľom pripraviť cieľovú zlúčeninu. Napriek týmto snahám sa nepodarilo izolovať priamo požadovanú látku IBF. Analýza získaných produktov však ukázala, že v reakčných systémoch dochádzalo k

tvorbe hydroxylovaného derivátu IBF a iným postranným reakciám.

Opakované získanie tejto hydroxylovanej formy pri rôznych syntetických postupoch naznačuje, že za zvolených reakčných podmienok je tento produkt termodynamicky alebo kineticky preferovaný. Toto je zrejme spôsobené elektrónovým posunom k dusíku, čo dovoľuje vznik enol formy. Kumaranón sa totiž vyskytuje bežne v oxo forme. Imino skupina teda zrejme pôsobí taký elektrónový posun, že sa enol forma stáva stabilnejšou a zabraňuje vzniku C=N väzby. Tento výsledok poskytuje cenné informácie o reaktivite IBF a poukazuje na zatiaľ nezdokumentovanú tendenciu týchto látok podliehať N-hydroxylácii a spadať do enol formy. Získané poznatky preto prispievajú k lepšiemu pochopeniu reakčných podmienok potrebných pre syntézu IBF a zároveň pomáhajú identifikovať vhodné reakčné podmienky, ako aj faktory, ktoré vedú k tvorbe jeho hydroxylovaného derivátu.

Napriek tomu, že pôvodný cieľ syntetizovať IBF nebol úplne splnený, práca priniesla reprodukovateľnú prípravu jeho hydroxylovaného analógu a poskytla experimentálne údaje, ktoré môžu slúžiť ako základ pre ďalšiu optimalizáciu syntetických postupov. Budúci výskum by sa mohol zamerať najmä na modifikáciu reakčných podmienok, použitie substituovaných reaktantov alebo zmenu reakčného prostredia s cieľom potlačiť vedľajšiu hydroxyláciu a zvýšiť pravdepodobnosť získania IBF.

PodĎakovanie

Touto cestou by sme sa chceli poďakovať pracovníkom Katedry organickej chémie PriF Univerzity Komenského v Bratislave za zmeranie NMR spektier. Ďakujeme aj páňovi doc. Budzákovi za výpočet spektier IČ. Táto práca bola podporená vďaka: Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00428.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] PETERMAYER, Christian; THUMSER, Stefan; KINK, Florian; MAYER, Peter; DUBE, Henry, (2017). Hemiindigo: Highly Bistable Photoswitching at the Biooptical Window. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 139, no. 42, pp. 15060-15067, doi: 10.1021/jacs.7b07531.
- [2] WIEDBRAUK, Sandra; DUBE, Henry, (2015). Hemithioindigo—an emerging photoswitch. *Tetrahedron Letters*, vol. 56, no. 29, pp. 4266-4274, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.05.022>.
- [3] BERDNIKOVA, Daria V., (2024). Aurones: Unexplored Visible-Light Photoswitches for Aqueous Medium. *Chemistry – A European Journal*, vol. 30, no. 20, pp. , doi: 10.1002/chem.202304237.
- [4] SZYMANSKI, Wiktor, (2019). A fast visible-light molecular photoswitch. *Research Communities by Springer Nature*, dostupné z: <https://communities.springernature.com/posts/a-fast-visible-light-molecular-photoswitch>.
- [5] BOËTIUS, Melody E.; HOORENS, Mark W. H.; OŠŤADNICKÝ, Martin; LAURENT, Adèle D.; DI DONATO, Mariangela; VAN WINGAARDEN, Aldo C. A.; HILBERS, Michiel F.; FERINGA, Ben L.; BUMA, Wybren Jan; MEDVEĎ, Miroslav; SZYMANSKI, Wiktor, (2024). Getting a molecular grip on the half-lives of iminothioindoxyl photoswitches. *Chemical Science*, vol. 15, no. 35, pp. 14379-14389, doi: 10.1039/D4SC01457J.
- [6] SCHIRMACHER, Karl, NEUMANN, Hans, 'Verfahren zur Darstellung von Küpenfarbstoffen', Patentschrift des Deutschen Reichs Nr. 469178, Klasse 22e Gruppe 7, ausgegeben am 4. Dezember 1928 (patentiert ab 22. Oktober 1926), I.G. Farbenindustrie Akt.-Ges. in Frankfurt a. M., doi/patent: DE469178C
- [7] FRIES, K., 'Zur Kenntnis des Oxindigos', *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 442, 1925, pp. 254-305
- [8] ZALESOV, V. V.; RUBTSOV, A. E., (2004). Synthesis, Structure, and Chemical Properties of N-Substituted 2(3)-Imino-2,3-dihydrofuran-3(2)-ones. (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, vol. 40, no. 2, pp. 133-152, doi: 10.1023/B:COHC.0000027884.75379.14.
- [9] HOORENS, Mark, 2020. *Seek and Destroy: Light-controlled Cancer Therapeutics for Local Treatment*. ISBN 978-94-034-2498-9. dizertačná práca
- [10] OHNO, Masatomi; IDO, Motohisa; SHIMIZU, Sadahiro; EGUCHI, Shoji, (1990). A Facile Synthesis of 2-Phenylimino-3(2*H*)-benzofuranones

from the Silyl Enol Ether of 2-Hydroxyacetophenones and Nitrosobenzene. *Synthesis*, vol. 1990, no. 08, pp. 703-704, doi: 10.1055/s-1990-26988.

SEKCIA

INFORMATIKA A MATEMATIKA



1 0 1
1 1 1 1
1 1 1 0 1
1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1
1 1 1 0 1 0 1
1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 0 1
1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1

Funkcionálne postupnosti v špeciálnych triedach funkcií

Sequences of functions in special classes of functions

Zuzana Čabaníková¹

Školiteľ: Vladimír Janiš²

^{1,2}Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹zcabanikova@student.umb.sk, ²vladimir.janis@umb.sk

Abstrakt

Práca sa zaoberá konvergentnými funkcionálnymi postupnosťami, definovanými na intervale reálnych čísel v špeciálnych triedach funkcií, akými sú napríklad monotónne funkcie, funkcie s ohraničenou variáciou, absolútne spojité alebo polospojité funkcie, prípadne Hölderovské funkcie. Skúmame, či bodová alebo rovnomerná limita funkcionálnych postupností v určitej špeciálnej triede je uzavretá vzhľadom na danú špeciálnu triedu. V práci sa nachádzajú aj základné definície, poprípade vety alebo lemy a ich dôkazy, ktoré nám pomáhajú hlbšie porozumieť daným špeciálnym triedam funkcií. Takisto slúžia ako nástroj pri dokazovaní uzavretosti špeciálnych tried vzhľadom na bodovú a rovnomernú konvergenciu.

Kľúčové slová: bodová konvergencia, rovnomerná konvergencia, postupnosť funkcií

Abstract

This study deals with convergent functional sequences defined on an interval of real numbers within special classes of functions, such as monotone functions, functions of bounded variation, absolutely continuous or semicontinuous functions, and possibly Hölder functions. We examine whether the pointwise or uniform limit of functional sequences in a given special class remains closed with respect to that particular class. This study also contains basic definitions, as well as theorems or lemmas and their proofs, which help us gain a deeper understanding of these special classes of functions. They also serve as

a tool for proving the closure of special classes with respect to pointwise and uniform convergence.

Key words: pointwise convergence, uniform convergence, sequence of functions

Úvod

Pri štúdiu reálnych funkcií reálnej premennej sa stretávame s rôznymi druhmi funkcií. Z hľadiska matematickej analýzy, ale hlavne jej aplikácii, zohrávajú mimoriadne dôležitú úlohu spojité funkcie, ale aj rôzne ich zovšeobecnenia, ako napríklad absolútne spojité funkcie, polospojité funkcie a podobne. Ak pracujeme s množinami takýchto funkcií, je dôležité vedieť, či limita postupnosti takýchto funkcií, pokiaľ existuje, je znovu funkcia tej istej kategórie. Toto je principiálna otázka, ktorou sa zaoberá naša práca.

1 Bodová a rovnomerná konvergencia

Je daný interval $I \subseteq \mathbb{R}$. Predpokladajme, že pre každé $n \in \mathbb{N}$ existuje funkcia $f_n : I \rightarrow \mathbb{R}$. Potom hovoríme, že $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ je postupnosť funkcií z I do \mathbb{R} . Podobne ako pri reálnych postupnostiach, aj postupnosti funkcií môžu konvergovať alebo divergovať a to dvoma spôsobmi.

Definícia 1 *Nech $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ je postupnosť funkcií, a nech $f_n : I \rightarrow \mathbb{R}$. Hovoríme, že postupnosť $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ konverguje bodovo na množine I k funkcii f práve*

vtedy, keď pre všetky $x \in I$ postupnosť reálnych čísel $f_n(x)$ konverguje k $f(x)$ pre každé $n \in \mathbb{N}$.

Túto skutočnosť vyjadrujeme zápisom $f_n \rightarrow f$, kde f sa nazýva bodová limita postupnosti funkcií $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$.

Definíciu znázorníme na nasledujúcich príkladoch. Uvažujme postupnosť

$$f_n(x) = \frac{x^2 + nx}{n}$$

pre všetky $x \in \mathbb{R}$ platí, že $\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = x$, čiže postupnosť konverguje bodovo k $f(x) = x$.

Naopak nasledujúca postupnosť

$$f_n(x) = (-1)^n$$

diverguje pre všetky $x \in \mathbb{R}$, pretože limita $\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x)$ neexistuje.

Definícia 2 Postupnosť funkcií $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ konverguje rovnomerne na množine I k funkcií f práve vtedy, keď ku každému $\epsilon > 0$ existuje $n_0 \in \mathbb{N}$ také, že pre každé $n \geq n_0$ a všetky $x \in I$ platí $|f_n(x) - f(x)| < \epsilon$.

Túto skutočnosť vyjadrujeme zápisom $f_n \rightrightarrows f$, kde f sa nazýva rovnomerná limita postupnosti funkcií $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$.

Lema 1 Nech

$$\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = f(x) \quad \text{pre každé } x \in I.$$

Potom $f_n \rightrightarrows f$ na I práve vtedy, keď

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \sup_{x \in I} |f_n(x) - f(x)| = 0.$$

[4]

Definíciu rovnomernej konvergenzie znázorníme na príklade. Nech

$$f_n(x) = \frac{x}{n} \quad \forall x \in [0, 1]$$

Pre $x \in [0, 1]$ platí, že $\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = 0$, teda bodová limita je 0. Potom

$$\sup_{x \in [0, 1]} \left| \frac{x}{n} - 0 \right| = \frac{1}{n}$$

čiže

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} = 0$$

týmto sme ukázali, že postupnosť rovnomerne konverguje k $f(x) = 0$ na intervale $[0, 1]$

Z definícií oboch konvergenzií vidíme, že rovnomerná konvergenzia je silnejšia. Narozdiel od bodovej konvergenzií, pri rovnomernej konvergenzii musíme nájsť pre každé ϵ také n_0 , ktoré vyhovuje všetkým $x \in I$ naraz. Pri bodovej konvergenzii dané n_0 nezávisí len od ϵ ale aj od bodu $x \in I$.

Z toho vyplýva, že ak postupnosť konverguje rovnomerne, tak konverguje bodovo. Naopak to však platiť nemusí, čo ukazuje nasledujúci kontrapríklad.

Uvažujme nasledujúcu postupnosť funkcií.

$$f_n(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x \leq n \\ 1 & \text{ak } x > n \end{cases}$$

$\forall x \in \mathbb{R}$ platí, že $\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = 0$, teda postupnosť bodovo konverguje k $f(x) = 0$. Rovnomerne ale nekonverguje, pretože

$$\sup_{\forall x \in \mathbb{R}} |f_n(x) - f(x)| = \sup_{\forall x \in \mathbb{R}} |f_n(x) - 0| = 1.$$

2 Monotónne funkcie

Jednou zo základných vlastností reálnych funkcií jednej premennej je monotónnosť. Pod funkciami monotónnymi na množine rozumieme funkcie, ktoré sú na tejto množine rastúce alebo klesajúce. Uvedieme definíciu oboch pojmov:

Definícia 3 Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je rastúca, ak pre všetky $x_1, x_2 \in I$ platí:

$$x_1 \leq x_2 \implies f(x_1) \leq f(x_2).$$

Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je klesajúca, ak pre všetky $x_1, x_2 \in I$ platí:

$$x_1 \geq x_2 \implies f(x_1) \geq f(x_2).$$

V prípade, že medzi funkčnými hodnotami je ostrá nerovnosť, hovoríme o ostro rastúcej a ostro klesajúcej funkcii. (Niektorí autori používajú pre takéto triedy funkcií terminológiu neklesajúca – rastúca, resp. nerastúca – klesajúca.)

Nasledujúce tvrdenie ukazuje, že bodová konvergencia zachováva monotónnosť. Tvrdenie dokážeme pre rastúce funkcie, dôkaz v prípade klesajúcich funkcií je analogický.

Veta 1 *Bodová limita konvergentnej postupnosti rastúcich funkcií je rastúca funkcia.*

Dôkaz. Nech $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ je postupnosť rastúcich funkcií definovaných na množine $I \subseteq \mathbb{R}$, teda pre každé $n \in \mathbb{N}$ platí

$$\forall x_1, x_2 \in I : x_1 \leq x_2 \implies f_n(x_1) \leq f_n(x_2).$$

Predpokladáme, že táto postupnosť konverguje na množine I bodovo k funkcii f , teda pre všetky $x \in I$ je

$$\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = f(x).$$

Ak $x_1, x_2 \in I, x_1 \leq x_2$, tak pre postupnosti funkčných hodnôt

$$\{f_n(x_1)\}_{n=1}^{\infty}, \{f_n(x_2)\}_{n=1}^{\infty}$$

je splnená nerovnosť $f_n(x_1) \leq f_n(x_2)$ pre každé $n \in \mathbb{N}$, a teda rovnaká nerovnosť platí aj pre limity týchto postupností, čiže $f(x_1) \leq f(x_2)$.

Teda $f(x)$ je rastúca. \square

Poznávame, že bodová konvergencia nemusí zachovávať ostrú monotónnosť. Príkladom môže byť postupnosť funkcií $f_n(x) = \frac{x}{n}$, z ktorých je každá na \mathbb{R} ostro rastúca, bodovou limitou tejto postupnosti je však funkcia $f(x) = 0$, ktorá na \mathbb{R} ostro rastúca nie je.

3 Spojité funkcie

V tejto kapitole sa budeme zaoberať postupnosťami spojitých funkcií. Budeme skúmať, či sa spojitost zachová pri konvergencii. Existujú rôzne definície spojitosti funkcie, v tomto prípade sa najviac bude hodiť tá nasledujúca (ϵ - δ definícia).

Definícia 4 *Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je spojitá v bode $a \in \mathbb{R}$ ak spĺňa:*

$$\forall \epsilon > 0, \exists \delta > 0; \forall x \in I; |x-a| < \delta \implies |f(x)-f(a)| < \epsilon$$

Hovoríme, že funkcia f je spojitá na intervale I , ak je spojitá v každom bode intervalu I .

Typickým príkladom spojitej funkcie, je ľubovoľná polynomiálna funkcia, ako napríklad

$$f(x) = 3x - 7$$

Chceme dokázať, že je táto funkcia spojitá na obore reálnych čísel \mathbb{R} , teda, že je spojitá v každom bode $a \in \mathbb{R}$. Musíme nájsť také δ aby platilo $|f(x)-f(a)| < \epsilon$.

$$|f(x) - f(a)| = |(3x - 7) - (3a - 7)| = 3|x - a| < \epsilon$$

teda zvolíme $\delta = \frac{\epsilon}{3}$.

Samozrejme, existujú aj funkcie, ktoré spojitú nie sú. Typickými sú funkcie so skokom, ako napríklad

$$f(x) = \begin{cases} -1 & \text{ak } x \leq 0 \\ 1 & \text{ak } x > 0 \end{cases}$$

Táto funkcia spojitá v bode $x = 0$ nie je, pretože ak zvolíme $\epsilon = 1$, tak neexistuje žiadne okolie bodu $x = 0$, ktoré by spĺňalo podmienku spojitosti. V každom okolí bodu 0 s polomerom $\delta > 0$ bude existovať bod x_1 pre ktorý platí

$$|f(0) - f(x_1)| = |-1 - 1| = 2 > \epsilon$$

čiže podmienku spojitosti nespĺňa, funkcia f v bode $x = 0$ spojitá nie je.

Veta 2 *Nech $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ je postupnosť spojitých funkcií na intervale I . Ak postupnosť $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ konverguje rovnomerne k f , potom funkcia f je spojitá na I . [5]*

Dôkaz. Nech $x_0 \in I$ a nech $\epsilon > 0$. Z rovnomernej konvergencie postupnosti $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ k funkcii f vyplýva, že k číslu $\frac{\epsilon}{3}$ existuje $n_0 \in \mathbb{N}$, také, že pre všetky $n \geq n_0$ a všetky $x \in I$ platí:

$$|f_n(x) - f(x)| < \frac{\epsilon}{3}$$

Nech n je pevne zvolená hodnota, $n \geq n_0$. Zo spojitosti funkcie f_n v bode $x_0 \in I$ vyplýva, že k číslu $\frac{\epsilon}{3}$ existuje $\delta > 0$ také, že pre všetky $x \in I$ platí

$$|x - x_0| < \delta \implies |f_n(x) - f_n(x_0)| < \frac{\epsilon}{3}$$

Nech $|x - x_0| < \delta$. Potom

$$\begin{aligned} |f(x) - f(x_0)| &= |f(x) - f_n(x) \\ &\quad + f_n(x) - f_n(x_0) \\ &\quad + f_n(x_0) - f(x_0)| \\ &\leq |f(x) - f_n(x)| \\ &\quad + |f_n(x) - f_n(x_0)| \\ &\quad + |f_n(x_0) - f(x_0)| \\ &< \frac{\epsilon}{3} + \frac{\epsilon}{3} + \frac{\epsilon}{3} \\ &= \epsilon \end{aligned}$$

□

Pre postupnosti spojitých funkcií, ktoré konvergujú bodovo k funkcii f , spojitosť zachovaná byť nemusí, ako aj vidíme v nasledujúcom príklade.

Uvažujme postupnosť funkcií

$$f(x) = \begin{cases} x^n & \text{ak } x \in [0, 1) \\ 1 & \text{ak } x \in [1, 2] \end{cases}$$

Táto postupnosť konverguje bodovo k funkcii

$$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x \in [0, 1) \\ 1 & \text{ak } x \in [1, 2] \end{cases}$$

táto funkcia už spojitá nie je.

4 Funkcie s ohraničenou variáciou

Funkcie s ohraničenou variáciou sú také, ktorých celková zmena je konečná.

Definícia 5 Nech $[a, b]$ je interval. Potom množina

$$D = \{x_0, x_1, x_2, \dots, x_{l-1}, x_l\}$$

splňajúca nerovnosti

$$a = x_0 < x_1 < x_2 < \dots < x_{l-1} < x_l = b$$

sa nazýva delenie intervalu $[a, b]$.

Množinu všetkých možných delení intervalu $[a, b]$ označíme ako $D_{[a,b]}$.

Definícia 6 Nech funkcia f je definovaná na intervale $[a, b]$. Ak existuje také kladné číslo M , že pre všetky delenia $D = \{x_0, x_1, x_2, \dots, x_{l-1}, x_l\}$ intervalu $[a, b]$ platí

$$\sum_{k=1}^l |f(x_k) - f(x_{k-1})| \leq M$$

tak potom hovoríme, že f je funkcia s ohraničenou variáciou na intervale $[a, b]$.

Definícia 7 Nech f je funkcia s ohraničenou variáciou na intervale $[a, b]$. Nech $\sum(D)$ označuje súčet $\sum_{k=1}^l |f(x_k) - f(x_{k-1})|$ zodpovedajúci deleniu $D = \{x_0, x_1, x_2, \dots, x_{l-1}, x_l\}$ intervalu $[a, b]$. Potom číslo

$$V_a^b[f] := \sup \{ \sum(D) : D \in D_{[a,b]} \}$$

sa nazýva celková variácia funkcie na intervale $[a, b]$.

Základným príkladom funkcie s ohraničenou variáciou je monotónna funkcia. Bez ujmy na všeobecnosti uvažujme ľubovoľnú rastúcu funkciu f , pre ktorú platí

$$\forall x_1, x_2 \in I : x_1 \leq x_2 \implies f(x_1) \leq f(x_2)$$

chceme ukázať

$$\sum_{k=1}^l |f(x_k) - f(x_{k-1})| \leq M$$

z monotónnosti f vyplýva, že všetky rozdiely $f(x_k) - f(x_{k-1})$, pre ľubovoľné delenie intervalu $[a, b]$ sú nezáporné, teda

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^l |f(x_k) - f(x_{k-1})| &= \sum_{k=1}^l (f(x_k) - f(x_{k-1})) \\ &= f(x_l) - f(x_0) < \infty \end{aligned}$$

Suma je teleskopická, výsledkom je rozdiel funkčných hodnôt, ktorý je v prípade monotónnych funkcií vždy konečný. Teda variácia monotónnej funkcie f je konečná.

Príkladom funkcie, ktorá nemá ohraničenú variáciu je napríklad Dirichletova funkcia definovaná na intervale $[0, 1]$.

$$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x \in \mathbb{R} \setminus \mathbb{Q} \\ 1 & \text{ak } x \in \mathbb{Q} \end{cases}$$

s delením intervalu $[0, 1]$

$$D_{[0,1]} = \{0 = x_0, x_1, \dots, x_l = 1\}$$

ktoré splňa

$$x_{2i} \in \mathbb{Q} \quad x_{2i+1} \in \mathbb{R} \setminus \mathbb{Q} \quad \forall i \in \mathbb{N}$$

Potom platí

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^{l=2i} |f(x_k) - f(x_{k-1})| &= |f(x_1) - f(x_0)| \\ &+ |f(x_2) - f(x_1)| + \dots \\ &+ |f(x_l) - f(x_{l-1})| \\ &= |1 - 0| + |1 - 0| + \dots \\ &+ |1 - 0| \\ &= l \end{aligned}$$

Číslo $l \in \mathbb{N}$ môže byť ľubovoľne veľké, jeho veľkosť závisí od delenia. Neexistuje pevne zvolené M , ktoré by ohraničovalo danú sumu.

Nespojitosť funkcie neimplikuje, že funkcia nemá ohraničenú variáciu. Veľmi jednoduchým príkladom je

$$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x < 0 \\ 1 & \text{ak } x \geq 0 \end{cases}$$

Je v 0 nespojitá ale $V_{-1}^1[f] = 1$

Všimnime si, že bodová limita postupnosti funkcií s ohraničenou variáciou už byť funkcia s ohraničenou variáciou nemusí.

Uvažujme nasledujúcu postupnosť funkcií definovaných na intervale $[0, 1]$

$$f_n(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x \in \left[0, \frac{1}{(n+1)\pi}\right) \\ \sin\left(\frac{1}{x}\right) & \text{ak } x \in \left[\frac{1}{(n+1)\pi}, \frac{1}{n\pi}\right] \\ 0 & \text{ak } x \in \left(\frac{1}{n\pi}, 1\right) \end{cases}$$

Kde pre každé delenie $D_{[0,1]}$ platí:

$$V_0^1[f_n] \leq 1, \quad \forall n \in \mathbb{N}$$

Vidíme, že:

$$f_n(x) \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \sin\left(\frac{1}{x}\right)$$

Nech je delenie intervalu $[0, 1]$ pri funkcii $\sin\left(\frac{1}{x}\right)$ nasledovné

$$D = \{0, 1\} \cup \left\{ \frac{1}{\frac{\pi}{2} + 2k\pi}, \frac{1}{\frac{3\pi}{2} + 2k\pi} : k = 0, 1, 2, \dots, n \right\}$$

všeobecne bude platiť, že:

$$\begin{aligned} |f(x_{2k}) - f(x_{2k+1})| &= \left| f\left(\frac{1}{\frac{\pi}{2} + 2k\pi}\right) - f\left(\frac{1}{\frac{3\pi}{2} + 2k\pi}\right) \right| \\ &= |1 - (-1)| = 2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^l |f(x_k) - f(x_{k-1})| &= |f(x_1) - f(x_0)| \\ &+ |f(x_2) - f(x_1)| + \dots \\ &+ |f(x_n) - f(x_{n-1})| \\ &= 2 + 2 + \dots + 2 \\ &= 2l \end{aligned}$$

Neexistuje pevne zvolené M , ktoré by ohraničovalo danú sumu, teda

$$V_0^1 \left[\sin\left(\frac{1}{x}\right) \right] = +\infty$$

Veta 3 *Rovnomerná limita postupnosti funkcií s ohraničenou variáciou je funkcia s ohraničenou variáciou.*

Dôkaz. Nech postupnosť $\{f_n\}_{n=1}^\infty$ je tvorená funkciami, ktoré majú ohraňujúcu variáciu, teda pre každé $n \in \mathbb{N}$ a ľubovoľné delenie D intervalu I platí

$$\sum_{k=1}^l |f_n(x_k) - f_n(x_{k-1})| \leq M_n$$

Nech n je pevne zvolená hodnota, $n \geq n_0$. Príslušné M_n označme pre jednoduchosť M , potom pre dané f_n platí

$$\sum_{k=1}^l |f_n(x_k) - f_n(x_{k-1})| \leq M$$

Z rovnomernej konvergencie postupnosti funkcií, pre dané f_n vyplýva

$$|f_n(x) - f(x)| < \frac{\epsilon}{2l}, \quad \forall x \in I$$

pre ľubovoľné delenie D intervalu I platí

$$\begin{aligned} & \sum_{k=1}^l (|f(x_k) - f(x_{k-1})|) \\ & \leq \sum_{k=1}^l (|f(x_k) - f_n(x_k)| \\ & \quad + |f_n(x_k) - f_n(x_{k-1})| \\ & \quad + |f_n(x_{k-1}) - f(x_{k-1})|) \\ & \leq \sum_{k=1}^l (|f_n(x_k) - f_n(x_{k-1})| \\ & \quad + \sum_{k=1}^l |f(x_k) - f_n(x_k)| \\ & \quad + \sum_{k=1}^l |f_n(x_{k-1}) - f(x_{k-1})|) \\ & \leq M + l \frac{\epsilon}{2l} + l \frac{\epsilon}{2l} \\ & = M + \epsilon. \end{aligned}$$

Pre $\epsilon \rightarrow 0$ dostávame $V_a^b[f] \leq M \quad \square$

5 Absolútne spojité funkcie

Absolútna spojitosť charakterizuje všetky funkcie, ktoré možno vyjadriť ako primitívnu funkciu svojej derivácie.

Definícia 8 Funkcia $f : [a, b] \rightarrow \mathbb{R}$ je absolútne spojitá na $[a, b]$ ak pre každé $\epsilon > 0$ existuje $\delta > 0$ tak, že pre ľubovoľný systém disjunktných podintervalov $\{(a_i, b_i) : i = 1, 2, \dots, n\}$ intervalu $[a, b]$ platí

$$\sum_{i=1}^n (b_i - a_i) < \delta \implies \sum_{i=1}^n |f(b_i) - f(a_i)| < \epsilon$$

Na uvedenie príkladu absolútne spojitej funkcie je potrebné aby sme uviedli nasledujúcu definíciu.

Definícia 9 Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$, kde $I \subseteq \mathbb{R}$ je Lipschitzovsky spojitá, ak existuje taká konštanta $L > 0$, že pre všetky $x, y \in I$ platí

$$|f(x) - f(y)| \leq L|x - y|$$

Príkladom absolútne spojitej funkcie je ľubovoľná Lipschitzova funkcia, pretože každá Lipschitzova funkcia je absolútne spojitá. Uvažujme nasledujúcu funkciu $f : I \rightarrow \mathbb{R}$, ktorá spĺňa

$$|f(x) - f(y)| \leq L|x - y| \quad L > 0$$

a nech $\{(a_i, b_i) : i = 1, 2, \dots, n\}$ sú disjunktné podintervaly množiny A .

Potom platí

$$\sum_{i=1}^n |f(b_i) - f(a_i)| \leq L \sum_{i=1}^n |a_i - b_i| \quad L > 0$$

Zvoľme $\delta = \frac{\epsilon}{L}$ potom

$$\sum_{i=1}^n |f(b_i) - f(a_i)| < L\delta = L \frac{\epsilon}{L} = \epsilon$$

Funkcia spĺňa podmienku absolútnej spojitosti.

Dôsledok 1 Ak funkcia f je absolútne spojitá, tak potom f je skoro všade diferencovateľná [3]

Definícia 10 Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je Lebesgueovsky integrovateľná na intervale $[a, b]$ ak je jej integrál konečný, teda

$$\int_a^b |f'(x)| dx < \infty$$

Množinu všetkých Lebesgueovských funkcií na intervale $[a, b]$ označujeme $L([a, b])$. [3]

Veta 4 Nech $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je absolútne spojitá. Potom jej derivácia f' je Lebesgueovsky integrovateľná a pre všetky $x \in [a, b]$ platí

$$f(x) = f(a) + \int_a^x f'(t) dt \quad f \in L([a, b])$$

[3]

Nasledujúci príklad ukazuje funkciu, ktorá nie je absolútne spojitá. Uvažujme funkciu

$$f(x) = \begin{cases} x \sin\left(\frac{1}{x}\right) & \text{ak } x \in (0, 1] \\ 0 & \text{ak } x = 0 \end{cases}$$

Funkcia f je spojitá v bode 0, pretože $f(x) = 0$, teda je spojitá a na intervale $(0, 1]$ je spojitá pretože ide o súčin dvoch spojitých funkcií $x \sin\left(\frac{1}{x}\right)$. Ukážeme, že funkcia f nie je absolútne spojitá tým, že nie je Lebesgueovsky integrovateľná. Derivácia f na intervale $(0, 1]$ je nasledovná

$$f'(x) = \sin\left(\frac{1}{x}\right) - \frac{1}{x} \cos\left(\frac{1}{x}\right)$$

$$\int_0^1 |f'(x)| dx = \int_0^1 \left| \sin\left(\frac{1}{x}\right) \right| dx - \int_0^1 \left| \frac{1}{x} \cos\left(\frac{1}{x}\right) \right| dx$$

vidíme, že

$$\int_0^1 \left| \sin\left(\frac{1}{x}\right) \right| dx = \int_1^\infty \frac{|\sin t|}{t^2} \approx 0,624$$

ale

$$\int_0^1 \left| \frac{1}{x} \cos\left(\frac{1}{x}\right) \right| dx = +\infty$$

táto funkcia nie je absolútne spojitá, pretože jej derivácia nie je integrovateľná.

Rovnomerná limita konvergentnej postupnosti absolútne spojitých funkcií na intervale $[a, b]$ absolútne spojitá funkcia byť nemusí.

Typickým príkladom je Cantorova funkcia na Cantorovej množine. Najprv si skonštruujeme Cantorovu množinu.

Nech E_0 je interval

$$[0, 1]$$

odstránime interval $\left(\frac{1}{3}, \frac{2}{3}\right)$. Nech E_1 je zjednotenie intervalov

$$\left[0, \frac{1}{3}\right], \left[\frac{2}{3}, 1\right]$$

odstránime stredné tretiny intervalov z E_1 , potom E_2 je zjednotenie intervalov

$$\left[0, \frac{1}{9}\right], \left[\frac{2}{9}, \frac{3}{9}\right], \left[\frac{6}{9}, \frac{7}{9}\right], \left[\frac{8}{9}, 1\right]$$

Pokračujúc týmto spôsobom, dostávame postupnosť kompaktných množín E_n takých, že

1. $E_1 \supseteq E_2 \supseteq E_3 \supseteq \dots$;
2. E_n je zjednotením 2^n intervalov, každá s dĺžkou 3^{-n} .

Potom množinu

$$C = \bigcap_{n=1}^{\infty} E_n$$

nazývame Cantorova množina C . Cantorova množina je kompaktná a neprázdna. [?]

Definícia Cantorovej funkcie je nasledovná. Vieme, že bod $x \in [0, 1]$ je reprezentovaný v trojkovej sústave ako

$$x = \frac{a_1}{3} + \frac{a_2}{3^2} + \frac{a_3}{3^3} + \dots = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{a_{nx}}{3^n}, \quad a_{nx} \in \{0, 1, 2\}$$

Nech N_x je najmenší index n , pre ktorý $a_{nx} = 1$, ak existuje. Ak neexistuje, tak $N_x = \infty$. Potom cantorovu funkciu definujeme nasledovne

$$c(x) := \frac{1}{2^{N_x}} + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_x-1} \frac{a_{nx}}{2^n}$$

Cantorova funkcia je rastúca a spojitá ale nie je absolútne spojitá.

Nech $\epsilon = \frac{1}{2}$ a $\delta > 0$. Keďže \mathcal{C} má nulovú Lebesgueovu mieru, môžeme množinu \mathcal{C} pokryť konečným počtom disjunktných intervalov $(a_1, b_1), \dots, (a_n, b_n)$ takých, že

$$\sum_{i=1}^n (b_i - a_i) < \delta$$

ale

$$\sum_{i=1}^n |c(b_i) - c(a_i)| = 1 > \epsilon$$

Zavedieme si postupnosť absolútne spojitých funkcií $\{\psi_n\}_{n=0}^{\infty}$ na intervale $[0, 1]$ ktorá bodovo aj rovnomerne konverguje ku Cantorovej funkcii. Nech $\psi_0(x) : [0, 1] \rightarrow \mathbb{R}$ je ľubovoľná funkcia.

pre každé $n \in \mathbb{N}$ definujeme

$$\psi_{n+1}(x) = \begin{cases} \frac{1}{2}\psi_n(3x) & , x \in [0, \frac{1}{3}] \\ \frac{1}{2} & , x \in [\frac{1}{3}, \frac{2}{3}] \\ \frac{1}{2} + \frac{1}{2}\psi_n(3x - 2) & , x \in (\frac{2}{3}, 1] \end{cases} \quad (1)$$

Pre každé $n \in \mathbb{N}$ platí, že funkcia ψ_n je po častiach lineárna. Každá lineárna funkcia je absolútne spojitá, teda $\{\psi_n\}_{n=0}^{\infty}$ je postupnosť absolútne spojitých funkcií.

Nech $M[0, 1]$ je Banachov priestor všetkých ohraničených reálnych funkcií na intervale $[0, 1]$ so supremovou normou.

Veta 5 Cantorova funkcia c je jediný prvok priestoru $M[0, 1]$, pre ktorý platí

$$c(x) = \begin{cases} \frac{1}{2}c(3x) & , x \in [0, \frac{1}{3}] \\ \frac{1}{2} & , x \in [\frac{1}{3}, \frac{2}{3}] \\ \frac{1}{2} + \frac{1}{2}c(3x - 2) & , x \in (\frac{2}{3}, 1] \end{cases}$$

Ak $\psi_0 \in M[0, 1]$, potom postupnosť $\{\psi_n\}_{n=0}^{\infty}$ definovaná v (1) konverguje rovnomerne k c .

Dôkaz.

Definujeme zobrazenie $F : M[0, 1] \rightarrow M[0, 1]$ následovne

$$F(f)(x) = \begin{cases} \frac{1}{2}f(3x) & , x \in [0, \frac{1}{3}] \\ \frac{1}{2} & , x \in [\frac{1}{3}, \frac{2}{3}] \\ \frac{1}{2} + \frac{1}{2}f(3x - 2) & , x \in (\frac{2}{3}, 1] \end{cases}$$

Kde f je ľubovoľná funkcia z Banachovho priestoru. Keďže platí

$$\|F(f_1) - F(f_2)\| \leq \frac{1}{2}\|f_1 - f_2\|$$

kde $f_1, f_2 \in M[0, 1]$ a $\|\cdot\|$ označuje normu v $M[0, 1]$, F je kontrakcia na úplnom priestore $M[0, 1]$ a podľa Banachovej vety o pevnom bode, F má práve jeden bod f_0 , pre ktorý platí $f_0 = F(f_0)$, a zároveň platí, že postupnosť $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ konverguje k f_0 rovnomerne na intervale $[0, 1]$. Z definície Cantorovej funkcie vyplýva, že definícia postupnosti funkcií platí, teda $F(c) = c$. Z jednoznačnosti pevného bodu $f_0 = c$. [9] \square

Lema 2 Ak funkcia f je absolútne spojitá na $[a, b]$, tak potom má konečnú variáciu. [3]

Bodová limita konvergentnej postupnosti absolútne spojitých funkcií na intervale $[a, b]$ už absolútne spojitá funkcia byť nemusí. Uvažujme postupnosť funkcií

$$f_n(x) = \begin{cases} 0 & , 0 \leq x \leq \frac{1}{n\pi} \\ \sin\left(\frac{1}{x}\right) & , \frac{1}{n\pi} < x \leq 1 \end{cases}$$

táto postupnosť obsahuje len funkcie, ktoré su absolútne spojité, pretože $\sin\left(\frac{1}{x}\right)$ je spojitá a na intervale $(\frac{1}{n\pi}, 1]$ má deriváciu

$$f'_n(x) = \left(\sin\left(\frac{1}{x}\right)\right)' = -\frac{\cos\left(\frac{1}{x}\right)}{x^2}$$

a táto derivácia má integrál

$$\begin{aligned} \int_{\frac{1}{n\pi}}^x -\frac{\cos\left(\frac{1}{t}\right)}{t^2} dt &= \int_{n\pi}^{\frac{1}{x}} -\frac{\cos(u)}{t^2} (-t^2) du \\ &= \int_{n\pi}^{\frac{1}{x}} \cos(u) du \\ &= \sin\left(\frac{1}{x}\right) - \sin(n\pi) \\ &= \sin\left(\frac{1}{x}\right) \end{aligned}$$

Teda f_n sú na celom intervale $[0, 1]$ absolútne spojité, pretože mimo intervalu sú konštantné.

Postupnosť funkcií bodovo konverguje k

$$f(x) = \begin{cases} \sin\left(\frac{1}{x}\right) & , x \in (0, 1] \\ 0 & , x = 0 \end{cases}$$

ktorá už nie je spojitá, teda ani absolútne spojitá.

6 Hölderovské funkcie

Hölderovské funkcie, alebo Hölderovsky spojité funkcie predstavujú množinu funkcií, ktoré sa nemožu lokálne meniť príliš rýchlo.

Definícia 11 Funkciu $f : I \rightarrow \mathbb{R}$, $I \subset \mathbb{R}$ nazývame Hölderovsky spojitou s koeficientom $\alpha > 0$, ak existuje konštanta $C > 0$ taká, že pre všetky $x, y \in I$ platí

$$|f(x) - f(y)| \leq C|x - y|^\alpha$$

V prípade, že $\alpha = 1$ hovoríme, že funkcia f spĺňa na množine I Lipschitzovu podmienku s konštantou $C \geq 0$.

Následujúci príklad demonštruje funkciu f , ktorá je na intervale $[0, 1]$ Hölderovsky spojitá

$$f(x) = x^\alpha \quad x \in [0, 1] \quad \alpha \in (0, 1]$$

Pre ľubovoľné $x, y \in [0, 1]$ platí

$$|f(x) - f(y)| = |x^\alpha - y^\alpha| \leq |x - y|^\alpha$$

Táto nerovnosť platí, pre ľubovoľné $C > 0$.

Ďalším, možno zaujímavejším príkladom je funkcia

$$f(x) = \sqrt{x} \quad x \in [0, \infty)$$

Pre ľubovoľné $x, y \in [0, \infty)$ platí

$$\begin{aligned} |f(x) - f(y)| &= |\sqrt{x} - \sqrt{y}| \\ &= \left| \frac{x - y}{\sqrt{x} + \sqrt{y}} \right| \\ &= \sqrt{|x - y|} \frac{\sqrt{|x - y|}}{\sqrt{x} + \sqrt{y}} \\ &\leq \frac{\sqrt{x + y}}{\sqrt{x} + \sqrt{y}} \sqrt{|x - y|} \\ &\leq \sqrt{|x - y|} \end{aligned}$$

Ak $\alpha = \frac{1}{2}$ a $C \leq 1$ platí

$$|\sqrt{x} - \sqrt{y}| \leq C\sqrt{|x - y|}$$

Následujúci príklad ukazuje funkciu, ktorá Hölderovská nie je

$$f(x) = \sin\left(\frac{1}{x}\right) \quad x \in (0, 1]$$

Nech $\alpha > 0$, Skonstruujeme postupnosť bodov x_k, y_k nasledovne

$$\frac{1}{x_k} = 2\pi k + \frac{\pi}{2} \quad \frac{1}{y_k} = 2\pi k + \frac{3\pi}{2}$$

Keď $k \rightarrow \infty$, tak $x_k, y_k \rightarrow 0$ a funkcia nadobúda hodnoty

$$f(x_k) = \sin\left(\frac{1}{x_k}\right) = 1$$

$$f(y_k) = \sin\left(\frac{1}{y_k}\right) = -1$$

potom

$$|f(x_k) - f(y_k)| = 2$$

zatiaľ čo

$$|x_k - y_k| = \left| \frac{1}{2\pi k + \frac{\pi}{2}} - \frac{1}{2\pi k + \frac{3\pi}{2}} \right|^\alpha = \left| \frac{4}{\pi(4k + 1)(4k + 3)} \right|^\alpha \rightarrow 0$$

pre $k \rightarrow \infty$

teda podmienka

$$|f(x_k) - f(y_k)| = 2 \leq C|x - y|^\alpha = 0$$

neplatí pre žiadnu konštantu $C > 0$.

Veta 6 Ak funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je Hölderovská, tak f je rovnomerne spojitá. [5]

Veta 7 Rovnomerná limita konvergentnej postupnosti Hölderovských funkcií je Hölderovská funkcia.

Dôkaz. Nech $\{f_n\}_{n=1}^\infty$ je postupnosť Hölderovských funkcií s koeficientmi $\alpha_n > 0$, teda existuje konštanta $C_n > 0$, taká, že pre všetky $x, y \in I$ a všetky $n \in \mathbb{N}$ platí

$$|f_n(x) - f_n(y)| \leq C_n |x - y|^{\alpha_n}$$

Nech n je pevne zvolená hodnota, $n \geq n_0$. Príslušný koeficient $\alpha_n > 0$ a príslušný koeficient $C_n > 0$ označme pre jednoduchosť ako α a C . Potom pre dané f_n a pre všetky $x, y \in I$ platí

$$|f_n(x) - f_n(y)| \leq C |x - y|^\alpha$$

Nech $f_n \Rightarrow f$, teda pre $\frac{\epsilon}{2} > 0$, dané f_n a všetky $x \in I$ platí

$$|f_n(x) - f(x)| < \frac{\epsilon}{2}$$

takisto pre všetky $y \in I$ platí

$$|f_n(y) - f(y)| < \frac{\epsilon}{2}$$

V prípade ľubovoľných $x, y \in I$

$$\begin{aligned} |f(x) - f(y)| &= |f(x) - f_n(x) \\ &\quad + f_n(x) - f_n(y) \\ &\quad + f_n(y) - f(y)| \\ &\leq |f(x) - f_n(x)| \\ &\quad + |f_n(x) - f_n(y)| \\ &\quad + |f_n(y) - f(y)| \\ &\leq C|x - y|^\alpha + \frac{\epsilon}{2} + \frac{\epsilon}{2} \\ &= C|x - y|^\alpha + \epsilon \end{aligned}$$

pre $\epsilon \rightarrow 0$ dostávame

$$|f(x) - f(y)| \leq C|x - y|^\alpha$$

□

Pri bodovej konvergencii sa už táto vlastnosť nezachová. Bodová limita konvergentnej postupnosti Hölderovských funkcií už Hölderovská funkcia byť nemusí. Uvažujme postupnosť

$$f_n(x) = x^{\frac{1}{n}} \quad x \in [0, 1]$$

Funkcie f_n sú Hölderovsky spojité

$$|f_n(x) - f_n(y)| = |x^{\frac{1}{n}} - y^{\frac{1}{n}}| \leq |x - y|^{\frac{1}{n}} \quad n = 1, 2, \dots$$

bodová limita postupnosti f_n

$$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{ak } x = 0 \\ 1 & \text{ak } x \in (0, 1] \end{cases}$$

f nie je spojitá v bode $x = 0$ a každá Hölderovská funkcia je rovnomerne spojitá. Teda f nie je Hölderovská.

7 Polospojité funkcie

Definícia 12 Nech $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je funkcia a nech x_0 je hromadný bod množiny I . Pre $\lambda > 0$ označme množinu $M(x_0, \lambda) = \{f(x); |x - x_0| < \lambda\}$. Potom

$$\liminf_{x \rightarrow x_0} f(x) = \sup_{\lambda > 0} \{\inf M(x_0, \lambda)\}$$

kde $\liminf_{x \rightarrow x_0} f(x)$ nazývame limes inferior funkcie f v bode x_0 . Analogicky

$$\limsup_{x \rightarrow x_0} f(x) = \inf_{\lambda > 0} \{\sup M(x_0, \lambda)\}$$

kde $\limsup_{x \rightarrow x_0} f(x)$ nazývame limes superior funkcie f v bode x_0 .

[6]

Definícia 13 Nech $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ a nech x_0 je hromadný bod na intervale I . Potom f je zdola polospojité v x_0 , ak

$$f(x_0) \leq \liminf_{x \rightarrow x_0} f(x)$$

[6]

Definícia 14 Nech $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ a nech x_0 je hromadný bod na intervale I . Potom f je zhora polospojité v x_0 , ak

$$f(x_0) \geq \limsup_{x \rightarrow x_0} f(x)$$

[6]

Nasledujúci príklad ukazuje funkciu, ktorá je nespojitá, ale niekde je spojitá zdola a niekde zhora

$$f(x) = \begin{cases} 1 & \text{ak } x \in \mathbb{Q} \\ 0 & \text{ak } x \in \mathbb{R} \setminus \mathbb{Q} \end{cases}$$

funkcia f je zhora polospojité pre všetky $x_0 \in \mathbb{Q}$

$$f(x_0) = 1 \geq \limsup_{x \rightarrow x_0} f(x) = 1$$

ale zdola polospojité pre všetky $x_0 \in \mathbb{Q}$ nie je

$$f(x_0) = 1 \leq \liminf_{x \rightarrow x_0} f(x) = 0$$

nerovnosť nie je splnená.

funkcia f je zdola polospojité pre všetky $x_0 \in \mathbb{R} \setminus \mathbb{Q}$

$$f(x_0) = 0 \leq \liminf_{x \rightarrow x_0} f(x) = 0$$

zhora polospojité pre všetky $x_0 \in \mathbb{R} \setminus \mathbb{Q}$ nie je

$$f(x_0) = 0 \geq \limsup_{x \rightarrow x_0} f(x) = 1$$

nerovnosť nie je splnená.

Veta 8 Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je zdola polospojité na intervale I práve vtedy, keď pre každé $a \in \mathbb{R}$ je množina $f^{-1}(a, +\infty)$ otvorená.

Analogicky, Funkcia $f : I \rightarrow \mathbb{R}$ je zhora polospojité na intervale I práve vtedy, keď pre každé $a \in \mathbb{R}$ je množina $f^{-1}(-\infty, a)$ otvorená.

[6]

Veta 9 Funkcia f je zdola polospojité v bode $x_0 \in I$ práve vtedy, keď, pre každé číslo $a < f(x_0)$ existuje také $\delta > 0$, že pre všetky $x \in I$ platí

$$|x - x_0| < \delta \implies f(x) > a$$

Analogicky, funkcia f je zhora polospojité v bode $x_0 \in A$ práve vtedy, keď, pre každé číslo $a > f(x_0)$ existuje také $\delta > 0$, že pre všetky $x \in I$ platí

$$|x - x_0| < \delta \implies f(x) < a$$

[6]

Veta 10 Nech $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ je rastúca postupnosť funkcií, ktoré sú zdola polospojité v bode $x_0 \in I$. Potom bodová limita existuje (platí pre vlasné/nevlastné limity) a je tiež zdola polospojité v x_0 .

Dôkaz. Ak $f(x_0) = -\infty$, tak $\liminf_{x \rightarrow x_0} f_n(x) \geq -\infty$ čo platí vždy. Nech $f(x_0) > a$, vieme, že postupnosť je rastúca pre každé $x \in I$, teda

$$f_n(x) \leq f_{n+1}(x)$$

a konverguje bodovo

$$\lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x_0) = f(x_0)$$

Čiže z definície limity vyplýva, že existuje $n_0 \in \mathbb{N}$ a $\epsilon > 0$

$$f_{n_0}(x) > a + \epsilon$$

Zvoľme $\delta > 0$ také, aby platila implikácia (Veta 9)

$$x \in I, |x - x_0| < \delta \implies f_{n_0}(x) > a + \epsilon$$

Z monotónnosti $\{f_n\}_{n=1}^{\infty}$ vyplýva, že pre všetky $n \geq n_0$ platí $f_n(x) > a + \epsilon$. To znamená, že platí implikácia

$$x \in A, |x - x_0| < \delta \implies f(x) = \liminf_{n \rightarrow \infty} f_n(x) \geq a + \epsilon > a$$

$$x \in I, |x - x_0| < \delta \implies f(x) > a$$

□ [6]

Analogicky postup platí pri dokazovaní vety pre klesajúcu a zhora polospojité postupnosť.

Keďže $\{f_n(x)\}_{n=1}^{\infty}$ je rastúca postupnosť, tak platí

$$\liminf_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = \lim_{n \rightarrow \infty} (\inf_{k \geq n} f_k(x)) = \lim_{n \rightarrow \infty} f_n(x) = f(x)$$

Bodová limita konvergentnej postupnosti zdola spojitéch funkcií nemusí byť zdola spojité funkcia

Uvažujme postupnosť funkcií

$$f_n(x) = \begin{cases} 1, & \text{ak } x < \frac{1}{n} \\ 0, & \text{ak } x \geq \frac{1}{n} \end{cases}$$

Funkcia f_n je zdola polospojité pre každé $n \in \mathbb{N}$, pretože pre $x = \frac{1}{n}$ platí

$$f_n\left(\frac{1}{n}\right) = 0 \leq \liminf_{x \rightarrow \frac{1}{n}} f_n(x) = 0$$

Postupnosť konverguje bodovo k

$$f(x) = \begin{cases} 1, & \text{ak } x = 0 \\ 0, & \text{inak} \end{cases}$$

Táto funkcia polospojité zdola nie je

$$f(0) = 1 \leq \liminf_{x \rightarrow 0} f(x) = 0$$

nerovnosť nie je splnená.

Veta 11 *Rovnomerná limita konvergentnej postupnosti zdola polospojitéch funkcií je zdola polospojité funkcia.*

Dôkaz. Nech $\{f_n\}_{n=1}^\infty$ je postupnosť zdola polospojitéch funkcií na intervale I . Nech $x_0 \in I$. Pre každé $n \in \mathbb{N}$ platí, že ak $a_n < f_n(x_0)$, tak existuje také $\delta_n > 0$, že pre $x \in I$ platí

$$|x - x_0| < \delta_n \implies f_n(x) > a_n$$

Predpokladáme, že postupnosť $\{f_n\}_{n=1}^\infty$ rovnomerne konverguje na intervale I k funkcií f , teda k číslu $\frac{\epsilon}{3} > 0$ existuje $n_0 \in \mathbb{N}$ také, že pre všetky $n \geq n_0$ a každé $x \in I$ platí

$$|f_n(x) - f(x)| < \frac{\epsilon}{3}$$

túto nerovnosť vyjadríme v tvare

$$-\frac{\epsilon}{3} < f_n(x) - f(x) < \frac{\epsilon}{3}$$

odtiaľ dostávame nerovnosť

$$f(x) > f_n(x) - \frac{\epsilon}{3} \quad \forall x \in I$$

Nech n je pevne zvolená hodnota, $n \geq n_0$. Príslušné δ_n označme pre jednoduchosť δ . Nech $a_n = f_n(x_0) - \frac{\epsilon}{3}$, potom

$$f_n(x) > f_n(x_0) - \frac{\epsilon}{3} \quad \forall x \in (x_0 - \delta, x_0 + \delta)$$

Z nerovností vyššie vyplýva

$$f(x) > f_n(x) - \frac{\epsilon}{3} > f_n(x_0) - \frac{\epsilon}{3} - \frac{\epsilon}{3}$$

Z rovnomernej konvergenencie postupnosti $\{f_n\}_{n=1}^\infty$ k f v bode x_0 , pre pevne zvolené $n \geq n_0$ získavame

$$f_n(x_0) > f(x_0) - \frac{\epsilon}{3}$$

nakoniec pre všetky $x \in (x_0 - \delta, x_0 + \delta)$ dostávame

$$f(x) > f_n(x_0) - \frac{\epsilon}{3} - \frac{\epsilon}{3} > f(x_0) - \frac{\epsilon}{3} - \frac{2\epsilon}{3} = f(x_0) - \epsilon$$

□ Analogicky veta platí aj pre postupnosti zhora polospojitéch funkcií.

8 Záver

V práci sme zisťovali uzavretosť niektorých tried funkcií vzhľadom na bodovú a rovnomernú konvergenciu. Pri bodovej konvergencii sme zistili, že okrem monotónnych funkcií, nie sú tieto priestory funkcií uzavreté. Naopak pri rovnomernej konvergencii sú skúmané priestory funkcií uzavreté pri všetkých triedach, okrem absolútne spojitéch funkcií.

Podakovanie

Chcela by som poďakovať svojmu školiteľovi prof. RNDr. Vladimírovi Janišovi, CSc za pomoc a podporu pri vypracovaní tejto práce.

Literatúra

- [1] Bronshtein I. N., Semendyayev K. A. (2007) Handbook of Mathematics. Springer, Germany
- [2] Hobson E. W. (1921) The theory of functions of a real variable and the theory of Fourier's series. Cambridge University Press, Cambridge
- [3] Royden H. L. (1988) Real Analysis. Macmillan Publishing Company, New York
- [4] Bartle, R.G., Sherbert, D.R. (2000) Introduction to Real Analysis. 3rd ed., Wiley, USA

- [5] Lafferriere B., Lafferriere G., Nguyen M. (2016) Introduction to Mathematical Analysis I. 3rd ed. Portland State University, USA
- [6] Švec M., Šalát T., Neubrun T. (1987) Matematická analýza funkcií reálnej premennej. Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava
- [7] Apostol T. M. (1981) Mathematical Analysis. 5th ed. Addison-Wesley, USA
- [8] Bruckner, A.M., Bruckner, J.B., Thomson, B.S. (1997) Real Analysis. Prentice Hall, USA
- [9] Dovgosheya O., Martio O., Ryazanov V., Vuorinen M. (2005) The Cantor function. Journal of Mathematical Analysis and Applications, Elsevier GmbH

Prediktívny model hodinového rizika dopravnej nehodovosti

Predictive model of hourly traffic accident risk

Miriama Javorská¹ – Jarmila Škrinárová²

^{1,3}Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica,

¹ miriama.javorska@student.umb.sk, ² jarmila.skrinarova@umb.sk

Abstrakt

Práca sa zameriava na návrh a implementáciu prediktívneho modelu pre analýzu faktorov ovplyvňujúcich dopravnú nehodovosť. Model pracuje s viacerými datasetmi ako počítadlo (sčítač) autodopravy, počítadlo cyklopravy, evidencia dopravných nehôd a meteorologické údaje.

Hlavným cieľom práce je identifikácia kľúčových faktorov vplývajúcich na vznik nehôd a overenie možnosti ich predikcie pomocou logistickej regresie v lokalitách Bratislavy, konkrétne Vajanského nábrežie, Dunajská ulica a Devínska cesta, pričom dáta boli agregované na hodinovú úroveň a doplnené o časové a kontextové atribúty.

Výsledkom je model poskytujúci hodinové rizikové skóre nehody a identifikácia významných faktorov ovplyvňujúcich bezpečnosť dopravy, medzi ktoré patria najmä intenzita dopravy, časové charakteristiky a vybrané meteorologické premenné.

Kľúčové slová: dopravné nehody, doprava, inteligentné mesto, logistická regresia, rizikové skóre

Abstract

This study focuses on the design and implementation of a predictive model for analyzing factors influencing traffic accidents. The model integrates multiple datasets, including motor vehicle traffic counts, bicycle traffic counts, traffic accident records, and meteorological data.

The main objective of the study was to identify key factors affecting the occurrence of accidents and to verify the feasibility of their prediction using logistic regression in specific locations within Bratislava, namely Vajanského nábrežie, Dunajská street and Devínska cesta. The data were aggregated to an hourly level and enriched with temporal and contextual features.

The result is a model providing an hourly accident risk score and the identification of significant factors impacting traffic safety, particularly traffic intensity, temporal characteristics, and selected meteorological variables.

Key Words: crashes, traffic, smart city, logistic regression, risk score

Úvod

Koncept inteligentných miest (Smart Cities) zahŕňa implementáciu senzorov (vrátane súvisiacich meraní), digitalizáciu a rozhodovanie podporované umelou inteligenciou, ktorých cieľom je zameranie sa na udržateľný rozvoj spoločnosti a zvyšovanie kvality života občanov, prostredníctvom zabezpečenia efektívneho využívania zdrojov a dátovo orientovaného rozhodovania. Jednou z kľúčových oblastí inteligentných miest je doprava, keďže ovplyvňuje mobilitu, životné prostredie a bezpečnosť [1].

Podľa publikácie *Dopravno-bezpečnostné činnosti 3* [2] sa dopravou rozumie premiestňovanie osôb a vecí z bodu A do bodu B. Súčasne je možné pozorovať nárast dopravných tokov, a to z hľadiska počtu presunov a vzdialenosti medzi nimi. Ako základná jednotka skúmania sa uvádza dopravný prúd, predstavujúci pohyb vozidiel, chodcov za sebou alebo v pruhoch vedľa seba v rovnakom smere jazdy príp. aj vo viacerých jazdných prúdoch. Medzi základné charakteristiky dopravného prúdu patria „intenzita dopravného prúdu – je daná počtom vozidiel, ktoré prejdú jedným alebo obidvoma smermi komunikácie za časovú jednotku; rýchlosť dopravného prúdu – je to určitá funkcia rozdelenia rýchlostí jednotlivých vozidiel v prúde, tento parameter často nahrádzame strednou hodnotou rýchlosti v čase, meranej na krátkom úseku trasy; hustota dopravného prúdu – je určená polohou a počtom vozidiel na určitej trase v určitom čase.“ Kvalitu dopravy určuje rýchlosť dopravných prostriedkov, čas prejazdu a ich manévrovacie možnosti.

Cieľom práce je vytvoriť model, ktorý analyzuje vzťah medzi intenzitou dopravy, počasím, nehodovosťou a kvantifikuje hodinové nehodové riziko. Bolo potrebné zabezpečiť, aby model vedel správne klasifikovať rizikové situácie oproti bežnej premávke, aby vedel správne určiť, ktorý faktor prispieva k zvyšujúcemu sa riziku a aby bol model škálovateľný a použiteľný aj v iných mestách. Model je založený na logistickej regresii a jeho výstupom je rizikové skóre v intervale 0-1.

Pre potreby práce sme vybrali Bratislavu ako moderné mesto disponujúce rozsiahlym množstvom otvorených datasetov, vhodných na realizáciu dátovo orientovaných analýz. Pre účely tejto práce sú využité

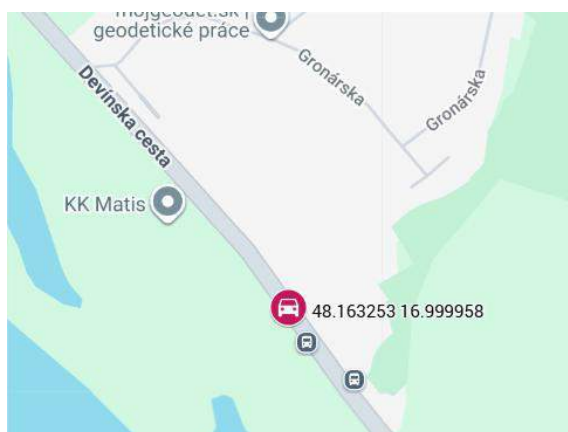
údaje z počítadiel intenzity motorovej dopravy [3], cyklodopravy [4], meteorologické údaje [5] a evidencia dopravných nehôd [6]. Integrácia spomínaných dát umožňuje aplikáciu analytických a prediktívnych metód v oblasti hodnotenia dopravnej bezpečnosti.

1 Spracovanie datasetov

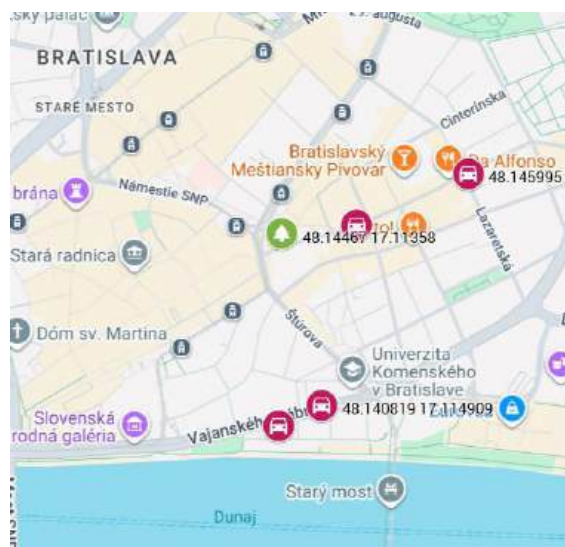
Spracovanie datasetov bolo realizované v programovacom jazyku Python v prostredí Jupyter Notebook. Analyzované obdobie zahŕňa roky 2023-2025.

Proces spracovania datasetov zahŕňal čistenie dát, časovú synchronizáciu datasetov na hodinovú úroveň, spojenie datasetov pomocou časovej a lokalizačnej spojitosti a tvorbu nových atribútov potrebných pre model. Údaje boli synchronizované na jednotnú hodinovú časovú os, keďže datasety počítadiel obsahovali hodinové záznamy a následne nehody boli agregované do binárnej premennej, kde 1 predstavovala nehodu a 0 ostatný stav. Pre lepšie učenie sa modelu bol použitý dvojhodinový kĺzavý priemer z minulosti, takto sme minimalizovali únik z budúcnosti do minulosti.

Datasety počítadiel intenzity prejazdov vozidiel a cyklistov, boli analyzované spolu. Potrebovali sme nájsť také lokality, ktoré disponujú senzormi na sčítanie auto aj cyklodopravy. Pomocou súradníc počítadiel sa nám podarilo vymedziť tri takéto lokality umiestnené na Vajanskom nábreží, Dunajskej ulici a Devínskej ceste v Bratislave, ako je viditeľné na mapách pomocou piatich bodov ružového vozidla s presnými súradnicami, zobrazených na Obr. 1 a Obr. 2.



Obr. 1 Mapa počítadiel



Obr. 2 Mapa počítadiel

V datasete nehodovosti sme filtrovali nehody pomocou 300 m radiusu od počítadiel.

Následne sme spojili všetky dáta do jedného datasetu, vrátane datasetu o počasi, ktorý obsahoval detailné dáta o počasi ako teplota, zrážky, dážď, sneženie, zamračenosť, vietor, nárazový vietor a pod.

Avšak dataset je pomerne nevyvážený, keďže výskyt nehôd predstavuje približne 0.5 % všetkých pozorovaní.

1.1 Časové úpravy datasetov

Čas predstavuje cyklickú veličinu, a teda pre lepšie pochopenie času modelom, sme použili cyklickú transformáciu času, pomocou ktorej bude čas vnímaný ako dve súradnice \sin a \cos . Takto upravený čas zabezpečí vnímanie času pomocou blízkosti ako bod na kružnici. Pre model bude zrejme, že po 23.00 nasleduje 00.00 a zachováme prirodzenú periodicitu [7].

Pre potreby zachytenia súvisu intenzity dopravy bol použitý kĺzavý dvojhodinový priemer z minulosti [8]. Pozri vzťah (1).

$$y(n) = \frac{1}{4}x(n) + \frac{1}{4}x(n-1) + \frac{1}{4}x(n-2) + \frac{1}{4}x(n-3) \quad (1)$$

1.2 Transformácia kategórií

Kategorické premenné lokalita, víkend, skupiny počasia boli premenené na typ categorical pri vytváraní modelu pomocou funkcie *fitglm* pričom sa transformovali na binárne indikátory s tým, že jedna kategória sa určí ako referenčná [11]. Napr.:

Lokalita	Dunajská	Devínska
Vajanského	0	0
Dunajská	1	0
Devínska	0	1

Meteorologický parameter `weather_code` bol agregovaný do širších skupín (*weather_group*): jasno, oblačno, mrholenie, sneh, aby sa eliminoval vplyv zriedkavých kategórií [5].

2 Tvorba modelu

Model bol vytvorený pomocou metód strojového učenia sa, teda učenia sa zo skúseností. Strojové učenie rozlišujeme na učenie sa s učiteľom (supervised learning) alebo bez učiteľa (unsupervised learning) [13]. Vzhľadom na dáta a cieľ práce bola zvolená metóda učenia sa s učiteľom, konkrétne klasifikačný prístup.

Modelovanie bolo realizované v prostredí Matlab, pomocou Classification Learner App. Spomedzi testovaných algoritmov dosahoval najlepšie výsledky Fine Tree a porovnateľné výsledky mala aj logistická regresia.

Po detailnejšom zhodnotení Fine Tree sme zistili, že vytvoril jednoduchú štruktúru.

Použitie neurónových sietí nebolo zvolené z dôvodu vysokého rizika preučenia sa, pretože vyžadujú omnoho rozsiahlejšie tréningové dáta [14].

Nakoniec na tréningovanie rizikového skórovacieho modelu pre hodinovú pravdepodobnosť nehody bola použitá na modelovanie logistická regresia pomocou Matlab funkcie *fitglm*.

Logistická regresia [9] modeluje pravdepodobnosť výskytu javu podľa vzťahu (2):

$$\log \frac{p(X)}{1-p(X)} = \beta_0 + \beta_1 \cdot X. \quad (2)$$

Pričom:

- p je pravdepodobnosť nehody,
- β_i sú regresné koeficienty, ktorých hodnota reprezentuje zmenu tzv. „log-odds“, ktoré nám hovoria, čo sa stane, ak sa premenná zvýši o jednotku,
- X sú prediktory [9].

Exponenciáciou regresných koeficientov získame pomer šancí (OddsRatio OR) a teda, ak obe strany rovnice vložíme do exponenciálnej funkcie [9] vznikne nasledujúca rovnica (3):

$$\frac{p(X)}{1-p(X)} = e^{\beta_0 + \beta_1 X} \quad (3)$$

Obr. 3 zobrazuje zoznamom prediktorov, s ktorými sme pracovali.

```
inputTable = data(:, { ...
    'NAZOV', ...
    'hour_sin', ...
    'hour_cos', ...
    'je_vikend', ...
    'auto_total', ...
    'cyklo_total', ...
    'auto_ma2', ...
    'cyklo_ma2', ...
    'temperature_2m', ...
    'precipitation', ...
    'wind_gusts_10m', ...
    'weather_group'
});
```

Obr. 3 Zoznam prediktorov

2.1 Hodnotenie modelu

Model bol hodnotený na základe ROC krivky (AUC), matice zámen, presnosť (Precision), senzitivita (Recall), F1-skóre (F1-score) a krížová entropia (Cross-Entropy (LogLoss)), ako je znázornené na Obr. 4.

```
AUC hodnota: 0.6911
Optimal threshold: 0.034027
Cross-Entropy (LogLoss): 0.042255
Precision: 0.0064626
Recall: 0.7037
F1-score: 0.012808
```

Obr. 4 Hodnoty modelu

2.2 ROC krivka a matica zámen

ROC krivka (Receiver operating characteristic) je založená na kontingenčnej tabuľke skutočného stavu (či nehoda nastala alebo nenastala) a predpovede modelu [15], v našom prípade (Tab. 1):

Tab. 1 Matica zámen [15]

	Nehoda nastala	Nehoda nenastala	
Model predpovedal nehodu	TP	FP	→PPV
Model nepredpovedal nehodu	FN	TN	→NPV
	↓ TPR	↓ FPR	

Pričom podľa Jana Hrdličku [15]:

- TP: true positive - správne
- TN: true negative – správna negativita
- FP: false positive – falošná pozitivita
- FN: false negative – falošná negativita
- TPR: true positive rate – senzitivitu (recall) vypočítame ako:

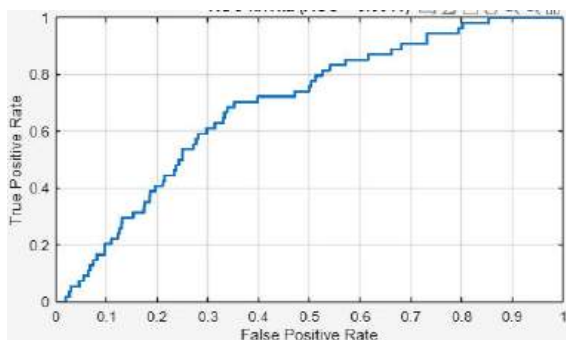
$$\text{Senzitivita} = TP / (TP + FN) \quad (4)$$

- FPR: false positive rate – mieru falošnej

pozitivity vypočítame ako:

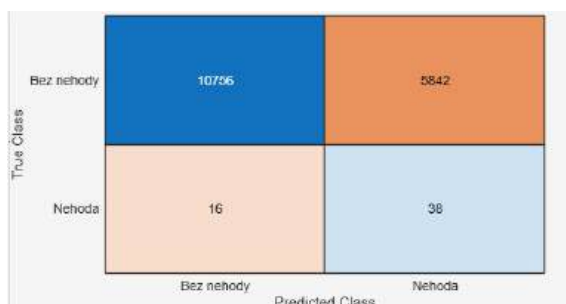
$$1 - \text{špecificita} = FP / (TN + FP) \quad (5)$$

Hodnota AUC (plocha pod krivkou) [15] dosahuje 0.6911, a teda pravdepodobnosť priradenia vyššieho rizika vybranej hodine s nehodou než hodine bez nehody je na úrovni takmer 70%, vid' Obr. 5.



Obr. 5 ROC krivka

Model dokázal identifikovať približne 70 % nehôd, keďže z 54 nehôd je identifikovaných 38 (vid' Obr. 6), avšak presnosť (precision) je pomerne nízka len na úrovni 0.6 %, čo je spôsobené nevyváženosťou dát, keďže nehody predstavujú len 0.5 % z celkových pozorovaní. V praxi by to mohlo viesť k častým nesprávnym upozorneniam.



Obr. 6 Matica zámen

Optimálny prah klasifikácie (optimal threshold) bol určený pomocou Youdenovho indexu (J), ktorý maximalizuje kombináciu senzitivity a špecificity [10].

$$J = \text{senzitivita} + \text{špecificita} - 1 \quad (6)$$

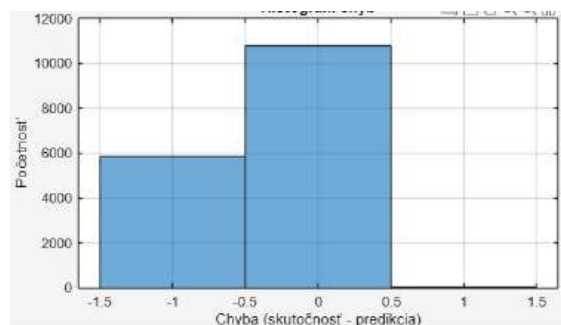
2.3 Histogram chýb

Histogram chýb, zobrazený na Obr. 7, predstavuje chybu ako rozdiel skutočnosti a predikcie.

Korešponduje s výsledkom z matice zámen, kedy hodnoty okolo 0 predstavujú identifikáciu stavu bez nehody, hodnoty okolo -1 predstavujú falošnú pozitivitu a hodnoty okolo 1 predstavujú falošnú negativitu.

Model síce minimalizuje falošnú negativitu, ale na

úkor falošnej pozitivity, čo nám potvrdzuje výsledok senzitivity (recall) na úrovni približne 70%.



Obr. 7 Histogram chýb

3 Výsledky a diskusia

Nasledujúca tabuľka predstavuje dané faktory ovplyvňujúce riziko nehody.

Interpretáciu výsledku pomocou pomeru šancí (OR):

- ak je OR > 1 tak riziko sa zvyšuje,
- ak je OR < 1 tak riziko sa znižuje,
- ak je OR = 1 tak nemá význam [9].

Tab. 2 Faktory ovplyvňujúce riziko nehody

Premenná	Beta	OddsRatio	pValue
{'NAZOV_Dunajská ulica' }	-0.06304	0.93891	0.39789
{'NAZOV_Devínska cesta' }	-0.13416	0.87445	0.064316
{'hour_sin' }	-0.43608	0.64657	2.0435e-31
{'hour_cos' }	-1.0032	0.36669	1.0414e-101
{'je_vikend_1' }	-0.4412	0.64326	5.7921e-15
{'auto_total' }	-0.002285	0.99772	3.9888e-14
{'cyklo_total' }	-0.0046604	0.99535	0.01808
{'auto_ma2' }	0.0017485	1.0017	1.3767e-09
{'cyklo_ma2' }	0.0066546	1.0067	0.0003697
{'temperature_2m' }	-0.026223	0.97412	5.3686e-17
{'precipitation' }	-0.0052695	0.99474	0.96072
{'wind_gusts_10m' }	-0.016822	0.98332	5.0582e-16
{'weather_group_Jasno' }	-0.058126	0.94353	0.85309
{'weather_group_Mrholenie' }	-0.99022	0.3715	0.00093968
{'weather_group_Oblačno' }	-0.30825	0.73473	0.32586
{'weather_group_Sneh' }	-99.546	5.8573e-44	0.99998

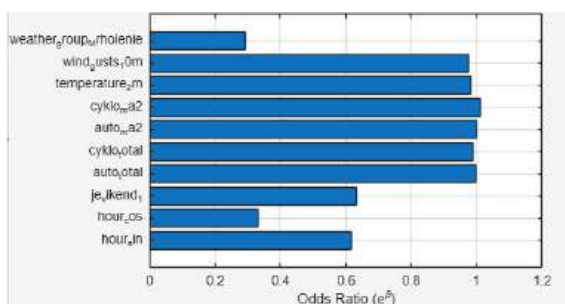
Z výsledkov vyplýva, že víkend znižuje riziko nehody o cca 36 %. Premenná temperature_2m hovorí, že každé zvýšenie teploty o stupeň zníži riziko o približne 2.6 %. A zaujímavým zistením je, že mrholenie vykazuje negatívny koeficient, čo spôsobuje zníženie rizika o cca 53 %. Môže to súvisieť so zvýšenou opatrnosťou vodičov počas nepriaznivého počasia.

3.1 Faktory ovplyvňujúce riziko nehody

Medzi najvýznamnejšie faktory ovplyvňujúce nehody patria intenzita dopravy, čas a z meteorologických ukazovateľov: teplota, nárazový vietor a mrholenie.

Na Obr. 8 sú vyobrazené iba štatisticky významné hodnoty pomocou premennej pHodnota (pValue), ktoré filtrujeme len na premenné s hodnotou nižšou ako 5 %, a teda ich vplyv na vznik nehody je štatisticky preukázateľný.

```
significant = coeffTable.pValue < 0.05;
```



Obr. 8 Významné faktory ovplyvňujúce riziko nehody

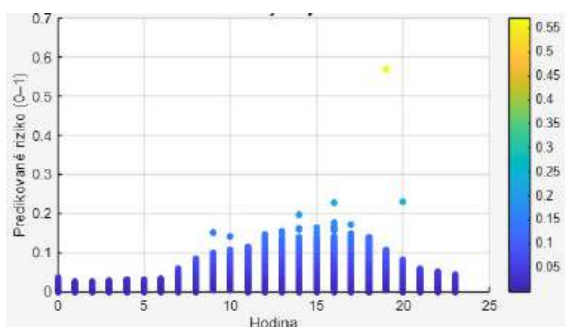
3.2 Hodinové riziko nehôd

Vajanského nábrežie sme nastavili ako referenčnú ulicu, keďže obsahuje najviac dát, a teda ostatné ulice predstavujú rozdiel oproti referenčnej ulici.

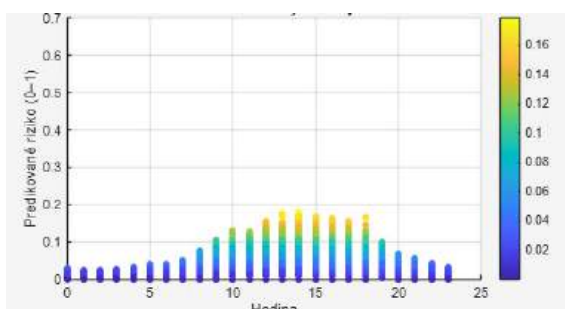
Všetky lokality vykazujú podobný trend, najvyššie riziko vzniká počas špičiek ráno a popoludní, nízke riziko je skoro ráno a večer a minimálne riziko v noci.

Maximálne rizikové skóre pre jednotlivé lokality:

- Vajanského nábrežie ~ 0.60 (Obr. 9)
- Dunajská ulica ~ 0.18 (Obr. 10)
- Devínska cesta ~ 0.34 (Obr. 11)



Obr. 9 Hodinové rizikové skóre pre Vajanského nábrežie



Obr. 10 Hodinové rizikové skóre pre Dunajskú ulicu



Obr. 11 Hodinové rizikové skóre pre Devínsku cestu

Záver

Ukázali sme, že na základe dopravných, nehodových a meteorologických dát sme dokázali kvantifikovať hodinové riziko dopravnej nehodovosti pomocou logistickej regresie.

Model dosiahol strednú diskriminačnú schopnosť (AUC ≈ 0.69) a identifikoval významné faktory vplyvajúce na riziko nehody, ide najmä o čas, teplotu, typ dňa (víkend vs. pracovný deň) a intenzitu dopravy.

Schopnosť zachytiť približne 70 % nehôd je však dosiahnutá na úkor veľmi nízkej presnosti (≈ 0.6 %), čo je dôkazom výraznej nevyváženosti dát. V praxi by to znamenalo vysoký počet falošných poplachov, čo obmedzuje jeho priame využitie.

Z hľadiska praktickej aplikácie je možné tento prístup využiť v koncepte inteligentného mesta ako:

- podklad pre inteligentné riadenie dopravy,
- preventívne bezpečnostné upozornenia vodičom prostredníctvom informačných panelov, navigačných aplikácií, upozornení vo vozidle, dopravné portály a pod.,
- plánovanie zásahových dopravných kapacít v kritických hodinách,
- podklad plánovania dopravnej infraštruktúry [12].

Model predstavuje príklad dátovo orientovaného riadenia mesta, ktoré je základným princípom Smart City konceptu [1].

Podakovanie

Ďakujem pani doc. Škrinárovej a pánovi prof. Svítekovi za to, že mi dokázali tému inteligentných miest predstaviť zaujímavým a pútavým spôsobom, ktorý ma nakoniec motivoval k hlbšiemu spracovaniu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SVÍTEK, Miroslav; POSTRÁNECKÝ, Michal a kolektív, (2018). *Města budoucnosti*. Praha: NADATUR, spol. s r.o., ISBN 978-80-7270-058-5.
- [2] AKADÉMIA POLICAJNÉHO ZBORU V BRATISLAVE KATEDRA POLICAJNÝCH VIED [online]. DOPRAVNO-BEZPEČNOSTNÉ ČINNOSTI 3. [23.02.2026]. Dostupné na: <https://share.google/tlMLQWly26UZZGUyR>

- [3] Magistrát hlavného mesta SR, Bratislava. [online]. Počet prejazdov vozidiel podľa sítačov za hodinu. [20.12.2025]. Dostupné na: https://data.bratislava.sk/datasets/7b5628f9234a461e8becfa37665290b3_0/explore
- [4] Magistrát hlavného mesta SR, Bratislava. [online]. Počet prejazdov cyklistov podľa sítačov za hodinu. [20.12.2025]. Dostupné na: https://data.bratislava.sk/datasets/097b7c8bc4b94560a7e34c9e64139a5e_0/explore
- [5] Open-Meteo. [online]. Historical Forecast API. [10.02.2026]. Dostupné na: <https://open-meteo.com/en/docs/historical-forecast-api>
- [6] Ministerstvo vnútra SR, Odbor Dopravnej Polície. Evidencia dopravných nehôd za roky 2023-2025. Interný dataset poskytnutý na vyžiadanie. Nepublikované
- [7] Axel Kud. [online]. Why we need encoding cyclical features. [24.02.2026]. Dostupné na: <https://medium.com/@axelazara6/why-we-need-encoding-cyclical-features-79ecc3531232>
- [8] Matlab. [online]. Data Analysis. [10.02.2026]. Dostupné na: <https://share.google/vpCgJbojQME6GTtPI>
- [9] MACHOVÁ, Kristína, (2016). Nové trendy v strojovom učení. Košice: Edícia vedeckých spisov Fakulty elektrotechniky a informatiky TU Košice., ISBN: 978-80-553-2602-3. Dostupné online na: <https://share.google/KJukYr5RZ9GzTewvy>
- [10] Daniel Berrar. [online]. Performance Measures for Binary Classification. [24.02.2026]. Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/referencework/abs/pii/B9780128096338203518>
- [11] MathWorks. [online]. fitglm. [24.02.2026]. Dostupné na: <https://nl.mathworks.com/help/stats/fitglm.html>
- [12] European Commission. [online]. Exploratory Study to assess the need for complementary action in the field of enhanced traffic and incident management services. ISBN 978-92-68-31146-2. [24.02.2026]. Dostupné na: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/df073872-9a87-11f0-97c8-01aa75ed71a1>
- [13] MathWorks . [online]. Machine Learning in MATLAB. [26.02.2026]. Dostupné na: <https://nl.mathworks.com/help/stats/machine-learning-in-matlab.html>
- [14] MathWorks . [online]. What Is a Neural Network?. [26.02.2026]. Dostupné na: <https://nl.mathworks.com/discovery/neural-network.html>
- [15] Jan Hrdlička. [online]. Výběr modelu, ROC křivka. [02.03.2026]. Dostupné na: https://cw.fel.cvut.cz/old/_media/courses/m33sad/roczadani.pdf

Diniho derivované čísla

Dini derivative numbers

Zuzana Kocúrová¹

Školiteľ: Vladimír Janiš²

^{1,2}Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹zuzana.kocurova@student.umb.sk, ²vladimir.janis@umb.sk

Abstrakt

Diniho derivácia je koncept derivácie, ktorá umožňuje analyzovať správanie funkcií na základe ich diferenciálnych vlastností. Skúmame aplikácie Diniho derivácií a ich vlastnosti, ako sú monotónnosť, spojitosť a extémy, spolu s praktickými príkladmi a ich riešeniami. Z analýzy vyplýva, že Diniho derivácie umožňujú modelovať správanie širšej kategórie funkcií. Výsledky práce potvrdzujú, že Diniho derivácie predstavujú efektívny nástroj na identifikáciu významných bodov funkcií a lepšie pochopenie ich diferenciálnych vlastností.

Kľúčové slová: reálna funkcia, Diniho derivácia, spojitosť, limes superior, limes inferior

Abstract

Dini derivative is a concept of derivative, which allows us to analyze how functions behave based on their differential properties. Applications of Dini derivatives and its properties, such as monotonicity, continuity and extremes, are examined along with practical examples and their solutions. The analysis shows that Dini derivatives allow to modeling behavior of a wider range of functions. The result of the work confirms that Dini derivatives are an effective tool for identifying significant points of functions and better understanding of their differential properties.

Key words real-valued function, Dini derivative, continuity, limes superior, limes inferior

1 Diniho derivované čísla

Diniho derivované čísla predstavujú rozšírenie pojmu derivácie v reálnej analýze. Umožňujú študovať lokálne správanie funkcií aj v bodoch, kde derivácia neexistuje.

Derivácia funkcie f v bode x_0 je definovaná ako

$$f'(x_0) = \lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h},$$

ak táto limita existuje. Vyžaduje sa, aby limita zľava aj sprava bola rovnaká a konečná.

Avšak mnohé funkcie majú v určitých bodoch zlomové miesta alebo skoky, kde táto limita neexistuje. Napríklad funkcia $f(x) = |x|$ nie je diferencovateľná v bode $x = 0$, hoci je spojitá a má jednoznačnú deriváciu zľava a sprava.

Práve tu využívame Diniho derivované čísla, ktoré študujú horné a dolné limity, čiže podiel

$$\frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h},$$

ktoré nám umožnia analyzovať jednostranné derivácie.

Limes superior (limsup) a limes inferior (liminf)

Predtým, než detailne preskúmame Diniho derivácie, je potrebné pochopiť, čo znamenajú *limsup* a *liminf*. Nech (a_n) je postupnosť. Ak limita tejto postupnosti neexistuje, môže stále existovať jej limes superior a limes inferior.

Definícia limsup

$$\limsup_{n \rightarrow \infty} a_n = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(\sup_{k \geq n} a_k \right).$$

Limes superior je teda najmenšia horná hranica všetkých hromadných hodnôt a_n .

Definícia liminf

$$\liminf_{n \rightarrow \infty} a_n = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(\inf_{k \geq n} a_k \right).$$

Limes inferior je najväčšia dolná hranica všetkých hromadných hodnôt a_n .

Zrejme je splnená nerovnosť

$$\liminf_{n \rightarrow \infty} a_n \leq \limsup_{n \rightarrow \infty} a_n$$

Ak sa \liminf a \limsup zhodujú, ruvnajú sa limite tejto postupnosti.

Definícia Diniho derivovaných čísel

Nech funkcia f je spojitá a definovaná na intervale $I = (a, b)$. Nech $x_0 \in (a, b)$.

Definujeme štyri Diniho derivované čísla:

1. **Horné derivované číslo sprava funkcie f v bode x_0 :**

$$D^+ f(x_0) := \limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h}$$

2. **Dolné derivované číslo sprava funkcie f v bode x_0 :**

$$D_+ f(x_0) := \liminf_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h}$$

3. **Horné derivované číslo zľava funkcie f v bode x_0 :**

$$D^- f(x_0) := \limsup_{h \rightarrow 0^-} \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h}$$

4. **Dolné derivované číslo zľava funkcie f v bode x_0 :**

$$D_- f(x_0) := \liminf_{h \rightarrow 0^-} \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h}$$

Geometrická interpretácia

Predstavme si graf funkcie f . Hodnoty

$$\frac{f(x+h) - f(x)}{h}$$

sú smernicami priamok prechádzajúcich bodom $(x, f(x))$ a $(x+h, f(x+h))$.

- **Horná pravostranná Diniho derivácia** zodpovedá najväčšej limitnej smernici dotyčnice pravej strany grafu v bode x .
- **Dolná pravostranná Diniho derivácia** zodpovedá najmenšej limitnej smernici dotyčnice pravej strany.
- Analógia platí pre ľavé Diniho derivácie.

Ak sa všetky štyri zhodujú, máme deriváciu — jediná smernicu dotyčnice.

V opačnom prípade funkcia nemusí byť hladká a v danom bode môže vykazovať napríklad ostrý zlom alebo iný typ nehladkého správania.

Vzťah medzi Diniho deriváciami a deriváciou

Tvrdenie:

Funkcia f má deriváciu v bode x s deriváciou L práve vtedy, keď

$$D_+ f(x) = D^+ f(x) = D^- f(x) = D_- f(x) = L$$

Dôkaz:

Ak $f'(x) = L$, potom limita

$$\lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(x+h) - f(x)}{h} = L$$

existuje, teda:

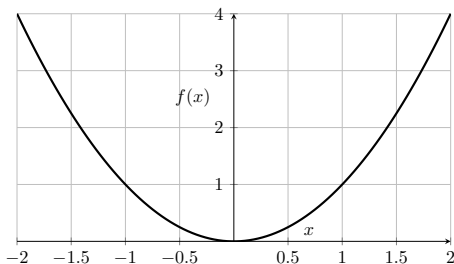
$$\limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(x+h) - f(x)}{h} = \liminf_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(x+h) - f(x)}{h} = L$$

a podobne pre $h \rightarrow 0^-$.

Naopak, ak sú všetky Diniho derivácie rovnaké, potom limsup a liminf sa zhodujú, a teda derivácia existuje.

Príklady

Príklad 1: Funkcia $f(x) = x^2$ v bode 0



Derivácia

$$f'(x) = 2x \implies f'(0) = 0$$

Takže očakávame, že pravé aj ľavé Diniho derivácie budú tiež 0.

Diniho derivácie

Horná pravá Diniho derivácia:

$$\begin{aligned} D^+ f(0) &= \limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(0+h) - f(0)}{h} \\ &= \limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{h^2 - 0}{h} \\ &= \limsup_{h \rightarrow 0^+} h \\ &= 0. \end{aligned}$$

Dolná pravá Diniho derivácia:

$$\begin{aligned} D_+ f(0) &= \liminf_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(0+h) - f(0)}{h} \\ &= \liminf_{h \rightarrow 0^+} \frac{h^2 - 0}{h} \\ &= \liminf_{h \rightarrow 0^+} h \\ &= 0. \end{aligned}$$

Horná ľavá Diniho derivácia:

$$\begin{aligned} D^- f(0) &= \limsup_{h \rightarrow 0^-} \frac{f(0+h) - f(0)}{h} \\ &= \limsup_{h \rightarrow 0^-} \frac{h^2 - 0}{h} \\ &= \limsup_{h \rightarrow 0^-} h \\ &= 0. \end{aligned}$$

Dolná ľavá Diniho derivácia:

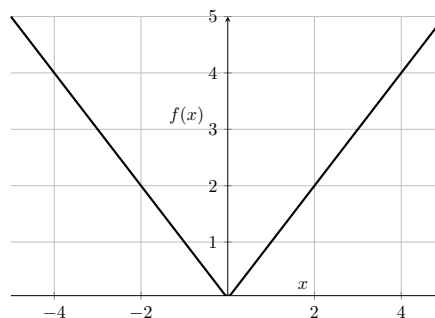
$$\begin{aligned} D_- f(0) &= \liminf_{h \rightarrow 0^-} \frac{f(0+h) - f(0)}{h} \\ &= \liminf_{h \rightarrow 0^-} \frac{h^2 - 0}{h} \\ &= \liminf_{h \rightarrow 0^-} h \\ &= 0. \end{aligned}$$

Pre $f(x) = x^2$ v bode 0 platí:

$$D^+ f(0) = D^- f(0) = 0; \quad D_+ f(0) = D_- f(0) = 0,$$

Funkcia je hladká, a všetky Diniho derivácie sa zhodujú s deriváciou, preto $f'(0) = 0$, v tomto prípade sme si vystačili s deriváciou.

Príklad 2: Funkcia $f(x) = |x|$ v bode 0



Pravostranný prírastok:

$$\frac{|0+h| - |0|}{h} = \frac{h}{h} = 1, \quad h > 0,$$

Ľavostranný prírastok:

$$\frac{|0+h|-|0|}{h} = \frac{-h}{h} = -1, \quad h < 0.$$

Preto:

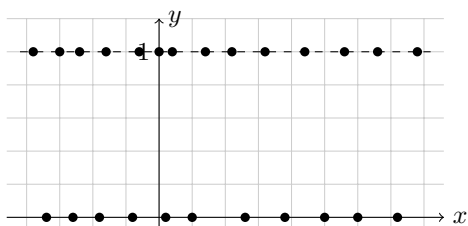
$$D_+f(0) = D^+f(0) = 1, \quad D_-f(0) = D^-f(0) = -1,$$

Horné a dolné derivácie sprava a zľava sa rovnajú, no nezhodujú sa medzi stranami, teda derivácia v bode $x = 0$ neexistuje, avšak Diniho derivácie áno.

Príklad 3: Dirichletová funkcia

$$f(x) = \begin{cases} 1, & x \in \mathbb{Q}, \\ 0, & x \notin \mathbb{Q}, \end{cases}$$

v bode $x = 0$.



Pre $h \neq 0$ máme podiel:

$$\frac{f(h) - f(0)}{h} = \frac{f(h) - 1}{h}.$$

Rozlíšime dva prípady:

- Ak $h \in \mathbb{Q}$, potom $f(h) = 1$, teda

$$\frac{f(h) - 1}{h} = 0.$$

- Ak $h \notin \mathbb{Q}$, potom $f(h) = 0$, teda

$$\frac{f(h) - 1}{h} = \frac{-1}{h}$$

Pre pravé Diniho derivácie platí:

- pre racionálne h :

$$\frac{f(h) - 1}{h} = \frac{1 - 1}{h} = 0$$

- pre iracionálne h :

$$\frac{f(h) - 1}{h} = \frac{0 - 1}{h} = \frac{-1}{h} \rightarrow -\infty$$

Z tohto dostávame:

$$D^+f(0) = 0 \quad \text{a} \quad D_+f(0) = -\infty$$

Pre ľavé Diniho derivácie platí:

- pre racionálne $-h$:

$$\frac{f(h) - 1}{-h} = \frac{1 - 1}{-h} = 0$$

- pre iracionálne $-h$:

$$\frac{f(h) - 1}{-h} = \frac{0 - 1}{-h} = \frac{1}{h} \rightarrow \infty$$

Preto:

$$D_-f(0) = 0 \quad \text{a} \quad D^-f(0) = \infty$$

Výsledkom sú dve nasledujúce nerovnosti:

$$D^+f(0) \neq D_+f(0),$$

$$D_-f(0) \neq D^-f(0);$$

preto funkcia f nie je derivovateľná v bode $x = 0$.

Toto zároveň ilustruje všeobecný princíp: ak sa horná a dolná Diniho derivácia líšia, derivácia v danom bode neexistuje.

V prípade Dirichletovej funkcie platí:

$$D^+f(0) = 0, \quad D_+f(0) = -\infty,$$

$$D^-f(0) = +\infty, \quad D_-f(0) = 0,$$

čo ukazuje, že funkcia je extrémne oscilujúca a nederivovateľná v každom bode, aj napriek striktnému definovaniu funkcie v každom jej bode $x \in \mathbb{R}$.

2 Vlastnosti Diniho derivácií

Väzba Diniho derivácií na monotónnosť funkcie

Diniho derivácie poskytujú užitočný nástroj na štúdium monotónnosti funkcií. Niektoré funkcie majú totiž špecifické vlastnosti svojich derivácií.

Ak je funkcia f rastúca (klesajúca) na intervale (a, b) , potom jej horné a dolné Diniho derivácie z ľavej a j pravej strany sú nezáporné (nekladné) v každom bode tohto intervalu:

$$\begin{aligned} D_- f(x) &\geq 0, & D^- f(x) &\geq 0, \\ D_+ f(x) &\geq 0, & D^+ f(x) &\geq 0 \end{aligned}$$

pre všetky x , resp.

$$\begin{aligned} D_- f(x) &\leq 0, & D^- f(x) &\leq 0, \\ D_+ f(x) &\leq 0, & D^+ f(x) &\leq 0 \end{aligned}$$

pre všetky x .

Táto vlastnosť nie je ničím odlišná od derivácie. Spojením týchto štyroch vlastností dostávame nasledujúcu nerovnosť, ktorá platí pre rastúce (klesajúce) funkcie:

$$D_- f(x) \leq D^- f(x) \leq D_+ f(x) \leq D^+ f(x),$$

$$D^- f(x) \geq D_- f(x) \geq D^+ f(x) \geq D_+ f(x).$$

Väzba Diniho derivácií na spojitost' funkcie

Spojitosť funkcie v bode je nevyhnutná pre interpretáciu derivácií, aj napriek tomu, že nie všetky spojitě funkcie sú diferencovateľné. Ak funkcia nie je spojitá v bode x vieme využiť práve Diniho derivované čísla.

- Ak je f spojitá v bode x , potom platí

$$\lim_{h \rightarrow 0} (f(x+h) - f(x)) = 0,$$

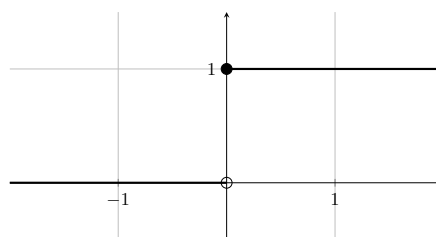
teda zmena hodnoty funkcie okolo x je malá.

- Ak f nie je spojitá, môžu nastať skoky na krivke, vtedy deriváciu nevieme využiť, preto využijeme na popis Diniho derivované čísla. Výsledok sa prejaví nerovnosťou medzi Diniho derivovanými číslami.

Príklad nespojitej funkcie

Uvažujme funkciu

$$f(x) = \begin{cases} 0, & x < 0, \\ 1, & x \geq 0. \end{cases}$$



V bode $x = 0$ je funkcia $f(x)$ nespojitá, derivácia preto neexistuje. Využijeme Diniho derivácie, ktoré sú nasledovné:

$$D^+ f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{1-1}{h} = 0,$$

$$D_+ f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^+} \frac{1-1}{h} = 0,$$

a

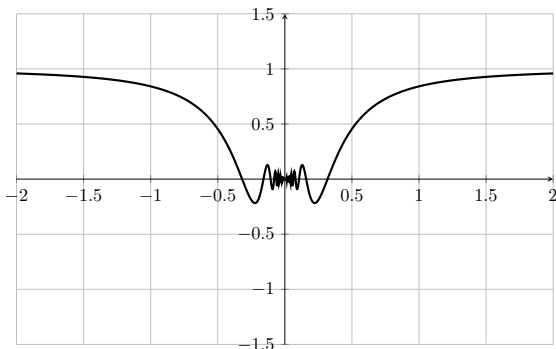
$$D^- f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^-} \frac{0-1}{h} = -\infty,$$

$$D_- f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^-} \frac{0-1}{h} = -\infty.$$

Príklad spojitej funkcie, ktorá nemá deriváciu

Majme funkciu $f(x)$ definovanú nasledovne:

$$f(x) = \begin{cases} x \sin \frac{1}{x}, & x \neq 0; \\ 0, & x = 0. \end{cases}$$



Derivácia v bode $x = 0$ by bola nasledovná:

$$\begin{aligned} f'(0) &= \lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(0+h) - f(0)}{h} \\ &= \lim_{h \rightarrow 0} \frac{h \sin \frac{1}{h} - 0}{h} \\ &= \lim_{h \rightarrow 0} \sin \frac{1}{h}. \end{aligned}$$

Funkcia $\sin(\frac{1}{h})$ osciluje medzi -1 a 1 pri $h \rightarrow 0$, teda limita neexistuje. Derivácia v bode $x = 0$ neexistuje aj napriek tomu, že funkcia je spojitá, preto využijeme Diniho derivované čísla.

Majme podiel:

$$\frac{f(h+0) - f(0)}{h} = \frac{h \sin(\frac{1}{h}) - 0}{h} = \sin \frac{1}{h}.$$

Pravé Diniho derivované čísla:

$$D^+ f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^+} \sin \frac{1}{h} = 1 \Rightarrow D^+ f(0) = 1,$$

$$D_+ f(0) = \liminf_{h \rightarrow 0^+} \sin \frac{1}{h} = -1 \Rightarrow D_+ f(0) = -1$$

Ľavé Diniho derivované čísla:

$$D^- f(0) = \limsup_{h \rightarrow 0^-} \sin \frac{1}{h} = 1, \Rightarrow D^- f(0) = 1,$$

$$D_- f(0) = \liminf_{h \rightarrow 0^-} \sin \frac{1}{h} = -1 \Rightarrow D_- f(0) = -1$$

Teda:

$$D^+ f(0) = D^- f(0) = 1, \quad D_+ f(0) = D_- f(0) = -1.$$

To znamená, že hodnoty smernice podielov sa pohybujú v intervale medzi -1 a 1 pri priblížení k nule.

Extrémy

Tvrdenie

Nech funkcia f je definovaná na uzavretom intervale z $[a, b] \rightarrow \mathbb{R}$, je spojitá. Pre funkčné hodnoty $f(a)$ a $f(b)$ platí: $f(a) = f(b) = 0$. Potom existuje bod c na intervale (a, b) , kde nastane jedna z nasledujúcich situácií:

$$(1.) \quad \begin{aligned} D_- f(c) &\leq 0, & D^- f(c) &\leq 0, \\ D_+ f(c) &\geq 0, & D^+ f(c) &\geq 0 \end{aligned}$$

$$(2.) \quad \begin{aligned} D_- f(c) &\geq 0, & D^- f(c) &\geq 0; \\ D_+ f(c) &\leq 0, & D^+ f(c) &\leq 0 \end{aligned}$$

Dôkaz

Ak je funkcia f na intervale $[a, b]$ konštantná, v tomto prípade je dôkaz evidentný, pretože všetky Diniho derivované čísla sú v každom bode rovné nule.

Predpokladajme teda, že f nie je konštantná. Zo spojitosti na uzavretom intervale vyplýva, že f nadobúda svoje maximum aj minimum. Keďže $f(a) = f(b) = 0$, aspoň jedna z týchto extrémnych hodnôt je nenulová a dosahuje sa v niektorom vnútornom bode c na intervale (a, b) .

Ak funkcia nadobúda v bode c kladné maximum a bod $x > c$, potom platí

$$\frac{f(x) - f(c)}{x - c} \leq 0.$$

Z toho vyplýva vzťah (1.)

Naopak ak funkcia nadobúda záporné minimum, analogickým postupom dostávame vzťah (2.)

Dôsledok

Nech funkcia f je spojitá na intervale $[a, b]$ a platí $f(a) = f(b)$. Potom existuje bod c na intervale (a, b) , pre ktorý platí

$$f'_+(c) \cdot f'_-(c) \leq 0.$$

Dôsledok (Rolleova veta)

Nech funkcia f je spojitá na intervale $[a, b]$ a derivácia funkcie f je f' a existuje v intervale (a, b) . Ak $f(a) = f(b)$, potom existuje bod $c \in (a, b)$, pre ktorý

$$f'(c) = 0.$$

Ak existuje derivácia, potom všetky Diniho derivované čísla sa rovnajú jej hodnote. Preto z predchádzajúceho dôsledku vyplýva existencia bodu s nulovou deriváciou.

3 Záver

V našej práci sme sa venovali Diniho derivovaným číslam ako rozšíreniu základného pojmu derivácie a skúmali sme ich význam pri analýze správania reálnych funkcií. Ukázali sme, že umožňujú opísať lokálne vlastnosti funkcie aj v bodoch, kde derivácia neexistuje.

Na vybraných príkladoch sme demonštrovali situácie, keď sa všetky Diniho derivované čísla zhodujú, ako aj prípady, keď sa líšia a poukazujú na nehladkosť, osciláciu alebo nespojitosť funkcie. Porovnanie horných a dolných jednostranných derivácií poskytuje dôležité informácie o monotónnosti funkcie a o podmienkach existencie extrémov.

Získané poznatky rozširujú aparát diferenciálneho počtu a umožňujú pracovať aj s funkciami, ktoré nie sú hladké. Štúdium Diniho derivácií tak prispieva k presnejšiemu charakterizovaniu lokálneho správania funkcií a k hlbšiemu pochopeniu ich diferenciálnych vlastností.

4 PodĎakovanie

Ďakujem prof. RNDr. Vladimírovi Janišovi, CSc. za jeho cenné rady, odborné pripomienky a čas venovaný konzultáciám pri príprave tejto práce.

Literatúra

- [1] Švec, M., Šalát, T., Neubrunn, T.: Matematická analýza funkcií reálnej premennej, Alfa, Bratislava, 1987.
- [2] Šulka, R., Moravský, L., Satko, L.: Matematická analýza (1), Alfa, Bratislava, 1986.
- [3] Kopáček, J.: Matematická analýza nejen pro fyziky I., MatfyzPress, Praha, 2016.

OSINT ako nástroj detegovania hrozieb

OSINT as a tool for detecting cyber vulnerabilities

Jakub Kubaliak¹

¹Katedra informatiky, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

¹jkubaliak@student.umb.sk

Abstrakt

Práca sa zaoberá využitím spravodajstva z otvorených zdrojov (OSINT) ako nástroja na detekciu potenciálnych hrozieb v oblasti kybernetickej bezpečnosti. V teoretickej časti je opísaný princíp fungovania OSINT, jeho historický vývoj, proces analýzy a hlavné výhody a obmedzenia pri práci s verejne dostupnými informáciami. Praktická časť je zameraná na realizáciu jednoduchej OSINT analýzy vybraného subjektu s cieľom identifikovať potenciálne bezpečnostné riziká vyplývajúce z verejne dostupných dát. Analýza bola realizovaná kombináciou manuálnych metód a automatizovaných nástrojov, pričom boli porovnané ich možnosti z hľadiska rozsahu a kvality získaných informácií. Výsledky ukázali, že automatizované nástroje umožňujú identifikovať širšie spektrum údajov ako manuálne vyhľadávanie. Práca poukazuje na význam OSINT ako nástroja, ktorý môže pomôcť bezpečnostným analytikom pri identifikácii potenciálnych slabých miest a prevencii kybernetických incidentov.

Kľúčové slová: open-source intelligence, OSINT, kybernetická bezpečnosť, threat intelligence, identifikácia hrozieb

Abstract

The scientific paper deals with the use of open source intelligence (OSINT) as a tool for detecting potential threats in the field of cyber security. The theoretical part describes the principle of OSINT, its historical development, the analysis process, and the main advantages and limitations of working with publicly available information. The practical part focuses on the implementation of a simple OSINT analysis of a selected entity in order to identify potential security risks arising from publicly available data. The analysis was carried out using a combination of manual methods and automated tools, comparing their capabilities in terms of the scope and quality of the information obtained. The results showed that automated tools allow for the identification of a wider

range of data than manual searches. The work highlights the importance of OSINT as a tool that can help security analysts identify potential vulnerabilities and prevent cyber incidents.

Key Words: open-source intelligence, OSINT, cybersecurity, threat intelligence, threat modeling

Úvod

S rozvojom internetu za posledné desaťročia sa zvýšilo aj množstvo informácií, ktoré sú dostupné pre každého na internete. Každoročne ľudstvo vygeneruje údaje v desiatkach zettabajtov, pričom tento trend každým rokom narastá. Sociálne siete, masmédiá, diskusné fóra alebo webstránky predstavujú výrazné zdroje týchto informácií. V rámci kybernetickej bezpečnosti sú tieto informácie dôležité, pretože sa stávajú cenným zdrojom o možných bezpečnostných rizikách, aktivitách útočníkov alebo zraniteľnostiach inštitúcií alebo informačných systémov. Získavanie takýchto informácií a ich následné spracovanie označujeme ako *Open Source Intelligence* (ďalej OSINT), teda spravodajstvo otvorených zdrojov, ktoré predstavuje významný nástroj pri obrane subjektu ačasnej identifikácie hrozieb.

Cieľom tejto práce je opísať OSINT, postup pri jeho aplikovaní, jeho nedostatky a využiteľnosť pri detekcii hrozieb. V rámci experimentu je cieľom vykonať jednoduchú analýzu vybranej inštitúcie, aplikovať rôzne metodiky a porovnať ich kvalitatívnu (porovnanie rozsahu, kvality a relevancie získaných informácií) a kvantitatívnu (počet nájdených informácií) úroveň. Záver práce je zameraný na vyhodnotenie výsledkov analýzy.

1 OSINT

Pod pojmom OSINT označujeme proces vyhľadávania, analýzy a následného spracovania informácií z verejne dostupných zdrojov. Medzi verejne dostupné zdroje patria napríklad sociálne siete, médiá, internet, verejné registre alebo iné voľne dostupné zdroje. Tento proces patrí medzi disciplíny spravodajského zberu informácií, ktorý zaraďujeme ako jeden z hlavných spolu s *Human*

Intelligence (HUMINT), *Signal Intelligence* (SIGINT) alebo *Imagery Intelligence* (IMINT). Metodika a aj samotný OSINT bol využívaný už počas 19. storočia v Americkej občianskej vojne. Medzi významnú zmienku patrí aj získavanie informácií o priebehu druhej svetovej vojny spoločnosťou BBC Monitoring, ktorá vznikla v roku 1939 s cieľom zberu a analýzy informácií zo zahraničných vysielaní a monitorovania diania v ostatných krajinách [1]. Posledný väčší rozkvet OSINT-u nastal s príchodom Internetu, ktorý aj v súčasnej dobe poskytuje rozsiahlu oblasť informácií.

V porovnaní s HUMINT, ktorý pracuje s ľudskými zdrojmi, alebo SIGINT, využívajúci technický zber signálov (komunikačné, rádiové alebo elektronické signály), vychádza OSINT výlučne z informácií, ktoré sú verejne dostupné a získavané pasívnymi spôsobmi, teda nevyžaduje aktívny kontakt s cieľom (pod cieľom rozumieme osobu, inštitúciu alebo iný analyzovaný subjekt). Je dôležité spomenúť, že bežné vyhľadávanie na internete, napríklad vyhľadávanie zaujímavej lokality na turistiku v okolí, nepovažujeme za OSINT. Za OSINT ho považujeme vtedy, kedy na získavané informácie aplikujeme systematickú analýzu, napríklad vyhľadávanie lokality podľa dostupných geolokačných údajov na základe dostupnej polohy, bezpečnostných rizík, vegetácie, dostupnosti, ktoré následne spracujeme a vyvodíme výsledky.

Pri procese aplikovania OSINT-u je potrebné rozumieť aj legislatívnej a etickej rovine, keďže medzi verejnými informáciami sa môžu vyskytnúť aj osobné údaje akými sú dátum narodenia alebo rodné číslo, adresa bydliska, e-mailová adresa a iné. Tieto údaje podliehajú ochrane osobných údajov podľa nariadenia GDPR a príslušnej národnej legislatívy.

V kontexte kybernetickej bezpečnosti „OSINT pomáha odborníkom kybernetickej bezpečnosti získať prehľad o zraniteľnostiach systémov, sledovať aktivity útočníkov a dokonca predchádzať kybernetickým útokom tým, že identifikuje indikátory kompromitácie už v počiatočnom štádiu.“ [2] Analýza otvorených zdrojov umožňuje bezpečnostným analytikom odhaliť rizikové aktivity, identifikovať zraniteľnosti alebo sledovať aktivity potenciálnych útočníkov ešte pred samotným vznikom bezpečnostného incidentu.

1.1 Proces OSINT analýzy

OSINT prebieha v niekoľkých na seba nadväzujúcich fázach, znázornených na Obrázku 1.



Obr. 1: Kolobeh OSINT-u.

Zdroj: [3]

Prvým krokom je príprava, v ktorom určujeme čo chceme dosiahnuť našou analýzou, jej požiadavky a ciele. OSINT je legálne vykonateľný aj bez súhlasu, keďže ide o otvorené zdroje. Súhlas je potrebný skôr pri penetračnom testovaní alebo aktívnom skenovaní. Tento krok je kľúčový hlavne preto, aby sme správne určili čo chceme analyzovať a odfiltrovali čo najviac nepotrebných informácií.

V druhom kroku dochádza k zberu údajov. Existuje veľké množstvo metód a nástrojov, pomocou ktorých vieme zbierať tieto údaje. *OSINT Framework* je jedným z odporúčaných katalógom nástrojov [4], obsahujúci prehľad nástrojov podľa analyzovanej domény (e-mailové adresy, verejné registre, *threat intelligence* a iné). Po získaní údajov nasleduje fáza spracovania a analýzy informácií. V tomto kroku dochádza k filtrácii získaných údajov, počas ktorej sa čistia získané informácie od duplicitných alebo nesprávne exportovaných údajov, aplikujú sa hodnotiace systémy a organizujú podľa využiteľnosti. Výsledkom tejto fázy je súbor informácií, ktoré môžu poukazovať napríklad na potenciálne bezpečnostné riziká alebo aktivity analyzovaného subjektu. Celý postup vieme aplikovať v cykle aj niekoľkokrát alebo s inými nástrojmi a metódami, v rôznych časových úsekoch a podobne upravovať podľa potreby.

1.2 Využitie OSINT-u pri detekcii hrozieb

OSINT predstavuje dôležitý zdroj informácií pre oblasť *threat intelligence*. „Threat intelligence sa týka zberu, spracovania a analýzy údajov s cieľom pochopiť motívy, ciele a metódy útokov páchatelov. Transformujú nespracované údaje na použiteľné informácie, ktoré umožňujú bezpečnostným tímom prijímať informované rozhodnutia založené na údajoch. Tým sa organizácie posúvajú z reaktívneho k proaktívnemu

postojú v oblasti ochrany pred kybernetickými hrozbami.“ ([5] preložené autorom) OSINT je schopný detegovať rôzne typy hrozieb, medzi ktoré patria úniky z databáz alebo úniky prihlasovacích údajov, zraniteľné body v infraštruktúre (porty, služby, credentials), phishing kampane, hrozby na sociálnych sieťach a iné.

V oblasti kybernetickej bezpečnosti sa informácie zbierajú napríklad z verejných registrov, DNS záznamov, sociálnych sietí, databázy únikov, diskusné fóra alebo verejných repozitárov (GitHub, Gitlab).

Vzhľadom na rozsiahly objem dát je potrebné zvoliť správnu metodiku a nástroje pre vykonanie analýzy daného subjektu. Ak zvolíme nesprávnu metodiku, alebo využijeme neefektívny alebo nevhodný nástroj, tak je pravdepodobné, že analýza neodhalí všetky detekovateľné riziká.

1.3 Výhody a nedostatky OSINT-u

Jednou z hlavných výhod OSINT-u je jeho dostupnosť. V porovnaní s inými spravodajskými disciplínami akými sú napríklad *Human Intelligence* (HUMINT), kde zber informácií je vykonávaný prostredníctvom ľudských zdrojov alebo *Imagery Intelligence* (IMINT), teda zber informácií cez satelitné snímky, je OSINT menej náročný na implementáciu. Vyžaduje nižšie náklady, teda je prístupný širokému okruhu používateľov. Ďalšou výhodou je jeho rýchlosť. Podľa autorov štúdie *Traditional media versus social media: challenges and opportunities*, sociálne médiá umožňujú okamžité šírenie informácií a interakciu s publikom, čo ich robí rýchlejšími v distribúcii obsahu v porovnaní s tradičnými masmédiami [6]. V prípade, že aplikujeme vhodnú metodiku pri analýze, je možné pokryť pomocou OSINT-u široké spektrum informácií, avšak aj OSINT má svoje systémové limity pri zbere dát, nezávislé od metodiky.

Nedostatkom OSINT-u je množstvo informácií, z ktorého musíme vybrať len to podstatné. Nesprávna voľba analytickej metodiky vedie k neodhaleniu niektorých hrozieb alebo analýza nepokryje dostatočne zdroje informácií, prípadne hrozby nebudú odhalené dostatočne rýchlo. Taktiež dokáže naraziť na spomínaný limit aj napriek správnej metodike. Dôvody, prečo nevieme nájsť informácie môžu byť kvôli utajovaniu, vysokému pomeru šumu, ktorý vzniká pri vyhľadávaní informácií alebo ich nepravdivosť (keďže sa môže jednať o dezinformácie), ich kvalita, vek (z akého obdobia pochádza informácia), dôveryhodnosť a iné faktory. Medzi riziká spájané s OSINT-om sú aj pojmy ako cyberstalking, doxing alebo ukradnutie identity, ktoré vznikajú pri nazbieraní finančných

informácií alebo osobných údajov, ktoré útočníci vedia využiť práve pri zbere informácií o organizácii alebo osobe [7].

Nedostatky OSINT-u vieme čiastočne riešiť v integrácii s inými spravodajskými disciplínami, napríklad HUMINT, IMINT alebo *Signals Intelligence* (SIGINT), označovaná pojmom All-Source Intelligence. Avšak aj napriek tomu, že takáto integrácia dokáže vyplniť niektoré z medzier, nie je vždy presná a preto je odporúčané vykonávať analýzu v rôznych časových intervaloch a s rôznou metodikou. Je však dôležité spomenúť, že OSINT nevie stopercentne pokryť alebo odhaliť všetky hrozby a preto je potrebné s ním pracovať ako doplnok pri práci.

1.4 Analýza

Na základe opísanej problematiky vykonáme jednoduchú OSINT analýzu vybranej inštitúcie. V našom prípade sme si vybrali Univerzitu Mateja Bela v Banskej Bystrici (ďalej len UMB). Keďže pri tejto analýze dochádza k zberu potenciálne citlivých informácií o infraštruktúre alebo obsahuje osobné údaje, je dôležité spomenúť, že v práci tieto informácie nebudeme zverejňovať. Analýza bola zameraná len na všeobecné zistenia ohrozenia v jednotlivých oblastiach.

Pri vykonávaní analýzy sme postupovali podľa spomínaného (OSINT cyklu), avšak zber informácií sme rozdelili na niekoľko častí. V prvej časti sme aplikovali manuálnu metodiku OSINT analýzy na skúmaný subjekt, teda namiesto automatizovaných nástrojov sme vykonávali analýzu manuálnym vyhľadávaním a pasívnym štýlom. Tento spôsob analýzy zahŕňal vyhľadávanie pomocou parametrov cez Google (tzv. Google Dorks), kontrola certifikátov pomocou nástroja *crt.sh* a *DNSDumpster* pre enumeráciu DNS záznamov a detegovanie infraštruktúry. Pomocou tejto rýchlej analýzy sme získali prehľad o dostupných doménach, subdoménach, príslušných IP adresách a platforme, ktorú UMB využíva.

V druhej časti analýzy sme aplikovali automatizované OSINT nástroje na analýzu rovnakej oblasti, s cieľom identifikovať širšie spektrum informácií a porovnať rozsah a efektivitu získaných dát v porovnaní s manuálnym prístupom. Pre enumeráciu domén, subdomén a hostiteľských systémov sme využili nástroj *theHarvester*, ktorý umožňuje automatizovaný zber dát z rôznych verejných zdrojov. Následne bol aplikovaný nástroj *SpiderFoot*, ktorý agreguje informácie z viacerých OSINT databáz a umožňuje koreláciu identifikovaných entít. Automatizovaná analýza tak umožnila identifikovať

širší rozsah domén, subdomén a IP adries spojených so skúmanou organizáciou. V tretej časti analýzy sme skontrolovali verejné repozitáre, služby na vyhľadávanie komprimovaných prihlasovacích údajov akými sú *Have I Been Pwned*, *DeHashed* alebo *DataBreach*. Taktiež sme aplikovali nástroje Shodan a Censys.

Celá analýza prebehla do pár hodín a nevyžadovala vysokú úroveň pochopenia nástrojov. Vieme teda povedať, že analýza sa pohybovala na úrovni obrancu-začiatočníka, ktorý je stále schopný odhaliť prípadné riziká systému.

1.4 Výsledky analýzy

Po aplikovaní jednotlivých častí analýzy sme potvrdili, že manuálne (pasívne) vyhľadávanie informácií nestačí. Pri aplikovaní metód v druhej a tretej časti sme získali viacej informácií, ktoré sme obvyčajným vyhľadávaním nedokázali zistiť.

Celková analýza neodhalila žiadne nové hrozby alebo potencionálne riziká. Pomocou analýzy sme skontrolovali súčasný stav infraštruktúry, jej bezpečnosť a integritu. Nenašli sme žiadne nové komprimované údaje. Aj napriek tomu, že neboli odhalené žiadne hrozby považujeme túto analýzu za úspešnú, keďže súčasný stav infraštruktúry nám hovorí, že je s ňou zaobchádzané správne.

Záver

V tejto práci sme sa zaoberali aplikovaním metód spravodajstva z otvorených zdrojov (OSINT) pre detekciu hrozieb v kybernetickej bezpečnosti z pohľadu obrancu. Zároveň sme analyzovali hlavné výhody a obmedzenia využívania OSINT v súčasnom bezpečnostnom prostredí, najmä v kontexte rastúceho množstva verejne dostupných dát a nepravdivých informácií vyžadujúce ich spracovanie.

V experimentálnej časti práce bola realizovaná OSINT analýza vybraného subjektu s cieľom identifikovať potenciálne bezpečnostné riziká vyplývajúce z verejne dostupných informácií. Analýza bola zameraná najmä na identifikáciu infraštruktúrnych prvkov organizácie, ako sú domény, subdomény a IP adresy, ako aj na overenie možných únikov údajov alebo iných verejne dostupných informácií, ktoré by mohli predstavovať potenciálnu bezpečnostnú hrozbu. Po aplikovaní navrhutej metodiky sme získali prehľad o verejne dostupnej digitálnej stope analyzovaného subjektu a identifikovali vybrané informácie, ktoré by mohli byť v prípade zneužitia využité pri príprave kybernetického útoku. Táto analýza nám potvrdila, že

aj bez prístupu k interným systémom organizácie je možné prostredníctvom analýzy otvorených zdrojov získať relevantné informácie o infraštruktúre a online prítomnosti subjektu. To potvrdzuje význam OSINT ako nástroja, ktorý môže byť využitý nielen útočníkmi pri príprave útokov, ale aj bezpečnostnými analytikmi pri identifikácii potenciálnych slabých miest a prevencii bezpečnostných incidentov, teda čo povoluujeme aby bolo vypustené do verejnej oblasti.

Ciele tejto práce boli vzhľadom na jej rozsah a charakter experimentálnej časti splnené čiastočne. Napriek tomu práca poskytuje základný prehľad o možnostiach využitia OSINT v oblasti kybernetickej bezpečnosti a poukazuje na jeho praktický význam pri identifikácii potenciálnych bezpečnostných hrozieb vyplývajúcich z verejne dostupných informácií. Do budúca by bolo možné tento výskum rozšíriť o aplikáciu ďalších analytických nástrojov, automatizovaných OSINT platforiem alebo o analýzu väčšieho množstva subjektov s cieľom komplexnejšie zhodnotiť efektivitu jednotlivých metódik.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] *The Historical Use of OSINT Through the Centuries*. IMSL [online]. 17. júla 2023 [cit. 2026-02-22]. Dostupné na: <https://www.intelmsl.com/osint-history/>
- [2] *Viete, čo je OSINT? CSIRT.SK* [online]. 2024 [cit. 2026-02-22]. Dostupné na: <https://www.csirt.gov.sk/posts/1258.html>
- [3] *About Black Box (CL)OSINT Tools*. Sector035 [online]. 19. októbra 2024. Dostupné na: <https://sector035.nl/articles/blackbox-osint>
- [4] *OSINT Framework*. OSINT Framework. Dostupné na: <http://osintframework.com>
- [5] BAKER, Kurt. *Cyber Threat Intelligence Explained*. CrowdStrike [online]. 4. marec 2025 [cit. 2026-03-01]. Dostupné na: <https://www.crowdstrike.com/en-us/cybersecurity-101/threat-intelligence/>
- [6] AL-QURAN, Marwan Walid. *Traditional media versus social media: challenges and opportunities*. ResearchGate [online]. December 2022 [cit. 2026-02-24]. Dostupné na: https://www.researchgate.net/publication/366177022_Traditional_media_versus_social_media_challenges_and_opportunities

- [7] *The Dark Side of Open-Source Intelligence (OSINT): How Your Information is Being Exploited*. Bokeh Solutions [online]. 12. mája 2023 [cit. 2026-02-24]. Dostupné na:
<https://www.bokeholutions.com/component/content/article/the-dark-side-of-open-source-intelligence-osint-how-your-information-is-being-exploited.html?catid=12&Itemid=101>

Iterácie relačných modifikátorov

Iterations of relational modifiers

Marcela Medlenová¹

¹Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹marcela.medlenova@student.umb.sk

Abstrakt

Relačný modifikátor je zobrazenie, ktoré je možné aplikovať na reálnu funkciu na základe informácie o vzťahoch medzi prvkami definičného oboru. Je možné využiť ho na popis rôznych rozhodovacích procesov. V práci sme sa zamerali na situáciu s tromi prvkami, kedy jeden z nich nepodlieha nijakému vplyvu zvyšných dvoch prvkov a zistili sme, že hodnoty zvyšných prvkov budú konvergovať k hodnote nemeniaceho sa prvku. Zistili sme, že rovnaký záver platí aj pre situáciu s k prvkami.

Kľúčové slová: modifikátor, binárna relácia, konjunktory, agregované funkcie, priemer

Abstract

A relational modifier is a mapping that can be applied to a real function based on a knowledge of mutual relations among the domain elements. It can be used in a description of various decision processes. In our work we focused on the case with tree elements, in which one of them is not influenced by the remaining two. We found out, that the values of the remaining two elements will converge to the value of the unchanging one. We also found out the same case with k elements has the same outcome.

Key words: modifier, binary relation, conjunctor, aggregation functions, mean

1 Základné pojmy

Ak skupina hodnotiteľov X oceňuje určitý produkt, môžeme toto hodnotenie reprezentovať ako zobrazenie $f : X \rightarrow [0, 1]$. Existujúce hodnotenie je možné pod vplyvom rôznych okolností zmeniť, teda funkcií f priradiť upravenú funkciu $M(f)$, pričom sa operátor M nazýva modifikátor. Vlastnosti modifikátorov a ich využitie boli skúmané napríklad v práci [4].

V tejto práci sa zameriame na skúmanie relačných modifikátorov, teda takých, ktoré využívajú informáciu o binárnej relácii medzi prvkami priestoru X . Takéto modifikátory zaviedli Kerre a De Cock v prácach [1, 2], kde skúmajú aj ich vlastnosti. Aby sme mohli zohľadniť stupeň vzťahu medzi prvkami základnej množiny X , budeme podobne ako Kerre a De Cock uvažovať o viachodnotových reláciách, teda zobrazeniach $R : X^2 \rightarrow [0, 1]$. Nadväzujeme na [5], kde množinu X tvorila skupina študentov a $R(x, y)$ bola miera vzťahu medzi príslušnou dvojicou študentov.

Nakoľko v definícii relačného modifikátora sa vyskytuje pojem konjunktora, uvedieme najprv jeho definíciu. Ide o zovšeobecnenie logickej spojky konjunkcie pre viachodnotové logiky.

Definícia 1 *Zobrazenie $C : [0, 1]^2 \rightarrow [0, 1]$ je konjunktory, ak je komutatívne, rastúce v oboch premenných a 1 je jeho neutrálny prvok.*

Podotýkame, že pod slovom rastúce v predchádzajúcej definícii rozumieme zobrazenie, ktoré nemusí byť nevyhnutne ostro rastúce (v niektorej literatúre sa pre takéto zobrazenie používa pojem neklesajúce).

Relačný modifikátor uvažujeme v nasledujúcom zmysle:

Definícia 2 ([1]) *Nech X je základná množina (univerzum), nech $C : [0, 1]^2 \rightarrow [0, 1]$ je konjunktory, nech $R : X^2 \rightarrow [0, 1]$ je viachodnotová relácia. Relačný modifikátor na množine $\{f : X \rightarrow [0, 1]\}$ pre danú reláciu R a konjunktory C je zobrazenie M_R^C definované predpisom*

$$M_R^C(f)(x) = \sup\{C(R(x, y), f(y)), y \in X\}.$$

Nakoľko v našej práci pôjde o konečné univerzum, môžeme supremum v predošlej definícii nahradiť maximom.

2 Porovnanie konjunktory

2.1 Popis experimentu

Je všeobecne známou ľudskou vlastnosťou, že človek môže meniť svoj názor pod vplyvom názoru ľudí, s ktorými má určitý vzťah. V práci z predchádzajúceho roku sme sa toto snažili modelovať pomocou relačných modifikátorov.

Ako skupinu ľudí tvoriacu univerzum X som použila triedu druhého ročníka na Gymnázium Boženy Slančíkovej Timravy v Lučenci. Na začiatku som triede ukázala obrázok a každý študent mal napísať jeho hodnotenie na škále od 1 (najnižšie) po 5 (najvyššie). Potom každý žiak ostatným povedal, aké hodnotenie zvolil a takisto aj zdôvodnil dôvody svojho rozhodnutia. Na to som im ukázala ďalší, veľmi podobný, obrázok, ktorý mali tak isto hodnotiť na rovnakej škále od 1 po 5. Predpokladám pritom, že pri druhom hodnotení mohli byť žiaci ovplyvnení argumentami svojich spolužiakov. Na záver nášho stretnutia som žiakov ešte poprosila aby vyplnili tabuľku vzťahov medzi sebou. Hodnotili aký vzťah majú ku každému spolužiakovi na škále od 1 po 5. Po normovaní do intervalu $[0, 1]$ som takto získala reláciu R . Tu som predpokladala, že každý má sám k sebe maximálne pozitívny vzťah, je teda konzistentný sám so sebou. Toto zodpovedá reflexívnosti R , teda vlastnosti $R(x, x) = 1$ pre všetky $x \in X$. Na druhej strane nie je žiadny dôvod predpokladať, že relácia R by mala byť symetrická, čo sa aj ukázalo v získaných hodnotách.

Po nazbieraní údajov som ich spracovala. Použila som vzťah z Definície 2, pričom som postupne používala nasledujúce konjunktory.

$$C_1(\alpha, \beta) = \min\{\alpha, \beta\}$$

$$C_2(\alpha, \beta) = \alpha\beta$$

$$C_3(\alpha, \beta) = \max\{\alpha + \beta - 1, 0\}$$

Ide teda v uvedenom poradí o minimový, súčinnový a Łukasiewiczov konjunktory. Je zrejme, že tieto funkcie majú vlastnosti z Definície 1. Podrobnejšie sú ich vlastnosti popísané v [3].

Hodnota $R(x, y)$ je stupeň vzťahu osoby x k osobe y a $f(x)$ je hodnotenie prvého obrazu osobou x .

Používala som predpis

$$M_R^C(f)(x) = \max\{C(R(x, y), f(y)), y \in X\}$$

do ktorého som pomocou programu v Pythone dosádzala parametre pre jednotlivých účastníkov prieskumu.

2.2 Výsledky experimentu

Po výpočtoch sa overilo, že najbližšie výsledky k reálnym výsledkom hodnotenia dosiahneme využitím konjunktora C_2 . Overila sa tiež aj úprava hodnoty vzťahu $R(x, x)$ z 1 na 0, keďže v opačnom prípade by sa pri výpočte modifikovanej hodnoty v bode x v príslušnej množine objavil prvok $C(R(x, x), f(x)) = C(1, f(x)) = f(x)$, čo vzhľadom na aplikáciu operátora maxima znamená, že modifikovaná hodnota by bola minimálne $f(x)$. Takýto modifikátor (nazýva sa expanzívny) však nezodpovedá skúmanej realite, nakoľko je bežným javom, že človek môže pod vplyvom iných hodnotení to svoje aj znížiť.

Použitý predpoklad $R(x, x) = 0$ síce zabezpečí, že modifikátor nebude nevyhnutne expanzívny, avšak na druhej strane je tým originálne hodnotenie $f(x)$ ignorované, pretože pre ľubovoľný konjunktory C je $C(R(x, x), f(x)) = C(0, f(x)) = 0$. Toto by bolo možné čiastočne vyriešiť buď voľbou $R(x, x) = \frac{1}{2}$ alebo nahradením $R(x, x)$ strednou hodnotou množiny $\{R(x, y); y \in X, y \neq x\}$. Celý experiment je podrobne popísaný v práci [5].

3 Vážené modifikátory

V tejto časti sa sústreďíme na modifikátory založené na operácii váženého priemeru. Nech X je základná množina (univerzum) a R je viachodnotová relácia na množine X , teda $R : X^2 \rightarrow [0, 1]$. Funkcia $f(x)$ definovaná ako zobrazenie $f : X \rightarrow [0, 1]$ je fuzzy funkcia príslušnosti prvku v univerze. Relačný modifikátor $M_R f(x)$ je definovaný predpisom

$$M_R f(x) = \frac{\sum_{y \in X} R(x, y) f(y)}{\sum_{y \in X} R(x, y)}$$

teda vážený priemer, kde hodnoty R reprezentujú váhy.

3.1 Prípád s tromi prvkami

Nech X je trojprvková množina, $X = \{x, y, z\}$. Predpokladajme, že R je reflexívna na množine X , teda $R(x, x) = R(y, y) = R(z, z) = 1$. Označme $\alpha = R(z, x) = 0$, $\beta = R(x, y)$, $\gamma = R(y, z)$, $A_0 = f(x)$, $B_0 = f(y)$, $C_0 = f(z)$. Nech β vyjadruje vplyv y na x a γ vyjadruje vplyv z na y , teda z nepodlieha nijakému vplyvu. Predpokladajme podmienku $\beta, \gamma \in (0, 1]$. Teda modifikované hodnoty sú

$$A_1 = \frac{A_0 + \beta B_0}{1 + \beta} = \frac{1}{1 + \beta} A_0 + \frac{\beta}{1 + \beta} B_0$$

$$B_1 = \frac{B_0 + \gamma C_0}{1 + \gamma} = \frac{1}{1 + \gamma} B_0 + \frac{\gamma}{1 + \gamma} C_0$$

$$C_1 = C_0$$

Predpokladajme, že tento výpočet sa vykonáva opakovane. Toto nás dostane k otázke iteračného procesu opísaného maticovou rovnicou

$$\begin{pmatrix} A_{n+1} \\ B_{n+1} \\ C_{n+1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{1+\beta} & \frac{\beta}{1+\beta} & 0 \\ 0 & \frac{1}{1+\gamma} & \frac{\gamma}{1+\gamma} \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_n \\ B_n \\ C_n \end{pmatrix}$$

Pre zjednodušenie zápisu označme $p = \frac{1}{1+\beta}$, $q = \frac{1}{1+\gamma}$ a vyjadrieme maticu M

$$M = \begin{pmatrix} p & 1-p & 0 \\ 0 & q & 1-q \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

ktorá v jej explicitnej forme je

$$\begin{pmatrix} A_n \\ B_n \\ C_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} p & 1-p & 0 \\ 0 & q & 1-q \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}^n \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \\ C_0 \end{pmatrix}$$

Aby sme zistili aký je dlhodobý trend vážených modifikátorov, vypočítame jej stacionárnu limitu (ak existuje).

$$\begin{pmatrix} A_n \\ B_n \\ C_n \end{pmatrix} = \lim_{n \rightarrow \infty} M^n \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \\ C_0 \end{pmatrix}$$

Pomocou determinantu $|M - \lambda I|$ nájdeme vlastné čísla a vlastné vektory pre maticu M . Jej charakteristický polynóm je

$$|M - \lambda I| = (p - \lambda)(q - \lambda)(1 - \lambda)$$

teda vlastné čísla sú $\lambda_1 = p = \frac{1}{1+\beta}$, $\lambda_2 = q = \frac{1}{1+\gamma}$, $\lambda_3 = 1$. Podmienka zo zadefinovania vplyvov β a γ určuje, že $\beta \neq 0$, $\gamma \neq 0$ z čoho vyplýva, že $p \neq 1$, $q \neq 1$.

Prislúchajúce vlastné vektory sú $(1, 0, 0)$ pre $\lambda_1 = p$, $(1, \frac{q-p}{1-p}, 0)$ pre $\lambda_2 = q$ a $(1, 1, 1)$ pre $\lambda_3 = 1$.

Na vypočítanie mocniny M použijeme Jordanov rozklad (diagonalizáciu)

$$M^n = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & \frac{q-p}{1-p} & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p & 0 & 0 \\ 0 & q & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}^n \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & \frac{q-p}{1-p} & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}^{-1}$$

Keďže $p, q \in (0, 1)$, limita diagonalizovanej matice je

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \begin{pmatrix} p^n & 0 & 0 \\ 0 & q^n & 0 \\ 0 & 0 & 1^n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Po dosadení do pôvodného rozkladu dostaneme

$$M^\infty = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & \frac{q-p}{1-p} & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & \frac{q-p}{1-p} & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}^{-1} \\ = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Z toho vyplýva

$$\begin{aligned} A_\infty &= C_0 \\ B_\infty &= C_0 \\ C_\infty &= C_0 \end{aligned}$$

Takže platí, že počtom iterácií, hodnoty prvkov A_n, B_n konvergujú k hodnote prvku C_0 . \square

Alternatívny dôkaz:

Vychádzame z

$$\begin{pmatrix} A_n \\ B_n \\ C_n \end{pmatrix} = \lim_{n \rightarrow \infty} M^n \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \\ C_0 \end{pmatrix}$$

Potrebujeme vypočítať $\lim_{n \rightarrow \infty} M^n$. Vyjadríme si tvary prvých troch mocnín.

$$M = \begin{pmatrix} p & 1-p & 0 \\ 0 & q & 1-q \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\ M^2 = \begin{pmatrix} p^2 & (1-p)(p+q) & (1-p)(1-q) \\ 0 & q^2 & 1-q^2 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\ M^3 = \begin{pmatrix} p^3 & (1-p)(p^2+pq+q^2) & m_{1,3}^3 \\ 0 & q^3 & 1-q^3 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

kde

$$m_{1,3}^3 = (1-p)(-pq - q^2) + 1 - p^2$$

Pozrime sa na jednotlivé prvky matice M^n . Vidíme, že diagonálne prvky $m_{1,1}, m_{2,2}$ budú konvergovať k 0, nakoľko tieto prvky majú tvar pred

substituáciou $m_{1,1} = \frac{1}{(\beta+1)^n}, m_{2,2} = \frac{1}{(\gamma+1)^n}$ a prvky $(\beta+1), (\gamma+1)$ sú konštanty väčšie ako 1.

Matica M je horná trojuholníková matica a táto vlastnosť ostáva aj pre každú mocninu danej matice. Z toho vychádza, že prvky $m_{2,1}^n, m_{3,1}^n, m_{3,2}^n$ budú vždy rovné 0.

Počiatočná matica M je stochatická, teda je štvorcová a súčet prvkov v každom riadku je rovný 1. Táto vlastnosť platí aj pre každú mocnicu tejto matice, teda aj pre M^n . Teda pre tretí riadok platí rovnosť $m_{3,1}^n + m_{3,2}^n + m_{3,3}^n = 1$ a keďže vieme, že $m_{3,1}^n = m_{3,2}^n = 0$, tak $m_{3,3}^n = 1$. Analogicky pre druhý riadok. Vieme, že $m_{2,1}^n + m_{2,2}^n + m_{2,3}^n = 1$, poznáme hodnoty $m_{2,1}^n = m_{2,2}^n = 0$, z čoho vyplýva, že $m_{2,3}^n = 1$. Pre prvý riadok platí $m_{1,1}^n + m_{1,2}^n + m_{1,3}^n = 1$. Poznáme iba hodnotu prvku $m_{1,1}^n = 0$, musíme teda vypočítať hodnotu prvku $m_{1,2}^n$ alebo $m_{1,3}^n$. Zamerajme sa na prvok $m_{1,2}^n$.

Chceme vypočítať limitu prvku $m_{1,2}^n$. Keďže matica je nulová pod diagonálou, aj po umocnení na n -tú mocnicu ostane nulová. Z toho vyplýva, že $m_{1,2}^n = (m_{1,1}^{n-1} \cdot m_{1,2}) + (m_{1,2}^{n-1} \cdot m_{2,2})$, čo je po dosadení ekvivalentné s $m_{1,2}^n = p^{n-1}(1-p) + m_{1,2}^{n-1}q$. Vyjadríme si prvé tri mocniny prvku $m_{1,2}^n$:

$$\begin{aligned} m_{1,2} &= 1-p \\ m_{1,2}^2 &= p(1-p) + (1-p)q = (1-p)(p+q) \\ m_{1,2}^3 &= p^2(1-p) + (1-p)(p+q)q = (1-p)(p^2+pq+q^2) \end{aligned}$$

Všimnime si, že násobiteľ $(1-p)$ je rovnaký v každej mocnicke a zvyšok sú členy geometrickej postupnosti. Prvok $m_{1,2}^n$ teda vieme zapísať v tvare geometrickej sumy

$$m_{1,2}^n = (1-p) \sum_{k=0}^{n-1} p^{n-1-k} q^k$$

táto suma v zatvorenej forme sa dá vyjadriť ako

$$m_{1,2}^n = (1-p) \frac{p^n - q^n}{p - q}$$

Pozrime sa z akých súčiniteľov sa skladá výraz $\lim_{n \rightarrow \infty} m_{1,2}^n = (1-p) \frac{p^n - q^n}{p - q}$ vidíme, že $(1-p)$ a $(p-q)$ sú konštanty a $p, q \in (0, 1)$. Teda vidíme,

že $\lim_{n \rightarrow \infty} m_{1,2}^n = 0$. Keďže pre prvý riadok matice platí rovnosť $m_{1,1}^n + m_{1,2}^n + m_{1,3}^n = 1$ a vieme, že $m_{1,1}^n = m_{1,2}^n = 0$, tak prvok $m_{1,3}^n = 1$.

Teda sme dostali

$$\lim_{n \rightarrow \infty} M^n = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

z čoho dosadením do pôvodnej rovnice dostaneme limitný vektor

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \\ C_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} C_0 \\ C_0 \\ C_0 \end{pmatrix}$$

Takže sme dokázali, že

$$\lim_{n \rightarrow \infty} A_n = \lim_{n \rightarrow \infty} B_n = \lim_{n \rightarrow \infty} C_n = C_0. \square$$

3.2 Prípady s k prvkami

Nech platia všetky predpoklady z prípadu pre tri prvky a nech máme konečný počet k prvkov. Tvar pre $n+1$ člen prvkov vyjadríme podobným spôsobom pomocou rovnosti matíc

$$\begin{pmatrix} A_{n+1}^{(1)} \\ A_{n+1}^{(2)} \\ A_{n+1}^{(3)} \\ \vdots \\ A_{n+1}^{(k)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} p_1 & 1-p_1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & p_2 & 1-p_2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & p_3 & 1-p_3 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & 1-p_{k-1} \\ 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_n^{(1)} \\ A_n^{(2)} \\ A_n^{(3)} \\ \vdots \\ A_n^{(k)} \end{pmatrix}$$

Z čoho dostávame ekvivalentné vyjadrenie pre $n+1$ členy prvkov:

$$\begin{aligned} A_{n+1}^{(1)} &= p_1 A_n^{(1)} + (1-p_1) A_n^{(2)} \\ A_{n+1}^{(2)} &= p_2 A_n^{(2)} + (1-p_2) A_n^{(3)} \\ &\vdots \\ A_{n+1}^{(k-1)} &= p_{k-1} A_n^{(k-1)} + (1-p_{k-1}) A_n^{(k)} \\ A_{n+1}^{(k)} &= 1 A_n^{(k)} \end{aligned}$$

Označme iteračnú maticu M .

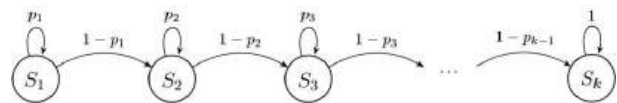
$$M = \begin{pmatrix} p_1 & 1-p_1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & p_2 & 1-p_2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & p_3 & 1-p_3 & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & 1-p_{k-1} \\ 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Všimnime si, že podobne ako pri prípade s tromi prvkami, aj tu je matica M štvorcová s rozmermi $k \times k$ a je stochastická. Môžeme ju teda interpretovať ako Markovov reťazec. Markovov reťazec opisuje reťazec stavov, kedy prechod medzi stavmi nezávisí od toho, v ktorom časovom okamžiku (teda v našom prípade v kolkej iterácii) prechod skúmame.

Vyjadrime si maticu prechodu P

$$P = \begin{matrix} & \begin{matrix} S_1 & S_2 & S_3 & S_4 & \dots & S_k \end{matrix} \\ \begin{matrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ \vdots \\ S_k \end{matrix} & \begin{pmatrix} p_1 & 1-p_1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & p_2 & 1-p_2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & p_3 & 1-p_3 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 1-p_{k-1} \\ & & & & & 1 \end{pmatrix} \end{matrix}$$

Výsledok S_{ij} v budúcom čase $n+1$ je ovplyvnený iba výsledkom prítomným v čase n , výsledky z minulosti nemajú na túto hodnotu vplyv. Preto pravdepodobnosť stavu S_{ij} môžeme napísať v tvare podmienenej pravdepodobnosti $S_{ij} = P(X_{n+1} = S_i | X_n = S_j)$. Toto môžeme znázorniť aj graficky.



Tu môžeme vidieť evolučný graf stavov. Vidíme, že všetky stavy S_n postupujú vždy dopredu a nikdy nie naspäť. Ak má vývoj nekonečný čas (nekonečný počet krokov), tak nezávisle od toho, z ktorého stavu začneme, máme tendenciu postupovať po indexoch stavov od S_1 po S_k odkiaľ sa už nevieme dostať späť. Tento stav je tzv. absorpčný a teda konečný. Z toho vyplýva

$$\lim_{n \rightarrow \infty} M^n = \begin{pmatrix} 0 & \dots & 0 & 1 \\ 0 & \dots & 0 & 1 \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & \dots & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Keď túto limitu dosadíme do pôvodnej rovnice, tak dostaneme stacionárny stav

$$\begin{pmatrix} 0 & \dots & 0 & 1 \\ 0 & \dots & 0 & 1 \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & \dots & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_0^{(1)} \\ A_0^{(2)} \\ A_0^{(3)} \\ \vdots \\ A_0^{(k)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_0^{(k)} \\ A_0^{(k)} \\ A_0^{(k)} \\ \vdots \\ A_0^{(k)} \end{pmatrix}$$

Takže sme dokázali predpoklad, že $\lim_{n \rightarrow \infty} A_n^{(1)} = \lim_{n \rightarrow \infty} A_n^{(2)} = \dots = \lim_{n \rightarrow \infty} A_n^{(k-1)} = A_0^{(k)}$. \square

4 Záver

V našej práci sme skúmali iterácie relačných modifikátorov. Zamerali sa na prípad s tromi prvkami, kedy dva z nich sú ovplyvnené len jedným iným prvkom a jeden z nich zostáva konštantný, teda nepodlieha nijakému vplyvu iných prvkov. Ukázalo sa, že v takejto situácii po určitých n iteráciách, sa spomenuté dva prvky budú približovať ku hodnote tretieho člena. Rovnaký prípad sme zovšeobecnil aj pre k -prvkovú množinu, kde k je prirodzené číslo a výsledok bol analogický.

Ukázali sme, že táto trieda modifikátorov dokáže vytvoriť konsenzus medzi expertmi počas iterovania. Výsledok je signifikantný v tom, že môže byť užitočný napríklad pri argumentácii alebo akejkoľvek situácii, kedy sa snažíme vytvoriť konsenzus medzi názormi ľudí alebo expertov v danej skupine.

V budúcej práci je užitočné porovnať toto zistenie na rôznych vzorkách skupín ľudí s rôznymi počtami členov. Okrem toho by bolo zaujímavé zamerať sa na prípad troch prvkov, kedy prvok C nie je ovplyvnený žiadnym iným prvkom, člen A je ovplyvnený iba prvkom B a prvkom B je ovplyvnený prvkom C **aj prvkom A .**

Literatúra

- [1] DE COCK, Martine a KERRE, Etienne E., (2004). Fuzzy modifiers based on fuzzy relations, *Information Sciences* no. 160, 173-199.
- [2] KERRE, Etienne E. a DE COCK, Martine, (1999). Linguistic modifiers: an overview, in: *G. Chen, M.Ying, K.-Y. Cai (Eds.), Fuzzy Logic and Soft Computing*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 69-85.
- [3] KOLESÁROVÁ, Anna a KOVÁČOVÁ, Monika (2004). *Fuzzy množiny a ich aplikácie*. Slovenská technická univerzita v Bratislave: vydavateľstvo STU, 160 s. ISBN 80-227-2036-4.
- [4] KORTELAJNEN, Jari (2001). Applying modifiers to knowledge acquisition, *Information Sciences* no. 134, 39-51.
- [5] MEDLENOVÁ, Marcela (2025). Relačné modifikátory, Študentská vedecká konferencia 2025, zborník príspevkov, UCM Trnava, 286-290.

Architektúra a možnosti federácie digitálnych dvojčiat v koncepte Smart City

Architecture and federation possibilities of digital twins in the Smart City concept

Marek Mráz¹,

Školiteľ: Alžbeta Michalíková²

¹Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

²Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹contact@marek-mraz.com, ²Alzbeta.Michalikova@umb.sk

Abstrakt

Rozvoj konceptu inteligentných miest (Smart City) vyžaduje robustné, škálovateľné a štandardizované prístupy k správe dát. Tento článok sa zaoberá návrhom a nasadením decentralizovanej architektúry digitálnych dvojčiat s využitím štandardizovaného API a informačného modelu ETSI NGSI-LD (European Telecommunications Standards Institute - Next Generation Service Interface - Linked Data). Osobitná pozornosť je venovaná možnostiam federácie kontextu a jednosmernej synchronizácie dát (one-way sync) prostredníctvom mechanizmu odberov (subscriptions). Predstavené riešenie umožňuje efektívne zdieľanie dát medzi mestami, univerzitami a externými vývojármi pri zachovaní plnej kontroly nad informačnými tokmi. Práca demonštruje výhody distribuovaného spracovania dát (edge computing) a integráciu senzorov pomocou FIWARE IoT agentov. Zároveň ukazuje, ako využitie princípov GitOps (ArgoCD) a automatizácie (Ansible) umožňuje nasadenie celého ekosystému v prostredí Kubernetes v priebehu niekoľkých minút.

Kľúčové slová: inteligentné mesto (Smart City), digitálne dvojča, NGSI-LD, Context Broker, jednosmerná synchronizácia

Abstract

The evolution of the Smart City concept requires robust, scalable, and standardized approaches to data management. This paper addresses the design and deployment of a decentralized digital twin architecture using the ETSI NGSI-LD (European Telecommunications Standards Institute - Next Generation Service Interface - Linked Data) standardized API and information model. Special attention is given to context federation and one-way data synchronization via the subscription mechanism. The presented solution enables efficient data sharing among cities, universities, and external developers while maintaining full control over information flows. The study demonstrates the benefits of distributed data processing (edge computing) and sensor integration using FIWARE IoT agents. It also shows how employing GitOps principles (ArgoCD) and automation (Ansible) allows the entire ecosystem to be deployed in a Kubernetes environment within minutes.

Keywords: Smart City, Digital Twin, NGSI-LD, Context Broker, one-way synchronization

Úvod

Zavádzanie konceptu Smart City (inteligentných miest) prináša rapidný nárast objemu dát pochádzajúcich z rôznorodých senzorov a mestských systémov. Pre zabezpečenie udržateľnosti a sémantickej interoperability je nevyhnutný prechod od izolovaných, monolitických riešení k otvoreným platformám. Súčasným štandardom pre výmenu kontextových informácií, ktorý definoval inštitút ETSI, je štandardizované API a informačný model NGSI-LD [1]. Tento štandard tvorí základ pre budovanie komplexných digitálnych dvojčiat (Digital Twins), ktoré sú v súlade so špecifikáciami minimálnej interoperability, ako je MIMs Plus [4].

Hlavným problémom doterajších implementácií bola snaha agregovať všetky dáta do jedného masívneho centrálného uzla. Takýto prístup však prináša bezpečnostné riziká, komplikuje prístupové práva a zvyšuje latenciu. Tento článok prezentuje modernú architektúru, ktorá stavia na decentralizácii, edge computingu a možnostiach bezpečného zdieľania dát pomocou federácie kontextu a mechanizmov jednosmernej synchronizácie. Vytvára sa tak základ pre budovanie suverénnych dátových priestorov (Data Spaces) podľa ekosystémového prístupu [5].

1 Metodológia a technológie

Základom pre prevádzku spoľahlivého Smart City ekosystému je plne automatizovaná infraštruktúra. V navrhnutom prístupe sa využíva kontajnerová orchestrácia platformou Kubernetes (v odľahčenej distribúcii K3s), pričom skripty nástroja Ansible boli využité primárne na úvodné nastavenie klastra s jedným riadiacim (control node) a dvoma pracovnými uzlami (worker nodes).

Následné nasadenie samotných aplikácií sa riadi modernými princípmi GitOps prostredníctvom platformy ArgoCD [2], kde sa na samotné nasadzovanie vo veľkej miere využívajú balíčky Helm chartov [3]. Tento prístup, kon-

krétne model „App-of-Apps“, umožňuje z inštalovaných predpisov v repozitári nasadiť celý ekosystém behom niekoľkých minút. Automaticky sa tak spúšťajú všetky nevyhnutné súčasti, ako je Orion-LD (Context Broker) [6], API brána (Kong) [7], manažment identít, databázy i podporné mikroslužby.

1.1 Pôvod architektúry a spracovávané údaje

Základ pre navrhnutú architektúru vychádza z open-source repozitára FIWARE Marinera [8], ktorý predstavoval referenčný model nasadenia komponentov na báze Kubernetes. Pôvodné moduly v tomto repozitári však už boli zastarané a pre súčasné produkčné potreby nepostačujúce. V nami vytvorenom riešení sme preto tieto komponenty nahradili ich aktuálnymi verziami a celú architektúru sme výrazne prebudovali. Predovšetkým sme integrovali robustnú bezpečnostnú vrstvu pozostávajúcu z API brány Kong a identity manažmentu Keycloak. Táto vrstva nespravuje len prístup k samotným aplikáciám, ale zabezpečuje aj komplexný manažment používateľov a politik, na základe ktorých sa dynamicky a bezpečne pridelujú prístupové práva k jednotlivým službám.

V rámci takto upraveného ekosystému spracúvame a analyzujeme štruktúrované kontextové údaje. Jednotlivé entity v systéme môžu reprezentovať reálne fyzické i logické objekty – napríklad budovy, miestnosti, senzory či aktuátory. Tieto entity v sebe uchovávajú komplexné dáta, ako je presná geografická poloha, názov, podrobný popis, aktuálny prevádzkový stav či okamžité namerané hodnoty zo zariadení (teplota, kvalita ovzdušia, obsadenosť). Pre lepšiu podporu moderných Smart City scenárov a integráciu špecifických nízkoenergetických sietí s dlhým dosahom sme do architektúry začlenili aj komponent IoT agent-LoRaWAN [9], ktorý zabezpečuje priamu komunikáciu s LoRaWAN zariadeniami. Systém tak poskytuje ucelené riešenie, ktoré umožňuje v reálnom čase zhromažďovať rôznorodé údaje, vytvárať presné digitálne dvoj-

čatá a na základe nich robíť lepšie a informovanejšie rozhodnutia.

1.2 Kľúčové komponenty štandardu NGSI-LD

Pre pochopenie fungovania platformy je dôležité predstaviť si základné stavebné bloky, z ktorých pozostáva navrhnutý ekosystém:

- **Context Broker:** Predstavuje centrálnu riadiacu zložku infraštruktúry, ktorá spravuje a udržiava aktuálny stav kontextových informácií. V nami navrhnutej architektúre je Context Broker [6] plne distribuovaný, čo umožňuje udržať dáta blízko miesta ich vzniku (Edge Computing) a výrazne znižuje latenciu siete. Hlavný (Master) Context Broker následne slúži na agregáciu informácií z lokálnych uzlov do uceleného systému.
- **Entity a Type Entity:** Každý fyzický alebo logický objekt (napríklad vozidlo, parkovacie miesto, senzor kvality ovzdušia) je v systéme reprezentovaný ako entita. Pre zabezpečenie sémantickej štruktúry je každej entite priradený špecifický typ (*Type*), ktorý definuje jej kategóriu a štandardizované vlastnosti (napríklad *AirQualitySensor* alebo *Vehicle*).
- **IoT Agent:** Koncové zariadenia a senzory komunikujú prostredníctvom rozličných protokolov (MQTT, LoRaWAN, HTTP). IoT Agent slúži ako integračná vrstva, ktorá prijíma tieto surové dáta a prekladá ich do štandardu NGSI-LD, čím zabezpečuje ich priamu spracovateľnosť v komponente Context Broker.
- **Subscription (Odbery):** Tento mechanizmus odstraňuje nutnosť opakovaného dopytovania (polling). Externé aplikácie si registrujú odber, na základe ktorého ich Context Broker asynchrónne a okamžite upozorní pri každej zmene sledovaných hodnôt.

1.3 Správa entít a zber dát

Pri budovaní digitálneho dvojčata je kľúčová flexibilita pripájania nových zariadení. O abstrakciu komunikačných protokolov sa starajú takzvané FIWARE IoT Agenty. Ekosystém integruje viaceré typy agentov: napríklad IoT Agent JSON pre štandardnú MQTT komunikáciu, Ultralight pre hardvérovo limitované mikrokontroléry, či už spomínaný špecializovaný LoRaWAN agent [9] pre zber dát z nízkoenergetických senzorov s dlhým dosahom [10].

Proces konfigurácie entít umožňuje priame mapovanie prichádzajúcich surových dát z hardvéru (payload) na konkrétne NGSI-LD atribúty. Dôležitým aspektom je využitie globálneho štandardu Smart Data Models [12], ktorý zabezpečuje, že takto štruktúrované dáta produkované mestom dosahujú plnú sémantickú interoperabilitu na medzinárodnej úrovni.

1.4 Architektúra v produkcii a bezpečnosť

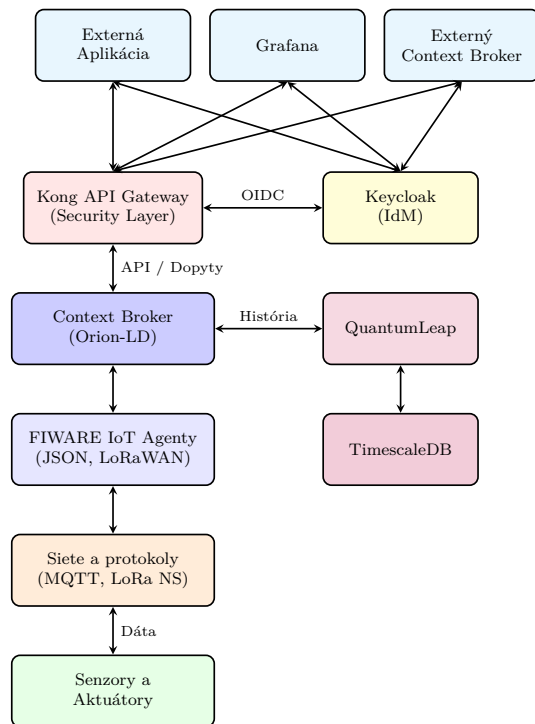
Produkčné nasadenie takéhoto komplexného ekosystému vyžaduje robustnú a priepustnú vrstvu riadenia prístupov. Túto úlohu plní Identity Management (IdM) systém **Keycloak**, ktorý primárne zabezpečuje správu identít a jednotné prihlásenie prostredníctvom OpenID Connect (OIDC) plošne pre všetky aplikácie.

O samotné vynucovanie bezpečnostných pravidiel na úrovni siete sa stará **Kong API Gateway**, ktorý v architektúre plní rolu PEP (Policy Enforcement Point). Zabezpečuje, že pre každú identitu je explicitne vytvorený zdroj (resource) a preň definované príslušné oprávnenia – takzvané scopes (*read*, *write*, *delete*, *update*). Akýkoľvek neautorizovaný dopyt smerujúci na Context Broker je tak aplikáciou Kong (API Gateway) okamžite zablokovaný na okraji siete.

Zatiaľ čo Context Broker drží prioritne aktuálny stav entít, pre analytiku je nevyhnutné archivovať históriu. Dlhodobé dáta sa plynule ukládajú v komponente **QuantumLeap**. K týmto historickým záznamom možno následne pristupovať dvoma spôsobmi: buď priamo dopytovať

ním podkladovej relačnej Time-Series databázy (TimescaleDB), alebo transparentne cez Context Broker s využitím NGSI-LD temporal queries.

Obr. 1: Celková architektúra produkčného prostredia a bezpečnosti



Zdroj: Vlastné spracovanie

2 Výsledky a diskusia

Nasadenie navrhutej architektúry preukázalo významné benefity v správe kontextových informácií a vo flexibilitě práce s dátami. Počas testovania sa úspešne podaril experiment, pri ktorom boli nasadené tri plnohodnotné kópie celého orchestra aplikácií pre digitálne dvojča mesta (obsahujúce Context Broker, IoT agenty, Grafanu, Node-RED). V každej z týchto troch inštancií sa vďaka konektoru Grafanu napojenému na data-

bázu a Context Broker podarilo vizualizovať telemetrické dáta. Jednotlivé senzory bolo možné prehľadne sledovať na mape vrátane ich presnej geografickej lokácie.

2.1 Decentralizácia a Edge Computing

Monolitický systém ukladania dát je nahradený distribuovaným prístupom. Vďaka presunu výpočtového výkonu a správy dát na okraj siete (Edge Computing) môžu byť jednotlivé Context Brokery nasadené lokálne – na úrovni mestskej štvrte, konkrétnej budovy alebo podniku. Systém je vďaka tomu prísne decentralizovaný. V jednotlivých častiach infraštruktúry sa reálne nachádzajú iba tie entity a dáta, ktoré sú pre daný uzol dôležité a relevantné. Tým sa minimalizuje prenos zbytočných dát cez chrbticovú sieť.

2.2 Federácia kontextu

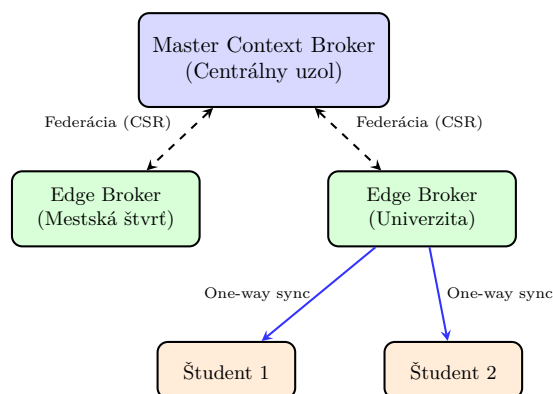
Pre prepájanie týchto oddelených uzlov slúži ETSI NGSI-LD mechanizmus nazývaný „Context Source Registrations“ (CSR). Federácia v tomto poňatí znamená, že centrálny systém (Master Broker) dynamicky smeruje dopyty na príslušné podradené uzly (Edge Brokers) v reálnom čase bez toho, aby dáta fyzicky duplikoval do svojej databázy.

Tento mechanizmus inovatívne mení prístup k zdieľaniu údajov medzi inštitúciami a okolitými samosprávami. Samosprávy môžu pristupovať k zdieľaným dátam bez nutnosti budovania spoločných centralizovaných dátových skladov, pričom každá inštitúcia zostáva výhradným vlastníkom a správcom svojich údajov. V distribuovanej topológii sa požiadavka zaslaná na Master Context Broker dokáže transparentne delegovať na príslušné lokálne uzly.

2.3 Jednosmerná synchronizácia (One-way sync)

Zatiaľ čo federácia poskytuje okamžitý prístup k vzdialeným dátam, v mnohých prípadoch je

Obr. 2: Schéma federácie a distribuovaného Context Brokera



Zdroj: Vlastné spracovanie

nutné vytvoriť fyzickú kópiu častí digitálneho dvojčata na inom mieste. Na to sa využíva jednosmerná synchronizácia pomocou odberov (NGSI-LD Subscriptions) s využitím prechodového Unwrapper middlewaru.

Tento model prináša rozsiahle možnosti aplikácie v praxi:

- **Externí dodávatelia:** Pri vývoji nových mestských modulov si môžu partnerské IT firmy vytvoriť vernú kópiu celého (alebo časti) digitálneho dvojčata formou „one-way sync“. Môžu tak vyvíjať a testovať riešenia bez hrozby narušenia produkčného prostredia mesta.
- **Univerzity a výskumné inštitúcie:** Lokálne univerzity sa môžu pridať do federácie ako rovnocenný partner, alebo čerpať jednosmerný dátový tok na analytické účely.
- **Edukácia študentov:** Univerzita môže alokovať každému študentovi (alebo tímu) izolovanú inštanciu NGSI-LD brokera. Systém následne zabezpečí automatickú synchronizáciu dát z produkcie priamo k študentom. Vzniká tak bezpečné testovacie

prostredie (sandbox), v ktorom môžu študenti pracovať s reálnymi dátami prostredníctvom nástrojov ako **Grafana**, **n8n** či **Node-RED**. Tento prístup im umožňuje bezpečne vyvíjať vlastné vizualizácie, integrácie alebo trénovať modely strojového učenia bez rizika narušenia ostrej prevádzky.

Všetky tieto interakcie zjednodušuje striktné dodržiavanie definícií zo Smart Data Models, čo zabezpečuje, že dáta prijaté partnerskou stranou sú okamžite strojovo spracovateľné.

3 Záver

Navrhnutá architektúra Smart City systému ukazuje, že posun od monolitických platforiem k decentralizovaným, na štandardoch založených NGSI-LD ekosystémoch, je nevyhnutným krokom k udržateľnosti. Vďaka integrácii moderných DevOps nástrojov (Kubernetes, Helm charts, ArgoCD, Ansible) je možné minimalizovať čas nasadenia na jednotky minút a pomocou IoT agentov (JSON, LoRaWAN) plynule integrovať akýkoľvek hardvér.

Hlavným prínosom je však bezprecedentná flexibilita pri práci s dátami. Koncepty distribuovaného edge computingu, federácie kontextu a jednosmernej synchronizácie umožňujú mestám efektívne a bezpečne spolupracovať s tretími stranami, technologickými firmami, inými mestami a akademickou obcou.

Podakovanie

Tento článok vznikol v rámci výskumu zameraného na moderné architektúry inteligentných miest s podporou projektu VEGA 1/0779/25 Znalostný prístup k udržateľnej doprave v mestských aglomeráciách. Ďakujeme komunite FIWARE, ETSI a iniciatíve Smart Data Models za rozvoj otvorených štandardov, vďaka ktorým je možné budovať vysoko interoperabilné a decentralizované systémy. Osobitné podakovanie patrí

mojej školitelke doc. RNDr. Alžbete Michalíkovej, PhD. za odborné vedenie.

Literatúra

- [1] ETSI, 2025. *GS CIM 009 V1.9.1: Context Information Management (CIM); NGSI-LD API*. Sophia Antipolis, France : European Telecommunications Standards Institute. [online] [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: https://www.etsi.org/deliver/etsi_gs/CIM/001_099/009/01.09.01_60/gs_CIM009v010901p.pdf
- [2] ARGO PROJECT AUTHORS, 2024. *Argo CD - Declarative GitOps CD for Kubernetes* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://argo-cd.readthedocs.io/en/stable/>
- [3] HELM PROJECT AUTHORS, 2026. *Helm - The package manager for Kubernetes* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://helm.sh/>
- [4] OASC, 2025. *MIMs Plus Specification 8.0* [online]. Open & Agile Smart Cities. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: https://living-in.eu/sites/default/files/files/mims-plus-v.8_1.pdf
- [5] OTTO, B., TEN HOMPEL, M. a WROBEL, S. (eds.), 2022. *Designing Data Spaces: The Ecosystem Approach to Competitive Advantage*. Cham : Springer. [online] [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-93975-5>
- [6] FIWARE FOUNDATION, 2026. *Orion-LD - Context Information Management* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://github.com/FIWARE/context.Orion-LD>
- [7] KONG INC., 2026. *Kong - API Gateway* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://github.com/Kong/kong>
- [8] FIWARE OPS, 2023. *Marinera - Kubernetes deployment of FIWARE components* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://github.com/FIWARE-Ops/marinera>
- [9] ATOS RESEARCH AND INNOVATION, 2024. *IoT Agent for LoRaWAN* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://github.com/Atos-Research-and-Innovation/IoTagent-LoRaWAN>
- [10] FIWARE FOUNDATION, 2023. *FIWARE IoT Agents framework documentation* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://fiware-iotagent-node-lib.readthedocs.io/>
- [11] FIWARE FOUNDATION, 2026. *QuantumLeap - Time Series Data Management* [online]. [cit. 2026-02-26]. Dostupné na: <https://quantumleap.readthedocs.io/en/latest/>
- [12] SMART DATA MODELS INITIATIVE, 2024. *Official repository of Smart Data Models* [online]. [cit. 2026-02-28]. Dostupné na: <https://smartdatamodels.org/>

Vývoj softvérovej aplikácie s integráciou generatívnej umelej inteligencie

Design and Development of a Software Application Incorporating Generative Artificial Intelligence

Martin Schmidt – Vladimír Siládi

Katedra informatiky, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica,
mschmidt4@student.umb.sk, vladimir.siladi@umb.sk

Abstrakt

Článok popisuje návrh a implementáciu full-stack webovej aplikácie na plánovanie lyžiarskych výletov s podporou umelej inteligencie. Systém pozostáva z backendu postaveného na frameworku Spring Boot s REST API, relačnou databázou PostgreSQL a frontendu implementovaného vo frameworku Nuxt 3. Jadrom aplikácie je agentová architektúra postavená na princípe ReAct, pričom na generovanie odpovedí využívame model Google Gemini 3 Flash Preview prostredníctvom služby OpenRouter.

Agent disponuje súborom 13 nástrojov schopných vyhľadávať aktuálne informácie o lyžiarskych strediskách, počasi a ubytovaní, ako aj ukladať rozhodnutia užívateľa a generovať interaktívne možnosti výberu. Konverzačný tok je rozdelený do troch fáz.

Výsledkom je funkčný prototyp preukazujúci praktické využitie generatívnych AI systémov v oblasti cestovného ruchu, vrátane automatického generovania personalizovaného PDF itineráru a interaktívnej mapy.

Kľúčové slová: generatívna umelá inteligencia, veľký jazykový model, agentová architektúra, plánovanie výletu

Abstract

This paper describes the design and implementation of a full-stack web application for AI-assisted ski trip planning. The system consists of a Spring Boot backend with a REST API, a PostgreSQL relational database, and a Nuxt 3 frontend. The core of the application is an agent architecture based on the ReAct principle, using the Google Gemini 3 Flash Preview model via the OpenRouter service. The agent has a set of 13 tools capable of searching for current information about ski resorts, weather and accommodation, as well as saving user decisions and

generating interactive selection options. The conversational flow is divided into three phases. The result is a functional prototype demonstrating the practical use of generative AI systems in the tourism domain, including automatic generation of a personalized PDF itinerary and an interactive map.

Key Words: generative artificial intelligence, large language model, agent architecture, trip planning

Úvod

V posledných rokoch prináša oblasť generatívnej umelej inteligencie, a predovšetkým veľkých jazykových modelov (LLM – Large Language Models), revolučné zmeny v spôsobe, akým ľudia interagujú s informačnými systémami. Modely ako GPT-4 alebo Gemini preukázali schopnosť porozumieť prirodzenému jazyku a generovať koherentné, kontextovo relevantné odpovede, čím otvorili nové možnosti v oblasti konverzačných rozhraní [1].

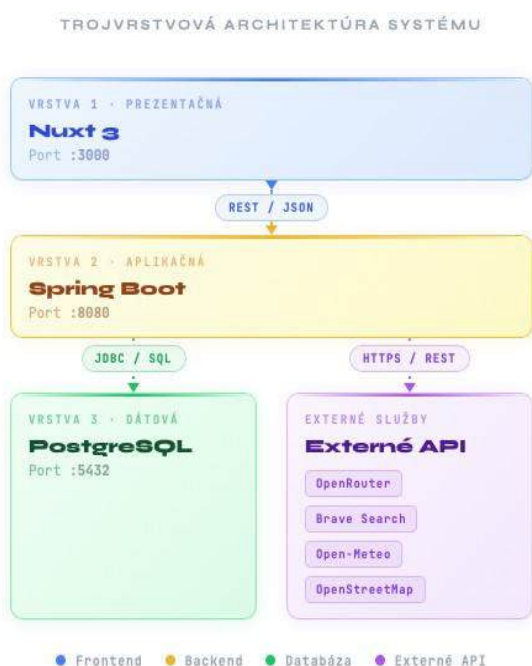
Plánovanie lyžiarskeho výletu je komplexný proces zahŕňajúci výber destinácie, lyžiarskeho strediska, ubytovania, dopravy, skipasu a ďalších aktivít. Tradičné webové portály ponúkajú väčšinou pasívne vyhľadávanie, pri ktorom si užívateľ sám zostavuje informácie z rôznych zdrojov. Konverzačný prístup s AI agentom umožňuje aktívne zbierať preferencie užívateľa a dynamicky prispôbovať výsledky jeho potrebám [2].

Existujúce komerčné riešenia, ako sú chatboty integrované do platforiem Expedia alebo Booking.com, poskytujú základnú odpoveď na otázky užívateľov, avšak spravidla neposkytujú plnohodnotné plánovacie prostredie s perzistentnou históriou, štruktúrovaným ukladaním dát a automatickým generovaním výstupných dokumentov. Cieľom tejto práce je navrhnúť a implementovať otvorený, rozšíriteľný prototyp, ktorý tieto obmedzenia prekonáva.

Kľúčovým technickým prístupom je implementácia tzv. ReAct (Reasoning and Acting) agentovej slučky [3], v ktorej jazykový model striedavo uvažuje a vykonáva akcie prostredníctvom nástrojov. Tento prístup umožňuje agentovi získavať aktuálne dáta z externých zdrojov a rozhodovať sa na základe reálnych informácií, nie len znalostí natrénovaných v modeli.

1 Architektúra systému

Aplikácia je navrhnutá ako trojvrstvová webová aplikácia: frontend, backend a databáza, doplnená o integrácie s externými API službami.



Obrázok 1 Schéma trojvrstvovej architektúry systému

Java 17 s využitím frameworku Spring Boot 3 [4]. Dodržiava vrstvovú architektúru v rámci doménovo orientovanej štruktúry balíčkov: **conversation/** a **user/**. Každá doména obsahuje podbalíčky **controller/**, **service/**, **persistence/** a **dto/**. Tento prístup zabezpečuje vysokú čitateľnosť kódu a nízku prepojenosť modulov.

Frontend je implementovaný vo frameworku Nuxt 3 s TypeScriptom, pričom na správu stavu využíva knižnicu Pinia a na UI komponenty PrimeVue. Mapová funkcionálna je implementovaná pomocou knižnice Leaflet.js.

Databázu tvorí PostgreSQL 17 bežiaci v Docker kontajneri. Schéma databázy je spravovaná automaticky prostredníctvom mechanizmu JPA ddl-auto=update bez nutnosti ručných migračných skriptov.

1.1 Backend a databázová schéma

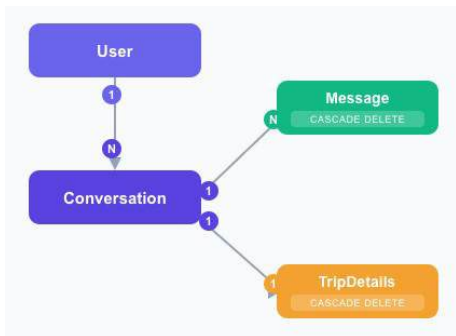
Databázová schéma pozostáva zo štyroch tabuliek.



Obrázok 2 Databázová schéma

Tabuľka **users** uchováva registrovaných užívateľov s heslom hashovaným algoritmom BCrypt. Tabuľka **conversations** uchováva metadáta konverzácie: identifikátor, väzbu na konverzáciu, názov, stav (ACTIVE, COMPLETED, ARCHIVED), fázu konverzácie (GUIDED_OPTIONS, FREE_FORM, REVIEW), JSON reťazec so súhrnom výletu a časové pečiatky. Tabuľka **messages** ukladá jednotlivé správy s atribútmi role (USER, ASSISTANT, SYSTEM), content, message_type (TEXT, OPTIONS, SELECTION), metadata vo formáte JSON a poradové číslo pre zachovanie chronológie. Tabuľka **trip_details** obsahuje 16 štruktúrovaných polí pre detaily výletu: destináciu, dátumy, stredisko, ubytovanie, rozpočet, počet účastníkov, úroveň zručností, informácie o skipasoch, doprave a ďalšie preferencie. Okrem toho uchováva JSON polia **pois_json** (geokódované body záujmu pre mapu) a **itinerary_json** (AI-generovaný denný itinerár), ako aj URL vygenerovaného PDF.

Servisná vrstva **ConversationService** riadi celý životný cyklus konverzácie. Pri vytvorení novej konverzácie systém prijme štruktúrované vstupné údaje z dotazníkového formulára a uloží ich do tabuľky **trip_details**. Metóda **sendMessage** uloží správu užívateľa, zavolá AI model prostredníctvom



Obrázok 3 Schéma databázových vzťahov

OpenRouterService a výsledok vrátane prípadných metadát uloží ako správu asistenta.

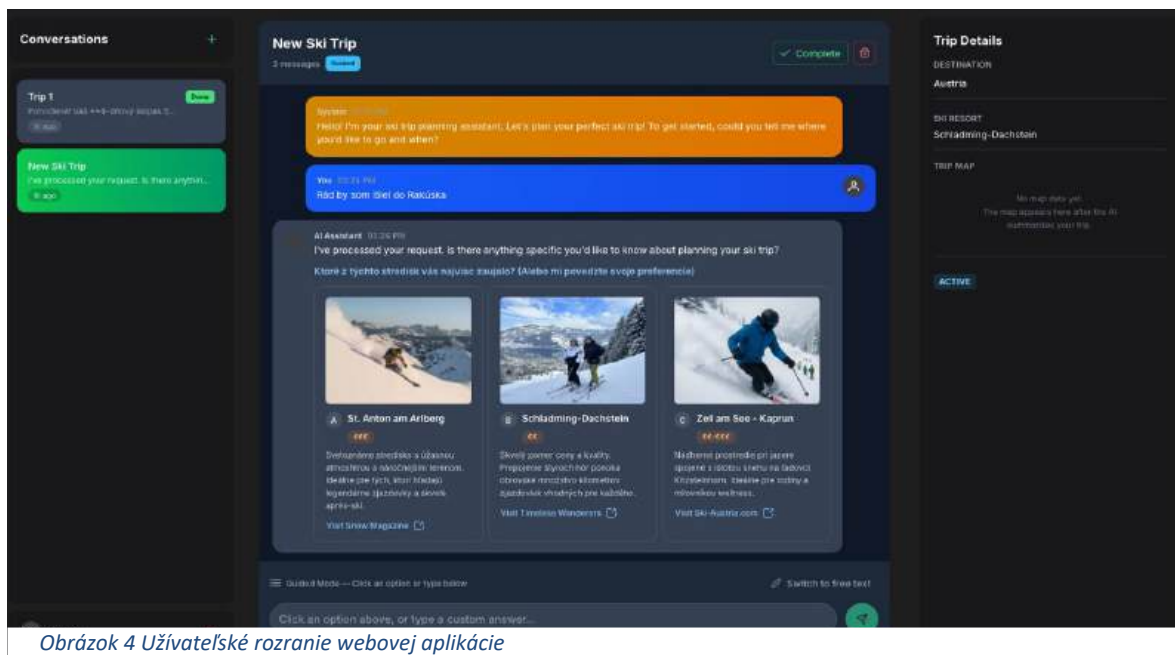
Bezpečnosť je implementovaná pomocou bezstavových JWT tokenov [5]. Po úspešnom prihlásení užívateľ obdrží token podpísaný algoritmom HS256 s platnosťou 24 hodín. Filter *JwtAuthenticationFilter* overí podpis tokenu pri každej chránenej požiadavke a nastaví bezpečnostný kontext. Každý prístup ku konverzácii je chránený kontrolou vlastníctva cez podmienku *findByIdAndUserId()*, čím je znemožnený prístup iných užívateľov k cudzím konverzáciám.

Hlavná stránka je rozdelená do troch stĺpcov: zoznam konverzácií (komponent **ConversationList**), chatové rozhranie so správami a vstupné pole (komponent **MessageInput**) a panel s detailmi výletu (komponent **TripDetailsPanel**). Komponent **ChatMessage** rozlišuje typy správ: textové správy sú renderované cez knižnicu **Marked** (Markdown → HTML), správy typu **OPTIONS** vyvolávajú komponent **OptionCards** s klikateľnými kartami.

Stav aplikácie je spravovaný dvoma Pinia stormi. **useAuthStore** uchováva JWT token a stav prihlásenia, pričom token perzistuje v *localStorage* a je obnovený pri každom načítaní stránky. **useConversationStore** spravuje zoznam konverzácií, aktuálnu konverzáciu, detaily výletu, stav načítavania a chybové hlásenia.

Komponent **TripDetailsPanel** zobrazuje štruktúrované informácie o výlete v reálnom čase a zahŕňa interaktívnu **Leaflet** mapu s geokódovanými bodmi záujmu (POI - Points of Interest). Pre každý POI je zobrazená farebná SVG ikona a popup s názvom a popisom. Po dokončení konverzácie je sprístupnené tlačidlo na stiahnutie PDF itineráru.

2 Integrácia umelej inteligencie



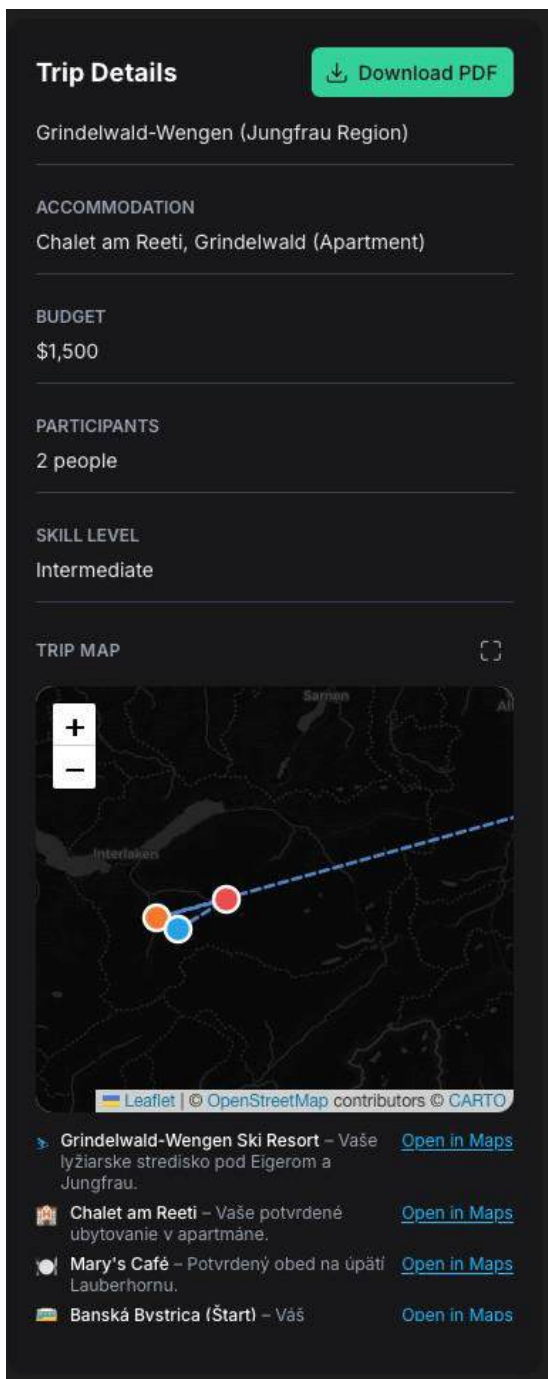
Obrázok 4 Užívateľské rozhranie webovej aplikácie

1.2 Frontend

Frontend aplikácia je organizovaná do troch stránok: prihlásenie (*login.vue*), registrácia (*register.vue*) a hlavná aplikácia (*index.vue*). Globálny autentifikačný middleware *auth.global.ts* spravuje presmerovanie na základe stavu prihlásenia pri každej navigácii.

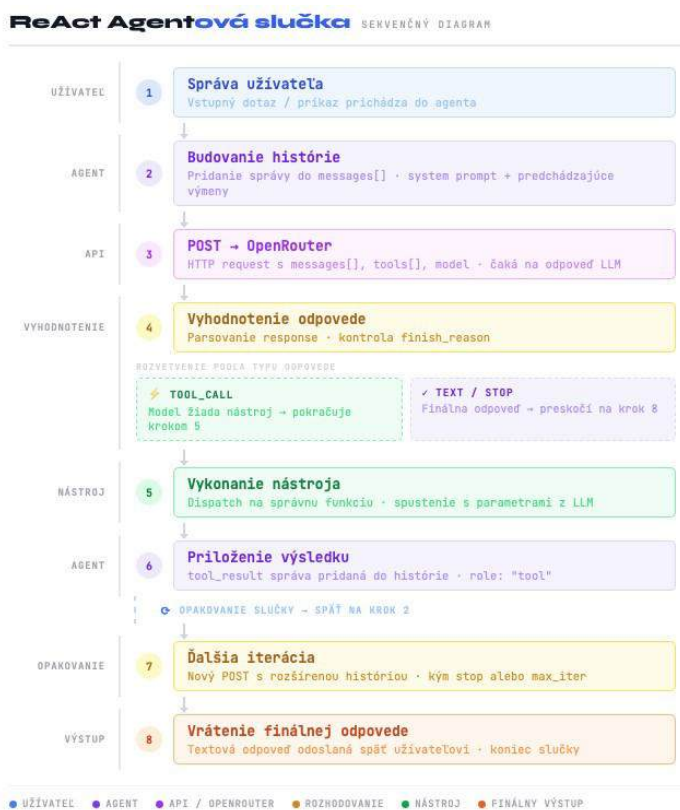
2.1 Jazykový model a agentová architektúra

Aplikácia komunikuje s veľkým jazykovým modelom prostredníctvom služby **OpenRouter**, ktorá slúži ako proxy pre prístup k modelu **Google Gemini 3 Flash Preview** (*google/gemini-3-flash-preview*). Pre každú požiadavku sú nastavené parametre: teplota 0.7



pre kreativnosť odpovedí a maximálna dĺžka odpovede 4096 tokenov.

Jazykový model pracuje v tzv. ReAct agentovej slučke (Reasoning and Acting) [3], implementovanej v triede OpenRouterService. Tento prístup umožňuje modelu striedavo uvažovať a vykonávať akcie prostredníctvom nástrojov, pričom výsledky nástrojov sú priebežne pridávané do histórie správ. Slučka prebieha nasledovne: model obdrží správu užívateľa spolu s históriou konverzácie a definíciami dostupných nástrojov, ak model vráti volanie nástroja (tool_call), trieda ToolExecutor nástroj vykoná a výsledok priloží k histórii ako správa s rolou *tool* tento postup sa opakuje až kým model nevráti textovú odpoveď bez volania nástrojov, alebo kým nie je dosiahnutý limit 10 iterácií.



Obrázok 5 Diagram agentovej slučky

Tento prístup inšpirovaný prácou Toolformer [6] umožňuje modelu dynamicky rozhodovať, kedy a aké nástroje použiť, na základe kontextu konverzácie.

2.2 Nástroje AI agenta

Agent disponuje 13 nástrojmi definovanými v triede **ToolDefinitions** a implementovanými v triede **ToolExecutor**. Tabuľka 1 sumarizuje dostupné nástroje a ich účel.

Nástroj *web_search* komunikuje s Brave Search API. Pre dodržanie limitu bezplatného tarifu (1 požiadavka za sekundu) je implementované oneskorenie 2 sekundy medzi volaniami. Výsledky sú spracované do kompaktného formátu maximálne 8 zápisov s poliami rank, title, url, snippet, age a prípadne image.

Nástroj *present_options* implementuje vzor **Tool-as-Intent**: nevykonáva žiadny výpočet, ale zachytáva zámer modelu prezentovať možnosti. Výsledok uloží do premennej **lastPresentedOptions** v triede **ToolExecutor**. Servisná vrstva po ukončení agentovej slučky skontroluje túto premennú a ak obsahuje dáta, priloží ich ako *metadata* k správe asistenta s typom **OPTIONS**. Frontend ich potom zobrazí ako klikateľné karty komponentu **OptionCards**.

Nástroj *present_options* zároveň vykonáva validáciu kvality dát: normalizuje ID možností na písmená A–E a overuje, že každé *site_url* nie je len domovská stránka.

Ak validácia zlyhá, nástroj vráti chybovú odpoveď, čím prinúti model znovu zavolať *web_search* s konkrétnejším dopytom a následne zopakovať *present_options* s korektnějšími URL adresami.

Nástroj *generate_trip_map* iteruje cez všetky body záujmu (POI), geokóduje chýbajúce súradnice, vypočíta centroid oblasti (s vylúčením dopravných POI, aby sa predišlo nesprávnemu centrovaniu mapy na mieste odchodu) a zostaví URL statickej mapy cez *staticmap.openstreetmap.de*. Všetky POI sú uložené do poľa *pois_json* v tabuľke **trip_details**, odkiaľ ich frontend zobrazuje v Leaflet mape.

2.3 Fázové riadenie konverzácie a stavové promptovanie

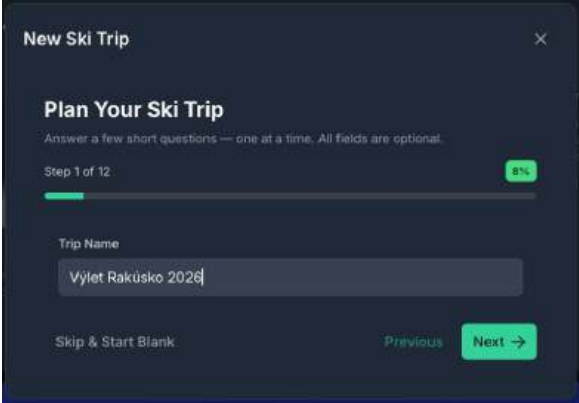
Konverzácia prechádza troma fázami: **GUIDED_OPTIONS**, **FREE_FORM**, **REVIEW**. Každé fáze zodpovedá iná varianta systémového promptu konštruovaná metódou *getSystemPrompt()*.

Fáza **GUIDED_OPTIONS** implementuje prísne pravidlá: agent musí pred prezentovaním možností zavolať *web_search*, nesmie písať zoznamy v texte, pred pokračovaním na ďalší krok musí uložiť rozhodnutie cez *save_trip_details*, a musí dodržiavať definovanú postupnosť krokov plánovania (stredisko, ubytovanie, skipas, doprava, aktivity).

Fáza **FREE_FORM** umožňuje voľný konverzačný text. Agent odpovedá na otázky, využíva vyhľadávacie nástroje a priebežne ukladá zmeny v plánovaní.

Fáza **REVIEW** zaväzuje agenta volať *generate_trip_map* so všetkými POI (pričom pre každé miesto pred tým zavolá *geocode_location*), zosumarizovať všetky dohodnuté detaily výletu a vyzvať užívateľa k dokončeniu plánovania.

Kľúčovým mechanizmom zabraňujúcim "zabudnutiu" modelu je stavové promptovanie (stateful prompting): pri každom volaní AI modelu je do systémového promptu vložený aktuálny stav tabuľky *trip_details* vo formáte čitateľného textového bloku GUIDED FLOW STATUS. Tento blok označuje každý krok plánovania ako DONE, PENDING alebo SKIPPED. Model tak nie je odkázaný výhradne na históriu správ, ale má explicitne k dispozícii všetky doposiaľ potvrdené rozhodnutia.

The image shows a dark-themed web interface for planning a ski trip. At the top, it says "New Ski Trip" with a close button. Below that is the heading "Plan Your Ski Trip" and a subtext "Answer a few short questions — one at a time. All fields are optional." A progress bar indicates "Step 1 of 12" with a green "8%" completion marker. There is a text input field for "Trip Name" containing "Výlet Rakúsko 2026". At the bottom, there are buttons for "Skip & Start Blank", "Previous", and "Next" with a right arrow.

Obrázok 6 Voliteľný vstupný formulár

3 Výsledky a diskusia

Implementovaný systém bol funkčne otestovaný prostredníctvom kolekcie REST požiadaviek pokrývajúcej všetky API endpointy. Tabuľka 2 sumarizuje implementované endpointy backendu.

Testovací scenár overoval kompletný tok plánovania: užívateľ zadal vstupné údaje výletu prostredníctvom vstupného formulára (destinácia: Švajčiarske Alpy, dátumy: 15.–22. marca 2026, 4 osoby, pokročilá úroveň, miesto odchodu Banská Bystrica). Agent v Guided Options fáze zavola

nástroj *search_ski_resorts*, získal aktuálne výsledky z Brave Search API, a prezentoval 3 konkrétne lyžiarske strediská vo forme klikateľných kariet. Po výbere strediska systém zavola *save_trip_details* a pokračoval výberom ubytovania cez *search_accommodation* a obdobne cez ďalšie fázy plánovania. Systém správne prešiel cez všetky kroky

plánovania, konverzačná história bola uchovaná v chronologickom poradí a dáta jednotlivých užívateľov boli správne izolované.

Po prechode do fázy REVIEW agent zavolał `geocode_location` pre každé kľúčové miesto a následne `generate_trip_map`, čím boli geokódované POI uložené do databázy a dostupné v Leaflet mape na webe.

Po nastavení stavu konverzácie na COMPLETED systém automaticky vykonal tri kroky:

- (1) geokódovanie chýbajúcich stredísk a ubytovaní,
- (2) AI generovanie štruktúrovaného JSON itineráru bez nástrojov cez separátne volanie modelu
- (3) Generovanie PDF pomocou knižnice iText [7].

Vygenerovaný PDF obsahuje titulnú stranu, tabuľku s dennými aktivitami, prehľad potvrdených rezervácií, balíčkovací zoznam, tipy a núdzové

Obmedzenia súčasného prototypu sa týkajú hlavne nekonzistentnosti AI modelov, niekedy nevyužijú dostupné nástroje správne alebo ponúknu užívateľovi nesprávne linky na web stránky. Taktiež sa objavujú problémy s geokódovaním lokalít. V backende sú vytvorené isté mechanizmy ktoré pomáhajú predísť týmto problémom, avšak tiež nie sú sto percentné. Testovali sme aj rôzne AI modely, no neboli diametrálne rozdielne. Dbali sme aj na cenu inferencie, preto je momentálne využívaný model Gemini Flash 3 Flash Preview, ktorého pomer ceny a výkonu je výhodný pre náš účel.

Výkon generácie PDF nie je optimalizovaný pre súbežné požiadavky, keďže generácia prebieha synchronne v HTTP vlákne. Statická mapa v PDF je závislá od dostupnosti verejnej `staticmap.openstreetmap.de` služby. Pre produkčné nasadenie by bolo vhodné využiť spoľahlivejšie API na vyhľadávanie a funkcionality máp. Avšak tieto API sú väčšinou platené a pre momentálnu implementáciu funkčného prototypu nepotrebné.

Navrhnutý systém demonštruje, že kombinácia moderných full-stack technológií s agentovou AI architektúrou predstavuje perspektívny prístup k tvorbe inteligentných plánovacích asistentov v oblasti cestovného ruchu [2]. Modulárna štruktúra uľahčuje budúce rozšírenia: REST API je bezstavové, čo umožňuje horizontálne škálovanie backendu. Abstrakcia OpenRouter dovoľuje výmenu modelu bez zmien v aplikačnej logike.

Záver

Článok prezentuje návrh a implementáciu full-stack chatbot aplikácie pre plánovanie lyžiarskych výletov s integráciou generatívnej umelej inteligencie. Bola navrhnutá trojvrstvová architektúra (Spring Boot 3 backend, PostgreSQL 17, Nuxt 3 frontend) s plnohodnotným REST API, JWT autentifikáciou a perzistentnou konverzačnou históriou. Jadrom systému je ReAct agentová slučka využívajúca model Google Gemini 3 Flash Preview prostredníctvom OpenRouter, ktorá je vybavená 13 nástrojmi pre prístup k reálnym externým dátam (Brave Search, Open-Meteo, OpenStreetMap).

Kľúčovými prínosmi práce sú:

- (1) Fázový konverzačný tok s dynamickým stavovým promptovaním, ktorý zabraňuje "zabudnutiu" modelu a zabezpečuje štruktúrovaný postup plánovania
- (2) Vzor Tool-as-Intent pre klikateľné možnosti s automatickou validáciou kvality URL adries

Trip Summary

An 8-day luxury ski expedition for 4 advanced skiers to the world-renowned LAAX resort in Switzerland. Staying at the Hotel Laaxerhof, the group will enjoy high-altitude terrain, dynamic skiing conditions, and a futuristic dining experience at Galaxy LAAX.

Day-by-Day Itinerary

Day 1 — Arrival and Check-in 2026-03-14		
Time	Activity	Price
06:00	Drive from Banská Bystrica to Laax Approximately 10-11 hour drive via Austria to the Swiss Alps.	Fuel + Vignettes
18:00	Check-in at Hotel Laaxerhof Check-in at your confirmed accommodation in Laax Murschtag. View / Book	
Day 2 — First Tracks on Vorab Glacier 2026-03-15		
Time	Activity	Price
08:30	Explore High Altitude Terrain Warm up on the Vorab Glacier (3017m) to take advantage of the advanced terrain and high snow quality. View / Book	
Day 3 — Futuristic Dining at Galaxy 2026-03-16		
Time	Activity	Price
12:30	Lunch at Galaxy LAAX Confirmed lunch at the futuristic station Crap Sogn Glen. International cuisine with 300-degree views. View / Book	
Day 4 — Freestyle and Powder Day 2026-03-17		
Time	Activity	Price
09:00	Snowpark LAAX Visit the world-famous snowparks or explore off-piste routes suitable for advanced levels.	
Day 5 — Films Side Exploration 2026-03-18		

Obrázok 7 Časť vygenerovaného PDF itineráru telefónne čísla.

- (3) Automatické generovanie personalizovaného PDF itineráru s interaktívnou geocódovanou mapou POI.

Do budúcnosti plánujeme implementovať asynchrónne generovanie PDF, extenzívnejšie testovanie modelov a fine-tuning systémových promptov. Tiež podporu viacerých jazykových modelov a implementáciu ďalších API ktoré zlepšia kvalitu a presnosť odpovedí (napríklad API na sledovanie cien leteniek alebo cestovných lístkov).

PodĎakovanie

Táto práca bola vypracovaná v rámci študentskej vedeckej konferencie na Katedre informatiky FPV UMB v Banskej Bystrici. Ďakujem vedúcemu práce Vladimírovi Siládimu za cenné konzultácie a odborné usmerňovanie počas realizácie projektu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BROWN, Tom; MANN, Benjamin; RYDER, Nick; SUBBIAH, Melanie; KAPLAN, Jared; DHARIWAL, Prafulla; NEELAKANTAN, Arvind; SHYAM, Pranav; SASTRY, Girish; ASKELL, Amanda and AMODEI, Dario, (2020). Language Models are Few-Shot Learners. V: Advances in Neural Information Processing Systems 33. Red Hook: Curran Associates, pp. 1877-1901. ISBN 9781713829546.
- [2] BUHALIS, Dimitrios and SINARTA, Youcheng, (2019). Real-time co-creation and nowness service: lessons from tourism and hospitality. Journal of Travel and Tourism Marketing, vol. 36, no. 5, pp. 563-582. ISSN 1054-8408.
- [3] YAO, Shunyu; ZHAO, Jeffrey; YU, Dian; DU, Nan; SHAFRAN, Izhak; NARASIMHAN, Karthik and CAO, Yuan, (2023). ReAct: Synergizing Reasoning and Acting in Language Models. In: The Eleventh International Conference on Learning Representations. Dostupné na: https://openreview.net/forum?id=WE_vluYUL-X [a 2026-02-25].
- [4] HECKLER, Mark, (2021). Spring Boot: Up and Running. Sebastopol: O'Reilly Media, 320 pp. ISBN 978-1492076988.
- [5] JONES, Michael; BRADLEY, John and SAKIMURA, Nat, (2015). JSON Web Token (JWT). RFC 7519. Dostupné na: <https://www.rfc-editor.org/rfc/rfc7519> [2026-02-25].
- [6] SCHICK, Timo; DWIVEDI-YU, Jane; DESSÌ, Roberto; RAILEANU, Roberta; LOMELI, Maria; HAMBRO, Eric; ZETTLEMOYER, Luke; CANCEDDA, Nicola and SCIALOM, Thomas, (2024). Toolformer: Language Models Can Teach Themselves to Use Tools. V: Advances in Neural Information Processing Systems 36. Red Hook: Curran Associates. Dostupné na: <https://arxiv.org/abs/2302.04761> [2026-02-26].
- [7] ITEXT GROUP NV, (2024). iText 7: The PDF library. Software. Version 7.2.5. Dostupné na: <https://itextpdf.com> [2026-02-26].
- [8] ADAM, Martin; WESSEL, Michael and BENLIAN, Alexander, (2021). AI-based chatbots in customer service and their effects on user compliance. Electronic Markets, vol. 31, no. 2, pp. 427-445. ISSN 1019-6781.
- [9] NUXT TEAM, (2024). Nuxt 3. Software. Version 3.x. Dostupné na: <https://nuxt.com> [2026-02-27].
- THE POSTGRESQL GLOBAL DEVELOPMENT GROUP, (2024). PostgreSQL: The World's Most Advanced Open Source Relational Database. Software. Version 17. Dostupné na: <https://www.postgresql.org> [2026-02-27].

Tabuľky

Nástroj	Účel
web_search	Vyhľadávanie na webe cez Brave Search API
get_weather_forecast	Aktuálna predpoveď počasia cez Open-Meteo API
search_ski_resorts	Vyhľadávanie lyžiarskych stredísk (kompoz. web_search)
search_accommodation	Vyhľadávanie ubytovania (kompoz. web_search)
get_ski_pass_prices	Ceny skipassov (kompoz. web_search)
get_ski_gear_rental	Požičovne lyžiarskeho výstroja (kompoz. web_search)
search_restaurants	Reštaurácie v oblasti (kompoz. web_search)
search_activities	Mimolyžiarské aktivity v oblasti (kompoz. web_search)
search_transportation	Dopravné možnosti (kompoz. web_search)
save_trip_details	Uloženie rozhodnutia do tabuľky trip_details
present_options	Prezentovanie klikateľných možností užívateľovi
geocode_location	Preklad názvu miesta na zemepisné súradnice (Open-Meteo)
generate_trip_map	Geokódovanie POI, uloženie do DB a vygenerovanie mapy

Tabuľka 1 Prehľad nástrojov AI agenta

Metóda	Cesta	Popis
POST	/auth/login	Prihlásenie, vrátenie JWT tokenu
POST	/users	Registrácia nového užívateľa
POST	/api/conversations	Vytvorenie konverzácie (s opt. intake dátami)
GET	/api/conversations	Zoznam konverzácií prihláseného užívateľa
GET	/api/conversations/{id}	Detail konverzácie so správami
POST	/api/conversations/{id}/messages	Odoslanie správy a prijatie AI odpovede
PATCH	/api/conversations/{id}/status	Zmena stavu (COMPLETED spustí PDF generáciu)
PATCH	/api/conversations/{id}/phase	Prechod medzi fázami konverzácie
GET	/api/conversations/{id}/trip-details	Štruktúrované detaily výletu
DELETE	/api/conversations/{id}	Zmazanie konverzácie
POST	/api/pdf/generate/{conversationId}	Manuálne spustenie generovania PDF
GET	/api/pdf/{filename}	Stiahnutie PDF súboru

Tabuľka 2 Prehľad REST API endpointov

Využitie veľkých jazykových modelov pri spracovaní dát v prostredí univerzitnej jedálni

Use of large language models for data processing in university canteen

Mikhail Shishov¹ – Mária Pappová²

^{1,2}Katedra informatiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹ mikhail.shishov@student.ukf.sk, ² maria.pappova2@ukf.sk

Abstrakt

Tento článok sa zaoberá návrhom a implementáciou systému na automatizované spracovanie a obohatenie dát o jedlách v prostredí webovej stránky pre študentskú jedáleň Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre. Hlavným cieľom práce bolo vytvoriť mechanizmus, ktorý dokáže transformovať neštruktúrované a skrátené názvy jedál do plnohodnotných a viacjazyčných opisov. Kľúčovou technológiou riešenia je využitie moderných a bezplatných modelov umelej inteligencie prostredníctvom API, s implementáciou stratégie "fallback" pre zabezpečenie vysokej dostupnosti. Výsledkom je webová aplikácia s backendom postaveným na frameworku Laravel a frontendom vo Vue.js, s fungujúcou možnosťou jednoduchého prekladu názvov jedál, ktorá uľahčuje prístup k informáciám o strave pre domácich aj zahraničných študentov.

Kľúčové slová: umelá inteligencia, Gemini, PHP, Laravel, API

Abstract

This article deals with the design and implementation of a system for automated processing and enrichment of food data within the environment of a website for the student canteen of Constantine the Philosopher University in Nitra. The main objective of the work was to create a mechanism capable of transforming unstructured and abbreviated meal names into comprehensive multilingual descriptions. The key technology of the solution is the utilization of the latest artificial intelligence models via API, featuring a "fallback" strategy implementation to ensure high availability. The result is a web application with a Laravel-based backend and a Vue.js frontend that has functioning food names translation feature, which improves access to dietary information for both domestic and international students.

Key Words: artificial intelligence, Gemini, PHP, Laravel, API

Úvod

V súčasnej dobe vďaka všeobecnému vývoju

technológií sa stále zvyšujú nároky na kvalitu a dostupnosť informácií v akademickom prostredí. Jednou z oblastí, kde môže dochádzať k informačným bariéram, je proces poskytovania informácií o dennom menu na jedálňach Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre. V gastronómii je kvalita prekladu jedálnych lístkov dôležitá pre spokojnosť používateľov a vnímanie poskytovaných služieb; nesprávne alebo nejasné preklady môžu viesť k strate záujmu a poškodeniu reputácie zariadenia, ako sa ukazuje pri turistických destináciách a reštauráciách [1]. Podobné jazykové a komunikačné bariéry môžu vznikať aj v prostredí univerzitných jedální, kde študenti, predovšetkým zahraniční, čelia ťažkostiam pri interpretácii skrátených a neštandardizovaných názvov jedál. Túto informačnú bariéru umocňuje aj absencia vizuálnej prezentácie jedál, čo sťažuje celkovú orientáciu používateľa v ponuke stravovacieho zariadenia.

Tradičné metódy manuálneho vkladania a spracovania dát predstavujú značnú časovú záťaž a nesú so sebou vysoké riziko chýb. Pre správcu systému je z hľadiska efektivity ťažko realizovateľné manuálne zabezpečovať preklady dynamicky sa meniaceho menu do viacerých cudzích jazykov, pretože podobné systémy narážajú na limity personálu, času a finančných zdrojov [2]. Takýto proces je ekonomicky neefektívny, nakoľko si vyžaduje buď externé prekladateľské služby, alebo vysokú časovú investíciu personálu, čo v konečnom dôsledku spomaľuje proces publikácie aktuálnych informácií.

Cieľom tejto práce je predstaviť modernejší prístup k spracovaniu týchto dát pomocou LLM (angl. Large Language Model, slov. veľký jazykový model). Navrhnutý systém automaticky analyzuje vstupný text, dopĺňa chýbajúce informácie a generuje vizuálny obsah, čím zvyšuje používateľskú prívetivosť celého systému.

1. Analýza súčasného stavu

V kontexte stravovacích zariadení UKF je bežnou praxou uvádzanie názvov jedál v skrátenej forme (napr. "Vypr. kur. prsia"), čo predstavuje výraznú bariéru pre priame automatizované spracovanie. Samotná translácia do cudzích jazykov bez predchádzajúcej úpravy by viedla k nepredvídateľným výsledkom. Preto

je nevyhnutné implementovať systém, ktorý najskôr zabezpečí rekonštrukciu plného názvu pokrmu a až následne vykoná lokalizáciu. Okrem textovej absencie údajov je problémom aj chýbajúca vizuálna dokumentácia, t.j. obrázky, čo sťažuje orientáciu používateľa pri výbere jedla (Obrázok 1).

streda 04. marca 2025	
Obed 01	1. Vypr. kur. prsia v sójovom, ryžakompoj. 1,3,7,11, pol.korová s párkom 3
Obed 02	2. Vypráži kuracie prsia v sójovom, omáčka, jablko 1,3,7,11
Obed 03	3. Časabôbi, zemiakov, oblička 1,1,3D
Obed 04	4. Štrúfle maková s vriškami,ovocie 1,3,7
Obed 05	5. Šesťdesiaty karbonátok, tekvicový prhvarok,1/2 az miaku,ovocie 1,3,7
Obed 06	6. Šalát špenát,šed,šal,rukevica,chemurgistika,čaj, pohárček, dressing) 3,4,10

Obr. 1 Ukážka menu na webovej stránke
Zdroj: <https://www.stravovanie.ukf.sk/>

Súčasný riešenie využíva databázu, ako je MySQL, na ukladanie a distribúciu dát používateľom. Chýba však inteligentná vrstva, ktorá by dokázala sémanticky porozumieť obsahu a vykonať hĺbkovú analýzu textu v reálnom čase. Práve túto medzeru vyplňa naše riešenie založené na integrácii modelov Gemini.

2. Metodológia a technológia

Pri návrhu systému sme sa zamerali na nízke náklady a efektivitu riešenia problému, keďže cieľom bolo vytvoriť riešenie schopné spoľahlivo fungovať aj pri dlhodobej prevádzke a spracovaní väčšieho množstva dát. Robustnosť systému je tiež kľúčová, a to najmä z hľadiska stability, odolnosti voči chybám a jednoduchej údržby. Zároveň je nutné zabezpečiť optimálne využitie dostupných zdrojov a plynulú odozvu aplikácie.

Ako hlavný framework v projekte bol zvolený Laravel, postavený na jazyku PHP, ktorý poskytuje rozsiahlu podporu pre tvorbu REST API, prácu s databázami a implementáciu bezpečnostných mechanizmov. Vďaka svojej modularnej architektúre a širokej komunite umožňuje rýchly vývoj aplikácie, zároveň však podporuje tvorbu prehľadného a dobre udržiavateľného kódu [3].

2.1 Integrácia modelov Gemini

Centrálnym prvkom navrhutej architektúry je servisná trieda AiService, ktorá zabezpečuje komunikáciu s rozhraním API spoločnosti Google. Voľba ekosystému Google bola podmienená dlhodobým pôsobením tejto spoločnosti na trhu, čo zvyšuje pravdepodobnosť záruky budúcej podpory a jednoduchého rozvoja implementovaného riešenia. V systéme je integrovaný model Gemini 3 Flash, ktorý v čase vývoja predstavuje dobrú voľbu v pomere efektivity a možnosti bezplatného použitia. Model bol zvolený aj pre jeho schopnosť sémantického porozumenia prirodzenému jazyku, čo bolo overené sériou validačných testov pred samotnou integráciou do produkčnej verzie systému [4].

2.2 Stratégia "Fallback" (angl. havarijný systém)

Počas testovani bol identifikovaný stavový kód HTTP 429, ktorý signalizoval dosiahnutie limitov požiadaviek v rámci bezplatnej úrovne API. Táto bariéra bola eliminovaná implementáciou stratégie fallback, ktorá v mojom prípade spočíva v dynamickom prepínaní medzi viacerými modelmi rodiny Gemini. Ten prístup zabezpečuje kontinuitu spracovania dát aj v momente, kedy primárny model vyčerpá pridelenú kvótu.

Vzhľadom na limity bezplatných verzií API a možnú dočasnú nedostupnosť, bola implementovaná nasledujúca hierarchická štruktúra modelov:

- Gemini 3 Flash ako primárny model pre najvyššiu kvalitu,
- Gemini 2.5 Flash ako stabilná náhrada,
- Gemini 2.5 Flash-Lite ako najúspornejší model pri vyčerpaní kvót.

Tento mechanizmus zabezpečuje, že systém zostane funkčný aj pri vysokom počte požiadaviek alebo dočasnom výpadku najnovšieho modelu.

Gemini má niekoľko limitov – žiadosti za minútu (tzv. RPM, angl. Requests per minute), žiadosti za deň (tzv. RPD, angl. Requests per day), a počet tokenov za minútu. Jeden token sa rovná približne 4 znákom [5].

V čase písania článku model Gemini 3 Flash ponúka maximálne 5 žiadostí za minútu, 20 žiadostí za deň, a 250 tisíc tokenov za minútu (Obrázok 2). Podobné limity majú aj ďalšie bezplatné modely.

Obr. 2 Ukážka limitov v AI Studio na stránke Google
Zdroj: [osobný účet autora na https://aistudio.google.com/rate-limit/](https://aistudio.google.com/rate-limit/)

Počas rozsiahleho testovania systému limit tokenov nebol vyčerpaný na viac ako 0.4%, a to len v jednom z troch použitých modelov, a kvôli tomu je možné predpokladať, že limity budú stačiť aj pre účely otvoreného podniku. Ak z nejakého dôvodu budú tieto limity presiahnuté, je možné ich zväčšiť použitím platených služieb od Google.

V prípade kritického zlyhania systému sú podrobné diagnostické informácie zaznamenávané do štandardného logovaciuho súboru frameworku Laravel

pod názvom laravel.log. V budúcich vylepšeniach aplikácie je možné vytvoriť implementáciu modulu na vizualizáciu týchto chybových hlásení priamo v administratívnom rozhraní, s cieľom transformovať technické záznamy do formátu zrozumiteľného aj pre administrátora bez hlbších znalostí zdrojového kódu. Takéto riešenie umožní efektívnejšiu identifikáciu problémov a zrýchli komunikáciu pri hlásení chýb vývojárovi.

3. Implementácia a výsledky

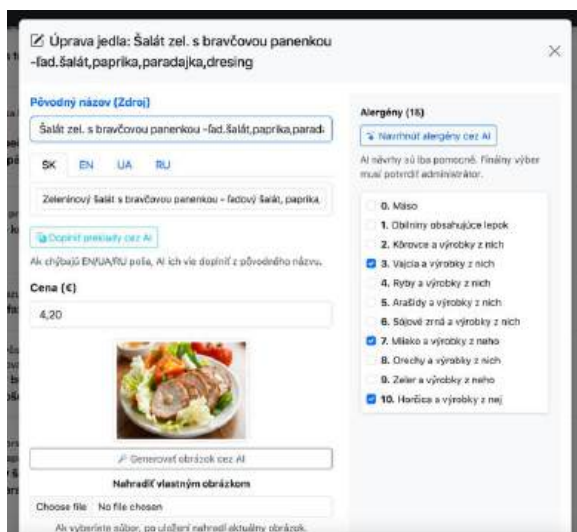
Realizácia projektu sa sústredila na tri hlavné oblasti: spracovanie názvov jedál, automatický preklad a vizualizáciu. Všetky spomenuté aspekty si opíšeme v jednotlivých podkapitolách.

3.1 Inteligentné obohatenie dát

Proces začína vložением „surového“ (angl. raw) názvu jedla. Systém následne vykoná de-skratkovanie, t.j. transformáciu skratiek na plné slová (napr. „pol.cicerová so zem.“ prekladáme do „polievka cicerová so zemiakmi“). Na to je zároveň zvolený vhodný prompt, t.j. príkaz pre umelú inteligenciu, kde je zadaný nízky parameter tzv. „teploty“, na úrovni 0.1, čo znižuje „kreativitu“ modelu a zaručuje fakty rešpektujúce odpovede.

Následne funguje automatický preklad do angličtiny, ukrajinčiny a ruštiny, čo je prínosom pre inkluzivitu na pôde univerzity.

Všetky operácie môže administrátor vykonávať aj počas vytvorenia jedla, aj počas následných úprav (Obrázok 3).



Obr. 3 Úprava položky administrátorom
Zdroj: autor

prostredníctvom modulu umelej inteligencie. Keď administrátor požiadá o návrh alergénov, systém odošle surový názov jedla, napr. „Vyprážaný rezeň s hranolkami“ do služby AiService. Model na základe svojich tréningových dát identifikuje kľúčové ingrediencie, ktoré sú v názve obsiahnuté alebo predpokladané. V tomto prípade AI rozpozná prítomnosť mäsa, lepku, vajec a potenciálne mlieka, pričom výsledkom je štruktúrovaný zoznam číselných kódov zodpovedajúcich oficiálnej klasifikácii alergénov. Pri spracovaní alergénov je tiež nastavený parameter „teploty“ 0.1, čo zaručuje presnosť odpovede bez halucinácií.

Ďalším bezpečnostným prvkom je následná kontrola navrhnutých dát s lokálnou databázou systému. Po tom, čo model vráti reťazec čísel, systém vykoná SQL dopyt do tabuľky allergens. Tu dochádza k filtrovaniu: v používateľskom rozhraní sa administrátorovi zobrazia ako návrhy iba tie kódy, ktoré majú reálny ekvivalent v systémovej číselníku (1 pre lepok, 3 pre vajcia atď.). Čísla sú priradené podľa platnej legislatívy. Ak by teda umelá inteligencia navrhla kód, ktorý v databáze jedálne nie je definovaný, systém ho zahodí, aby nedošlo k nepresnostiam. V prípade, že je lokálna databáza alergénov prázdna, funkcia automatického priradovania bude neaktívna.

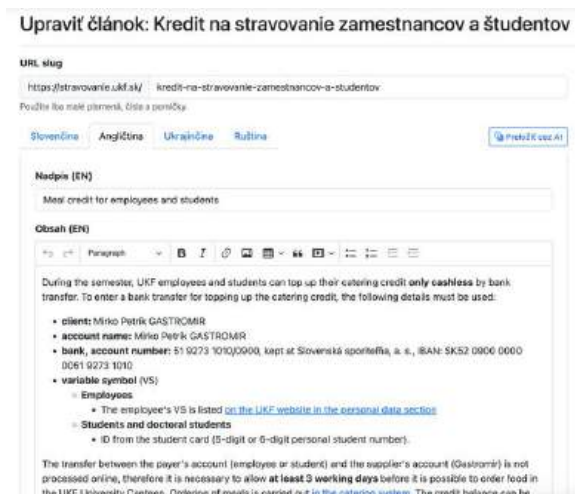
Z hľadiska správcu systému a zodpovednosti je proces navrhnutý ako poloautomatický. Systém po obdržaní dát z AI neukladá dáta ticho a automaticky, ale vizuálne podfarbuje príslušné zaškrtačacie polia v editovacom formulári jedla. Administrátor je explicitne upozornený, že návrh vygenerovaný umelou inteligenciou je len informatívny, môže byť nepresný, a pred finálnym uložením do databázy musí administrátor osobne potvrdiť správnosť identifikovaných alergénov. Prítomnosť človeka je kritická, pretože pri stravovacích službách môžu mať chybné informácie priamy dopad na zdravie aj život zákazníkov. Systém teda nahrádza manuálne listovanie v papierových zoznamoch inteligentným predvýberom, ale konečnú voľbu a zodpovednosť ponecháva na kvalifikovanom pracovníkovi.

Navrhnutý systém integruje aj modul na lokalizáciu informačných príspevkov relevantných pre prevádzku študentských jedální UKF. Príkladom praktického využitia je spracovanie inštruktážnych materiálov, ktoré používateľov usmerňujú v procese dopĺňania kreditu na stravovanie. Implementácia tejto funkcie adresuje potrebu efektívnej distribúcie organizačných pokynov širšiemu spektru študentov, vrátane tých, ktorí neovládajú štátny jazyk, a nevedia o možnosti preložiť stránku cez prehliadač (Obrázok 4).



Obr. 4 Príklad článku na súčasnom webe
Zdroj: <https://www.ukf.sk/stravovanie/kredit-na-stravovanie-zamestnancov-a-studentov>

Z hľadiska administrácie je proces prekladu plne automatizovaný. Používateľovi s oprávnením správcu postačuje vložiť primárny text v slovenskom jazyku, a následné stlačenie tlačidla “Preložiť cez AI” iniciuje požiadavku na API. Systém v priebehu niekoľkých sekúnd vygeneruje a automaticky priradí preklady do anglickej, ukrajinskej a ruskej jazykovej mutácie. Existuje aj možnosť aktualizácie obsahu; systém dovoľuje opätovnú synchronizáciu cudzojazyčných verzií aj pri drobných redakčných úpravách už publikovaného článku v slovenčine, čím sa zlepšuje jednotnosť a správnosť informácií naprieč celou platformou (Obrázok 5).



Obr. 5 Preložený pomocou AI článok, ako ho vidí administrátor systému
Zdroj: autor

Technický proces prekladu a zachovania štruktúry článkov v systéme funguje na princípe sémantickej

integrity značkovacieho jazyka HTML v rámci už vytvoreného kontextu. Pri prenose dát z editora CKEditor do služby AiService sa text nečistí od formátovacích značiek, ale odosiela sa ako surový HTML reťazec priamo v tele JSON objektu. Tento prístup zabezpečuje vnímanie HTML tagov (ako napríklad , <a> alebo <h2>) nie ako prostý text, ale ako syntaktických konstant, ktoré tvoria štruktúru dokumentu.

V rámci metódy translateBatch je definovaný špecifický prompt, ktorý explicitne inštruuje model k zachovaniu všetkých HTML elementov. Keďže LLM modely súčasnej generácie sú trénované na programových kódoch, dokážu presne identifikovať hranice tagov a preložiť len ich textový obsah bez toho, aby narušili hierarchiu alebo uzatváranie značiek. Dáta putujú cez API rozhranie v asynchrónnom režime s vynúteným MIME typom application/json, čo zabezpečuje, že výsledný preklad sa vráti v štruktúrovanom formáte s kľúčmi pre anglický, ukrajinský a ruský jazyk, pričom v každej hodnote je zachovaná identická kódová stopa pôvodného slovenského originálu.

Vďaka vyššie uvedenému prenosu a využitiu kontextového okna modelu zostávajú odkazy a štylizácia textu na svojich presných miestach, pretože model spracováva článok ako jeden logický blok. Na strane frontendu vo Vue.js sa tieto preložené reťazce následne spätne injektujú do editora, čo eliminuje potrebu dodatočného manuálneho formátovania zo strany administrátora a zaručuje vizuálnu konzistenciu naprieč všetkými jazykovými mutáciami jedálneho lístka a oznamov.

Hoci je proces prekladu a zachovania formátovania plne automatizovaný, systém je navrhnutý s ohľadom na manuálnu kontrolu. Integrované rozhranie umožňuje administrátorovi po vygenerovaní prekladu okamžitú revíziu a úpravu výsledného obsahu priamo v editore. Táto funkcia je dôležitá pre jemné ladenie kontextu, aktualizáciu odkazov alebo napríklad selektívne odstraňovanie častí textu, ktoré v cudzojazyčných verziách nie sú relevantné. Používateľ tak získava spojenie rýchlosti umelej inteligencie a presnosti ľudského dohľadu, čo zvyšuje mieru korektnosti publikovaných informácií.

3.2 Generovanie vizuálneho obsahu

Okrem spracovania textových informácií sa v ďalších etapách vývoja zameriavame na automatizovanú generáciu vizuálneho obsahu. Počas implementácie som identifikoval technologickú bariéru v podobe reštriktívnej politiky popredných poskytovateľov (napr. Google Imagen, ChatGPT atď.), ktorí aktuálne neponúkajú bezplatné úrovne prístupu pre generovanie obrazových dát v rámci vývojových prostredí.

Ako bezplatné riešenie som preto zvolil integráciu

Pollinations AI, ktorá poskytuje zadarmo rôzne staršie difúzne modely, ako napríklad FLUX Schnell, uvedený v auguste 2024. Pomocou toho môžeme efektívne otestovať vizuálnu relevanciu aj pri obmedzenom rozpočte. Aj keď v tom prípade špičková kvalita nebude zaručená, stále to umožňuje flexibilne generovať potrebné obrázky a prispôbovať štýl vygenerovaného obsahu realite jedálni na Slovensku. Generácia obrázku sa spustí iba vtedy, keď je uvedený názov jedla počas jeho pridávania alebo úpravy, a iba po stlačení príslušného tlačidla. Na rozdiel od jednoduchých riešení, ktoré ukladajú len odkazy na obrázky, náš systém pracuje s dátami bližšie: systém pred uložením overuje Content-Type v HTTP a kontroluje hlavičku odpovede (image/), čím predchádza uloženiu chybných textových správ namiesto obrázka.

Ďalej sa využíva integrácia s existujúcim v API Laravel Illuminate\Support\Facades\Storage, kde sa vygenerovaný obsah ukladá pod unikátnym názvom (slug názvu jedla a časová pečiatka). To zabezpečuje unikátnosť dát, a všetky obrázky sa ukladajú v priečinku storage nášho projektu.

Každopádne, v systéme bola vytvorená aj možnosť manuálneho pridávania obrázkov administrátorom, v prípade ak skutočné fotografie sú k dispozícii.

Záver

Implementáciou navrhnutého systému sa podarilo vytvoriť modernú platformu, ktorá efektívne integrovala súčasné webové technológie s prvkami pokročilej umelej inteligencie. Práca sa zamerala na automatizáciu spracovania dát v prostredí univerzitnej jedálne UKF, čím prispela k objaveniu nových možností v transformácii univerzitných služieb. Využitím modelu Gemini sa dosiahla časová úspora na strane personálu, nakoľko administrátor je zbavený repetitívnych úloh spojených s manuálnym prekladom položiek či sémantickým dopĺňaním názvov. Použitie striktnej JSON schémy pri komunikácii s AI zabezpečilo jednotné formátovanie dát v databáze, čím sa eliminovala chybovosť ľudského faktora a zjednodušila sa následná integrácia s externými informačnými systémami univerzity. V neposlednom rade, vďaka implementácii mechanizmu "fallback" a modulárnemu návrhu služieb, sa podarilo vytvoriť architektúru pripravenú na budúci technologický vývoj v sfére AI. Navrhnuté riešenie predstavuje funkčný prototyp inteligentnej aplikácie modernej generácie.

Poďakovanie

Ďakujem Mgr. Márii Pappovej za odborné vedenie, cenné pripomienky a čas, ktorý mi venovala v priebehu vypracovania tohto článku.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] FUENTES-LUQUE, A. (2017). An approach to analysing the quality of menu translations in southern Spain restaurants. *Journal of Multilingual and Multicultural Development*, 38(2), 177–188. <https://doi.org/10.1080/01434632.2016.1187154>
- [2] WILCZEWSKI, M., & ALON, I. (2022). Language and communication in international students' adaptation: a bibliometric and content analysis review. *Higher Education*, 85, 1235 - 1256. <https://doi.org/10.1007/s10734-022-00888-8>.
- [3] SUBECZ, Z. (2021). Web-development with Laravel framework. *Gradus*. <https://doi.org/10.47833/2021.1.csc.006>.
- [4] GHEORGHE Comanici et al. (2025). Gemini 2.5: Pushing the Frontier with Advanced Reasoning, Multimodality, Long Context, and Next Generation Agentic Capabilities. *ArXiv*, abs/2507.06261.
- [5] GOOGLE, 2026. Understand and count tokens [online]. Dostupne na: <https://ai.google.dev/gemini-api/docs/tokens>

Deterministická heuristická inference cizích klíčů v polostrukturovaných datech

Deterministic Heuristic-Based Foreign Key Inference in Semi-Structured Data

Elvira Suchánková¹ – Martin Drlík²

^{1,2}Katedra informatiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹elvira.suchankova@student.ukf.sk, ²mdrlik@ukf.sk

Abstrakt

Automatizovaná inference schématu a vztahů je klíčová pro integraci heterogenních polostrukturovaných dat, kde strukturální závislosti nejsou explicitně deklarovány. Tento článek představuje deterministický dvoufázový rámec pro heuristickou inferenci cizích klíčů v datech ve formátu JSON v širším kontextu harmonizace schémat a integrace heterogenních dat.

První fáze aplikuje interpretovatelné heuristiky založené na pojmenovacích konvencích, typové kompatibilitě a strukturálních charakteristikách za účelem generování kandidátních vztahů. Druhá fáze provádí instanční validaci prostřednictvím analýzy hodnotového pokrytí mezi kandidátními atributy cizích klíčů a doménami primárních klíčů.

Výsledkem je, že navržený rámec upřednostňuje přesnost před úplností, což umožňuje bezpečné a reprodukovatelné nasazení v automatizovaných scénářích migrace z JSON do relačního modelu.

Klíčová slova: polostrukturovaná data, integrace heterogenních dat, harmonizace schémat, inference cizích klíčů, deterministická validace.

Abstract

Automated schema and relationship inference is essential for data integrations from heterogeneous sources, where possible structural dependencies are not explicitly declared. This paper presents a deterministic two-phase framework for heuristic-based foreign key inference in JSON-based data within the broader context of schema harmonization and heterogeneous data integration.

The first phase applies interpretable heuristics based on naming conventions, type compatibility, and structural cues to generate candidate relationships. The second phase performs instance-level validation by analyzing value coverage between candidate foreign key attributes and primary key domains.

The resulting framework prioritizes precision over recall, enabling safe and reproducible deployment in automated JSON-to-relational migration scenarios.

Key Words: semi-structured data, heterogeneous data integration, schema harmonization, foreign key inference, deterministic validation.

Úvod

Malé a střední podniky (SME) běžně provozují více nezávislých informačních systémů, včetně webových aplikací, účetních systémů, CRM nástrojů a specializovaných doménových řešení. Každý z těchto systémů produkuje data v odlišných strukturálních formách a serializačních formátech, jako jsou JSON, XML nebo CSV. Ačkoli tyto formáty zachycují syntaktickou strukturu, jen výjimečně explicitně deklarují relační sémantiku napříč systémy. Strukturální závislosti mezi entitami tak zůstávají implicitní a nejsou formálně vyjádřeny.

V praxi může být jedna obchodní událost, například zákaznická objednávka, současně zaznamenána na více místech: platforma elektronického obchodování, účetní systém nebo skladová databáze. Integrovaní mechanismy sice umožňují synchronizaci datových toků mezi systémy, avšak neurčují, jakým způsobem mají být entity a jejich vztahy rekonstruovány pro další analytické zpracování. Transformace heterogenních polostrukturovaných dat do relační reprezentace, vhodné pro reporting a rozhodovací podporu, tak zůstává sofistikovaným, převážně manuálním, časově náročným a chybově zatíženým procesem.

Tento problém je obzvláště výrazný v prostředích typu *data lake* a *schema-on-read*, kde jsou heterogenní datové zdroje ukládány bez předem definovaných relačních omezení [1]. Strukturální inference označuje automatizovaný proces odvozování datových typů, strukturálních vzorů a vzájemných vztahů přímo z obsahu dat, bez nutnosti předem definovaného schématu. Nástroje pro strukturální inferenci dokážou extrahovat datové typy a základní strukturální vzory

z polostrukturovaných dat [2, 3], zpravidla však neinferují sémantické vztahy, jako jsou cizí klíče. Bez spolehlivé inference vztahů zůstává automatizovaná migrace z JSON do relačního modelu i harmonizace schémat neúplná.

Problematika párování schémat a odhalování vztahů je dlouhodobě studována v oblasti *schema matching* a integrace dat [4, 5]. Nedávný rozvoj velkých jazykových modelů (LLM) přinesl nové přístupy využívající předem trénované jazykové reprezentace pro sémantické porovnávání schémat [6–8] a obecnější práci s datovými strukturami [9]. Tyto přístupy mohou zvyšovat schopnost zachytit sémantické podobnosti nad rámec čistě lexikální shody. Přímá aplikace LLM-založených metod na heterogenní surová data však vyvolává otázky determinismu, reprodukovatelnosti, interpretovatelnosti a správy dat (*data governance*). V produkčně orientovaných integračních pipeline, zejména v prostředí malých a středních podniků, musí být datová transformace a inference vztahů zcela transparentní, vysvětlitelná a reprodukovatelná. Proto deterministická strukturální inference představuje podstatný a nezbytný základ pro důvěryhodné analytické systémy.

Tento článek navrhuje a experimentálně vyhodnocuje deterministický dvoufázový rámec pro heuristickou inferenci schématu a vztahů v semi-strukturovaných datech ve formátu JSON. Přístup se zaměřuje na automatickou detekci cizích klíčů jako klíčovou součást rekonstrukce relačního schématu. V první fázi jsou pomocí interpretovatelných heuristik založených na pojmenovacích konvencích, typové kompatibilitě a strukturálních charakteristikách generovány kandidátní vztahy. Druhá fáze provádí instanční validaci prostřednictvím analýzy hodnotového pokrytí mezi kandidátními atributy cizích klíčů a doménami primárních klíčů.

Navržený rámec upřednostňuje přesnost před úplností, což umožňuje bezpečné a reprodukovatelné nasazení v automatizovaných scénářích migrace z JSON do relačního modelu.

1 Metodologie

Tato kapitola představuje navržený deterministický dvoufázový rámec pro inferenci schématu a vztahů ze semi-strukturovaných dat ve formátu JSON, včetně jeho formálního vymezení a algoritmické realizace.

1.1 Formální vymezení problému

Nechť

$$D = \{d_1, d_2, \dots, d_n\}$$

je kolekce JSON dokumentů reprezentujících heterogenní polostrukturovaná data.

Cílem je z této kolekce odvodit:

1. množinu entit

$$E = \{E_1, E_2, \dots, E_k\}$$

2. množinu vztahů (cizích klíčů)

$$R \subseteq A \times E$$

kde A je množina atributů všech entit.

Každý vztah je reprezentován jako čtveřice:

$$r = (E_{src}, a_{fk}, E_{tgt}, conf)$$

kde:

E_{src} je zdrojová entita, a_{fk} je kandidátní atribut cizího klíče, E_{tgt} je cílová entita, $conf$ je výsledné skóre důvěry.

Rámec je navržen jako deterministický: pro stejný vstup vždy produkuje stejný výstup.

1.2 Kanonická strukturální reprezentace

Před samotnou inferencí vztahů jsou JSON dokumenty převedeny do kanonické strukturální reprezentace (*Canonical Intermediate Representation, CIR*).

CIR agreguje normalizované názvy atributů, inferované datové typy, míru přítomnosti atributů, informaci o nulovatelosti (*nullable*) a vzorky hodnot pro instanční validaci.

Normalizace názvů zahrnuje například rozdělení CamelCase (např. PostID \rightarrow post_id), převod na malá písmena a sjednocení oddělovačů. Tento krok je klíčový pro zachování sémantických hranic názvů před jejich lexikálním porovnáváním.

1.3 Fáze 1 – Heuristické generování kandidátů

První fáze generuje kandidátní cizí klíče na základě deterministických heuristik aplikovaných na metadata atributů. Kandidátní atribut musí splňovat soubor strukturálních podmínek – konvenci pojmenování, kompatibilní datový typ a existenci odpovídající cílové entity. Protože názvy entit v reálných JSON datech bývají zkrácené nebo tvarově odlišné (např. cust místo customers), je součástí procesu také fuzzy párování entit, které tyto variace systematicky překlenuje.

Atribut je považován za kandidátní cizí klíč, pokud jeho název končí příponou `_id`, jeho datový typ je kompatibilní (integer nebo string) a zároveň existuje odpovídající cílová entita.

Funkce `match_entity()` zajišťuje fuzzy párování entit, přičemž podporuje přesnou shodu, shodu v čísle

(category \leftrightarrow categories) i zkrácené varianty názvů (cust \leftrightarrow customers). Minimální délka porovnávaného podřetězce je stanovena na 3 znaky.

Algoritmus 1: Generování kandidátních cizích klíčů

Vstup: Množina entit E s atributy a jejich metadata

Výstup: Množina kandidátních cizích klíčů C

1. Inicializuj $C \leftarrow \emptyset$
 2. Pro každou entitu $e_{src} \in E$:
 - Pro každý atribut $a \in e_{src}.attributes$:
 - Pokud název atributu nekončí příponou „_id“, pokračuj
 - $base_name \leftarrow normalize(a.name)$ bez přípony „_id“
 - $target \leftarrow match_entity(base_name, E)$
 - Pokud $target$ neexistuje nebo $target = e_{src}$, pokračuj
 - Pokud $a.type \notin \{int, string\}$, pokračuj
 - $conf \leftarrow 0.4$
 - Pokud $a.presence_ratio \geq 0.9$, $conf += 0.2$
 - Jinak pokud $a.presence_ratio \geq 0.6$, $conf += 0.1$
 - Pokud $a.type = int$, $conf += 0.2$
 - Pokud atribut není null, $conf += 0.1$
 - Pokud $conf \geq threshold$, přidej kandidátní vztah do C
 3. Vrať C
-

Proměnná $conf$ představuje skóre spolehlivosti kandidátního vztahu (*confidence*). Její výchozí hodnota 0,4 odpovídá základní shodě přípony `_id`. Přírůstky jsou kalibrovány empiricky: míra přítomnosti atributu $\geq 0,9$ přidává 0,2 (atribut se vyskytuje konzistentně), míra $\geq 0,6$ přidává 0,1, celočíselný datový typ přidává 0,2 (typický vzor pro identifikátory) a absence hodnot NULL přidává 0,1.

Tyto váhy nejsou odvozeny z publikované literatury, ale byly nastaveny empiricky na základě analýzy testovacích dat.

1.4 Fáze 2 – Instanční validace pomocí hodnotového pokrytí

Druhá fáze ověřuje kandidátní vztahy na základě skutečných hodnot atributů v datech.

Nechť: FK je množina hodnot kandidátního atributu, PK je množina hodnot primárního klíče cílové entity.

Definujeme pokrytí jako:

$$Coverage = \frac{|FK \cap PK|}{|FK|}$$

Uvedená metrika hodnotového pokrytí (*coverage*) kvantifikuje, do jaké míry jsou hodnoty kandidátního cizího klíče zastoupeny v doméně cílového primárního klíče. Tato míra je klíčová pro rozlišení skutečných

referenčních vztahů od náhodných shodných názvů atributů

Algoritmus 2: Validace kandidátních vztahů

Vstup: množina kandidátů C , dokumenty D

Výstup: množina validovaných vztahů V

1. Pro každou entitu $e \in E$ extrahuj množinu hodnot primárního klíče PK_e .
 2. Pro každý kandidátní vztah $fk \in C$:
 - a) Extrahuj množinu hodnot FK ze zdrojové entity.
 - b) Získej odpovídající množinu PK cílové entity.
 - c) Vypočítej hodnotové pokrytí dle definice uvedené výše.
 - d) Aktualizuj skóre důvěry podle hodnoty pokrytí.
 - e) Pokud aktualizované skóre překročí práh, přidej vztah do V .
 3. Vrať V .
-

Hodnota pokrytí 1,0 odpovídá plné referenční integritě, hodnota $\geq 0,95$ poskytuje velmi silný důkaz o existenci vztahu, hodnota $\geq 0,80$ je považována za akceptovatelný vztah a hodnota $< 0,60$ indikuje slabý nebo náhodný vztah. Tyto prahové hodnoty nejsou odvozeny z publikované literatury, ale byly stanoveny empiricky na základě analýzy testovacích dat autorkou práce.

Skóre kandidátního vztahu se aktualizuje na základě naměřeného hodnotového pokrytí: při pokrytí $\geq 0,95$ se skóre zvyšuje o 0,3, při pokrytí $\geq 0,80$ o 0,2 a při pokrytí $\geq 0,60$ o 0,1.

Pokud výsledné skóre překročí prahovou hodnotu, vztah je potvrzen.

1.5 Vlastnosti navrženého rámce

Navržený přístup tudíž je deterministický – nevyužívá žádnou náhodnost ani externí modely, interpretovatelný – každé skóre lze rozložit na dílčí signály, reprodukovatelný – stejné vstupy vždy vedou ke stejným výstupům, a konzervativní – záměrně upřednostňuje přesnost před úplností.

2 Experimentální vyhodnocení

Cílem experimentálního vyhodnocení bylo ověřit schopnost navrženého deterministického rámce správně inferovat cizí klíče v polostrukturovaných datech.

Evaluační byla provedena na několika synteticky vytvořených více tabulkových datových sadách, které byly navrženy tak, aby simulovaly realistické scénáře

datové heterogenity, nekonzistentního pojmenování a strukturálního šumu.

Použití kontrolovaně generovaných dat umožnilo přesné definování referenčních vztahů (*ground truth*), tj. předem známé množiny skutečných cizích klíčů, vůči níž byly výsledky algoritmu porovnávány.

Každá datová sada obsahuje více entit (5–6) s kontrolovaně zavedenými problémy datové heterogenity, jako jsou CamelCase pojmenování polí, zkrácené názvy entit, alternativní přípony nebo chybějící konvence `_id`. Tato konfigurace umožnila objektivní měření přesnosti a úplnosti.

Pro každou datovou sadu byly měřeny standardní evaluační metriky převzaté z oblasti strojového učení a informačního vyhledávání – Precision, Recall a F1-score, doplněné o doménově specifické hodnotové pokrytí definované v sekci 1.4:

- Přesnost

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$

- Úplnost

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

- F1-score

$$F1 = 2 \cdot \frac{Precision \cdot Recall}{Precision + Recall}$$

kde: *TP* = správně detekované vztahy, *FP* = chybně detekované vztahy, *FN* = nedetekované skutečné vztahy.

2.1 Popis datových sad

V experimentech jsou analyzovány struktury datových sad na úrovni atributů jednotlivých entit. Algoritmus identifikuje kandidátní klíče a potenciální vztahy mezi entitami na základě pojmenování atributů a následné validace jejich hodnot v datech. Samotné datové sady obsahují konkrétní záznamy, které slouží pro ověření těchto vztahů.

Datová sada 1: Messy E-commerce

Sada zahrnuje 6 entit a celkem 66 záznamů přičemž obsahuje 5 skutečných cizích klíčů. Kontrolovaně zavedené problémy zahrnují CamelCase pojmenování polí (např. OrderID), zkrácené názvy entit (`cust_id`), smíšené datové typy identifikátorů (string/integer) a také přítomnost NULL hodnot.

Datová sada 2: Messy Healthcare

Sada zahrnuje 5 entit, 50 záznamů a 4 skutečné cizí klíče. Testované problémy pokrývají pole s CamelCase

pojmenováním (např. PatientID), nekonzistentní formáty dat a alternativní přípony pro identifikátory (`_ref`, `_code`) – tyto přípony jsou záměrně mimo vzorek `_id`, který algoritmus v první fázi vyhledává.

Datová sada 3: Messy Social Network

Sada zahrnuje 5 entit, 50 záznamů a 4 skutečné cizí klíče. Kontrolovaně zavedené problémy zahrnují chybějící přípony `_id` (např. atribut `author` místo `author_id`), sémantické nesoulady mezi entitami (`follower_id` odkazuje na entitu `users`, nikoli `followers`) a řídká data. Tato sada testuje schopnost algoritmu identifikovat vztahy, kde konvence pojmenování nevyhovuje standardnímu vzoru.

2.2 Výsledky detekce vztahů

Tabulka 1 Výkon detekce cizího klíče

Sada	FK	Detect	Precision	Recall	F1 score
shop	5	3	100 %	60 %	75 %
health	4	2	100 %	50 %	67 %
social	4	1	100 %	25 %	40 %

Celkem bylo hodnoceno 13 skutečných vztahů.

Klíčová zjištění potvrzují konzervativní charakter navrženého rámce: celková přesnost dosáhla 100 %, což znamená, že nebyl detekován žádný falešně pozitivní vztah. Celkový recall dosáhl 46 %, přičemž variabilita hodnot recall napříč datovými sadami odpovídá míře strukturálního šumu v jednotlivých sadách.

2.3 Výsledky instanční validace

Tabulka 2 Hodnotové pokrytí validace

Vztah	Pokrytí
order_items.order_id → orders	100% - plná integrita
order_items.product_id → products	100% - plná integrita
visits.patient_id → patients	100% - plná integrita
visits.doctor_id → doctors	100% - plná integrita
comments.post_id → posts	100% - plná integrita
orders.cust_id → customers	75% - detekce NULL

Průměrné pokrytí: 95,8 %

To potvrzuje, že detekované vztahy mají vysokou instanční konzistenci.

2.4 Interpretace výsledků

Experimentální výsledky potvrzují základní designové rozhodnutí rámce: prioritu přesnosti před úplností, eliminaci falešně pozitivních vztahů a schopnost detekovat potenciální problémy referenční integrity prostřednictvím instanční validace.

Nedetekované vztahy byly způsobeny alternativními příponami identifikátorů (`_code`, `_ref`), sémantickými nesoulady názvů entit a absencí přípony `_id` u některých referenčních atributů.

Tyto případy představují jasně identifikované směry dalšího rozšíření.

3 Diskuse

Navržený rámec byl vyhodnocen na synteticky generovaných datových sadách s kontrolovanou heterogenitou. Tato sekce interpretuje dosažené výsledky, diskutuje návrhová rozhodnutí a vymezuje limity přístupu.

3.1 Precision-Recall kompromis

Experimentální výsledky ukazují 100 % precision při celkovém recall pouhých 46 %. Tento výsledek není náhodný, ale je důsledkem vědomého návrhového rozhodnutí upřednostnit přesnost před úplností, ale zároveň jej nelze považovat za překvapivý. Vysoká přesnost je mechanicky garantována samotnou strukturou algoritmu: vztah je potvrzen pouze tehdy, jsou-li současně splněny všechny podmínky (konvence přípony `_id`, kompatibilní datový typ, existence cílové entity a hodnotové pokrytí nad prahovou hodnotou). Na datech odpovídajících těmto předpokladům tento kumulativní filtr falešně pozitivní výsledky z definice vylučuje.

Je však třeba zdůraznit, že výsledky vycházejí výhradně z malých syntetických datových sad, jejichž struktura byla záměrně přizpůsobena pravidlům algoritmu. Zobecnitelnost na větší nebo reálné datové sady nebyla ověřena a představuje klíčové omezení tohoto výzkumu, protože v reálném prostředí mohou nastat podmínky, za nichž by ani kumulativní filtr nemusel spolehlivě eliminovat falešně pozitivní výsledky.

Přesto je preferování přesnosti před úplností v kontextu datového inženýrství odůvodněné. V produkčních scénářích jsou falešně pozitivní vztahy zpravidla výrazně nákladnější než vztahy nedetekované. Chybně inferovaný cizí klíč může vést k nesprávným JOIN operacím, duplicitám dat, zkeslení agregací nebo porušení referenční integrity v navazujících analytických vrstvách, a takové chyby se

dále propagují napříč ETL procesy, čímž ovlivňují kvalitu rozhodovacích výstupů.

Naopak nedetekovaný vztah obvykle nepředstavuje kritické riziko, protože může být následně identifikován manuální validací, doplněn doménovým expertem nebo odhalen dodatečnou analýzou datových profilů. Z tohoto důvodu rámec záměrně preferuje konzervativní chování v situacích, kdy není k dispozici dostatečně silný důkaz podporující existenci vztahu.

3.2 Analýza nedetekovaných vztahů

Nedetekované vztahy lze rozdělit do tří kategorií: alternativní přípony identifikátorů (`_code`, `_ref`), sémantické nesoulady v názvech entit (`follower_id` → `users`) a atributy bez přípony `_id` (`author`). Každá z těchto kategorií reprezentuje konkrétní rozšiřovací příležitost pro budoucí iterace algoritmu.

Tyto případy reprezentují strukturální limity současné heuristické strategie založené primárně na pojmenovacích konvencích a lexikálním párování entit. Současná implementace záměrně pracuje s restriktivním vzorovým filtrem, který minimalizuje riziko falešně pozitivních inferencí, avšak za cenu snížené úplnosti.

Identifikované kategorie nedetekovaných vztahů zároveň poskytují systematický základ pro další rozšíření algoritmu. Rozšíření o podporu alternativních přípon, pokročilejší sémantické párování entit či detekci implicitních identifikátorů bez explicitní `_id` konvence představuje přirozený směr dalšího výzkumu.

Získané experimentální poznatky tedy neukazují pouze omezení současné verze algoritmu, ale zároveň vymezují konkrétní výzkumné problémy, jejichž řešení může vést k překonání identifikovaných limitů bez narušení *precision-first* filozofie návrhu.

Zároveň potvrzují, že algoritmus provádí inferenci pouze na základě explicitně detekovaných strukturálních signálů a instanční validace, a vyhýbá se odvozování vztahů bez dostatečné podpory v datech.

3.3 Význam instanční validace

Průměrné hodnotové pokrytí 95,8 % potvrzuje, že detekované vztahy vykazují vysokou referenční konzistenci. Zvláště případ 75% pokrytí demonstrovuje další přínos druhé fáze – schopnost detekovat potenciální problémy referenční integrity.

Instanční validace tak neplní pouze roli potvrzení vztahu, ale i diagnostický nástroj kvality dat.

3.4 Postavení vůči LLM přístupům

Zatímco moderní přístupy využívající LLM a vektory (*embedding*) mohou zvyšovat recall díky zachycení sémantických podobností, přinášejí současně s tím vyšší výpočetní náročnost, nedeterminismus a omezenou interpretovatelnost.

Navržený deterministický rámec poskytuje stabilní, reprodukovatelný a plně vysvětlitelný mechanismus inference, který může být v budoucnu rozšířen o sémantickou vrstvu, aniž by došlo k narušení jeho transparentnosti. Zajímavou otázkou pro budoucí výzkum je, jak by mohl LLM přispět k překonání konkrétních omezení identifikovaných v sekci 3.2.

Lze uvažovat například o využití LLM pro rozpoznávání sémanticky ekvivalentních názvů entit (`follower_id` → `users`) nebo pro detekci referenčních atributů bez konvence `_id`. LLM by přitom mohl sloužit jako volitelný sémantický modul vyvolaný až tehdy, kdy deterministická první fáze nenajde kandidáta, čímž by bylo zachováno deterministické jádro pro standardní případy a sémantická síla LLM by se uplatnila jen tam, kde strukturální heuristiky nestačí.

Záver

Tento článek představil deterministický dvofázový rámec pro heuristickou inferenci schématu a vztahů v polostrukturovaných datech ve formátu JSON. Navržený přístup kombinuje pravidlovou detekci kandidátních cizích klíčů založenou na pojmenovacích konvencích a typové kompatibilitě s instanční validací prostřednictvím analýzy hodnotového pokrytí.

Experimentální vyhodnocení na datových sadách s kontrolovanou heterogenitou prokázalo dokonalou přesnost a střední úplnost. Výsledky potvrzují, že konzervativní a na důkazu založená strategie umožňuje eliminovat falešně pozitivní vztahy, které by mohly vést k chybám v následném analytickém zpracování. Současně instanční validace přispívá nejen k potvrzení správnosti detekovaných vztahů, ale i k identifikaci problémů referenční integrity v datech.

Kombinace interpretovatelných heuristik a deterministické hodnotové validace představuje stabilní, a hlavně reprodukovatelný základ pro automatizovanou migraci polostrukturovaných dat do relačního modelu. Přístup demonstruje, že i bez využití strojového učení lze dosáhnout vysoké spolehlivosti detekce vztahů při zachování plné transparentnosti rozhodovací logiky.

Z praktického hlediska může být navržený přístup využit v integračních vrstvách malých a středních podniků, při budování datových skladů i v

heterogenních integračních prostředích jako součást nástrojů pro automatizovanou harmonizaci schémat. Díky své jednoznačně definované rozhodovací logice je vhodný pro produkční nasazení v situacích, kde je klíčová kontrola nad kvalitou dat a dohledatelnost odvozených vztahů.

Další výzkum bude směřovat k systematickému rozšiřování heuristických mechanismů a validačních strategií v oblasti inference cizích klíčů, jednak k rozšíření modelu na inferenci inter-databázových vztahů a identifikaci entit napříč doménami. Cílem je postupně zvýšit úplnost detekce a rozšířit aplikační rozsah přístupu při zachování jeho deterministického a auditovatelného charakteru.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BOGATU, Alex, Alvaro A. A. FERNANDES, Norman W. PATON a Nikolaos KONSTANTINOOU. Dataset Discovery in Data Lakes. In: *2020 IEEE 36th International Conference on Data Engineering (ICDE)* [online]. 2020, s. 709–720 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.1109/ICDE48307.2020.00067
- [2] CHILLÓN, Alberto Hernández, Meike KLETTKE, Diego Sevilla RUIZ a Jesús García MOLINA. A Generic Schema Evolution Approach for NoSQL and Relational Databases. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering* [online]. 2024, 36(7), 2774–2789. ISSN 1041-4347, 1558-2191, 2326-3865. Dostupné z: doi:10.1109/TKDE.2024.3362273
- [3] VEINHARDT LATTÁK, Ivan a Pavel KOUPIL. A Comparative Analysis of JSON Schema Inference Algorithms: In: *17th International Conference on Evaluation of Novel Approaches to Software Engineering: Proceedings of the 17th International Conference on Evaluation of Novel Approaches to Software Engineering* [online]. Online Streaming, --- Select a Country ---: SCITEPRESS - Science and Technology Publications, 2022, s. 379–386 [vid. 2026-02-25]. ISBN 978-989-758-568-5. Dostupné z: doi:10.5220/0011046000003176
- [4] KOUTRAS, Christos, George SIACHAMIS, Andra IONESCU, Kyriakos PSARAKIS, Jerry BRONS, Marios FRAGKOULIS, Christoph LOFI, Angela BONIFATI a Asterios KATSIFODIMOS. *Valentine: Evaluating Matching Techniques for Dataset*

- Discovery* [online]. B.m.: arXiv. 13. únor 2021 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.2010.07386. arXiv:2010.07386 [cs]
- [5] CAPPUZZO, Riccardo, Paolo PAPOTTI a Saravanan THIRUMURUGANATHAN. Local Embeddings for Relational Data Integration. In: *Proceedings of the 2020 ACM SIGMOD International Conference on Management of Data* [online]. 2020, s. 1335–1349 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.1145/3318464.3389742
- [6] SHEETRIT, Eitam, Menachem BRIEF, Moshik MISHAELI a Oren ELISHA. *ReMatch: Retrieval Enhanced Schema Matching with LLMs* [online]. B.m.: arXiv. 30. květen 2024 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.2403.01567. arXiv:2403.01567 [cs]
- [7] ZHANG, Yunjia, Avriella FLORATOU, Joyce CAHOON, Subru KRISHNAN, Andreas C. MÜLLER, Dalitso BANDA, Fotis PSALLIDAS a Jignesh M. PATEL. Schema Matching using Pre-Trained Language Models. In: *2023 IEEE 39th International Conference on Data Engineering (ICDE): 2023 IEEE 39th International Conference on Data Engineering (ICDE)* [online]. Anaheim, CA, USA: IEEE, 2023, s. 1558–1571 [vid. 2026-02-25]. ISBN 979-8-3503-2227-9. Dostupné z: doi:10.1109/ICDE55515.2023.00123
- [8] WANG, Sha, Yuchen LI, Hanhua XIAO, Bing Tian DAI, Roy Ka-Wei LEE, Yanfei DONG a Lambert DENG. *LLMATCH: A Unified Schema Matching Framework with Large Language Models* [online]. B.m.: arXiv. 15. červenec 2025 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.2507.10897. arXiv:2507.10897 [cs]
- [9] NARAYAN, Avanika, Ines CHAMI, Laurel ORR, Simran ARORA a Christopher RÉ. *Can Foundation Models Wrangle Your Data?* [online]. B.m.: arXiv. 24. prosinec 2022 [vid. 2026-02-25]. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.2205.09911. arXiv:2205.09911 [cs]

Spracovanie modelu kocky PaperCube v softvéri GeoGebra

Processing of the PaperCube model in GeoGebra software

Zoran Trnka¹

¹Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ zoran.trnka@student.umb.sk

Abstrakt

Geometrické modelovanie je kľúčovou súčasťou vizualizácie dejov a telies. Približujú štruktúru prípadne priebeh akým je možné ich zhotoviť. V článku sa zaoberáme vytvorením dvoch modelov kocky. Budeme sa venovať simulovaniu procesov skladania pomocou softvéru GeoGebra.

V úvodnej časti uvedieme celkový význam tvorby modelov geometrických telies a ich efektívne používanie v rámci vyučovacieho procesu. Následne opíšeme proces modelovania a jeho prepojenie s počítačovými animáciami. Ďalšia časť je venovaná samotnej tvorbe modelov kocky. Spomenieme klasický model kocky a rozdiel medzi nami vybraným modelom. Uvedieme postup zhotovenia papierového modelu, ktorý nevyžaduje lepenie spojov a tvorbu appletu simulujúceho proces skladania.

Na záver analyzujeme a porovnávame výhody zhotovených modelov.

Kľúčové slová: geometrický model, 3D geometria, kocka, GeoGebra

Abstract

Geometric modeling is a key component of the visualization of processes and solids. They clarify the structure or the procedure by which they can be constructed. In this article, we deal with the creation of two cube models. We will focus on simulating the folding processes using the GeoGebra software.

In the introductory part, we present the overall significance of creating models of geometric solids and their effective use within the teaching process. Subsequently, we describe the modeling process and its connection to computer animations. The next part is dedicated to the creation of the cube models themselves. We mention the classical cube model and the difference between it and our selected model. We present the procedure for constructing a paper model that does not require gluing the joints, as well as the creation of an applet simulating the folding process.

In conclusion, we analyze and compare the advantages of the constructed models.

Key Words: geometric model, 3D Geometry, cube, GeoGebra

Úvod

Geometrické modely stereometrických telies vizualizujú ich stavbu. Papierový model kocky prepája plochý náčrt siete povrchu s objemom. Hlavnou prednosťou takéhoto modelu je jednoduchosť zhotovenia.

1 Vyučovanie geometrie

Geometria vo všeobecnosti umožňuje vytvoriť konštrukcie rôznymi spôsobmi. Stereometrické telesá majú plášť, resp. sieť tvorenú jednoduchými planimetrickými útvarmi ako sú napr.: trojuholník, štvorec, obdĺžnik a kruh. Ich usporiadanie v rozloženom stave má určitú variabilitu. Ako príklad uvedieme valec, ktorého plášť sa skladá z dvoch kruhov a obdĺžnika. Umiestnenie kruhov je možné zvoliť ľubovoľne oproti seba tak aby sa nachádzali na tej strane obdĺžnika, ktorá tvorí obvod valca.

1.1 Rozvoj priestorového vnímania

Prepojenie planimetrie a stereometrie v rámci vyučovacieho procesu umožňuje trénovať priestorovú predstavivosť a vnímanie.

„Priestorovou predstavivosťou rozumieme schopnosť predstavovať si vlastnosti geometrických trojrozmerných predmetov, ich tvar (podoba telies), polohu, veľkosť a umiestnenie v priestore“ [1]. Pri prezeraní reálnych objektov vzniká zrakový vnem. Ak si predmet prehmatávame zapájame aj hmatové vnímanie. Dôsledkom je proces vytvárania podnetov na zapamätávanie. Takéto kombinované činnosti rozvíjajú aj motorické zručnosti.

Tvorba siete stereometrických telies zapája predstavivosť. Teleso, ktorého sieť chceme vytvoriť

najprv rozložíme na steny, ktoré rozvineme do rovinatej plochy. Následným zložením sa zhotoví model telesa, čím sa overí správnosť postupu. „Sieť kocky vznikne rozložením stien kocky (jej plášťa) do roviny tak, aby po ich opätovnom zložení vznikla kocka. Steny kocky (zhodné štvorce) majú v sieti kocky spoločne niektoré celé strany“ [1]. Proces vytvárania modelov stručne popíšeme v nasledujúcej časti.

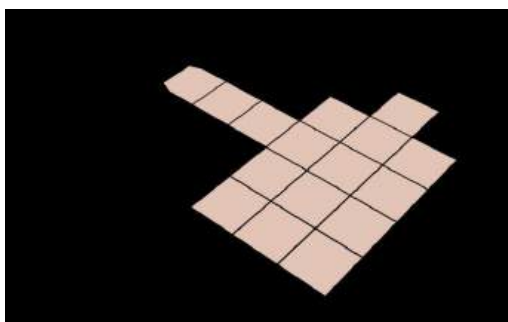
2 Modelovanie

„Pre rozvoj priestorovej predstavivosti je dôležitý vlastný zážitok a skúsenosť. Je preto nevyhnutné, aby žiak pracoval na hodinách geometrie s priestorovými objektmi a modeloval si priestorové situácie“ [2].

Pri modelovaní je dôležité zohľadniť do akej miery má vytvorený model zodpovedať realite. V rámci jednoduchých telies ako je napr. kocka je samotné modelovanie tvaru jednoduché. Pri vytváraní pohyblivého modelu, kde sa kocka skladá krok za krokom z rozloženej siete je proces zložitejší. Zvolili sme si namodelovať skladanie v rámci možností programu GeoGebra 5. Applet vytvorený v programe GeoGebra je celosvetovo populárnym doplnením vyučovacieho procesu. Táto popularita vychádza z univerzálnosti programu a jednoduchého ovládania, ktoré je pomerne intuitívne aj pre žiakov základnej školy. Hlavná výhoda programu spočíva v širokom spektre prednastavených funkcií a nástrojov, ktoré je možné dopĺňať.

2.1 Animácia PaperCube

Animácia PaperCube [2] je vizuálne komplexným znázorneným skladania. Rotácia siete v priestore umožňuje pohľad z viacerých strán.



Obr. 1: Obrázok z animácie PaperCube

```

Permission is granted to copy, modify, distribute, and sell this software and
its documentation for any purpose, in any medium, provided the above copyright
notice and this permission notice appear in supporting
documentation. No warranties are made about the suitability of the
software for any purpose, is provided, is without express or
implied warranty.

#define DEFAULTS *delay: 30000 *n* \
*count: 30 *n* \
*showFPS: false *n* \
*autoplay: false *n* \
*suppressRotationAnimation: true *n* \

#define release_cube #

#include "lockmore.h"
#include "gltrackball.h"
#include "rotator.h"

#ifdef USE_GL // while (1) {

#define DEF_SPIN "Y"
#define DEF_WANDER "True"
#define DEF_SPEED "1.0"

static char *ds_opts[] = {
{"spin", "spin", KrmotionNoArg, 0},
{"spn", "spn", KrmotionNoArg, 0},
{"speed", "speed", KrmotionNoArg, 0},
{"wander", "wander", KrmotionNoArg, "True"},
{"wander", "wander", KrmotionNoArg, "False"}
};

static argtype vars[] = {
{ds_opts, "spin", "Spin", DEF_SPIN, t_String},
{ds_opts, "wander", "Wander", DEF_WANDER, t_Boolean},
{ds_opts, "speed", "Speed", DEF_SPEED, t_Float},
};

ENTRYPOINT ModeSpecOpt cube_opts = { countOf(opts), opts,
countOf(vars), vars, NULL};

#define MAP_ROWS 6
#define MAP_COLUMNS 5
#define BOTTOM_FIELD_ROW 1
#define BOTTOM_FIELD_COLUMN 1
#define PRESERVED_HEIGHT_TO_WIDTH 1.0
#define SUN_DURATION 2.0
#define FOLD_DURATION 1.0
#define PAUSE_DURATION 1.0
#define SPIN_DURATION 3.0
#define SPIN_RPS 1.0

#define PICTURE_SQUARE_COUNT 8
#define PICTURE_SQUARE_SIZE 30
#define PICTURE_LINE_WIDTH 2
#define PICTURE_BORDER_WIDTH 2

```

Obr. 2: Ukážka kódu PaperCube

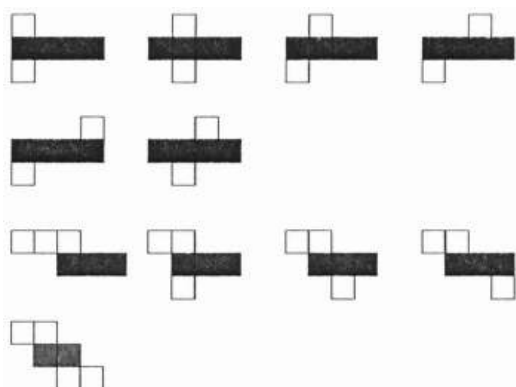
3 Vytváranie modelu

V rámci práce je naše zameranie vytvorenie appletu, ktorý vizualizuje reálne skladanie modelu kocky. Pred tvorbou samotného appletu sme sa rozhodli najskôr zhotoviť papierový model. Umožňoval rotovanie v priestore a opakovanie krokov skladania prípadne rozkladania, čo bolo významné pri vytváraní appletu. Zvolená sieť umožňuje opakované zloženie a rozloženie bez lepených spojov. Po zhotovení reálnej papierovej predlohy nasledovalo vytvorenie appletu, ktorý simuluje skladanie krok za krokom.

3.1 Vytvorenie papierového modelu

Papierový model siete kocky demonštruje vytváranie priestorového telesa skladaním listu papiera.

V prípade klasickej skladačky je kocka tvorená šiestimi štvorcami, ktoré je možné rozmiestniť jedenástimi spôsobmi.

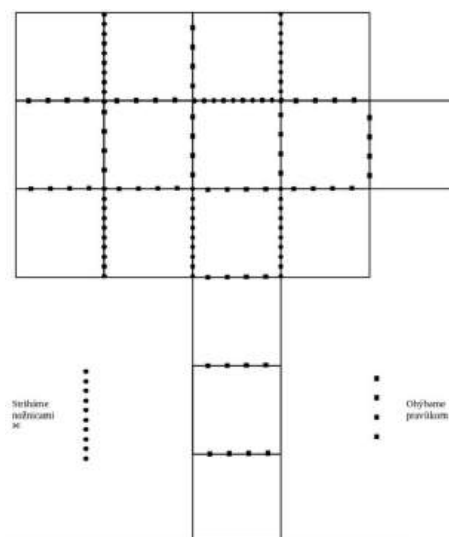


Obr. 3: Všetky rozloženia siete kocky. Zdroj: [4]

Nevýhoda spočíva v nutnosti fixovania zloženej polohy napr. zlepením hrán. Nami použitá papierová predloha sa od klasickej konštrukcie odlišuje tým, že po zložení drží tvar a je znovu rozložiteľná.

Teraz stručne popíšeme stavbu papierovej predlohy. Na začiatku si na papier rozvrhne kompozíciu rozloženej siete kocky a narysujeme jednotlivé štvorce.

Následne vystrihne sieť po vonkajšom obvode. potrebné strany štvorcov a ohýbame.



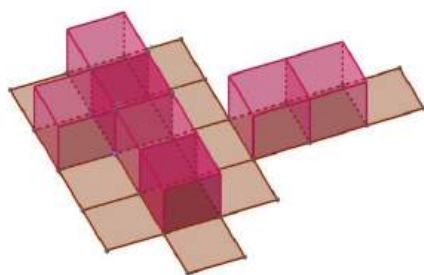
Obr. 4: Rozložená sieť papierového modelu



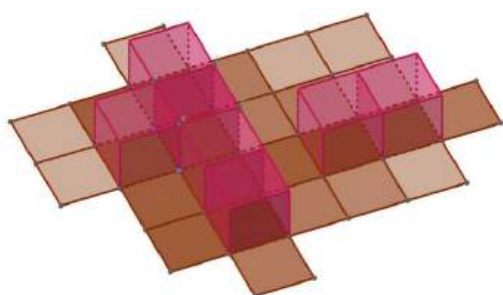
Obr. 5: Hotový papierový model

3.2 Vytvorenie appletu

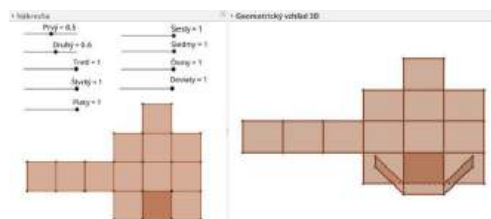
Zostrojenie appletu siete kocky, ktorá vyzerá rovnako ako sieť papierového modelu začalo konštrukciou pomocných kociek. Každá kocka sa doplnila sieťou. Rozmiestňovanie kociek nasledovalo v poradí skladania. Nasledujúca kocka, umiestnená na sieť predchádzajúcej kocky, sa počas skladania pohybovala spolu so sieťou. Po zhotovení všetkých pomocných objektov sa prebytočné objekty skryli. Výsledkom je konštrukcia, ktorá pozostáva z deviatich krokov ovládaných posuvníkmi. Applet je dostupný na stránke [5].



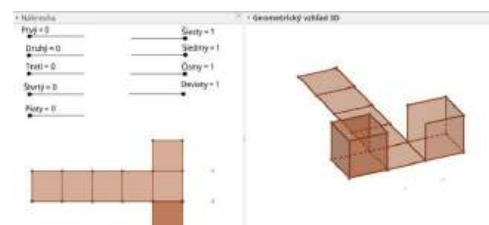
Obr. 6: Pomocné kocky



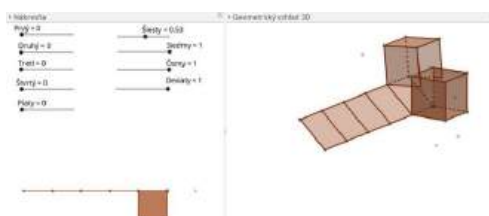
Obr. 7: Siete pomocných kociek



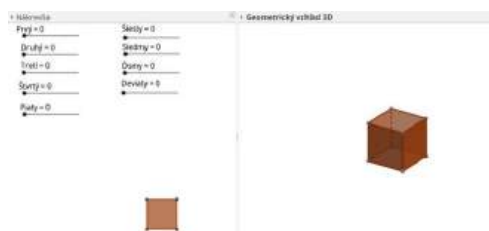
Obr. 8: Proces skladania 2. krok



Obr. 9: Proces skladania 5. krok



Obr. 10: Proces skladania 6. krok



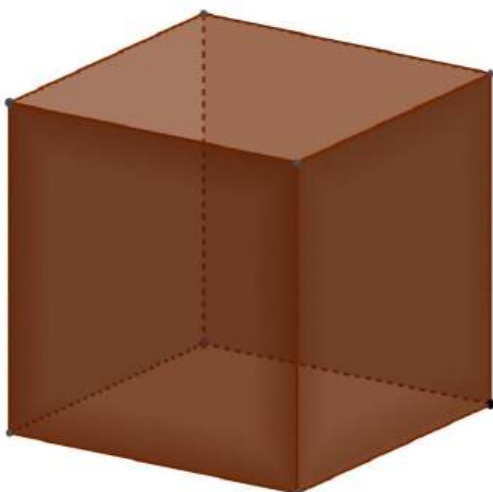
Obr. 11: Proces skladania 9. krok

Záver

Vytvorený papierový model kocky, ktorý slúžil ako základ pri tvorbe appletu, sa ukázal ako vhodný geometrický objekt. Applet simuluje krok za krokom proces skladania.

Možnosti tvorby podobných modelov zahŕňajú použitie ďalšieho softvéru prípadne programovacieho jazyka ako napr. C v ktorom bola napísaná animácia PaperCube. V rámci vyučovania sa takýmto spôsobom rozšíri aplikácia modelu o napr. definovanie matíc rotácie a podmienok pre ukončenie kroku skladania.

Ciele, stanovené na začiatku, boli splnené. Vytvorený papierový model vizualizuje proces skladania a zapája tvorivé schopnosti. Nákresňa a 3D okno appletu zobrazujú priestorové zmeny počas vykonávania krokov skladania.



Obr. 12: Kompletná kocka

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] Šedivý, O., STEREOMETRIA Umenie vidieť a predstavovať si priestor. 1. vyd. Nitra: FPV UKF v Nitre, 2007. 106 s. [Online] [05.02.2026]
https://www.geometriatelies.km.fpv.ukf.sk/zbornik/2_Vallo.pdf
- [2] Vavrinčíková, B., Rozvíjanie priestorovej predstavivosti pomocou modelovania telies. Prešov 2014. 40 s. [online] [05.02.2026]
- [3] Zawinski, J., Xscreensaver [online] [30.01.2026]
<https://www.jwz.org/xscreensaver/download.html>
- [4] Palenčárová, D., Parametre vplývajúce na obtiažnosť kombinatorických úloh 2013 [online] [20.02.2026] <http://dml.cz/dmlcz/149482>
- [5] Trnka, Z., Model skladania siete papierovej kocky 2026 [online] [28.02.2026]
<https://www.geogebra.org/m/shdhtvjz>

Zovšeobecnenia vybraných reálnych integrálov metódami komplexnej analýzy

Generalizations of selected real integrals using methods of complex analysis

Martin Vajs¹,

Školiteľ: Roman Hric²

^{1,2}Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹martin.vajs@student.umb.sk, ²roman.hric@umb.sk

Abstrakt

Zámerom tejto práce je odvodiť hodnoty, respektíve predpisy pre hodnoty vybraných určitých integrálov a niektorých ich zovšeobecnení. V tejto práci vychádzame najmä z metód komplexnej analýzy, konkrétne z teórie rezíduí, pričom tieto doplníme metódami reálnej analýzy, elementárneho integrálneho počtu a kombinatoriky.

Uvádžame zovšeobecnenie integrálu vedúceho na funkciu arkustangens a skúmame niektoré možnosti zovšeobecnení Dirichletovho integrálu.

Pri odvodzovaní výsledkov skúmame vplyv zmeny parametrov integrandu jednak na konvergenciu požadovaného integrálu, ale aj na jeho hodnotu.

Všetky získané výsledky overujeme numerickými metódami výpočtov určitých integrálov a uvádzame ilustračné príklady, ktoré demonštrujú, ako získané predpisy možno aplikovať na konkrétny prípad.

Kľúčové slová: určitý integrál, meromorfnosť, rezíduum, Cauchyho veta o rezíduách

Abstract

The aim of this work is to derive the values or the formulae for values of selected definite integrals and some of their generalizations. We base our approach mainly on the methods of complex analysis,

specifically on the theory of residues, and we complement these methods by methods of real analysis, elementary integral calculus and combinatorics.

We present a generalization of the integral resulting in the inverse tangent function and we explore some of the possible options for generalizations of the Dirichlet integral.

All of the results were verified using numerical methods for solving definite integrals. Furthermore, we provide examples to demonstrate the usage of the derived results on a specific case.

Key words: definite integral, meromorphic function, residue, Cauchy's residue theorem

1 Teoretický základ

V tejto práci vychádzame zo základných poznatkov z oblasti komplexnej analýzy ([1, 2]).

Definícia 1. *Nech f je funkcia komplexnej premennej. Nech $\Omega \subseteq \mathbb{C}$ je oblasť—súvislá otvorená množina v komplexnej rovine. Funkciu f nazývame **holomorfnou** (komplexne diferencovateľnou) na oblasti Ω , pokiaľ v každom bode $z_0 \in \Omega$ a jeho okolí existuje derivácia funkcie f v zmysle*

$$f'(z_0) = \lim_{z \rightarrow z_0} \frac{f(z) - f(z_0)}{z - z_0} \quad (1)$$

Diferencovateľnosť funkcie komplexnej premennej predstavuje omnoho silnejšiu vlastnosť než diferencovateľnosť funkcie reálnej premennej. Pokiaľ je funkcia komplexnej premennej holomorfná na otvorenej množine, je na tejto množine aj analytická, teda v každom bode rozvinuteľná do Taylorovho radu s istým polomerom konvergencie. Jedným z dôležitých tvrdení o holomorfných funkciách je Cauchyho integrálna veta.

Tvrdenie 1. *Nech f je funkcia komplexnej premennej holomorfná na oblasti $\Omega \subseteq \mathbb{C}$, ktorá obsahuje jednoduchú uzavretú krivku K a jej vnútro. Potom*

$$\int_K f(z) dz = 0 \quad (2)$$

Pri odvodzovaní niektorých výsledkov využívame koncept blízky komplexnej diferencovateľnosti, v ktorom ide o funkcie s konkrétnym typom singularít.

Definícia 2. *Funkcia komplexnej premennej f , ktorá je holomorfná na (prstencovom) okolí bodu z_0 , má v z_0 singularitu typu **pól**, ak $\lim_{z \rightarrow z_0} |f(z)| = +\infty$.*

Definícia 3. *Nech $\Omega \subseteq \mathbb{C}$ je otvorená množina. Pokiaľ je f holomorfná na Ω s možnou výnimkou bodov, v ktorých má f izolované singularity typu pól, tak funkciu f nazývame **meromorfná** na Ω .*

Meromorfnosť funkcie f komplexnej premennej na oblasti dovoľuje vyjadriť f cez zovšeobecnenie Taylorovho radu, tzv. Laurentov rad v bode z_0

$$\sum_{n \in \mathbb{Z}} c_n (z - z_0)^n \quad (3)$$

Z tohoto možno odvodiť viacero fundamentálnych poznatkov o správaní sa takýchto funkcií. Pomocou Laurentovho radu meromorfné funkcie v bode z_0 , v ktorom má funkcia singularitu typu pól, možno definovať **rezíduum** funkcie ako koeficient tohoto radu s indexom c_{-1} . Pre získanie rezídua funkcie je vhodné použiť nasledujúce vyjadrenie.

Tvrdenie 2. *Nech f je funkcia komplexnej premennej, ktorá je meromorfná na oblasti $\Omega \subseteq \mathbb{C}$. Nech má*

f pól stupňa $m \in \mathbb{N}$ v bode $z_0 \in \Omega$. Potom rezíduum funkcie f v bode z_0 možno počítat ako

$$\operatorname{res}_{z=z_0} f(z) = \frac{1}{(m-1)!} \lim_{z \rightarrow z_0} [(z - z_0)^m f(z)]^{(m-1)} \quad (4)$$

kde $(z - z_0)^m f(z) = g(z)$ je funkcia holomorfná na oblasti Ω a $[g(z)]^{(m-1)}$ označuje jej deriváciu.

Krivkové integrály s meromorfnými integrandmi možno efektívne vyhodnotiť za pomoci Cauchyho vety o rezíduách (5), pričom pri riešeníach použijeme estimačnú lemu, tzv. ML-nerovnosť (6).

Tvrdenie 3. *Nech f je funkcia komplexnej premennej, ktorá je meromorfná na oblasti $\Omega \subseteq \mathbb{C}$. Nech K je krivka v komplexnej rovine, ktorá je jednoduchá, uzavretá, po častiach hladká a kladne orientovaná, pričom $K \subseteq \Omega$. Nech $z_1, z_2, \dots, z_n \in \Omega$ sú póly funkcie f ležiace vo vnútri krivky K . Pre krivkový integrál po krivke K potom platí*

$$\oint_K f(z) dz = 2\pi i \sum_{k=1}^n \operatorname{res}_{z=z_k} f(z) \quad (5)$$

Tvrdenie 4. *Nech f je spojitá funkcia komplexnej premennej. Nech K je krivka v komplexnej rovine. Potom modul hodnoty krivkového integrálu po krivke K môžeme zhora ohraničiť ako*

$$\left| \int_K f(z) dz \right| \leq ML \quad (6)$$

kde $M = \sup_{z \in K} |f(z)|$ označuje suprémum modulu funkcie f na uvedenej krivke a L označuje dĺžku krivky K v komplexnej rovine.

2 Integrál vedúci na $\arctan x$

Cyklometrická funkcia arkustangens (ozn. $\arctan z$) patrí medzi elementárne funkcie skúmané v oblasti matematickej analýzy. Ide o inverznú funkciu ku goniometrickej funkcii tangens.

Pre jej deriváciu je známy nasledujúci vzťah, pričom tento je platný pre komplexné čísla $z \neq \pm i$

$$\frac{d}{dz} \arctan z = \frac{1}{z^2 + 1} \quad (7)$$

2.1 Úvodné pozorovania

Zo vzťahu (7) vieme pre reálnu premennú x zapísať nasledujúci neurčitý integrál

$$\int \frac{1}{x^2 + 1} dx = \arctan x + c \quad (c \in \mathbb{R}) \quad (8)$$

Pre určitý integrál po celej reálnej osi získavame na základe Fundamentálnej vety diferenciálneho a integrálneho počtu hodnotu

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{x^2 + 1} dx = \arctan x \Big|_{-\infty}^{+\infty} = \pi \quad (9)$$

2.2 Jednoduché zovšeobecnenie

Za pomoci substitúcie možno odvodiť jednoduché, avšak praktické zovšeobecnenie tohoto výsledku.

Nech je teraz menovateľ integrandu tvaru $x^2 + a^2$ pre fixné kladné reálne číslo a . Neurčitý integrál možno vyjadriť v tvare

$$\int \frac{1}{x^2 + a^2} dx = \frac{1}{a} \arctan \left(\frac{x}{a} \right) + c \quad (c \in \mathbb{R}) \quad (10)$$

Pre určitý integrál po reálnej osi opäť dostávame vyjadrenie hodnoty, tentokrát závislé od a

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{x^2 + a^2} dx = \frac{1}{a} \arctan \left(\frac{x}{a} \right) \Big|_{-\infty}^{+\infty} = \frac{\pi}{a} \quad (11)$$

2.3 Umocnenie integrandu

Zmysluplné je zaoberať sa tým, čo sa deje, keď integrand umocníme na prirodzené číslo $n \geq 1$. Skúmame integrál tvaru

$$\int \frac{1}{(x^2 + a^2)^n} dx \quad (12)$$

Pre tento neurčitý integrál možno odvodiť rekurzívny vzťah na zníženie exponentu. Naším cieľom však bude ďalej zovšeobecniť vzťah v (11), teda určiť predpis pre hodnotu určitého integrálu v (13), kde $a \in \mathbb{R}^+$ je fixné kladné reálne číslo a $n \in \mathbb{N}$ je fixné prirodzené číslo.

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{(x^2 + a^2)^n} dx \quad (13)$$

Všimnime si, že pre $n = 1$ získavame prípad opísaný v (11). Prípad, kde $n = 1$ a zároveň $a = 1$, predstavuje východzí problém uvedený v (9). Na odvodenie vzťahu pre hodnotu integrálu v (13) využijeme teóriu rezíduí.

Funkciu v integrande rozšírime na funkciu komplexnej premennej. Nech f je funkcia komplexnej premennej. Pre fixné $a \in \mathbb{R}^+$ a $n \in \mathbb{N}$ definujeme predpis funkcie vzťahom

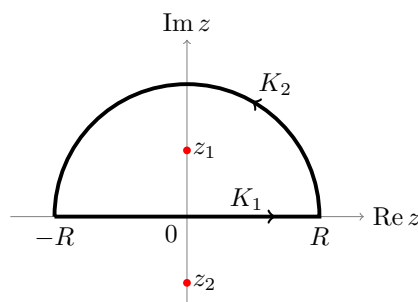
$$f(z) = \frac{1}{(z^2 + a^2)^n} \quad (14)$$

Najprv určíme kanonický rozklad polynomickej funkcie v menovateli nad komplexnými číslami

$$(z^2 + a^2)^n = (z - ia)^n (z + ia)^n \quad (15)$$

Komplexné čísla $z_1 = ia$, $z_2 = -ia$ predstavujú póly funkcie f , oba stupňa n . Pre použitie Cauchyho vety o rezíduách je potrebné zvoliť uzavretú krivku v komplexnej rovine, avšak pre naše potreby je dôležité istým spôsobom zahrnúť do tejto krivky reálnu os. Krivku K zvolíme ako na Obr. 1. Krivka je definovaná ako reálny interval $[-R, R]$ (ozn. K_1) a polkružnica v hornej polrovine komplexnej roviny s polomerom R (ozn. K_2), pričom R je kladné reálne číslo, ktoré je parametrom krivky.

Obr. 1: Polkruhová krivka s polomerom R



Využitím aditívnosti krivkového integrálu v komplexnej rovine môžeme pre integrál po krivke K písať vyjadrenie

$$\oint_K f(z) dz = \int_{K_1} f(z) dz + \int_{K_2} f(z) dz \quad (16)$$

Modul integrandu možno pre každé prirodzené číslo v exponente zhora ohraničiť ako

$$\left| \frac{1}{(z^2 + a^2)^n} \right| \leq \frac{2}{|z|^2} \quad (\text{pre } n \geq 1) \quad (17)$$

pre dostatočne veľké $|z| = R$. Použitím estimačnej lemy z tohoto vyplýva, že hodnota integrálu po polkružnici K_2 ide k nule pre $R \rightarrow +\infty$. Príspevok po krivke K_1 môžeme v tomto istom limitnom prípade stotožniť s požadovaným integrálom uvedeným v (13).

Vo vnútri krivky K sa nachádza iba bod z_1 . Určíme rezíduum funkcie f v tomto bode. Vychádzame zo vzťahu pre rezíduum meromorfnjej funkcie pre singularitu príslušného typu. Po zjednodušení dostaneme

$$\text{res}_{z=z_1} f(z) = \frac{1}{(n-1)!} \lim_{z \rightarrow ia} \frac{d^{n-1}}{dz^{n-1}} \frac{1}{(z+ia)^n} \quad (18)$$

Predpis pre uvedení deriváciu určíme opakovaným derivovaním. Proces je ilustrovaný v Tab. 1. Predpis pre požadovanú deriváciu je

$$\frac{d^{n-1}}{dz^{n-1}} (z+ia)^{-n} = \frac{(-1)^{n-1} K(n)}{(z+ia)^{2n-1}} \quad (19)$$

Vo vzťahu (19) sme pre jednoduchosť použili pre konštantu závislú od n označenie

$$K(n) = \prod_{k=1}^{n-1} (n+k-1) \quad (20)$$

Konštanta $K(n)$ sa vyskytla pri opakovanom derivovaní a zrejme ide o súčin prirodzených čísel. Tento súčin môžeme zapísať vo forme rastúceho faktoriálu, definovaného pre prirodzené čísla m, n ako

$$\begin{aligned} m^{\overline{n}} &= \underbrace{m(m+1)(m+2) \dots (m+n-1)}_{n \text{ členov}} \\ &= \prod_{k=1}^n (m+k-1) \end{aligned} \quad (21)$$

Z uvedeného môžeme hodnotu rezídua v bode z_1 zapísať ako

$$\text{res}_{z=z_1} f(z) = \frac{(-1)^{n-1} n^{\overline{n-1}}}{(n-1)! (2ia)^{2n-1}} \quad (22)$$

Výsledok možno zjednodušiť spojením všetkých členov s faktoriálmi v našom výsledku do jedného binomického koeficientu. Vychádzame zo vzťahu

$$\frac{m^{\overline{n}}}{n!} = \binom{m+n-1}{n} \quad (23)$$

Tabuľka 1: Proces opakovaného derivovania

Predpis	Všeobecné vyjadrenie
$\left[\frac{1}{(z+ia)^n} \right]'$	$\frac{-n}{(z+ia)^{n+1}}$
$\left[\frac{1}{(z+ia)^n} \right]''$	$\frac{-n(-n-1)}{(z+ia)^{n+2}}$
$\left[\frac{1}{(z+ia)^n} \right]'''$	$\frac{-n(-n-1)(-n-2)}{(z+ia)^{n+3}}$
$\left[\frac{1}{(z+ia)^n} \right]^{(m)}$	$\frac{(-1)^m}{(z+ia)^{n+m}} \prod_{k=1}^m (n+k-1)$
$\left[\frac{1}{(z+ia)^n} \right]^{(n-1)}$	$\frac{(-1)^{n-1}}{(z+ia)^{2n-1}} \prod_{k=1}^{n-1} (n+k-1)$

Využitím vzťahu (23) a úpravou zostávajúcej časti menovateľa v (22) po viacerých úpravách získavame

$$\text{res}_{z=z_1} f(z) = \frac{-i}{2^{2n-1} a^{2n-1}} \binom{2n-2}{n-1} \quad (24)$$

Použitím Cauchyho vety o rezíduách môžeme určiť hodnotu krivkového integrálu po krivke K ako

$$\oint_K f(z) dz = \frac{\pi}{4^{n-1} a^{2n-1}} \binom{2n-2}{n-1} \quad (25)$$

Hodnota krivkového integrálu po K zodpovedá integrálu po krivke K_1 a v prípade pre $R \rightarrow +\infty$ aj požadovanému integrálu v (13).

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{(x^2 + a^2)^n} dx = \frac{\pi}{4^{n-1} a^{2n-1}} \binom{2n-2}{n-1} \quad (26)$$

Napokon uvádzame ilustračné príklady použitia tohoto vzťahu. Napríklad pre $a = 1$ a $n = 5$ alebo pre $a = \sqrt{2}$ a $n = 4$ získavame

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{(x^2 + 1)^5} dx = \frac{35}{128} \pi \approx 0.86 \quad (27)$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{(x^2 + 2)^4} dx = \frac{5\sqrt{2}}{256} \pi \approx 0.09 \quad (28)$$

2.4 Závěrečné pozorovania

Tento vzťah sme overili mimo iného aj numerickými metódami výpočtu určitých integrálov. Po preskúmaní správania sa funkcie v integrande zisťujeme, že s rastúcim a hodnota integrálu veľmi prudko klesá k nule.

Zaujímavé je podotknúť, že binomický koeficient vo výsledku je tzv. centrálny binomický koeficient, ide o hodnoty nachádzajúce sa v strednom stĺpci Pascalovho trojuholníka. Hodnota tohoto binomického koeficientu sa s rastúcim n prudko zvyšuje, avšak nárast parametru a má omnoho väčší vplyv na výslednú hodnotu tohoto integrálu.

3 Integrál funkcie $\sin x / x$

Nech f je funkcia reálnej premennej s predpisom $f(x) = \sin x / x$. Určitý integrál po celej reálnej osi, prípadne jej kladnej časti, možno v literatúre nájsť pod názvom Dirichletov integrál. Hodnota týchto určitých integrálov je známa, ide o

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x} dx = \frac{\pi}{2} \quad (29)$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\sin x}{x} dx = \pi \quad (30)$$

Prípad uvedený v (30) je dvojnásobkom hodnoty v (29), keďže ide o párnú funkciu a integrál je po symetrickom intervale.

Na tejto situácii je zaujímavé to, že odvodiť hodnotu týchto dvoch integrálov vôbec nie je triviálne. Problémom je, že funkcia $\sin x / x$ nemá antideriváciu vyjadriteľnú v podobe elementárnej funkcie.

Nájsť riešenie tohoto problému je možné za pomoci viacerých pokročilých metód matematickej analýzy, konkrétne v oblasti reálnej analýzy sa zdá byť vhodné použiť Laplaceovu transformáciu. My však ukážeme riešenie z oblasti komplexnej analýzy, opäť za pomoci Cauchyho vety o rezíduách.

3.1 Odvodenie vzťahu v (29)

Funkciu komplexnej premennej definujeme za pomoci exponenciálnej funkcie e^{iz} . Využívame fakt, že kom-

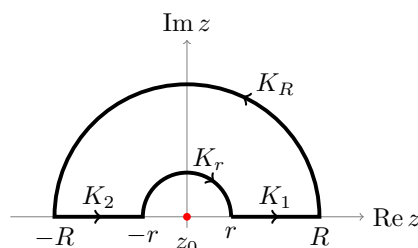
plexná exponenciálna funkcia v sebe zahŕňa funkcie $\sin z$ a $\cos z$. Nech f je funkcia komplexnej premennej daná predpisom

$$f(z) = \frac{e^{iz}}{z} \quad (31)$$

Funkcia f je analytická na $\mathbb{C} \setminus \{0\}$. Bod $z_0 = 0$ je jednoduchým pólom funkcie f . Z tohoto vyplýva, že f je meromorfnou funkciou na \mathbb{C} .

Zvolíme vhodnú krivku, ktorá ale nezahŕňa uvedenú singularitu. Dôvodom je, že veta o rezíduách má v predpokladoch, že žiadne singularity neležia na krivke.

Obr. 2: Polkruhovú krivku s výrezom



Uvedená krivka $K = K_1 \cup K_R \cup K_2 \cup K_r$ neobsahuje žiadnu singularitu a funkcia f je na tejto krivke holomorfná, teda podľa Cauchyho integrálnej vety je krivkový integrál z f rovný nule.

Sústredíme na najprv na integrály po krivkách K_1 a K_2 . Na týchto dvoch krivkách je vstupná premenná reálna, označme ju ako x . Dostávame

$$\int_{K_1 \cup K_2} f(z) dz = \int_r^R \frac{e^{ix}}{x} dx + \int_{-R}^{-r} \frac{e^{ix}}{x} dx \quad (32)$$

V druhom integráli na pravej strane rovnosti využijeme substitúciu $x \mapsto -x$, $dx \mapsto -dx$. Z komplexnej verzie definície funkcie $\sin z$ môžeme napokon odvodiť, že

$$\int_{K_1 \cup K_2} f(z) dz = 2i \int_r^R \frac{\sin x}{x} dx \quad (33)$$

Získavame, že pre $r \rightarrow 0^+$ a zároveň $R \rightarrow +\infty$ je integrál po krivke $K_1 \cup K_2$ rovný $(2i)$ -násobku

požadovaného integrálu. Krivky K_r a K_R parametrizujeme v súhlade s ich orientáciou, napríklad

$$K_r : \gamma_r(t) = r e^{i(\pi-t)} \quad (0 \leq t \leq \pi) \quad (34)$$

$$K_R : \gamma_R(t) = R e^{it} \quad (0 \leq t \leq \pi) \quad (35)$$

Teraz možno odvodiť vzťahy pre jednotlivé príspevky po K_r a K_R

$$\int_{K_r} f(z) dz = -i \int_0^\pi e^{ir} e^{i(\pi-t)} dt \quad (36)$$

$$\int_{K_R} f(z) dz = i \int_0^\pi e^{iR} e^{it} dt \quad (37)$$

Pre príspevok po menšom polkruhu K_r v prípade pre $r \rightarrow 0^+$ vychádzajúc z (36) získavame

$$\lim_{r \rightarrow 0^+} \int_{K_r} f(z) dz = -i\pi \quad (38)$$

Integrál po krivke K_R možno vo vyjadrení na pravej strane (37) zhora ohraničiť pomocou nerovnosti pre určitý integrál reálnej premennej

$$\begin{aligned} \left| i \int_0^\pi e^{iR} e^{it} dt \right| &\leq \int_0^\pi \underbrace{|e^{iR \cos t}|}_{=1} \underbrace{|e^{-R \sin t}|}_{\text{pre } t \in (0, \pi)} dt \\ &= \int_0^\pi e^{-R \sin t} dt \end{aligned} \quad (39)$$

V prípade pre $R \rightarrow +\infty$ z tohoto ohraničenia získavame, že príspevok po krivke K_R ide k nule

$$\lim_{R \rightarrow +\infty} \int_{K_R} f(z) dz = 0 \quad (40)$$

Zo všetkého uvedeného môžeme pre krivkový integrál po krivke K uzavrieť, že

$$\lim_{\substack{r \rightarrow 0^+ \\ R \rightarrow +\infty}} \oint_K f(z) dz = 2i \int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x} dx - i\pi \quad (41)$$

Všimnime si však, že sme určili, že integrál po krivke K má byť súčasne rovný nule. Z toho napokon získavame, že

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x} dx = \frac{\pi}{2} \quad (42)$$

3.2 Jednoduché zovšeobecnenie

Ďalej sa prirodzene naskytuje otázka, ako možno výsledok tohoto integrálu zovšeobecniť. Najprv skúsime jednoduché zovšeobecnenie, kde sa v čitateli nachádza funkcia $\sin(ax)$ pre fixné reálne číslo $a \neq 0$.

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin(ax)}{x} dx \quad (43)$$

Použijeme substitúciu $x \mapsto t/a$. S použitím predošlých poznatkov vieme pre $a > 0$ písať

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin(ax)}{x} dx = \int_0^{+\infty} \frac{\sin t}{t/a} \frac{dt}{a} = \frac{\pi}{2}$$

Pre $a < 0$ sa pri substitúcii zmenia hranice integrovania, čo spôsobí opačné znamienko výsledku. Nech $\operatorname{sgn} a$ označuje znamienkovú funkciu nenulovej konštanty a . Výsledok možno kompaktné zhrnúť ako

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin(ax)}{x} dx = \begin{cases} \frac{\pi}{2} \operatorname{sgn} a & (a \neq 0) \\ 0 & (a = 0) \end{cases} \quad (44)$$

Hodnota integrálu v (43) teda závisí od toho, či je konštantá a kladná alebo záporná, toto je samozrejme viditeľné aj z nepárnosti funkcie sínus. Zaujímavé je podotknúť, že výsledok je rovnaký ako výsledok nášho východzieho problému v (42).

3.3 Umocnenie čitateľa

Pozrieme sa na verziu, kde je čitateľ umocnený na prirodzené číslo $n \geq 1$

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin^n(x)}{x} dx \quad (45)$$

Uvedený integrál je v zmysle riemannovskej integrovateľnosti divergentný pre párne n . Parita exponentu spôsobuje problém v konvergencii, ktorý možno prirovnať situácii, že harmonický rad diverguje, zatiaľ čo alternujúci harmonický rad konverguje. Zameriame sa na integrál tvaru

$$I = \int_0^{+\infty} \frac{\sin^{2m+1}(x)}{x} dx \quad (46)$$

kde $m \geq 1$ je prirodzené číslo. Podotkneme, že pre možné $m = 0$ získavame opäť východzí problém uvedený v (42).

Označme $S_n(x) = \sin^n(x)$. Pomocou komplexnej definície funkcie sínus a binomickej vety možno určiť zápis funkcie $S_n(x)$ ako lineárnu kombináciu funkcií, ktorej členy sú tvaru $a \sin(kx)$ pre nejaké $a \in \mathbb{C}$ a $k \in \mathbb{N}$. Po úpravách získavame

$$S_n(x) = \frac{1}{(2i)^n} \sum_{k=0}^n (-1)^k \binom{n}{k} e^{i(n-2k)x} \quad (47)$$

Pre požadovaný nepárny exponent $n = 2m + 1$ vieme tento vzťah v zjednodušiť na verziu bez komplexných čísel

$$\begin{aligned} S_{2m+1}(x) &= \sin^{2m+1} x \\ &= \frac{(-1)^m}{4^m} \sum_{k=0}^m (-1)^k \binom{2m+1}{k} \sin(Kx) \end{aligned} \quad (48)$$

kde $K = 2m + 1 - 2k$. Pre toto K platí nerovnosť $K \geq 1$ pre všetky $m \geq 1$ a $k \in \{0, 1, \dots, m\}$. Pre požadovaný integrál v (46) (ozn. I) vieme ďalej písať

$$\begin{aligned} I &= \frac{(-1)^m}{4^m} \sum_{k=0}^m (-1)^k \binom{2m+1}{k} \underbrace{\int_0^{+\infty} \frac{\sin(Kx)}{x} dx}_{\text{rovné } \pi/2 \text{ podľa (44)}} \\ &= \frac{\pi (-1)^m}{2^{2m+1}} \sum_{k=0}^m (-1)^k \binom{2m+1}{k} \end{aligned} \quad (49)$$

Pre striedavú sumu (ozn. σ) možno nájsť kompaktnější zápis. Pre binomicke koeficienty je známa rovnosť

$$\binom{n}{k} = \binom{n-1}{k} + \binom{n-1}{k-1} \quad (50)$$

Po dosadení $n = 2m + 1$, pre násobení obidvoch strán rovnosti faktorom $(-1)^k$ a ich spočítaní cez všetky k získavame po úprave vzťah

$$\sigma = \sum_{k=0}^m (-1)^k \binom{2m}{k} + \sum_{k=-1}^{m-1} (-1)^{k+1} \binom{2m}{k} \quad (51)$$

Pri problémovej situácii zodpovedajúcej $k = 0$ v rovnosti (50) využívame definíciu binomickeho ko-

eficientu pre takýto prípad, konkrétne $\binom{2m}{-1} = 0$. Nakoniec dospejeme k vyjadreniu

$$\begin{aligned} \sigma &= \sum_{k=0}^m (-1)^k \binom{2m}{k} - \sum_{k=0}^{m-1} (-1)^k \binom{2m}{k} \\ &= (-1)^m \binom{2m}{m} \end{aligned} \quad (52)$$

Všimnime si, že opäť ide o centrálny binomicke koeficient. Pre výsledok integrálu v (46) máme

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin^{2m+1} x}{x} dx = \frac{\pi}{2^{2m+1}} \binom{2m}{m} \quad (53)$$

Nakoniec uvádzame ilustráciu tohoto vzťahu. Pre $m = 1$ alebo $m = 2$ získavame hodnoty integrálov

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin^3 x}{x} dx = \frac{\pi}{2^3} \binom{2}{1} = \frac{\pi}{4} \approx 0.79 \quad (54)$$

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin^5 x}{x} dx = \frac{\pi}{2^{11}} \binom{10}{5} = \frac{3\pi}{16} \approx 0.59 \quad (55)$$

3.4 Umocnenie menovateľa

Teraz skúmame zovšeobecnenie, kde je menovateľ umocnený na reálne číslo p

$$J = \int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x^p} dx \quad (56)$$

Obor hodnôt p , pre ktoré integrál v (56) konverguje, dokážeme určiť z asymptotického správania funkcie $\sin x$. Ide o hodnoty $p \in (0, 2)$.

Nasledujúce odvodenie je postavené na [4]. Predstavuje zjednodušenie tohoto postupu s pridanými pozorovaniami a úpravami. Využijeme vhodnú reprezentáciu funkcie $1/x^p$. Nech f je funkcia reálnej premennej u s predpisom $f(u) = e^{-u}$. Mellinova transformácia tejto funkcie zodpovedá gama funkcii

$$(\mathcal{M}f)(p) = \int_0^{+\infty} e^{-u} u^{p-1} du = \Gamma(p) \quad (57)$$

Ďalej využijeme substitúciu $u \mapsto xt$, $du \mapsto x dt$. Premenná x tu vystupuje ako parameter, pričom z (56) volíme $x \in (0, +\infty)$.

$$\int_0^{+\infty} e^{-u} u^{p-1} du = x^p \int_0^{+\infty} e^{-xt} t^{p-1} dt \quad (58)$$

Z rovností v (57) a (58) vieme odvodiť reprezentáciu

$$\frac{1}{x^p} = \frac{1}{\Gamma(p)} \int_0^{+\infty} e^{-xt} t^{p-1} dt \quad (59)$$

Pre požadovaný integrál môžeme písať vyjadrenie

$$\begin{aligned} J &= \frac{1}{\Gamma(p)} \int_0^{+\infty} \sin x \int_0^{+\infty} e^{-xt} t^{p-1} dt dx \\ &= \frac{1}{\Gamma(p)} \int_0^{+\infty} t^{p-1} \underbrace{\int_0^{+\infty} e^{-xt} \sin x dx}_{\text{opakovane po častiach}} dt \\ &= \frac{1}{\Gamma(p)} \int_0^{+\infty} t^{p-1} \frac{1}{t^2 + 1} dt \end{aligned} \quad (60)$$

Integrál na konci (60) je konvergentný opäť pre $p \in (0, 2)$. Na kompaktejší zápis môžeme použiť vlastnosti gama a beta funkcie, pričom jedným z najjednoduchších zápisov elementárnymi funkciami je

$$\int_0^{+\infty} \frac{x^m}{x^n + 1} dx = \frac{\pi}{n \sin\left(\frac{m+1}{n}\right)} \quad (61)$$

kde $m, n \in \mathbb{N} : 0 < m + 1 < n$. V našom prípade teda možno pre výsledok požadovaného integrálu písať

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x^p} dx = \frac{\pi}{2 \sin\left(\frac{\pi}{2}p\right)\Gamma(p)} \quad (62)$$

Tiež uvádzame ilustráciu uvedeného vzťahu. Pre $p = 1/2$ alebo $p = 3/2$ získavame hodnoty

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{\sqrt{x}} dx = \frac{\pi/2}{\sin\left(\frac{\pi}{4}\right)\Gamma\left(\frac{1}{2}\right)} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \approx 1.25 \quad (63)$$

$$\int_0^{+\infty} \frac{\sin x}{x^{\frac{3}{2}}} dx = \frac{\pi/2}{\sin\left(\frac{3\pi}{4}\right)\Gamma\left(\frac{3}{2}\right)} = \sqrt{2\pi} \approx 2.51 \quad (64)$$

3.5 Záverečné pozorovania

Pozorujeme, že pridávanie rôznych parametrov do integrandu vytvára mnohonásobne komplikovanejšie situácie než náš východzí problém. Aj malé zmeny v integrande dokážu spôsobiť problémy v otázkach konvergencie.

Prirodzené by bolo ďalej hľadať zovšeobecnenie, kde by sme umocnili celý integrand na prirodzené číslo. Postup odvodenia vzťahu v (60) naznačuje možný prístup, pričom integrovanie po častiach sa značne skomplikuje a výsledný integrál je potrebné rozkladať metódou parciálnych zlomkov alebo použiť ďalšie metódy z oblasti komplexnej analýzy.

4 Záver

V tejto práci sme odvodili hodnoty niektorých určitých integrálov po reálnej osi a pokúsili sme sa popísať niektoré ich zovšeobecnenia. Metódy komplexnej analýzy—či už ide o krivkový integrál po krivke v komplexnej rovine alebo o komplexné vyjadrenia elementárnych funkcií sínus a kosínus—predstavujú silný nástroj na riešenie niektorých problémov v oblasti reálnej analýzy.

Zaujímavým zistením je tiež súvis mnohých týchto metód s oblasťou diskretnéj matematiky. Ide napríklad o vznik faktoriálov pri opakovanom derivovaní polynomickej funkcie, toto môžeme pozorovať napríklad aj priamo vo vzťahu pre výpočet rezídua meromorfných funkcií v póle stupňa m .

Taktiež je zaujímavé, že väčšina výsledkov odvodených v tejto práci naznačuje, že pri viacerých integráloch po reálnej osi alebo jej kladnej časti ide o nejaký kombinatoricky popisateľný násobok konštanty π .

Literatúra

- [1] Asmar N. H., Grafakos L. 2010. Complex Analysis with Applications. Springer
- [2] Bourchtein A., Bourchtein L. 2021. Complex Analysis. Springer
- [3] Orloff, J. 2018. Complex Variables with Applications. MIT OCW (<https://ocw.mit.edu>)
- [4] YouTube kanál Maths 505 (https://youtu.be/1LDiIf_BB-I)
- [5] Výpočtová služba WolframAlpha, numerické výpočty. (<https://www.wolframalpha.com>)

Efektívne spôsoby znižovania halucinácií v generatívnej umelej inteligencii

Effective ways to reduce hallucinations in generative artificial intelligence

Serhii Vielkin¹ - Jiří Pospíchal²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹vielkin1@ucm.sk, ²jiri.pospichal@ucm.sk

Abstrakt

Halucinácie v generatívnych modeloch, napr. veľké jazykové modely (ďalej LLM), predstavujú problém nepresnosti, keď model generuje na prvý pohľad správne, ale fakticky nepravdivé informácie. V článku poskytujeme prehľad najefektívnejších prístupov k znižovaniu halucinácií v LLM, vrátane techník ako RLHF (reinforcement learning z ľudskej spätnej väzby), jemné doladenie (fine-tuning) na overených dátach, zabezpečenie kontroly výstupu a zapojenie vonkajších znalostí cez retrieval-augmented generation (RAG). Práca prezentuje prehľad danej oblasti a diskutuje obmedzenia každého prístupu. Záver navrhuje kombinovaný prístup a využitie týchto metód v praxi pre zvýšenie spoľahlivosti aplikácií generatívnej Umelej Inteligencie (ďalej AI).

Kľúčové slová: halucinácie, LLM, RLHF, RAG, doladenie modelu

Abstract

Hallucinations in generative models as large language models (LLMs), represent an inaccuracy problem where the model generates information that appears correct at first glance but is in fact false. In this article, we provide an overview of the most effective approaches to reducing hallucinations in LLMs, including techniques such as RLHF (reinforcement learning from human feedback), fine-tuning on verified data, output control, and incorporating external knowledge through retrieval-augmented generation (RAG). We present research results and discuss the limitations of each approach. The conclusion proposes a combined approach and the practical application of these methods to increase the reliability of generative artificial intelligence (AI) applications.

Keywords: hallucinations, LLM, RLHF, RAG, model fine-tuning

Úvod

Halucinácie v LLM znamenajú prípady, keď model vygeneruje text, ktorý pôsobí plynule a konzistentne, ale obsahuje faktické chyby alebo neexistujúce informácie. Ide o významný problém najmä v kritických aplikáciách (zdravotníctvo, právo, žurnalistika), kde výsledky modelov musia byť spoľahlivé [1]. Halucinačné výstupy môžu vzniknúť buď chybným promptom (zle položená otázka) alebo vnútornými nedostatkami modelu (biasy v trénovacích dátach, nesprávne generalizovanie) [1].

Halucinácie v LLM môžu mať rôzne formy, ktoré sa vo všeobecnosti delia na vnútorné a vonkajšie halucinácie, ako aj faktické a sémantické halucinácie:

Vnútorná halucinácia sa týka vnútorných nezrovnalostí v generovanom texte, kde model protirečí sám seba [1].

Vonkajšia halucinácia vzniká, keď model vloží obsah, ktorý chýba vo vstupnom kontexte alebo

znalostiach reálneho sveta [1].

Faktická halucinácia predpokladá vytváranie tvrdení, ktoré sú v rozpore s overenými faktami [1].

Sémantická halucinácia vzniká, keď je generovaný text gramaticky správny, ale chýba mu logická súvislosť alebo relevancia k úlohe [1].

Cieľom tohto článku je prehľadne popísať a porovnať moderné techniky na redukciu halucinácií. Najskôr charakterizujeme problém, potom rozoberieme hlavné kategórie riešení: drobné doladenie modelu a RLHF, mechanizmy kontroly a verifikácie výstupu, využitie externých znalostí cez RAG a ďalšie prístupy (napr. prompt engineering, counter-training). V časti výsledky sumarizujeme, aké vplyvy tieto metódy zvyčajne prinášajú a diskutujeme obmedzenia prístupov. Záver naznačuje, ako tieto metódy zjednotiť v praxi.

1 Metódy znižovania halucinácií

Zníženie halucinácií v texte je kombináciou správneho nastavenia modelu, architektúry interakcie s ním a následného spracovania.

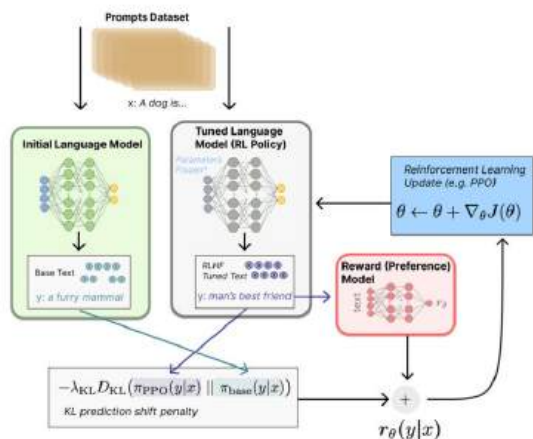
Hlavné stratégie:

- Architektonické a metodické prístupy
- Prompt engineering
- Kontrola a post-spracovanie
- Obmedzenie generovania
- Ľudská kontrola.

Existuje veľa spôsobov, ako znížiť počet halucinácií, a ďalej sa budeme podrobnejšie venovať tým najúčinnjším z nich, ako aj tomu, ako ich možno kombinovať a kedy je vhodné ich používať.

1.1 Posilňované učenie na základe spätnej väzby od ľudí (RLHF)

RLHF je proces, pri ktorom sa existujúci jazykový model (policy) doladí pomocou signálov preferencií od ľudských anotátorov. Model najprv vytvorí niekoľko verzií odpovedí na rôzne promptové vstupy, ktoré ľudia ohodnotia (vyberú lepšiu odpoveď). Tieto hodnotenia sa použijú na natrénovanie odmeňovacieho modelu, ktorý uprednostňuje výstupy bližšie k ľudským preferenciám. Nakoniec sa pôvodný model doladí pomocou metód Reinforcement Learning (napr. Proximal Policy Optimization) tak, aby maximalizoval skóre od odmeňovacieho modelu. RLHF prístup využili známe systémy ako ChatGPT [2]. V schematickom procese na obrázku 1 je znázornený mechanizmus RLHF, kde upravený model po tréningu generuje relevantnejšie a fakticky presnejšie odpovede.



Obr. 1 RLHF
Zdroj: [3]

Použitie RLHF preukázateľne znižuje počet halucinácií. Kalai a kol. (2025) uvádzajú, že RLHF spolu s podobnými metódami: učenie posilňovaním so spätnou väzbou od umelej inteligencie (RLAIF) či priama optimalizácia preferencií (DPO), potláča produkciu konšpiračných či nesprávnych tvrdení [2]. Dôvodom je, že RLHF cielene zlepšuje spoľahlivosť výstupu - model sa „naučí“ dávať prednosť pravdivým alebo overeným informáciám. Napr. aplikácia RLHF pri modeli ChatGPT výrazne zlepšila pravdivosť odpovedí. Nevýhodou RLHF je vysoká náročnosť na zbieranie kvalitných ľudských anotácií a potreba ďalšieho tréningu veľkého modelu [2, 1].

1.2 Doladenie modelu (fine-tuning)

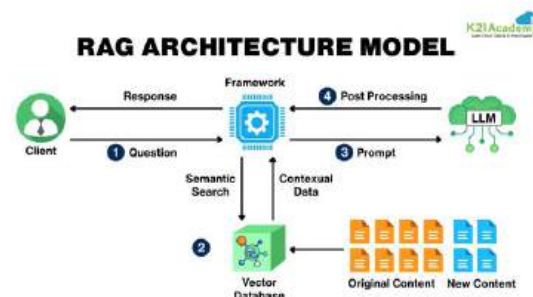
Drobné doladenie znamená ďalšie tréningové kroky LLM na špecializovaných dátach. Napríklad model možno dodatočne trénovať na overenom znalostnom korpuse alebo v konkrétnej doméne. Cieľom je posilniť správanie modelu, ktoré je fakticky konzistentné s novými dátami a potlačiť generovanie chybných informácií. Doladenie môže prebehnúť ako supervised fine-tuning (model sa učí z párov prompt-odpoveď) alebo aj s ľudskou spätnou väzbou (RLHF je v podstate špeciálny fine-tuning).

Ahadian a Guan (2025) upozorňujú, že fine-tuning je jednou z najpoužívanejších metód na obmedzenie halucinácií v generatívnych modeloch [1]. Zameraním na kvalitné a konzistentné tréningové dáta model lepšie zachytí správne vzory a faktické súvislosti. V experimentoch bolo demonštrované, že selektívne doladenie môže podstatne zlepšiť faktickú presnosť. Na druhej strane, Dang et al. (2024) zistili, že prvotné zníženie halucinácií po doladení môže časom opäť vzrásť, ak model začne „preplňovať“ nové znalosti nekompatibilným spôsobom [4]. Teda drobné doladenie treba robiť opatrne s dohľadom. Kalai a kol. tiež uvádzajú, že doladenie modelu často vyvoláva súťaž s pôvodným obsahom modelu (vyžaduje sa napr.

Kullback–Leibler (KL) penalizácia na zachovanie zmysluplnosti textu) [2].

1.3 Retrieval-augmented generation (RAG)

RAG prináša externé znalosti priamo do generatívneho procesu. Model pred generovaním odpovede najprv načíta relevantné úryvky textu z databázy faktov alebo dokumentov (retrieval) a generuje odpoveď s využitím týchto pasáží. Takto sa výstup modelu zakladá na skutočných dátach, čím sa dramaticky znižuje riziko dezinformácií. Príklad architektúry na obrázku 2. RAG sa oplatí implementovať najmä v doménach s bohatými vedomosťami (napr. liečebné postupy, právne texty).



Obr. 2 RAG
Zdroj: [5]

Viaceré štúdie potvrdili silný vplyv RAG na redukcii halucinácií. Napr. Shuster a kol. (2022) demonštrovali v otvorenom QA (otázky a odpovede), že použitie RAG znížilo množstvo faktických chýb vo výstupoch o viac ako 40 % [6]. To isté experimentálne potvrdili aj iní výskumníci. Napríklad Xu a kol. (2025) dokazujú, že ich metóda MEGA-RAG výrazne znižuje frekvenciu halucinácií [7]. Podobne Dang a kol. (2025) uvádzajú, že RAG dokáže efektívne potláčať vonkajšie halucinácie (t.j. vkladané fakty, ktoré nie sú založené na vstupnom kontexte) použitím overených externých zdrojov [4]. RAG teda patrí medzi najúčinnnejšie metódy - model v princípe dokáže „odcitovať“ zdroj vedomostí podobne ako sudca s pomocou úradníka, ktorý donáša právne precedentné prípady [7, 6]. Nevýhodou RAG je závislosť na kvalite znalostnej bázy - ak sú v nej nepresnosti alebo zastarané informácie, model ich môže nevedome reprodukovať [6]. Navyše vyhľadávanie útržkov môže spomaliť generovanie (nevhodné pre extrémne rýchle aplikácie). Naplnenie databázy tiež vyžaduje údržbu. Preto sa v praxi RAG kombinuje s vyhodnocovaním kvality načítaných textov (napr. Kontrastného učenia na filtrovanie spoľahlivých zdrojov).

1.4 Overenie a kontrola výstupu

Popri vylepšení samotného modelu je možné halucinácie obmedziť aj post-faktovou kontrolou odpovedí. Typicky ide o samostatný modul alebo proces, ktorý posudzuje generovaný text a overuje jeho zhody s faktami. Príkladom sú tzv. „AI strážcovia“ (AI

guardrails) a automatizované odôvodňovanie (automated reasoning) navrhnuté pri nasadzovaní generatívnych modelov v priemysle.

Napríklad Amazon Web Services (AWS) Guardrails umožňujú definovať logické pravidlá a formálne overovacie procedúry, ktoré overujú obsah modelu. Používanie matematických a logických overovacích algoritmov dokáže zachytiť protichodné alebo nepravdivé tvrdenia vo výstupe modelu [8]. Antje Barth (2024) opisuje automatizované overovanie výsledkov, ktoré „matematicky a logicky verifikuje“ generovaný obsah, aby bol konzistentný s existujúcimi faktami [8]. V praxi sa to uplatňuje napr. zrušením nepravdivých výstupov alebo úpravou promptu a opätovným generovaním. Ďalším prístupom je zapojenie druhého modelu na kontrolu pravdivosti – napr. špeciálny verifikačný model, ktorý klasifikuje odpoveď ako spoľahlivú či nedôveryhodnú, prípadne ju opraví. Tieto kontroly výrazne zvyšujú dôveru v systém, hoci často vyžadujú dodatočné zdroje (napr. ďalší model či znalostný graf) [1].

1.5 Ďalšie metódy

Medzi ďalšie postupy na znižovanie halucinácií patrí napríklad prompt engineering - tvorba kvalitných vstupných promptov a demonštrácií (few-shot). Známa je technika chain-of-thought, kde sa model vyzýva, aby odpovedal krok za krokom; Wei a kol. (2022) ukázali, že takáto štruktúrovaná výzva dokáže udržať model na relevantných úvahách a znížiť chyby [10]. Instruction tuning (tréning modelu na odpovedanie podľa jasných pokynov) má podobný efekt na konzistenciu faktov. Ďalšou kategóriou sú adversariálne a kontrastné metódy. Vytváranie ťažkých negatívnych príkladov (falošných odpovedí) počas tréningu núti model rozlišovať pravdivé od vymyslených faktov [4]. Napríklad kontrastné učenie trénuje model na súčasné porovnávanie korektných a zavádzajúcich odpovedí, čím sa model naučí preferovať fakticky konzistentné výstupy [9, 4]. Tieto metódy sú účinné, ale často náročné na vytvorenie vhodných dát.

2 Výsledky a diskusia

Výskumy ukazujú, že kombinácia niekoľkých metód prináša najlepšie výsledky pri eliminácii halucinácií. V experimente Shuster a kol. (2022), a rovnako aj v experimente Xu a kol. (2025) RAG preukázal redukciu faktických omylov vo výstupoch až o 40 % oproti neaugmentovanému modelu [6, 7]. Dodatočne, Kalai et al. (2025) zdôrazňujú, že RLHF a príbuzné techniky (RLAIF, DPO) významne potláčajú halucinácie, pričom model sa učí hodnotiť si pravdivosť cez ľudskú spätnú väzbu [2]. Naopak, čisté doladenie na nové údaje priniesie spočiatku pokles halucinácií, no bez starostlivého štiepenia znalostí môže nastať ich nárast [4].

Hlavné zistenia:

- RLHF a kontrolované doladenie modelu (SFT) vyžaduje ľudský dozor, ale výrazne zvyšuje spoľahlivosť generovaných odpovedí [2]. Umožňuje modelu prioritizovať pravdivé informácie.

- RAG - ukázalo sa ako mimoriadne účinné, model priam „citoval“ externé zdroje, čím eliminoval vymyslené fakty [6]. Nevýhodou je potreba spravovať kvalitnú bázu textov.

- Fine-tuning - dobre zvolené doladenie (SFT) zlepšuje špecifickú odbornosť modelu, ale vyžaduje sa opatrná integrácia nových dát (inak sú konflikty so základnou vedomosťou) [4].

- Kontrola výstupu - dodatočná validácia (napr. formálne odôvodnenie) poskytuje ručné aj automatizované filtre na nezrovnalosti [8]. Je to účinné v systémoch, kde je možná extra latencia.

Kombinácia viacerých prístupov prináša ďalšie benefity. Napríklad RLHF model doplnený o RAG a následne preverovaný špecializovaným modulom má minimálnu mieru chybných výstupov [9, 1].

To všetko naznačuje, že pri správnom používaní a kombinovaní týchto metód sa dá výrazne znížiť počet halucinácií.

Každý systém alebo architektúra je postavená na určitých predpokladoch, preto je dôležité aj pri kombinovaní rôznych prístupov pochopiť, prečo ich používate, aby ste správne zvolili základ.

Ak potrebujete vysoko kvalitnú a pravdivú odpoveď vo všeobecnom prípade, stojí za to použiť RLHF, pretože tento prístup umožňuje modelu zohľadniť ľudský dohľad a uprednostniť spoľahlivé informácie. Ak sú dôležité konkrétne zdroje a je potrebné, aby ich model mohol priamo „citovať“ ich, je lepšie použiť RAG, na to však potrebujete dobre organizovanú databázu textov. Ak je cieľom posilniť odbornosť modelu v úzkej oblasti, je vhodné fine-tuning, ale je dôležité starostlivo vyberať údaje, aby nedochádzalo ku konfliktom so základnými znalosťami. Nakoniec, ak existuje možnosť dodatočnej kontroly výsledkov, má zmysel použiť kontrolu výstupných údajov - tá umožňuje filtrovať chyby ručne alebo automaticky, hoci to pridáva oneskorenie.

Na základe uvedených poznatkov navrhujeme viacvrstvovú architektúru redukcie halucinácií v generatívnych systémoch, ktorá je založená na princípe postupnej eliminácie chýb na viacerých úrovniach spracovania informácií. Na rozdiel od použitia izolovaných techník (napr. výlučne RAG alebo výlučne RLHF) architektúra integruje viaceré komplementárne mechanizmy do jedného koherentného systému, v ktorom každá vrstva cielene redukuje konkrétny typ halucinácií.

Každý modul plní presne definovanú funkciu v procese generovania odpovede a spoločne vytvárajú viacúrovňový ochranný mechanizmus (defense-in-depth), ktorý minimalizuje riziko generovania

nepravdivých alebo zavádzajúcich informácií.

- Modul validácie vstupu: Zabezpečenie kvality a korektnosti vstupného dopytu pred samotným generovaním odpovede. Modul vykonáva detekciu logicky nekonzistentných alebo protirečivých otázok, identifikáciu neúplných, nejednoznačných alebo špecifikovaných vstupov, rozpoznávanie fakticky nesprávnych predpokladov vo vstupe, klasifikáciu typu dopytu (faktický, hypotetický, analytický, špekulatívny) a automatickú opravu nekvalitných promptov do štruktúrovanej a jednoznačnej podoby.
- Modul získavania znalostí (Retrieval – RAG): Funkciou modulu je zabezpečenie väzby generovania odpovede na reálne a overené externé zdroje znalostí, pričom modul vykonáva sémantické vyhľadávanie relevantných dokumentov pomocou vektorových reprezentácií, filtrovanie nekvalitných alebo nerelevantných zdrojov, hodnotenie dôveryhodnosti a aktuálnosti informácií, výber najrelevantnejších textových úryvkov a poskytovanie kontextových znalostí generatívnemu modelu.
- Modul generovania odpovede (LLM s RLHF): Funkciou modulu je kontrolovaná generácia odpovede s preferenciou faktickej presnosti a spoľahlivosti, pričom modul vykonáva generovanie odpovede na základe vstupného dopytu a dát, ktoré sme získali z vektorovej databázy, aplikáciu modelu doladeného pomocou RLHF, preferenciu overiteľných tvrdení pred špekulatívnymi, obmedzenie generovania v prípadoch nízkej miery istoty a adaptívne rozhodovanie medzi poskytnutím odpovede a odmietnutím odpovede.
- Modul verifikácie výstupu (Verification Model): Funkciou modulu je nezávislá kontrola správnosti generovaného výstupu, pričom modul vykonáva porovnávanie odpovede s zdrojmi ktoré sa nachádzajú v databáze, detekciu neoveriteľných alebo nepodložených tvrdení, identifikáciu faktických rozporov, klasifikáciu odpovede podľa miery dôveryhodnosti a hodnotenie zhody medzi odpoveďou a vstupným kontextom.
- Modul logickej konzistencie (Logical Consistency Check): Funkciou modulu je formálna kontrola logickej súdržnosti generovaného obsahu, pričom modul vykonáva detekciu vnútorných rozporov v texte, kontrolu časových a kauzálnych vzťahov, overovanie kompatibility tvrdení, identifikáciu logických paradoxov a nekonzistencií a aplikáciu pravidiel formálnej logiky a symbolického uvažovania.

- Modul filtrácie výstupu (Output Filtering): Funkciou modulu je kontrola kvality a bezpečnosti finálnej odpovede, pričom modul vykonáva hodnotenie rizika halucinácie (hallucination risk scoring), detekciu absencie zdrojového ukotvenia, označovanie odpovedí s nízkou mierou istoty, blokovanie alebo úpravu problematických výstupov a rozhodovanie o potrebe regenerácie odpovede.
- Modul spätnej väzby a regenerácie (Regeneration Loop): Funkciou modulu je automatická korekcia chýb prostredníctvom iteratívneho generovania odpovedí, pričom modul vykonáva opätovné generovanie odpovede pri detekcii chýb, úpravu vstupného promptu na základe chybovej analýzy, opakovanie procesu generovania s dodatočnými obmedzeniami a adaptívne zlepšovanie systému na základe predchádzajúcich zlyhaní.

Je nevyhnutné zohľadniť, že navrhovaná viacvrstvová architektúra výrazne zvyšuje výpočtovú náročnosť a latenciu generovania odpovedí, a preto je jej použitie opodstatnené výlučne v systémoch, kde je možné akceptovať predĺžený čas odozvy výmenou za výrazné zníženie rizika halucinácií, pričom jej nasadenie si vyžaduje dostupnosť dostatočných výpočtových zdrojov, kvalitnú znalostnú bázu, spoľahlivé verifikačné mechanizmy, vhodnú infraštruktúru na orchestráciu jednotlivých modulov a jasne definované kritériá vyhodnocovania kvality výstupov.

Záver

Halucinácie v generatívnej AI sú vážnym problémom, ale súčasný výskum prináša efektívne riešenia. Kombinácia doladenia modelu (SFT/RLHF) s RAG a kontrolou výstupu ukazuje najväčší prínos. RLHF a SFT prispôsobia model, aby si vážil ľudské fakty; RAG mu dáva priame prepojenie na reálne dáta; a kontroly výsledných odpovedí znižujú posledné riziko nesúladu. V praxi to znamená budovať systémy s viacerými vrstvami overenia: napríklad zdravotnícky asistent by najprv načítal relevantné lekárske štúdie (RAG), potom odpovedal modelom doladeným na klinické dáta (RLHF/SFT) a nakoniec odpoveď verifikoval voči znalostnému grafu.

Ďalšia výzva je zabezpečiť, aby tieto metódy boli škálovateľné a rýchle pre reálne aplikácie. To si vyžaduje napr. dynamické aktualizácie znalostí a automatizovanú tvorbu overovacích príkladov. Avšak už dnes vieme využiť kombináciu techník na dramatické zlepšenie spoľahlivosti AI. Ako prax rastie, nasadzovanie RAG pipelineov, RLHF protokolov a systémov kontrol (guardrails) sa stáva štandardom - čím generatívna AI postupne získava dôveryhodnosť v širšej škále odborov [6].

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] AHADIAN, P.; GUAN, Q., (2025). A Survey on Hallucination in Large Language and Foundation Models. Preprints (2025). Dostupné na: <https://www.preprints.org/manuscript/202504.1236/v1>
- [2] KALAI, A.T.; NACHUM, O.; VEMPALA, S. S.; ZHANG, E., (2025). Why Language Models Hallucinate. OpenAI – technická správa, 36 s. [online]. Dostupné na: <https://arxiv.org/abs/2509.04664>
- [3] MANIKANTH, G., (2024, March 10). *What is RLHF — Reinforcement Learning from Human Feedback*. Medium. [online]. Dostupné na: <https://manikanthgoud123.medium.com/what-is-rlhf-reinforcement-learning-from-human-feedback-d0ec88e0866c>
- [4] DANG, Anh-Hoang D.A.; TRAN, Vu T.V.; NGUYEN, Le-Minh, L.N., (2025). *Survey and analysis of hallucinations in large language models: attribution to prompting strategies or model behavior*. Frontiers in Artificial Intelligence, vol. 8, č. 1622292. [online]. Dostupné na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frai.2025.1622292>
- [5] VARABYO, (2025, December 23). *RAG — это главное. Почему специализированные LLM реже галлюцинируют*. Хабр. [online]. Dostupné na: <https://habr.com/ru/articles/977260/>
- [6] SHUSTER, K.; KOMEILI, M.; ADOLPHS, L.; ROLLER, S.; SZLAM, A.; WESTON, J., (2022). *Language Models that Seek for Knowledge: Modular Search & Generation for Dialogue and Prompt Completion*. In: *Findings of the Association for Computational Linguistics: EMNLP 2022*. Association for Computational Linguistics. DOI: 10.18653/v1/2022.findings-emnlp.27. [online]. Dostupné na: <https://aclanthology.org/2022.findings-emnlp.27>
- [7] XU, S.; YAN, Z.; DAI, C.; WU, F., (2025). *MEGA-RAG: a retrieval-augmented generation framework with multi-evidence guided answer refinement for mitigating hallucinations of LLMs in public health*. Frontiers in Public Health, 13, 1635381. [online]. Dostupné na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2025.1635381>
- [8] BARTH, A., (2024, December 3). *Prevent factual errors from LLM hallucinations with mathematically sound Automated Reasoning checks (preview)*. AWS News Blog. [online]. Dostupné na: <https://aws.amazon.com/blogs/aws/prevent-factual-errors-from-llm-hallucinations-with-mathematically-sound-automated-reasoning-checks-preview/>
- [9] PULKUNDWAR, P.; DHANAWADE, V.; YADAV, R.; SONKAR, M.; ASURLEKAR, M.; RATHOD, S., (2025). *A concise review of hallucinations in LLMs and their mitigation*. arXiv. [online]. Dostupné na: <https://arxiv.org/abs/2512.02527v1>
- [10] WEI, J.; WANG, X.; SCHUURMANS, D.; LE, Q. V.; et al., (2022). *Chain-of-Thought Prompting Elicits Reasoning in Large Language Models*. *Advances in Neural Information Processing Systems*, vol. 35, s. 1–35. [online]. Dostupné na: <https://proceedings.neurips.cc/paper/2022/hash/abcdef123456-Chain-of-Thought-Prompting.pdf>

SEKCIA

**GEOGRAFIA
A REGIONÁLNY ROZVOJ
A GEOLÓGIA**



1 0 1
1 1 1 1
1 1 1 0 1
1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1
1 1 1 0 1 0 1
1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 0 1
1 1 0 0 0 1 0 0 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1

Distribúcia chemických prvkov vo výplni amygdaloidných dutín permských bázických vulkanitov hronika na lokalite Malužiná – Svidovo v Nízkych Tatrách (Západné Karpaty)

Distribution of chemical elements in the filling of amygdaloidal cavities in the Permian basic volcanic rocks of the Hronic Unit at the Malužiná – Svidovo, Nízke Tatry Mts. (Western Carpathians)

Filip Antalík¹ – Štefan Ferenc¹

¹Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
filip.antalik@student.umb.sk, stefan.ferenc@umb.sk

Abstrakt

Predmetom štúdia bol výskum amygdaloidných dutín (hlavne achátov) v melafýroch na lokalite Malužiná – Svidovo. XRF-mapy distribúcie vybraných chemických prvkov boli porovnané s príslušnými vzorkami, s cieľom identifikácie základných minerálov a významnejších akcesorií podieľajúcich sa na ich stavbe. Najhojnším prvkom je Si viazaný v rámci mikrokryštalických variet SiO₂. Ca v karbonátoch vyplňa zväčša centrálnu časť dutín, pukliny alebo dutiny po alterovaných mineráloch. S, Pb, Cu, As, menej Fe sa viažu v sulfidoch v menších tmavosivých zónach v karbonátoch, alebo na ich styku s materskou horninou. Mg, Mn, K, Fe, Zn, Ba sú zastúpené v horninotvorných mineráloch v okolitej hornine. Zr a Th vystupujú hlavne v akcesorickom zirkóne a P zas v apatite.

Kľúčové slová: amygdaloidné dutiny, acháty, XRF-mapy, permský bazalt, hronikum

Abstract

The subject of the study was the research of amygdaloidal cavities (mainly agates) in melaphyres at the Malužiná – Svidovo locality. XRF maps of the distribution of selected chemical elements were compared with the corresponding samples, aiming to identify the primary minerals and significant accessories involved in their composition. The most common element is Si, bound within microcrystalline varieties of SiO₂. Ca in carbonates usually fills the central parts of cavities, cracks, or voids after altered minerals. S, Pb, Cu, As, and less commonly Fe, are bound in sulfides in smaller dark-gray zones within the carbonates or at their contact with the host rock. Mg, Mn, K, Fe, Zn, and Ba are present in rock-forming minerals in the surrounding rock. Zr and Th are mainly found in accessory zircon, while P is found in apatite.

Key Words: amygdaloidal cavities, agates, XRF maps, Permian basalt, Hronic Unit

Úvod

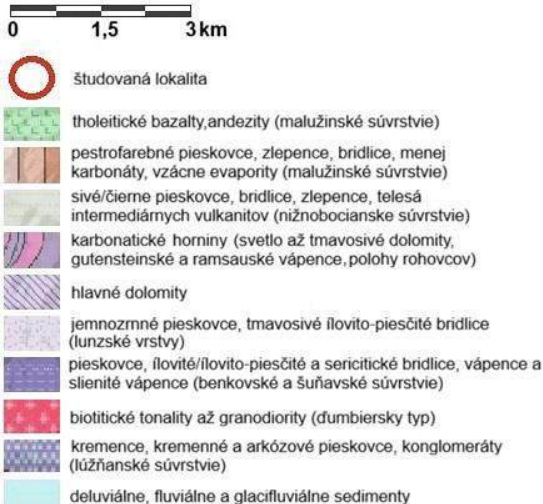
Vulkanické horniny, vystupujúce v širšom okolí Malužinej predstavujú bimodálny súbor výlevných hornín a ich klastických ekvivalentov, ktorý je z väčšej časti reprezentovaný bázickými efuzívami permského veku, nazývanými aj melafýry. Ich vznik na území Západných Karpát bol spätý s post-variským extenzným vulkanizmom, kedy dochádzalo ku masívnemu prenikaniu plášťových hmôt, kontaminovaných prechodom cez kontinentálnu litosféru. Z petrologického hľadiska sa jedná o kontinentálne tholeitické bazalty s mierne zvýšenými obsahmi LREE a Th, podobné tým zo stredoocéánskych chrbtov. Vytvárajú početné, často bezprostredne na sebe nasadajúce prúdy dosahujúce hrúbku od 0,5-2,5 m a dlhé od desiatok po stovky metrov. Takéto výlevy tvoria zväčša niekoľko desiatok metrov hrubé sekvencie, ktoré sú oddelené tenkými vrstvičkami vulkanoklastického materiálu. Často sú výrazne pórovité, s hojným výskytom amygdaloidných dutín rozličných tvarov, veľkostí a charakteru výplne [1]. Acháty vyskytujúce sa na lokalite by bolo spravidla možné rozdeliť na 3 typy, a teda acháty v rámci výplne amygdaloidných dutín, žilné typy vyplňajúce pukliny v melafýroch a zmiešané, u ktorých dochádza ku kombinácii predošlých dvoch. Ich negatívnou vlastnosťou je vysoká puklinatosť spôsobená presunom, tektonickým porušením, miestami aj nízkometamorfnou premenou (max. prehnit-pumpelyitová fácia) hostiteľských permských vulkanosedimentárnych komplexov počas alpínskej orogenézy [1]. Ťažba melafýru v svidovskom lome začala približne koncom 60-tych rokov 20. storočia [2, 3], pričom

prakticky bez väčšej prestávky prebieha aktívne dodnes. Asociácia minerálov reprezentovaná SiO₂ varietami, kalcitom, barytom, chloritmi, epidotom, pyritom, chalkopyritom, galenitom a bežnými produktami zvetrávania spomenutých sulfidov [4, 5], bola v neskorších prácach [5, 6] doplnená o vanadinit [5] a hemimorfit [6].

Cieľom práce bolo na základe porovnania XRF-distribučných máp chemických prvkov a predošlých známych výskumov realizovaných na lokalite, identifikovať základné minerály podieľajúce sa na výplni amygdaloidných dutín (prevažne achátov), napomôcť tak ku pochopeniu minerálno-sukcesných vzťahov ktoré prebiehali počas tvorby výplne týchto dutín a predbežne identifikovať pre lokalitu nové minerálne fázy.



Obr. 1 Pohľad na časť lomu odkiaľ bola odoberaná väčšina študovaných vzoriek, stav v novembri 2024. Foto: [Filip Antalík]



Obr. 2 geologická stavba širšieho okolia študovanej lokality. Zdroj: [3D mapový portál ŠGÚDŠ; Filip Antalík]

1 Poloha a popis lokality

Rozmerný mnohoetážový lom na permský paleobazalt sa nachádza asi 1 km ZJZ od obce Malužiná, v doline Svidovského potoka v severnej časti Nízkych Tatier (Obr. 2). Širšie okolie je budované prevažne horninami ipoltickej skupiny hronika (starš. melafýrová séria) ktoré sú severne od obce prekryté mladšími nadložnými triasovými sedimentami (sivé/svetlosivé vápence a dolomity, pieskovce, rauvaky) [7, 8]. Ipoltická skupina hronika pozostáva z vrchnokarbónskeho nižnobocianskeho súvrstvia, v ktorého nadloží sa nachádza permské malužinské súvrstvie (paleobazaltové prúdy a príslušné pyroklastiká, paleobazaltové porfýry, kremenné porfýry, klastické sedimenty) dosahujúce miestami hrúbku až 1500-2000 m [1, 7, 9, 10]. Práve vo

vulkanitoch tohoto súvrstvia sa nachádzajú študované amygdaloidné dutiny s pomerne pestrou výplňou [11].

2 Metodika

Študované vzorky boli odobraté prevažne v okrajových zónách stredných etáží lomu (Obr. 1). Vzorky boli následne rozrezané pílou s diamantovým kotúčom. Vybrané kusy s najzaujímavejšou textúrou a minerálnou asociáciou boli študované pomocou XRF-spektrometra M4 Tornado Bruker, na Ústav vied o Zemi SAV v Banskej Bystrici, za účelom vyhotovenia distribučných máp chemických prvkov vo výplni amygdaloidných dutín (prístroj obsluhoval a XRF-mapy vyhotovil Mgr. Jozef Vlasáč PhD.). Zhotovené XRF-distribučné mapy boli následne porovnané s príslušnými narezanými vzorkami. Ku miernemu skresleniu výsledkov (máp) mohlo dôjsť v dôsledku nerovností a puklín na rezoch vzoriek, alebo vplyvom drobných defektov, dutiniek a perimorfóz po alterovaných mineráloch amygdaloidných dutín.



Obr. 3 amygdaloidná dutina s achátovou výplňou; v centrálnej časti sú priestorovo vyvinuté kryštáliky ružovkastého kalcitu, narastajúce na kryštáloch kremeňa, žltý okrajový lem je tvorený starším kalcitom, ktorý kryštalizoval ako prvý v rámci dutiny. Rozmery: 9,1 x 4,5 cm. Foto: [Filip Antalík]

3 Výsledky

3.1 Kremík – Si

Je najdominantnejšie zastúpeným prvkom vo výplni amygdaloidných dutín. Vyskytuje sa v ich podstatnej časti, pričom jeho nositeľom sú mikrokryštalické variety SiO_2 , hlavne chalcedón, menej opál, príp. moganit [12, 13]. Ich vzájomný pomer však v rámci tohto výskumu nebol bližšie sledovaný. Vo väčšine dutín kryštalizovali vyššie uvedené variety SiO_2 ako prvé minerály vo výplni (zväčša tvoria okrajové časti dutín, resp. achátov), prípadne v rôznych etapách (Obr. 6). Si-bohaté zóny sú obyčajne chudobné na ostatné prvky, čo je pravdepodobne spôsobené prevažne obmedzenou možnosťou ich substitúcie do štruktúry SiO_2 variet.



Obr. 4 Menší achát s výraznou karbonátovou pseudomorfózou po bližšie neurčenom mineráli (aragonit?, skolecit?,...). Rozmery: 2,4 x 1,5 cm. Foto: [Filip Antalík]

3.2 Vápnik – Ca

Je druhým najrozšírenejším prvkom v rámci výplne dutín. Obyčajne sa koncentruje v centrálnych častiach, v hrubokryštalickom masívnom, žltkastom, béžovom až ružovkastom kalcite, ktorý má lokálne mierne zvýšený obsah Mg, Mn a K. V druhom prípade je rovnomerne s Si zastúpený v Ca-Si bohatých sivých, sivozelených/hnedých masách s hubovitou, alebo machovitou textúrou (Obr. 6). V týchto sa často nachádzajú menšie sivé/tmavosivé zóny s výskytom sulfidických minerálov. Pôvod týchto „hubovitých/machovitých“ más je nejasný, teoreticky môže ísť o alterované Ca-zeolity (laumontit?), ktoré boli stmelené zvyškovým, alebo druhotne prenikajúcim Si-fluidom obohateným aj o Fe, Cu, As, S (Obr. 5). Karbonátové minerály taktiež často vyplňajú pukliny,

alebo dutiny po alterovaných mineráloch v achátových mandliach (Obr. 3, 4).

3.3 Horčík – Mg, Mangán – Mn

Vyskytujú sa spolu a v podobnej koncentrácii hlavne v Ca-Si bohatých zónach dutinovej výplne (Obr. 6), kde ich obsah pozitívne koreluje s obsahom Ca, čo je spôsobené ich substitúciou za vápnik na katiónovej pozícii v kalcite. V Si-bohatých zónach je ich koncentrácia zanedbateľná. Mimo samotnej výplne amygdaloidných dutín sú tiež obsiahnuté v okolitej hornine, kde sú bežnou súčasťou pyroxénov a chloritov.

3.4 Draslík – K

Podobne ako horčík a mangán sa draslík vo zvýšenej miere vyskytuje v Ca-Si bohatých zónach (Obr. 6), avšak v jeho prípade je príslušnosť ku konkrétnej minerálnej fáze otázná. V okolitej hornine je viazaný v plagioklasoch.

3.5 Fosfor – P

Spolu s Mg, Mn a K dosahuje vyššie obsahy v rámci Ca-Si bohatých zón (Obr. 6), kde sa najskôr viaže s vápnikom a vhodným aniónom (OH-, Cl-, F-) v akcesorickom apatite. Koncentráciu fosforu v hornine možno taktiež vysvetliť prítomnosťou akcesorického apatitu, ktorý bol v paleobazaltoch dokázaný napr. z výskytov v Malých Karpatoch [7].

3.6 Železo – Fe

Železo je prítomné spolu s Mg, Mn, K, Si a Ca hlavne v okolitej hornine (Obr. 6), kde je viazané v pyroxénoch, chloritoch, alebo Fe-bohatých akcesóriách (hematit, ilmenit, Fe-Ti oxidy). V rámci výplne dutín sa nepodarilo potvrdiť jeho predpokladaný súvis s červeným sfarbením kremitých zón, ktoré je charakteristické pre danú lokalitu. Mierne zvýšené obsahy sa zistili v tmavosivých, na sulfidy bohatých zónach v rámci Si-Ca bohatých zón, kde je viazané v pyrite, chalkopyrite, arzenopyrite, hematite alebo prípadne bornite (Obr. 5).

3.7 Síra – S

V okolitej hornine sa vyskytuje iba veľmi sporadicky. Najvyššie obsahy síry vykazujú tmavosivé, na sulfidy bohaté zóny, nachádzajúce sa priamo v Ca-Si bohatých zónach dutinovej výplne (Obr. 6), alebo na ich styku materskou horninou (Obr. 5). Jej nositeľmi sú sulfidické minerály.

3.8 Olovo – Pb, Meď – Cu, Arzén – As

Podobne ako síra sa Pb, Cu a As v hornine vyskytujú iba vo veľmi obmedzenej miere. Najviac koncentrované sú vo vyššie spomínaných tmavosivých zónach, kde sa viažu na drobné zrná sulfidických minerálov (pyrit, chalkopyrit, arzenopyrit, chalkozín, covellit, galenit) ktoré miestami dorastajú do veľkosti niekoľko mm a sú viditeľné aj voľným okom (Obr. 5, 6).



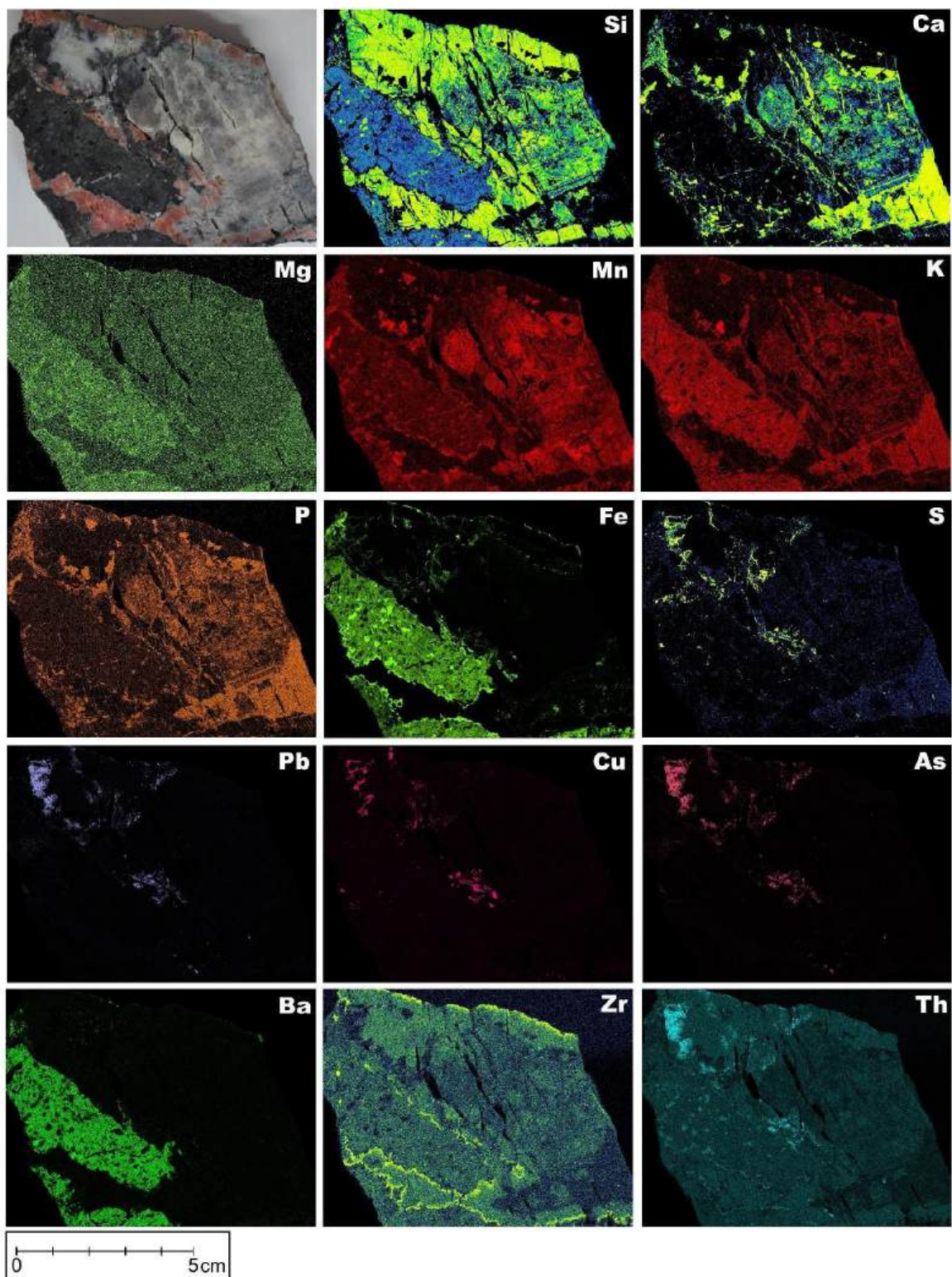
Obr. 5 menšia amygdaloidná dutina s rôznorodou achátovou výplňou a makroskopickým zrnom chalkopyritu v pravej dolnej časti. Rozmery: 2,9 x 2,2 cm. Foto: [Filip Antalík]

3.9 Zinok – Zn

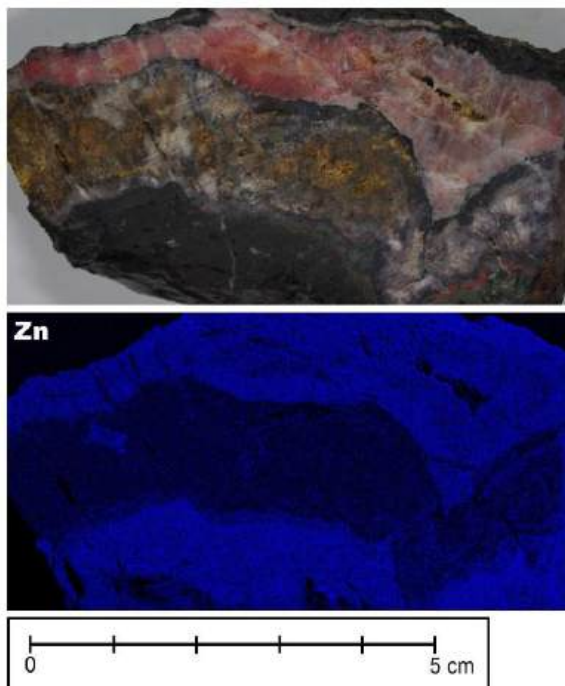
Obsahy zinku vo výplni amygdaloidných dutín sú zanedbateľné a rovnomerne rozptýlené (Obr. 7). Vyššie koncentrácie nedosahuje ani v tmavosivých zónach bohatých na sulfidy, kde by teoreticky mal možnosť sa viazať so sírou vo sfalerite. Túto skutočnosť by podporoval aj vyššie spomínaný, starší nález hemimorfitu [6]. Vo väčšej miere je prítomný v okolitej hornine, kde s najväčšou pravdepodobnosťou substituuje dvojmocné Fe v pyroxénoch a v akcesorickom magnetite a ilmenite [7].

3.10 Bárium – Ba

I napriek tomu, že v samotnom lome je možné nájsť aj niekoľko desiatok cm hrubé a niekoľko desiatok m dlhé žily masívneho barytu, bárium v achátovej výplni prakticky chýba a dosahuje ešte nižšie koncentrácie ako napr. Zn. Zvýšený obsah bol zistený v okolitej hornine, kde je Ba rovnomerne rozptýlené (Obr. 6), čo naznačuje (podobne ako u Zn) jeho substitúciu v horninotvorných mineráloch. Podľa Cubínka [7], najskôr ide o vstupovanie do plagioklasov (prípadne K, Ba-živcov: hyalofán-celsián) namiesto draslíka.



Obr. 6 Reprezentatívne porovnanie XRF-máp distribúcie vybraných chemických prvkov so samotnou narezanou vzorkou. Foto: [Jozef Vlasáč, Štefan Ferenc, Filip Antalík]



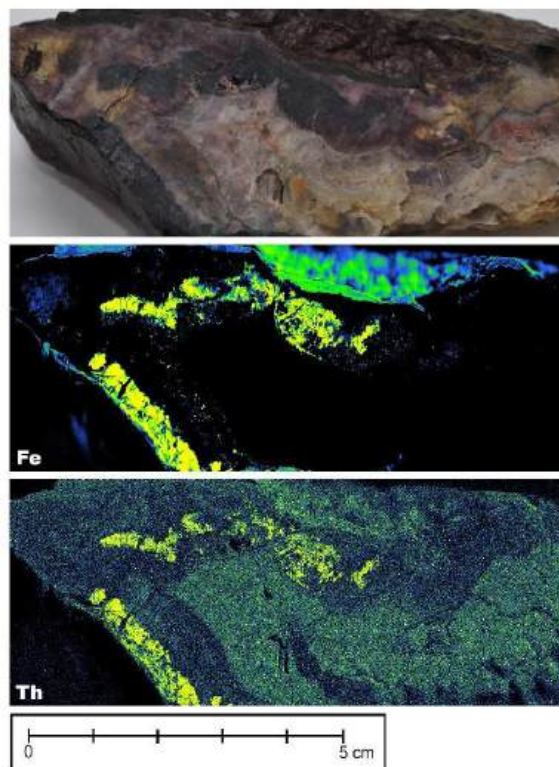
Obr. 7 Distribúcia Zn v rámci achátovej výplne vybranej vzorky. Foto: [Jozef Vlasáč, Štefan Ferenc, Filip Antalík]

3.11 Zirkónium – Zr

U všetkých vzoriek je typické rovnomerné rozptýlenie nízkeho obsahu Zr v rámci celej plochy rezov študovaných vzoriek. V prípade materskej horniny je Zr viazané v akcesorickom zirkóne. Pokiaľ ide o výplň amygdaloidných dutín, je jeho príslušnosť ku konkrétnej minerálnej fáze nejasná. Zvýšeným obsahom sa u niekoľkých vzoriek vyznačoval hlavne kontakt okolitej horniny so samotnou dutinovou výplňou, kde zvýšené obsahy Zr vytvárali jasne viditeľný „lem“ na okraji týchto dutín (Obr. 6)

3.12 Tórium – Th

Distribúcia Th je sčasti zhodná s distribúciou Zr. Rovnomerné rozptýlenie v hornine možno vysvetliť prítomnosťou akcesorických zirkónov [7]. Na rozdiel od Zr sa však Th nekonzcentruje v takej vysokej miere na styku dutinovej výplne a okolitej horniny (Obr. 6) Diskutabilné sú aj príčiny jeho zvýšenej koncentrácie v tmavosivých, na sulfidy bohatých zónach v samotnej výplni amygdaloidných dutín. V jednom prípade boli v takejto zóne pozorované obzvlášť vysoké koncentrácie Th korelujúce s Fe, no prakticky bez vyššieho obsahu akéhokoľvek iného sledovaného prvku (Obr. 7)



Obr. 8 Zvýšená koncentrácia Fe a Th nejasnej príčiny v rámci tmavosivej zóny achátovej výplne. Foto: [Jozef Vlasáč, Štefan Ferenc, Filip Antalík]

4 Diskusia a Záver

Štúdium XRF- distribučných máp chemických prvkov objasnilo súvislosti medzi rozmiestnením a koncentráciou jednotlivých chemických prvkov v rámci výplne amygdaloidných dutín v permských bazaltoch a zodpovedajúcim minerálom. Skupina prvkov Pb, Cu, As a Fe sa viaže spolu s S na sulfidické minerály, ktoré sú koncentrované výhradne v tmavosivých zónach na styku Ca-Si bohatých zón a okolitej horniny. Kremík, vystupujúci v mikrokryštalických varietách SiO₂, je prítomný v základnej mase výplne achátových mandlí, resp. amygdaloidných dutín a je najhojnešie zastúpeným prvkom. Chemicky zdanlivo čisté karbonátové zóny majú vždy pomerne vysoké koncentrácie Si. Karbonátové minerály tvoria často pseudomorfózy po preexistujúcich alterovaných mineráloch alebo tmelia pukliny v achátoch, či vypĺňajú centrálnu časť amygdaloidných dutín. Zirkónium a tórium sú koncentrované v akcesorickom zirkóne. Zr je však výraznejšie koncentrované v ledoch na styku dutinovej výplne s okolitou horninou a Th je zas omnoho viac prítomné v tmavosivých, na sulfidy bohatých zónach, pričom jeho príslušnosť ku

konkrétne minerálu je tu zatiaľ nejasná. Ba, Zn a Fe sú významnejšie obsiahnuté v materskej hornine, kde substituujú niektoré prvky v pyroxénoch, plagioklasoch a v prípade Fe hlavne v pyroxénoch, akcesorickom magnetite, ilmenite a Ti-oxidoch. Ďalšie výskumy a podrobnejšie analýzy jednotlivých identifikovaných minerálov, môžu napomôcť ku pochopeniu samotného procesu formovania výplne amygdaloidných dutín na študovanej lokalite, resp. viesť ku objasneniu sukcesívnych vzťahov medzi minerálnymi fázami, prípadne ku identifikácii pre lokalitu nových minerálov.

PodĎakovanie

Veľká vďaka patrí môjmu školiteľovi, Štefanovi Ferencovi za poskytnutie vzoriek, mnohých študijných materiálov a XRF-distribučných máp využitých pri výskume. Ďakujem aj Jozefovi Vlasáčovi (SAV-BB) za vyhotovenie daných XRF-distribučných máp.

Výskum výplne amygdaloidných dutín bol uskutočnený s podporou grantu MŠVVaM a SAV VEGA 1/0574/25.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] DOSTAL, Ján; VOZÁR, Jozef; KEPPIE, D. John; HOVORKA, Dušan, (2003). Permian volcanism in the Central Western Carpathians (Slovakia): Basin-and-Range type rifting in the southern Laurussian margin. *International Journal of Earth Sciences*, 92, 1, s. 27-35.

[2] URBAN, František, (1959). Prieskum kameňa v ČSR 1959, lokalita Malužiná - lom Svidovo (česky). Manuskript, archív ŠGÚDŠ, Bratislava, s. 1-19, archívne číslo: 8388.

[3] HRUŠOVSKÝ, Stanislav, a kol. (1980). Malužiná - surovina: stavebný kameň, podrobný prieskum, stav k: 6.9. 1979 - záverečná správa a výpočet zásob. Manuskript, archív ŠGÚDŠ, Bratislava, s. 1-107, archívne číslo: 48322.

[4] KODĚRA, Miroslav, a kol. (1990). Topografická Mineralógia Slovenska 2. Veda, Bratislava, s. 755-777. ISBN: 80-224-0101-3.

[5] FRIEDL, Ivan; ŽENIŠ, Pavel, (1991). Vanadinit z permských bazaltov v Malužinej. *Mineralia Slovaca*, 23, 4, s. 361-364.

[6] ŽENIŠ, Pavel; FRIEDL, Ivan, (1992). Hemimorfit - prvý nález v permských bazaltoch Západných Karpát. *Mineralia Slovaca*, 24, 1-2, 165-166

[7] CUBÍNEK, Jozef, (1971). Geochemický výskum stopových prvkov v melafýrových horninách Malých Karpát. diplomová práca, Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava.

[8] BIELY, Anton; BEŇUŠKA, Pavol; BEZÁK, Vladimír; BUJNOVSKÝ, Alfonz; HALOUZKA, Rudolf; IVANIČKA, Ján; KOHÚT, Milan; KLINEC, Albín.; LUKÁČIK, Eduard; MAGLAY, Juraj; MIKO, Oto.; PULEC, Miroslav; PUTIŠ, Marián; VOZÁR, Jozef, (1992). Geologická mapa Nízkych Tatier. Slovenský Geologický Úrad – Geologický Ústav Dionýza Štúra, Bratislava.

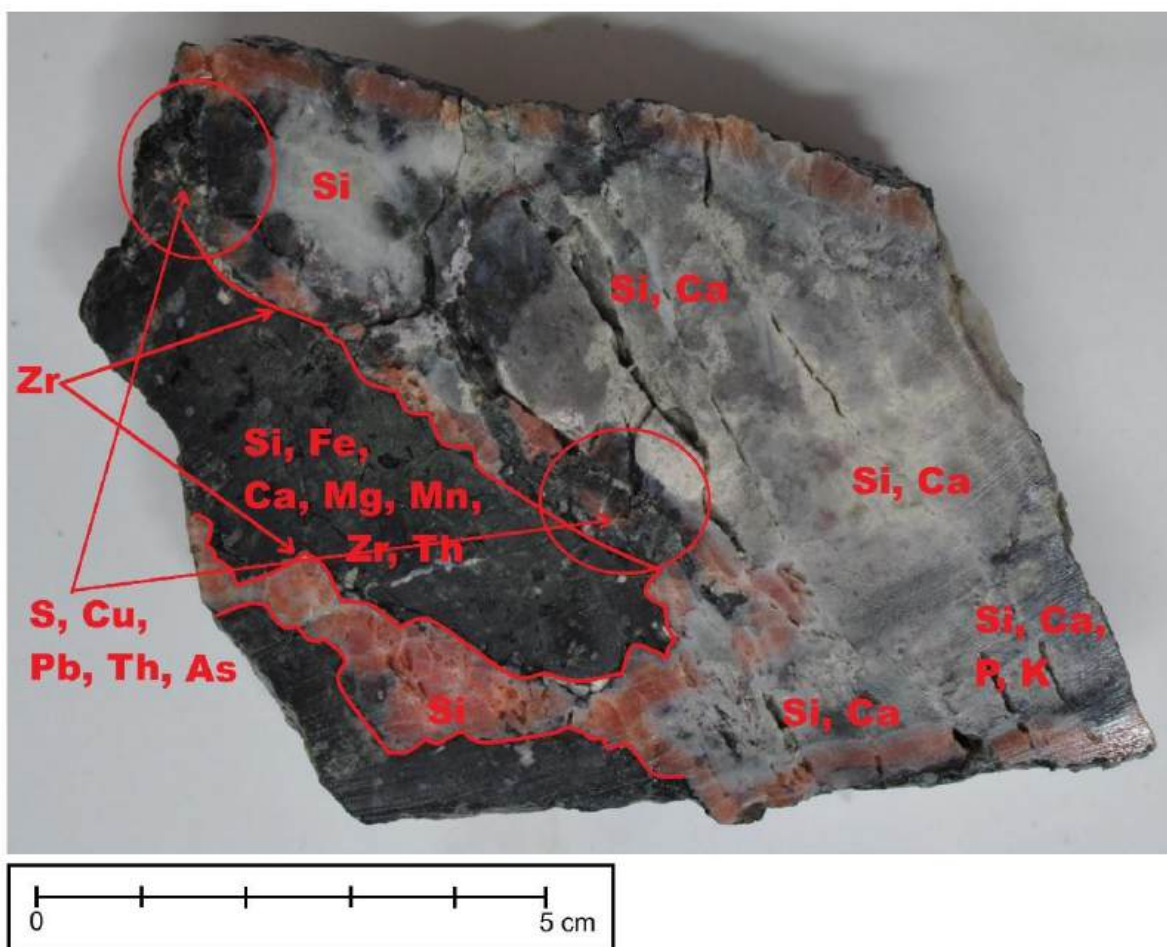
[9] VOZÁROVÁ, Anna; VOZÁR, Jozef, (1981). Litostratigrafická charakteristika mladšieho paleozoika hronika. *Mineralia Slovaca* 13, 5, 385-403

[10] VLASÁČ, Jozef; FERENC, Štefan; Mikuš, Tomáš; POLÁK, Ľuboš; LUPTÁKOVÁ, Jarmila; BIROŇ, Adrián, (2018). Výskyt Cu mineralizácie v permských bazaltoch hronika pri Banskej Bystrici (Slovenská republika). *Bull Mineral Petrolog*, 26, 2, 176-187.

[11] ANTALÍK, Filip, (2026). Nové nálezy achátov z lokality Hranovnica-Dubina. *ZA MINERÁLMI*, 2, 01, s. 34-38.

[12] PRŠEK, Jaroslav; DUMAŇSKA-SŁOWIK, Magdalena; POWOLNY, Tomasz; NATKANIEC-NOWAK, Lucyna; TOBOŁA, Tomasz; ZYCH, Damian; SKREPNIČKA, Dominika, (2020). Agates from Western Atlas (Morocco)—Constraints from Mineralogical and Microtextural Characteristics. *Minerals*, 10, 2, 198.

[13] GÖTZE, Jens; MÖCKEL, Robert; PAN, Yuanming, (2020). Mineralogy, Geochemistry and Genesis of Agate—AReview. *Minerals* 10, 11, 1037.



Obr. 9 Názorná ukážka distribúcie najviac zastúpených chemických prvkov na reprezentatívnej vzorke. Foto: [Štefan Ferenc, Filip Antalík]

Krajina ako zdroj poznania: TOP 10 lokalít mikroregiónu Púchov

Landscape as a source of knowledge: TOP 10 sites of Púchov microregion

Martin Bakoš¹ – Hilda Kramáreková²

^{1,2}Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹ martin.bakos@student.ukf.sk, ² hkramarekova@ukf.sk

Abstrakt

Cieľom práce je predstaviť mikroregión Púchov ako špecifický celok a zhodnotiť jeho potenciál pre cestovný ruch a geografické vzdelávanie. Pri spracovaní boli využité viaceré metódy – terénny výskum, metóda vysvetľujúceho opisu, štatistické a matematické metódy, kartografické metódy a systémová metóda. Pozornosť je tiež venovaná implementácii aktivizujúcich metód prostredníctvom digitálnych technológií, konkrétne formou m-learningu. Využitie voľne dostupnej mobilnej aplikácie, akou je Mapy.com umožní žiakom prepojiť teoretické vedomosti so skutočnými geografickými javmi v krajine. Výber a zoradenie konkrétnych lokalít mikroregiónu sa opiera o kľúčové kritériá, akými sú dopravná dostupnosť, ich popularita a možnosti využitia vo vyučovacom procese. Výsledkom je ucelený zoznam lokalít, ktorý môže slúžiť ako praktická pomôcka pri plánovaní geografických vychádzok a zároveň prispieva k propagácii mikroregiónu v kontexte udržateľného turizmu.

Kľúčové slová: mikroregión, miestna krajina, lokalita, geografická vychádzka, cestovný ruch

Abstract

The aim of the paper is to present the Púchov microregion as a unique entity and evaluate its potential for both tourism and geographical learning. The research methodology includes field research, explanatory description, statistical and mathematical analysis, cartographic methods and a systems approach. Furthermore, it focuses on the implementation of activating teaching methods through digital technologies, specifically m-learning. The use of easily accessible mobile application such as Mapy.com enables pupils to connect theoretical knowledge and real-world features in the landscape. The selection and ranking of specific sites within the microregion are based on key criteria such as transport accessibility, popularity and their potential for use in the educational process. The outcome is a comprehensive list of sites serving as a practical guide for planning geographical field trips while simultaneously contributing to the promotion of the microregion.

Key Words: microregion, local landscape, site, geographical field trip, tourism

Úvod

Súčasný svet, charakteristický vysokou mierou mobility, nás často núti hľadať atraktívne miesta vo vzdialených krajinách. Zvyčajne však prehliadame lokality, ktoré máme doslova „za dverami“. Poznanie miestnej krajiny je však kľúčovým predpokladom pre budovanie vzťahu k miestu, kde žijeme. Tento vzťah nám umožňuje nielen lepšie chrániť prírodné a kultúrne dedičstvo, ale aj efektívne plánovať udržateľný rozvoj turizmu. Pre žiakov a študentov navyše miestna krajina predstavuje to najlepšie prostredie, v ktorom môžu pozorovať geografické javy priamo v praxi prostredníctvom geografických vychádzok.

Cieľom práce je predstaviť mikroregión Púchov ako špecifický celok a zhodnotiť jeho potenciál pre cestovný ruch a geografické vzdelávanie. Zameriava sa na identifikáciu a analýzu desiatich najvýznamnejších lokalít, ktoré sú zoradené na základe kritérií, ako dostupnosť, popularita a edukačná hodnota. Výsledkom má byť ucelený zoznam, ktorý posluží nielen turistom, ale aj pedagógom pri plánovaní geografických vychádzok a exkurzií. Jednotlivé lokality môžu taktiež slúžiť ako podklad na aktivizujúce vyučovanie geografie prostredníctvom digitálnych technológií.

Využívanie digitálnych technológií priamo v miestnej krajine umožňuje žiakom osvojiť si základné metódy terénneho výskumu. Práca s údajmi a digitálnym mapovaním trasy tak vytvára priamy vzťah medzi teoretickými poznatkami a ich praktickou aplikáciou prostredníctvom moderných technológií.

1 Teoreticko-metodické východiská problematiky

Teoretické východiská predstavujú základný pilier každej odbornej práce. Poskytujú rámec, v ktorom je možné skúmanú problematiku nielen pochopiť, ale aj systematicky spracovať. V práci boli použité takmer výlučne elektronické zdroje.

Metodika práce bola vypracovaná na základe vysokoškolského učebného textu Vademecum

literárnej a vedeckej činnosti geografa [1] a článku Didaktické metódy a ich aplikácia v zemepise/geografii [2].

V kapitole vymedzenie územia a charakteristika mikroregiónu Púchov boli využité webové stránky rôznych inštitúcií – Štatistický úrad [3][9], Geodetický a kartografický ústav [4], Štátna ochrana prírody [6], Slovenská správa ciest [7], Železnice Slovenskej republiky [8]. Na lokalizáciu geomorfologických celkov bola využitá mapa Geomorfologické členenie Slovenska [5]. Webová stránka obce Dohňany [10] obsahuje informácie o mikroregióne Púchovská dolina a stránka Naše Považie [11] o MAS Naše Považie.

V tretej kapitole, ktorá predstavuje zoznam lokalít, bola využitá publikácia Mikrogeografia – krajina okolo nás [12]. Mikroregión bol zaradený do turistického regiónu na základe Ministerstva cestovného ruchu a športu [13]. Pre charakteristiku lokalít boli využité rôzne zdroje – Kúpele Nimnica [14], Čarovný Púchov a okolie [15], Štátna ochrana prírody [16], Náučný chodník Tri skaly [18], Historický park Lednické Rovne [19], Župný dom v Púchove [19] a nakoniec Belušské vráta [21]. Obrázok osady Čertov pochádza zo stránky obce Lazy pod Makytou [17].

Výskumné metódy umožňujú systematické a odborné riešenie problematiky. Tieto postupy viedli k efektívnemu zhromaždeniu, spracovaniu a interpretácii údajov. Pre potreby práce bol realizovaný terénny výskum na lokalizáciu a opis jednotlivých lokalít. Cenné informácie poskytol aj predseda mikroregiónu, p. Ján Prekop. Okrem toho boli v práci použité nasledovné metódy: metóda vysvetľujúceho opisu (opis jednotlivých lokalít), štatistické a matematické metódy (spracovanie údajov – tvorba tabuľky), kartografické metódy (ilustrovanie priestorového rozloženia javov) a systémová metóda (usporiadanie práce – kapitoly a podkapitoly) [1].

Aktivizujúce metódy vo výučbe geografie predstavujú postupy, ktoré transformujú žiaka z pasívneho prijímateľa faktov na aktívneho aktéra. Tým podnecujú jeho kritické myslenie a schopnosť samostatne riešiť problémy. V spojení s digitálnymi technológiami tieto metódy umožňujú interaktívne poznávať miestnu krajinu. Dochádza teda k efektívnemu prepojeniu teoretických poznatkov a skutočných javov [2].

V kontexte implementácie digitálnych technológií prostredníctvom aktivizujúcich metód navrhujeme využitie mobilného mapovania v reálnom čase. Žiak sa stane aktívnym pozorovateľom, ktorý prostredníctvom mobilných zariadení (m-learning) a aplikácie Mapy.com realizuje terénny zber údajov. Táto aplikácia obsahuje funkciu Stopár, ktorá slúži na zaznamenávanie pohybovej aktivity, napr. turistiky. Umožňuje jednoducho sledovať trasu, vzdialenosť, prevýšenie trasy, čas a rýchlosť pohybu. Žiaci by počas geografickej vychádzky vytvárali na trase body, kde by vytvorili

fotografiu a krátky popis sledovaného javu vlastnými slovami. Výsledkom je digitálny záznam trasy, ktorý umožňuje následnú interpretáciu a analýzu nazbieraných údajov v školskom prostredí. Uvedený prístup zvyšuje nielen digitálnu gramotnosť študentov, ale zároveň prehĺbuje ich väzbu k miestnej krajine. Týmto spôsobom sa zároveň implementujú prierezové témy mediálna výchova, environmentálna výchova, regionálna výchova a tradičná ľudová kultúra.

2 Vymedzenie územia a charakteristika mikroregiónu Púchov

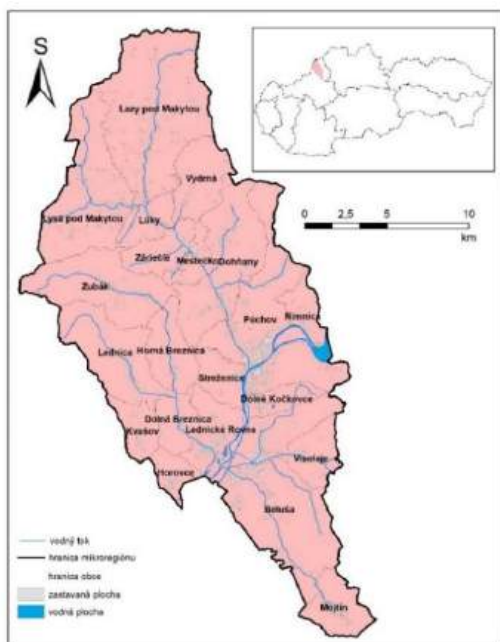
Mikroregión Púchov predstavuje združenie obcí, ktoré vzniklo dobrovoľnou a vzájomnou dohodou v roku 2001. Tvoria ho všetky obce okresu spolu s mestom Púchov (tab. 1).

Obec	Počet obyvateľov	Rozloha [km ²]	Hustota obyvateľstva [obyv./km ²]
Beluša	6 183	51,34	120,43
Dohňany	1 903	28,75	66,19
Dolná Breznica	1 073	8,36	128,35
Dolné Kočkovce	1 177	6,12	192,32
Horná Breznica	497	12,28	40,47
Horovce	917	5,35	171,40
Kvašov	636	7,47	85,14
Lazy pod Makytou	1 224	49,86	24,55
Lednica	894	22,65	39,47
Lednické Rovne	3 844	10,75	357,58
Lysá pod Makytou	1 964	33,4	58,80
Lúky	901	7,74	116,41
Mestečko	488	5,42	90,04
Mojtín	426	10,84	39,30
Nimnica	732	7,36	99,46
Púchov	16 781	41,27	406,61
Streženice	1 105	7,98	138,47
Visolaje	960	9,65	99,48
Vydrná	252	13,44	18,75
Zubák	830	25,67	32,33
Záriečie	696	9,42	73,89
SPOLU	43 483	375,12	115,92

Tabuľka 1 Obce mikroregiónu Púchov
Zdroj: [3]

Mikroregión Púchov (mapa 1) je situovaný na severozápade Slovenskej republiky v Trenčianskom kraji a úplne sa zhoduje s okresom Púchov. Na východe

susedí s okresom Považská Bystrica a na juhozápade s okresom Ilava. Severozápadná hranica mikroregiónu je zároveň štátnou hranicou. Mesto Púchov, kde je evidované sídlo mikroregiónu, je vzdialené 19,9 km od hraničného priechodu Lysá pod Makytou – Střelná, 42,7 km od Trenčína a 159,7 km od Bratislavy [4].



Mapa 1 Mikroregión Púchov
Zdroj: [4]; Autor: Martin Bakoš

Charakter krajiny je veľmi rôznorodý, keďže sa rozprestiera na rozhraní Strážovských vrchov, Považského Podolia, Javorníkov a Bielych Karpát [5]. Z týchto geomorfologických celkov majú najmenšie plošné zastúpenie Strážovské vrchy, no v obci Mojtiín sa nachádza najvyšší bod mikroregiónu – Gabrišské vrchy (939 m n. m.). V kontraste k nemu stojí najnižší bod územia, ktorý sa nachádza vo výške 241,8 m n. m. na dne koryta rieky Váh v mieste, kde opúšťa územie obce Beluša. Okrajové časti územia zároveň zasahujú do viacerých veľkoplošných chránených území, konkrétne do CHKO Strážovské vrchy, CHKO Biele Karpaty a CHKO Kysuce [6].

Pre rozvoj cestovného ruchu v mikroregióne Púchov zohráva nenahraditeľnú úlohu dopravná dostupnosť územia. Z tohto hľadiska je zásadný prechod diaľnice D1 cez obce Beluša a Visolaje. V obci Beluša zároveň začína rýchlostná cesta R6, ktorá po dokončení prepojí diaľnicu D1 s hraničným priechodom do Českej republiky pri Lysej pod Makytou. Na hranici rýchlostná cesta R6 nadviaže na českú diaľnicu D49. V súčasnosti má však pre mikroregión kľúčový význam cesta I. triedy 49, ktorá vedie Lyským priesmykom do Českej republiky [6]. Dôležité postavenie v rámci dopravnej infraštruktúry má mesto Púchov, ktoré predstavuje dôležitý železničný uzol na tratiach ŽSR 120 Bratislava –

Žilina a ŽSR 125 Púchov – Strelenka – Horní Lideč (CZ) [8].

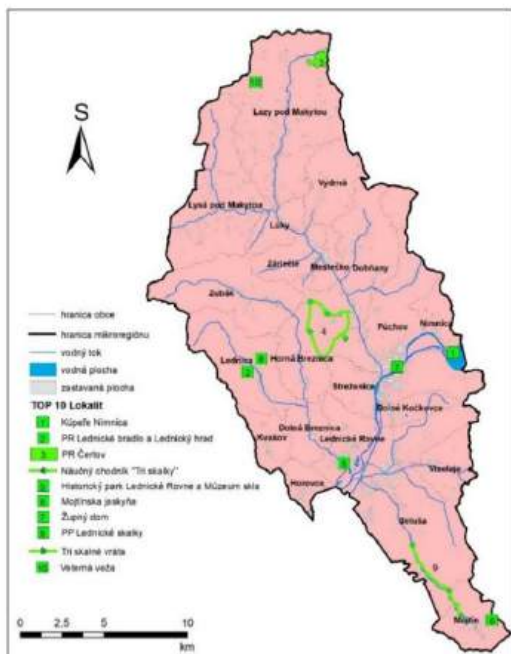
Mikroregión Púchov je z právneho hľadiska záujmové združenie právnických osôb, ktoré vzniklo v roku 2001. Obce sa v rámci združenia snažia spolupracovať v oblastiach ako regionálny rozvoj alebo cestovný ruch. Prostredníctvom koordinovaného postupu by mali obce riešiť spoločné problémy (najmä v oblasti sociálnych vecí, starostlivosti o životné prostredie a pod.). Momentálne je predsedom mikroregiónu starosta obce Beluša, p. Ján Prekop [9]. Mikroregión Púchov však nie je jediné združenie obcí v okolí a mnohé obce sú členmi viacerých združení. Takým je napríklad Združenie obcí Púchovská dolina, ktoré obsahuje 7 obcí (Dohňany – sídlo, Mestečko, Záriečie, Lúky, Vydrná, Lazy pod Makytou a Lysá pod Makytou). Toto združenie vzniklo v roku 2013 za účelom bližšej a efektívnejšej spolupráce obcí okresu a vo väčšom rozsahu, ako pôsobí združenie Mikroregión Púchov. Taktiež sa zameriava vo väčšej miere na spoluprácu so Sdružením obcí Hornolidečka v Českej republike [10]. V oblasti zároveň pôsobí občianske združenie MAS Naše Považie. Združuje fyzické osoby, právnické osoby a samosprávy okresov Púchov a Považská Bystrica za účelom spolupráce v rozvoji regiónu. Toto občianske združenie vzniklo v roku 2007 a jeho súčasťou je 48 samospráv, vrátane členov Mikroregiónu Púchov. Nakoniec občianske združenie COOLTUR Považie je zamerané na spoluprácu a podporu pri rozvoji cestovného ruchu na území okresov Púchov a Považská Bystrica [11].

3 TOP 10 lokalít mikroregiónu

Cestovný ruch predstavuje dôležitý zdroj príjmov viacerých obcí mikroregiónu. Jeho rozvoj sa opiera predovšetkým o prírodné bohatstvo a kultúrne pamiatky tohto územia. Stále však existuje potenciál ďalšieho rozvoja, ktorý môže pozitívne ovplyvniť ekonomiku aj spoločenský život mikroregiónu [12]. Ministerstvo cestovného ruchu klasifikuje južnú časť mikroregiónu ako súčasť Strednopovažského turistického regiónu. Severnú časť a zároveň väčšinu územia klasifikuje v rámci Severopovažského turistického regiónu [13]. Vysoký potenciál mikroregiónu v oblasti cestovného ruchu dokazujú napr. tržby za ubytovanie. V roku 2019 dosiahli až 5 894 438 eur. Následné obdobie však v dôsledku pandemických opatrení znamenalo ich pokles a v roku 2024 dosiahli tržby hodnotu 2 788 783 eur [3].

Lokality boli vybrané a zoradené na základe viacerých kritérií. Posudzovaná bola ich dostupnosť, konkrétne od železničnej stanice v Púchove, celkový počet recenzií na portáloch Google mapy a Mapy.com, ktoré indikujú celkovú návštevnosť a nakoniec vhodnosť využitia lokality na geografickú vychádzku alebo exkurziu. Pri lokalitách, ktoré nedisponujú železničným prepojením, bude udávaná vzdialenosť od

autobusovej zastávky Púchov, železničná stanica. Prvé miesto v rebríčku pritom indikuje najvhodnejšiu lokalitu. Prvých desať lokalít je zobrazených na mape 2.



Mapa 2 TOP 10 lokalít mikroregiónu Púchov
Zdroj: [4]; Autor: Martin Bakoš

3.1 Kúpele Nimnica

Kúpele Nimnica patria medzi najmladšie kúpele Slovenskej republiky, ktoré fungujú od roku 1959. Liečivý prameň je klasifikovaný ako vysoko mineralizovaná voda, uhličitá, so zvýšeným obsahom hydrogénuhličitanov, slabo kyslá. Teplota vody je 12,7 °C. Poskytujú kúpeľnú a ambulatnú kúpeľnú liečbu so zameraním na širokú škálu ochorení (onkologické choroby, choroby obehového ústrojenstva, choroby tráviaceho ústrojenstva a i.) [14].



Obr. 1 Kúpele Nimnica
Autor: Martin Bakoš (8.2.2026)

Kúpele sa nachádzajú v obci Nimnica a sú vzdialené iba 6,2 km od Púchova s priamym autobusovým spojením. Sú lokalizované na úpätí Javorníkov priamo pri Priehrade mládeže (vodná nádrž Nosice). Návštevníci sa môžu ubytovať priamo v zariadení. Ide

o jednoznačne najnavštevovanejšiu lokalitu v mikroregiónu, ktorá je vhodná na geografickú vychádzku, prípadne poznávanie miestnej krajiny. Lokalitu je možné využiť napríklad na priblíženie histórie kúpeľov alebo priehrady, pre ktorú bola úplne zatopená obec Okrut a časť obce Podvažie [4].

3.2 Lednické bradlo a Lednický hrad

Lednické bradlo spolu s Lednickým hradom predstavujú slovenský unikát. Hrad totiž nestojí na skalnom útvare, ale je do neho priamo postavený. Z tohto dôvodu sú neoddeliteľné a predstavujú jednu lokalitu. Hradná zručanina pochádza z druhej polovice 13. storočia, s účelom chrániť severozápadnú hranicu Uhorského kráľovstva. Momentálne prebieha rekonštrukcia hradu a návštevníkom je sprístupnený v letných mesiacoch [15]. Lednické bradlo je skalný výstupok bradlového pásma, ktoré predstavuje prírodnú rezerváciu so 4. stupňom ochrany prírody. Predmetom ochrany sú geomorfologicky výrazné bradlové tvrdoše, teda druhohorné horniny, najmä vápence, dolomity a pieskovce. Zároveň sa tu vyskytujú významné spoločenstvá a druhy rastlín a živočíchov Bielych Karpát. Veľká časť územia obce Lednica sa nachádza v CHKO Biele Karpaty [16].



Obr. 2 Lednické bradlo a Lednický hrad
Autor: Martin Bakoš (8.2.2026)

Lokalita sa nachádza v obci Lednica, ktorá je vzdialená 17 km od mesta Púchov s priamym autobusovým spojením. Pre viacdňové exkurzie je ubytovanie možné priamo v obci v troch rôznych objektoch (chalupa a dva minidomy) so spoločnou kapacitou 10 osôb. [4]. Miesto je taktiež vhodné na geografickú vychádzku alebo poznávaciu exkurziu. Bradlá predstavujú hodnotný a typický prvok krajiny Bielych Karpát. Tie sa nachádzajú ešte v príslušných obciach ako Červený Kameň alebo Vršatecké Podhradie.

3.3 Čertov

Osada, ktorá je súčasťou obce Lazy pod Makytou, leží pod hlavným hrebeňom Javorníkov. Aktuálne je vyhľadávaná najmä pre rekreáciu a turizmus. Nachádza sa tu viacero lyžiarskych zjazdoviek a možnosť wellnessu. Osada je však typická veľmi čistým

prírodným prostredím, ktoré je súčasťou CHKO Kysuce. Časť územia predstavuje taktiež územie európskeho významu Čertov a prírodnú rezerváciu Čertov (5. stupeň ochrany). Predmetom ochrany sú najmä zachovalé lesné spoločenstvá Javorníkov [16].



Obr. 3 PR Čertov
Zdroj: [17]

Osada sa nachádza na periférii mikroregiónu priamo na štátnych hraniciach s Českou republikou. Napriek vzdialenosti 23,7 km od Púchova je lokalita dostupná priamym autobusovým spojením [4]. V samotnej osade sa nachádza mnoho ubytovacích zariadení – tri hotely, viacero chát a chalúp. Vďaka zachovalému prírodnému prostrediu patrí lokalita k najlepším miestam na spoznávanie miestnej krajiny. Územie ponúka vhodné podmienky na pozorovanie viacerých krajinných javov. Prítomnosť chránených území umožňuje oboznámiť sa s problematikou ochrany prírody a významom zachovaných lesných spoločenstiev. Osada je preto vhodná aj na realizáciu geografických vychádzok a exkurzií v rámci vyučovacieho procesu.

3.4 Náučný chodník Tri skaly

Náučný chodník predstavuje vzdelávaciu trasu turistického charakteru. Má 5 zastávok – Dohňany, Lazovská skala, Čertova skala, Rozhľadňa na Tlstej hore a skalný útvar Vieska. Takmer celou dĺžkou (13 km) sa nachádza v obci Dohňany s prevýšením 440 m. Predstavuje stredne náročnú trasu [18]. Rozhľadňa na Tlstej hore (650 m n. m.) meria 21,5 m. Postavená bola v roku 2009 v rámci projektu „Rozhľadny Hornolidečska a Púchovské doliny na kótách 651 m n. m.“. Tento projekt vznikol na základe cezhraničnej spolupráce mikroregiónu Púchovská dolina a sdružení obcí Hornolidečska. Začiatok náučného chodníka sa nachádza priamo v obci Dohňany vzdialenej 6 km od Púchova s priamym železničným aj autobusovým spojením. Dohňany však disponujú viacerými kultúrnymi zaujímavosťami ako sú Dom kultúrnych tradícií alebo Dujkov mlyn. V obci sa však nenachádzajú ubytovacie zariadenia [4].



Obr. 4 Rozhľadňa na Tlstej hore
Autor: Martin Bakoš (10.2.2026)

Keďže ide o náučný chodník, ktorý spája hodnotné prírodné lokality, je ideálny na poznávanie miestnej krajiny, prípadne geografickú vychádzku. Jednotlivé zastávky predstavujú síce základný, ale logický prehľad daných miest. Je však pomerne dlhý, preto je vo vyučovacom procese vhodný skôr pre starších žiakov.

3.5 Historický park Lednické Rovne a múzeum skla

Park bol vybudovaný koncom 18. storočia a jeho súčasťou je viacero pamiatok vrátane kaštieľa. V jeho časti sa nachádza sklárske múzeum, ktoré je jediné svojho druhu na území Slovenska. Ďalej sa tu nachádza náhrobok grófa Aspremonta, starý kostol, mauzóleum Jozefa Schreiberera, gotická brána, chrám bohyně Minervy a mnoho ďalších objektov. Celý areál aj s jednotlivými časťami predstavuje národnú kultúrnu pamiatku. V súčasnosti je park vo vlastníctve RONA a. s. a obce Lednické Rovne [19]. Eduard Schreiber natočil v priestoroch parku snímku Únos (r. 1910). Ide o prvý hraný slovenský film. Na území obce sa nachádzajú ešte dva ďalšie kaštiele (jeden z nich v časti Medné).



Obr. 5 Kaštieľ v obci Lednické Rovne
Autor: Martin Bakoš (8.2.2026)

Historický park sa nachádza v centre obce Lednické Rovne. Obec je vzdialená 9,1 km od mesta Púchov, s ktorým je spojená autobusovou linkou. [4]. Nachádza sa tu taktiež penzión, ktorý ponúka možnosť ubytovania. Park je vhodný na geografické vychádzky z viacerých dôvodov. Je ľahko dostupný a zároveň pri každom objekte v parku sa nachádza tabuľa s popisom daného objektu.

3.6 Mojtínska jaskyňa

Strážovské vrchy sú tvorené z veľkej časti vápencami a dolomitmi. Táto skutočnosť umožnila tvorbu krasu, ktorý je pomerne rozšírený v obci Mojtín. Nachádza sa tu mnoho endogénnych a exogénnych foriem krasového reliéfu. Najvýraznejšou je Mojtínska jaskyňa, ktorá je tvorená dvomi, na seba kolmými, chodbami. Obe chodby sú dlhé približne 24 m. V hornej časti sa nachádza nevýrazná sintrová výzdoba. Počas 19. storočia slúžila jaskyňa ako chrám, kde sa konali omše, keďže sa v tej dobe v obci nenachádzal kostol. Aj z tohto dôvodu je jaskyňa občas označovaná ako jaskyňa sv. Jozefa. Jaskyňa je prírodnou pamiatkou od roku 1994.



Obr. 6 Mojtínska jaskyňa
Autor: Martin Bakoš (9.2.2026)

Jaskyňa v obci Mojtín je situovaná 19 km od Púchova. Hoci je obec s mestom prepojená pravidelnou autobusovou dopravou, samotná jaskyňa sa nachádza 1,5 km od najbližšej zastávky [4]. Napriek tejto skutočnosti je pomerne ľahko dostupná. Obec disponuje vhodným počtom ubytovacích zariadení, ktoré zahŕňajú jeden penzión a viacero chát a chalúp. Okrem vysokého počtu jaskýň a škrapov sa tu nachádza lyžiarske stredisko, skalný útvar Zdenkova brána, technické pamiatky v podobe opustenej bauxitovej šachty či tradičné zemiakové jamy (slúžili na ukladanie predovšetkým zemiakov). V súčasnosti je pri vstupe do Mojtínskej jaskyne osadená len stručná informačná tabuľa. Hoci je miesto vhodné na poznávanie miestnej krajiny alebo využitie vo vyučovacom procese, existuje tu priestor na zlepšenie prezentácie objektu.

3.7 Župný dom

Budova predstavuje národnú kultúrnu pamiatku z konca 18. storočia. Názov však nie je úplne výstižný. Dom síce dala postaviť Trenčianska župa, avšak nikdy nepredstavoval sídlo župy. Mal počas svojej histórie viacero rôznych funkcií - slúžil ako sídlo okresného úradu, následne ako policajný súd. Momentálne je v jeho priestoroch stála archeologická expozícia

Púchovskej kultúry spolu s výstavou bábok divadelného súboru D121. Okrem toho sa v tejto barokovo-klasicistickej budove konajú rôzne kultúrne podujatia [20].



Obr. 7 Župný dom v Púchove
Autor: Martin Bakoš (8.2.2026)

Župný dom sa nachádza priamo v meste Púchov. Vzdialený je iba 1,1 km od železničnej stanice. Mesto je zároveň vybavené viacerými ubytovacími zariadeniami [4]. Nachádzajú sa tu štyri hotely, štyri penzióny, sedem apartmánov a mnoho chát najmä v miestnych častiach Keblie a Cérov. Miesto je ideálne na spoznávanie histórie mikroregiónu. Múzeum je však verejnosti prístupné iba v utorok, štvrtok a nedeľu v poobedňajších hodinách.

3.8 Lednické skalky

Skalný útvar predstavuje prírodnú pamiatku so 4. stupňom ochrany, ide o hodnotný reliéfny útvar bradlového pásma. Areál taktiež predstavuje refúgium teplomilných druhov rastlín a živočíchov trávnych a skalnatých spoločenstiev [16].



Obr. 8 PP Lednické skalky
Autor: Martin Bakoš (28.2.2026)

Skalky sa nachádzajú v obci Lednica, vo vzdialenosti 17 km od mesta Púchov s priamym autobusovým spojením. Nie sú však tak výrazné a ľahko dostupné ako Lednické bradlo s hradom. Ubytovanie je možné priamo v obci v troch rôznych objektoch (chalupa a dva minidomy) so spoločnou kapacitou 10 osôb [4]. Lokalita je vhodná na spoznávanie miestnej krajiny a základných reliéfnych javov bradlového pásma.

Zachované skalné a trávnaté spoločenstvá možno využiť na názorné oboznámenie sa s výskytom teplomilných druhov. Lednické skalky tak vytvárajú vhodný priestor pre spoznávanie miestnej krajiny formou vychádzok.

3.9 Tri skalné vráta

Vráta predstavujú sériu troch skalných tiesňav v Slatinskej doline. Vytvorené boli činnosťou Slatinského potoka vo vápencovom podloží Manínskeho príkrovu. Vráťami vedie cesta III. triedy 1946 pre ktorú bol priechod umelo vytvorený odstránením časti skaly. Prvé vráta, tzv. Belušské vráta, tvoria klesajúci skalný hrebeň vrchu Hradište. Táto lokalita predstavuje dôležité archeologické nálezisko a zároveň sa viaže k povesti o Beluši. Druhé vráta, tiež nazývané Dolné mojtínske vráta, sú vzdialené 3,8 km od prvých. Posledné tretie vráta sú vzdialené 1,7 km od druhých vrát a nazývajú sa taktiež Mojtínska brána [21].



Obr. 9 Prvé skalné vráta
Autor: Martin Bakoš (9.2.2026)

Prvé dve vráta sa nachádzajú na území obce Beluša, tretie vráta na území obce Mojtín. Od mesta Púchov sú vzdialené 11,1 km (prvé), 14,9 km (druhé) a 16,5 km (tretie) [4]. Ubytovanie je možné v oboch obciach, cestou prechádzajú aj autobusy z Púchova. V Beluši a Mojtíne sa nachádza spolu jeden hotel, štyri penzióny a mnoho chát a chalúp. Lokalita je ideálna najmä na cykloturistiku. Taktiež je vhodná na spoznávanie miestnej krajiny, najmä na demonštrovanie vplyvu vodného toku na reliéf. Vzhľadom na vedenie cesty III. triedy priamo cez tiesňavy je potrebné pri využití lokality vo vyučovacom procese zohľadniť bezpečnosť. Vhodné by bolo využiť na geografickú vychádzku iba jedny vráta.

3.10 Veterná veža

Veterná veža predstavuje prírodný skalný útvar v obci Lazy pod Makytou. Nachádza sa v nadmorskej výške 711 m n. m. neďaleko vrchu Makyta. Ide o relatívne málo známu lokalitu neďaleko slovensko-českých hraníc. Obec je vzdialená 24,1 km od mesta Púchov [4]. Ubytovanie je možné priamo v obci, ktorá je spojená s Púchovom autobusovou dopravou. V obci sa nachádzajú tri hotely, viacero chát a chalúp. Táto skala

je však odľahlá a nevedie k nej označená turistická alebo poľná cesta. Lokalita má potenciál na spoznávanie prírodného prostredia horských polôh Javorníkov. Avšak vzhľadom na jej odľahlosť nie je momentálne vhodná na použitie vo vyučovacom procese. Pri aktuálnej situácii je určená najmä pre individuálne poznávanie krajiny skúsenejšími turistami [22][23].



Obr. 10 Veterná veža
Autor: Martin Bakoš (10.2.2026)

Záver

Mikroregión Púchov predstavuje priestor, kde sa kultúrno-historické lokality prelínajú s pestrými prírodnými podmienkami. Analýza desiatich vybraných lokalít ukázala, že toto územie nie je vhodné len pre cestovný ruch, ale je aj cenným priestorom pre geografické vzdelávanie. Identifikované miesta, od bradlových štruktúr v Lednici až po krasové formy v Mojtíne, či zachovalé horské spoločenstvá Javorníkov, dovoľujú žiakom a turistom pozorovať komplexné geografické javy priamo v teréne. Kultúrno-historické pamiatky sú v mikroregióne zastúpené do menšej miery. Avšak historický park s kaštieľom v Lednických Rovniach a Župný dom v Púchove predstavujú hodnotné lokality.

Výsledný zoznam lokalít bol zostavený na základe kritérií dostupnosti, popularity a edukačnej hodnoty. Popularitu sme posudzovali na základe počtu hodnotení na mapových portáloch Google Mapy [22] a Mapy.com [23]. Edukačná hodnota lokalít bola stanovená na základe ich potenciálu pre názorné vyučovanie geografie v súlade so štátnym vzdelávacím programom. Hlavným kritériom bol výskyt konkrétnych javov v teréne, ktoré umožňujú žiakom pochopiť teoretické učivo (napr. krasové formy či vplyv človeka na krajinu) prostredníctvom priameho pozorovania. Zároveň sa posudzovala vhodnosť lokality pre implementáciu uvedenej formy m-learningu prostredníctvom aplikácie Mapy.com.

Realizovanie takejto formy vzdelávania podľa kurikulárnej reformy je vhodné pre 3. cyklus ZŠ v rámci vzdelávacej oblasti človek a spoločnosť. Geografický komponent predmetu človek a spoločnosť obsahuje tematický celok Geografia v teréne. Tento spôsob vyučovania v miestnej krajine prostredníctvom m-

learningu je vhodný, pretože obsahuje viacero požadovaných činností Vzdelávania pre 21. storočie.

Zoznam preukázal, že niektoré lokality, ako Kúpele Nimnica či Historický park v Lednických Rovniach, vykazujú vysokú popularitu. Iné miesta, najmä Veterná veža predstavujú doposiaľ nevyužitý potenciál pre turizmus. Zoznam môže slúžiť ako praktická pomôcka pre pedagógov pri plánovaní geografických vychádzok a exkurzií. Taktiež však slúži na propagáciu mikroregiónu pre účely cestovného ruchu. Prepojenie vybraných lokalít s aktivizujúcimi metódami a digitálnymi technológiami formou mobilného mapovania obohacuje tradičné geografické vychádzky. Takýto prístup nielen zefektívňuje geografické vzdelávanie, ale prostredníctvom práce s reálnymi údajmi v teréne zároveň buduje hlbší vzťah žiakov k miestnej krajine, jej ochrane a prispieva k formovaniu regionálnej identity.

PodĎakovanie

Príspevok vznikol v rámci riešenia projektu KEGA 015UKF-4/2024 Aktivizujúce vyučovacie metódy v prírodovednom vzdelávaní s implementáciou digitálnych technológií.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] DUBCOVÁ, A., CHRASTINA, P., KRAMÁREKOVÁ, H., (2003). *Vademecum literárnej a vedeckej činnosti geografa*. Online. Nitra: UKF, 38 s. ISBN 80-8050-273-0. Dostupné z: https://www.kggrr.fpvai.ukf.sk/images/pdfka/vademecum_2003.pdf [citované 2026-02-17].
- [2] ZAŤKOVÁ, M., (1998). Didaktické metódy a ich aplikácia v zemepise/geografii, 2. časť. *Geografia*, r. 6, č. 2, s. 52-53. ISSN 1335-9258.
- [3] ŠÚ SR. (2024). *DATAcube*. Databáza. Dátum aktualizácie 2026-02-02. Dostupné z: <https://datacube.statistics.sk/> [citované 2026-02-02].
- [4] GKÚ. *Základná mapa*, (2026). Online mapa. Mapa verzia 8.0.6. Dostupné z: <https://zbgis.skgeodesy.sk/mkzbgis/sk/teren?> [citované 2026-02-16].
- [5] *Geomorfologické členenie Slovenska (Mazúr, Lukniš)*, (1986). Online mapa. Dostupné z: <http://apl.geology.sk/temapy/> [citované 2026-02-02].
- [6] ŠOP SR. *Kategórie chránených území v národnej sieti*. Online. Dostupné z: <https://www.biomonitoring.sk/InternalGeoportal/ProtectedSites/ListNationalCategories> [citované 2026-02-04].
- [7] SSC. *Púchov*, (2025). Online mapa. Dátum aktualizácie 2025-01-01. Dostupné z: <https://www.cdb.sk/Files/Galleries/mapyokresov/puchov.jpg> [citované 2026-02-04].
- [8] ŽSR. *Sieť železníc Slovenskej republiky*, (2024). Online mapa. Dostupné z: <https://www.zsr.sk/onas/siet-zeleznic-slovenskej-republiky/> [citované 2026-02-04].
- [9] ŠÚ SR. (2026). *Register právnických osôb, podnikateľov a orgánov verejnej moci*. Databáza. Verzia 2.16.4. Dostupné z: <https://rpo.statistics.sk/new/> [citované 2026-02-05].
- [10] OBEC DOHŇANY. (2026). *Dohňany – oficiálna stránka obce*. Online. Dostupné z: <https://www.dohnany.sk/> [citované 2026-02-07].
- [11] OZ NAŠE POVAŽIE. *Naše Považie*. Online. Dostupné z: <https://www.nasepovazie.sk/sk/stranka/uvod> [citované 2026-02-05].
- [12] DUBCOVÁ, A., KRAMÁREKOVÁ, H., NEMČÍKOVÁ, M., NÉMETHOVÁ, J., OREMUSOVÁ, D. a ďalší, (2012). *Mikrogeografia – krajina okolo nás*. Nitra: UKF, 185 s. ISBN 978-80-558-0112-4.
- [13] MCRAŠ SR. (2026). *Slovakia travel*. Online. Dostupné z: <https://slovakia.travel/kamist/turisticke-regiony> [citované 2026-02-07].
- [14] KÚPELE NIMNICA. (2024). *Kúpele Nimnica*. Online. Dostupné z: <https://www.kupelenimnica.sk/sk/stranka/domov> [citované 2026-02-09].
- [15] DARANSKÁ, M., SIPTÁK, M., KMEŤ, M., (2024). *Čarovný Púchov a okolie*. Banská Bystrica: CBS, 156 s. ISBN 978-80-8144-366-4.
- [16] ŠOP SR. (2017). *Zoznam osobitne chránených častí prírody SR*. Databáza. Dostupné z: <https://data.sopsr.sk/chranene-objekty/> [citované 2026-02-09].
- [17] OBEC LAZY POD MAKYTOU. (2026). *Letecké fotografie obce*. Online. Dostupné z: <https://www.lazypodmakytou.sk/letecke-fotografie-obce.html> [citované 2026-02-22].
- [18] UK. (2026). *Náučný chodník Tri skaly*. Online. Dostupné z: <https://naucnechodniky.eu/naucny-chodnik-tri-skaly/> [citované 2026-02-09].
- [19] *Historický park Lednické Rovne*. Online. Dostupné z: <https://www.parklednickerozne.sk/sk/> [citované 2026-02-10].
- [20] SPOZNAJ SLOVENSKO. (2026). *Župný dom v Púchove*. Online. Dostupné z: <https://spoznajslovensko.eu/zupny-dom-v-puchove/> [citované 2026-02-10].
- [21] OBEC BELUŠA. (2026). *Belušké vráta*. Online. Dostupné z: <https://www.belusa.sk/obcan-turista/turista/tipy-na-turistiku/belusske-vrata/> [citované 2026-02-10].
- [22] GOOGLE. (2026). *Google Mapy*. Online. Dostupné z: <https://www.google.com/maps> [citované 2026-02-23].
- [23] SEZNAM.CZ. (2026). *Mapy.com*. Online. Dostupné z: <https://mapy.com/sk> [citované 2026-02-23].

Edukácia geografie v Maroku

Geography education in Morocco

Boris Brath¹ – Miroslava Trembošová²

^{1,2}Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja FPVaI UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1,
949 01 Nitra,

¹ boris.brath@student.ukf.sk, ² mtrembosova@ukf.sk

Abstrakt

Edukácia sa vo svetle svetových dejín ukázala ako dôležitý prvok ľudského bytia. Výchova a dosiahnuté vzdelanie má multidimenzionálny charakter a je v každej spoločnosti prispôsobená istej populácii.

Cieľom práce je skúmať marocký vzdelávací systém so zameraním na predmet geografia najmä na základných a stredných školách. Práca je metodologicky založená na kvalitatívnej analýze dostupných zdrojov. Výsledky odhaľujú kultúrne odlišný systém vzdelávania, ide o francúzsky typ vzdelávacieho systému, geografia je súčasťou humanitných vied a úzko prepojená s históriou a občianskou výchovou. Výučba geografie sa realizuje formou problémového vyučovania, zameraného predovšetkým na environmentálnu výchovu a klimatické otázky. Analýza tiež potvrdila predpoklad nevyváženej rodovej rovnosti v školskej dochádzke. Práca poskytuje cenné poznatky pre porovnanie geografie v Maroku a na Slovensku, a prispieva k diskusii o globálnych vzdelávacích praktikách.

Kľúčové slová: marocký vzdelávací systém, Maroko, geografia, vzdelávanie, kultúrne odlišnosti

Abstract

Education has proven to be an important element of human existence in the light of world history. Upbringing and teaching have a multidimensional character and are adapted to a certain population in every society.

The aim of the work is to examine the Moroccan educational system with a focus on the subject of geography, especially in primary and secondary schools. The work is methodologically based on a qualitative analysis of available sources. The results reveal a culturally different educational system, it is a French type of educational system, geography is part of the humanities and is closely linked to history and civic education. Geography teaching is implemented in the form of problem-based teaching, focused primarily on environmental education and climate issues. The analysis also confirmed the assumption of unbalanced gender equality in school attendance. The work provides valuable knowledge for comparing geography in Morocco and Slovakia, and contributes to the discussion of global educational practices.

Keywords: Moroccan educational system, Morocco, geography, education, cultural differences

Úvod

Vedný odbor Geografia zahŕňa štúdium ľudských činností a ich vzájomných vzťahov a interakcií s prostredím na lokálnej až globálnej úrovni. Prepája prírodné a spoločenské vedy, a preto sa zaoberá priestorovou variabilitou, teda skutočnosťou, že javy, udalosti a procesy sa líšia v rámci jednotlivých miest aj medzi nimi. Z tohto dôvodu by mala byť považovaná za základnú súčasť vzdelávania všetkých občanov v každej spoločnosti. Vyššie uvedené základy geografie možno považovať za podporu vzdelávania v oblasti udržateľnosti. Podľa Daya a Spronken-Smitha [1] sú interdisciplinárne prístupy, ktoré integrujú tri aspekty – ekonomické, sociálne a fyzické aspekty udržateľnosti – nielenže vhodné pre geografiu, ale zostávajú aj predpokladom pre pochopenie jej mnohých dimenzií.

Severná Afrika je geograficky najbližším africkým regiónom k Európe, a preto má s európskym kontinentom úzke vzťahy. Táto väzba je obzvlášť dôležitá v kontexte migrácie, ktorá významne ovplyvňuje krajiny Európskej únie, vrátane Slovenskej republiky.

V roku 2024 tvorili práve Maročania najväčšiu časť migrantov prichádzajúci západnou stredomorskou cestou do Európy ako ekonomickí migranti. Zároveň podľa štatistík Eurostatu v období rokov 2017 až 2024 podali občania Maroka na Slovensku až 250 žiadostí o azyl [2]. V kontexte geografickej vzdialenosti západnej stredomorskej cesty po hranicu SR, táto vzdialenosť predstavuje cca 3 000 km, čo považujeme za vysoké číslo.

V Maroku je geografia kľúčovým predmetom pre pochopenie miestneho a globálneho prostredia a kultúrnej identity. Je súčasťou širších vzdelávacích reforiem, ktoré podporujú globálne občianstvo a medzikultúrne porozumenie [3,4,5,6].

V Maroku je cieľom rozvíjať kritické myslenie, globálne občianstvo a porozumenie miestnym a globálnym problémom [3,4,5]. Dôležitá je pre nich kultúrna identita a podpora jazyka Amazigh.

V Maroku je dôraz kladený na klimatické zmeny, sociálno-ekonomické interakcie a kultúrnu identitu Amazigh [6].

Edukácia geografie v Maroku je zameraná na rozvoj kritického myslenia, pochopenie globálnych súvislostí a podporu občianskych hodnôt, pričom marocký vzdelávací systém obsahuje špecifický predmet *rekreácia*, ktorý je prepojitelný s predmetom geografia [4,5].

Cieľom tejto štúdie je poznanie kurikula geografického vzdelávania najmä na zakladaných a stredných školách v Maroku.

1 Metódy a postupy

Pri vypracovaní článku sme v úvodnej fáze aplikovali metódu zhromažďovania informácií. V ďalšom kroku bola realizovaná analýza získaných zdrojov, najmä odbornej literatúry, vedeckých článkov a štúdií. Súčasťou spracovania bola aj kvalitatívna analýza. V rámci spracovania bola využitá systémová metóda, vychádzajúca z prístupu, ktorý skúmaný problém chápe ako komplexný systém. Tento prístup umožňuje sledovať logickú nadväznosť jednotlivých krokov vedeckého skúmania, od analytickej fázy až po syntézu. Výsledkom jej aplikácie je systematické usporiadanie obsahu a štruktúrovanie článku do kapitol a podkapitol.

2 Výsledky

2.1 Charakteristika Marockého kráľovstva

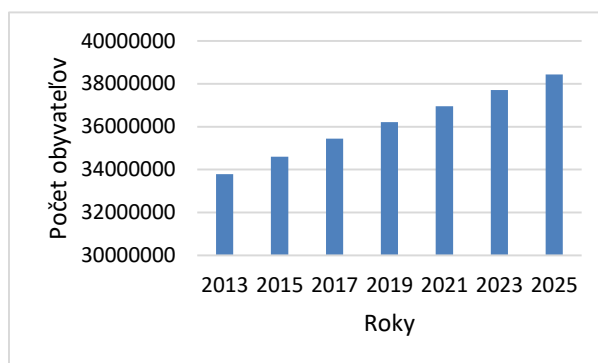
Marocké kráľovstvo (Al-Mamlaka al-Maghribia) je konštitučná monarchia, na čele ktorej stojí kráľ Mohammed VI. Hlavným mestom je Rabat, zatiaľ čo najväčším mestom je Casablanca. Krajina je administratívne rozdelená na 37 provincií a dve samostatné mestá Rabat a Casablanca. Maroko má rozlohu 446 550 km² a jeho oficiálnou menou je marocký dirham (MAD). Obyvateľstvo tvoria prevažne Arabi a miešanci (70 %), pričom Berberi tvoria 29 % populácie. Dominantným náboženstvom je sunnitský islam, ku ktorému sa hlási 98 % obyvateľov [7]. Úradnými jazykmi sú od roku 2011 arabčina a berberština [8].

Marocká ústava z 10. marca 1972 označuje Maroko za suverénny islamský štát, súčasť Veľkého Maghrebu, podporuje jednotu Afriky, medzinárodnú spoluprácu a ochranu mieru [9].

Marocký parlament má 240 členov volených na 4 roky (2/3 priamo, 1/3 nepriamo), rozhoduje o vojne a mimoriadnom stave. Jeho právomoci sú obmedzené, kráľ ho môže rozpustiť a vymenúva vládu, ktorá je zodpovedná jemu aj parlamentu [9].

Marocká populácia (graf 1) za rok 2025 tvorí 38 430 770 obyvateľov a hustota zaľudnenia je 86 oby./km² [10].

Graf 1 Vývoj počtu obyvateľov Maroka v období rokov 2013 – 2025



Zdroj: [10]

Tabuľka 1 Štátne symboly Maroka

<p>Štátny znak</p> 	<p>Tvoria ho dva levy držiace oválny erb so zelenou päťcípou hviezdou dole a slnkom s lúčmi hore.</p>
<p>Štátna vlajka</p> 	<p>Tvorená je červenou farbou, v strede je päťcípá zelená hviezda.</p>
<p>Heslo kráľovstva</p>	<p>„Boh, vlasť, kráľ“</p>
<p>Hymna</p>	<p>Text hymny: „Rodo nezávislých, hor sa k svetlu ...“ napísal Alí Skallí a hudbu zložil Leon Morgon.</p>

Zdroj: [9], [11]

Maroko využíva blízkosť Európy na rozvoj otvorenej trhovej ekonomiky. Investuje do dopravy, prístavov a priemyslu, aby sa stalo obchodným centrom Afriky. Kľúčovým projektom je prístav a zóna voľného obchodu pri Tangeri [12].

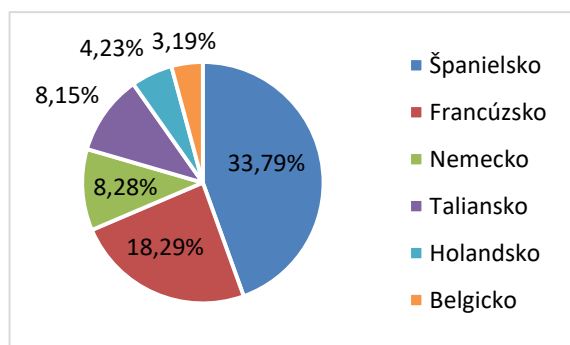
V rámci *primárneho sektora* sa Maroko zameriava najmä na pestovanie paradajok, ovocia, citrusových plodov ako aj na ťažbu nerastných surovín – prírodných fosforečnanov, medenej rudy, zinková rudy, kobaltu, striebra, zlata a ďalších. V *sekundárnom sektore* dominuje výroba zmiešaných hnojív, spracovanie fosfátov, výroba leteckých a automobilových komponentov, ako aj textilná výroba (dámske kostýmy, nohavice, košeľe a pánske obleky). *Terciárny sektor* je

zameraný predovšetkým na cestovný ruch a dopravu [13].

V 80. rokoch bolo Maroko zadlžené, no reformy pod dohľadom MMF ho stabilizovali. Od roku 1999 ekonomika rástla, podporená obchodnými dohodami, no pretrvávajú problémy ako nezamestnanosť, chudoba a negramotnosť; výzvou zostáva reforma školstva a justície [12].

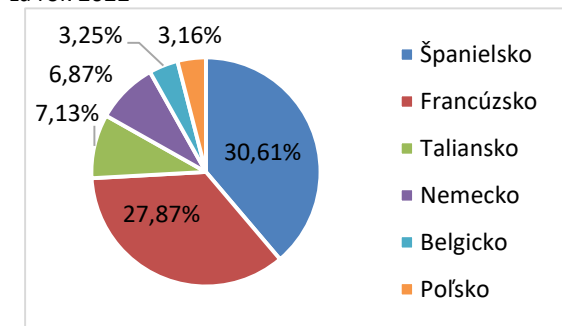
V roku 2022 Maroko exportovalo (graf 2) produkty v hodnote 62,6 miliardy USD, pričom export za posledných päť rokov rástol priemerne o 7,7 % ročne, čím prekonal celkový ekonomický rast. Neropný export rástol rovnakým tempom ako svetový priemer. Dovozy dosiahol 74,5 miliardy USD, čo viedlo k obchodnému deficitu. Tri hlavné destinácie marockého exportu v EÚ sú Španielsko (30,61 %), Francúzsko (27,87 %) a Taliansko (7,13 %). Tri hlavné krajiny marockého importu (graf 3) z EÚ sú Španielsko (33,79 %), Francúzsko (18,29 %) a Nemecko (8,28 %) [13].

Graf 2 Export Maroka do vybraných krajín Európskej únie za rok 2022



Zdroj: [13]

Graf 3 Import Maroka z vybraných krajín Európskej únie za rok 2022



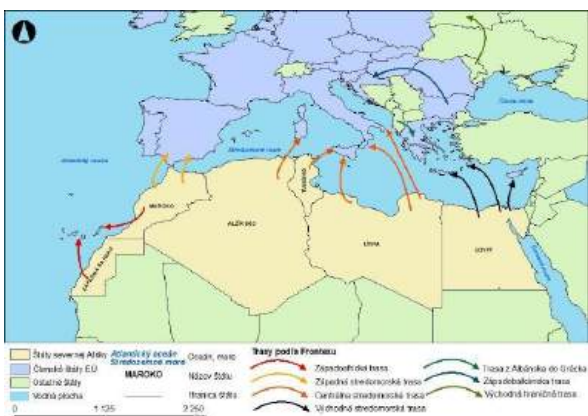
Zdroj: [13]

2.2 Marocká migrácia na Slovensko

Severná Afrika je **tranzitný región**. Mnoho migrantov pochádza z krajín ako sú Mali, Senegal, Guinea, Keňa a Uganda. Títo migranti putujú na sever, odkiaľ sa následne cez migračné trasy (mapa 1) dostávajú do Európskej únie. Často smerujú do Maroka a Tuniska, ktoré sú najbližšie k európskemu kontinentu. Hoci Alžírsko a Egypt majú silné ekonomiky, niektoré ich regióny čelia nezamestnanosti, čo vedie k priamej

migrácii z týchto krajín. Líbya bola v nedávnom období postihnutá politickými konfliktami a vojnou, čo spôsobilo masové presuny obyvateľstva. Západná Sahara je kvôli extrémne náročným klimatickým podmienkam, kde sucho a nedostatok vody negatívne ovplyvňuje život, tiež príčinou migrácie [14].

Mapa 1 Migračné trasy afrických utečencov do Európskej únie

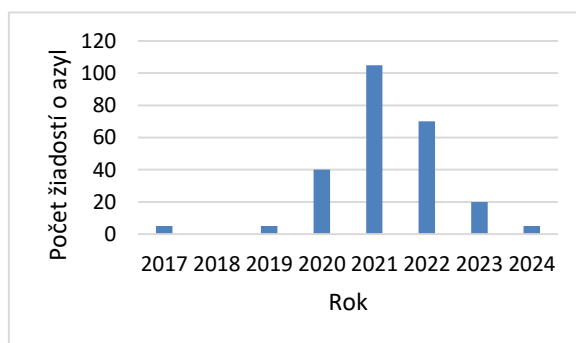


Zdroj: [15]

Autor: Brath, 2025 by ArcGIS 10.8.

Za posledných 9 rokov požiadalo o azyl 250 Maročanov, ktorí na územie SR prišli západnou migračnou cestou, najviac v roku 2021 (graf 4).

Graf 4 Počet marockých žiadateľov o azyl na Slovensku v období rokov 2017 – 2024



Zdroj: [16]

2.3 Marocký vzdelávací systém

Ústredným štátnym orgánom zodpovedným za spravovanie vzdelávania v Maroku je Ministerstvo národného školstva, predškolských zariadení a športu. Riadi vzdelávanie na všetkých úrovniach verejného aj súkromného školstva. Marocká národná strategická vízia na roky 2015 – 2023 určila vytvorenie regionálnej akadémie vzdelávania a odbornej prípravy, ktoré realizujú národnú vzdelávaciu politiku. Regionálne riaditeľstvá sú zodpovedné za poskytovanie

vzdelávacích služieb a implementáciu smerníc stanovených na národnej alebo regionálnej úrovni [17].

V Maroku je povinná školská dochádzka pre detí od šiestich rokov. Rodičia majú možnosť výberu medzi bezplatným verejným a plateným súkromným vzdelávacím zariadením. Školský rok trvá od septembra do polovice júla nasledujúceho kalendárneho roka, pričom sú v ňom zahrnuté viaceré prázdninové obdobia v októbri, decembri, januári, marci, apríli a v máji [18].

Ministerstvo predstavilo plán na roky 2022 – 2026, ktorého hlavným cieľom je zavedenie nového modelu riadenia vzdelávacej reformy. Plán zahŕňa 12 cieľov zameraných na zásadné zlepšenie v oblasti prípravy študentov, učiteľov a vzdelávacích inštitúcií. Tento plán sa sústreďuje na tri hlavné strategické priority, ktoré chce dosiahnuť do roku 2026 [17]:

- 1) Zlepšenie základného vzdelávania,
- 2) Podpora otvorenosti a občianskej angažovanosti,
- 3) Zabezpečenie povinného vzdelávania pre všetky deti bez rozdielu pohlavia.

Marocký vzdelávací systém sa v súčasnosti člení na predškolské, základné, stredoškolské a vysokoškolské vzdelanie.

2.3.1. Predškolské a základné vzdelanie

Predškolské vzdelanie v Maroku nie je povinné. Rodičia majú možnosť vybrať si medzi dvoma zariadeniami. Prvý typ zariadenia je súkromná materská škola, ktorá sa zameriava na rozvoj čítania a matematiky. Druhý typ zariadení sú verejné školy Koránu, ktoré sa zameriavajú predovšetkým na boj proti negramotnosti (80 % marockých detí navštevuje tento druhý typ zariadenia) [18].

V súčasnosti žiaci vo veku od šiestich do dvanástich rokov povinne navštevujú základnú školu. Dĺžka štúdia na základnej škole trvá 6 rokov. Obsah vzdelávania je nasledovný: čítanie, sociálny rozvoj, arabčina a cudzí jazyk [19].

Žiaci po absolvovaní základnej školy obdržia certifikát Certificat d'Études Primaires (CEP), ktorý potvrdzuje ukončenie tohto stupňa vzdelávania. Na základe tohto certifikátu sa môžu uchádzať o prijatie na strednú školu [19].

Marocký vzdelávací systém prešiel reformou, ktorá zahŕňa prepojenie predškolského a základného vzdelávania do jednotného 8-ročného cyklu. Tento cyklus je rozdelený na základný a stredný, pričom predškolské vzdelávanie je integrované do základného cyklu [20].

Ciele tejto reformy boli: zabezpečiť rovnosť príležitostí pre všetky marocké deti od útleho veku, poskytnúť stimulujúce vzdelávacie prostredie na rozvoj potenciálu, osvojiť si náboženské, etické, občianske a ľudské hodnoty, získať vedomosti a zručnosti v arabčine a cudzích jazykoch, rozvíjať reflexiu, komunikáciu a adaptáciu, osvojiť si základné technické, odborné, športové a umelecké zručnosti [20].

Predškolské vzdelávanie (4 – 6 rokov) je zamerané na fyzický, kognitívny a emocionálny vývoj; rozvoj senzorio-motorických, časopriestorových a vyjadrovacích schopností; zasvätenie k náboženským, etickým a občianskym hodnotám; prax v základných praktických a umeleckých činnostiach; príprava na čítanie a písanie v arabčine [20].

Základná škola (6 rokov) je rozdelená na dva cykly:

- 1) Prvý cyklus (2 roky): Žiaci si v rámci tohto cyklu upevnia predškolské vzdelanie, cyklus sa zameriava na rozvoj základných vedomostí a zručností v arabčine a cudzom jazyku, žiaci si osvoja základné pojmy zdravia a *životného prostredia*, žiaci sa zamerajú na rozvoj ikonických, grafických a hravých kapacít a žiaci si taktiež osvoja pravidlá života v spoločnosti [20].
- 2) Druhý cyklus (4 roky): Žiaci si prehĺbia a rozšíria vzdelanie, cyklus sa zameria na rozvoj schopností porozumieť a vyjadrovať sa v arabčine a v cudzom jazyku, žiaci sa zamerajú na rozvoj praktickej inteligencie, žiaci sa zamerajú na objavovanie prírodného, sociálneho a kultúrneho prostredia a žiaci si taktiež osvoja úvod do moderných technológií a druhého cudzieho jazyka. Žiaci končia základnú školu s vysvedčením [20].

Počas 6 rokov základného vzdelávania žiaci absolvujú niekoľko predmetov. *Geografia* sa na základnej škole vyučuje spolu s históriou a občianskou výchovou od 5. a 6. ročníka, kde týždenná dotácia je 1h30/90 min (tab. 2).

Tab. 2 Prehľad predmetov a časová dotácia vyučovacích hodín na marockej základnej škole

Predmet / Úroveň	1. Ročník	3. Ročník	5. Ročník
	2. Ročník	4. Ročník	6. Ročník
Islamská výchova	4 hodiny	3 hodiny	3 hodiny
Arabský jazyk	11 hodín	6 hodín	6 hodín
Francúzsky jazyk	-	8 hodín	8 hodín
Umelecké a technické vzdelávanie	2 hodiny + 2 hodiny 30 min.	1 hodina + 1 hodina 30 min.	-
História, geografia a občianska výchova	-	-	1 hodina 30 min.
Matematika	5 hodín	5 hodín	5 hodín
Telesná výchova	2 hodiny	2 hodiny	2 hodiny
Vedecké aktivity	1 hodina 30 min.	1 hodina 30 min.	1 hodina 30 min.
Rekreácia	2 hodiny	2 hodiny	2 hodiny

Zdroj: [20]

2.3.2. Stredoškolské vzdelanie

Stredoškolské vzdelávanie je rozdelené do dvoch fáz a každá trvá tri roky. Prvá fáza je pre študentov od 12 do 15 rokov života študenta a druhá fáza je od 15 do 18 rokov života študenta, ktorý bol prevzatý z francúzskeho systému organizácie vyučovania [19].

1) Nižšie stredoškolské vzdelanie („collège“)

Je ukončené skúškami, ktoré sa nazývajú Brevet d'Enseignement Collégial (BEC) [19].

2) Vyššie stredoškolské vzdelanie („lycée“)

Vyššie stredoškolské vzdelávanie je ukončené skúškami na Attestation du Baccalauréat (ak si študent vyberie *všeobecný vzdelávací program*) a na Baccalauréat d'enseignement technologique et professionnel (ak si študent vyberie študijný program *technologického a odborného vzdelávania*) [19].

Študenti získajú „Attestation du Baccalauréat“ po 3 rokoch stredoškolského štúdia. Prvý ročník je spoločný, od druhého si volia zameranie (jazyky, prírodné vedy alebo matematika). Podmienkou je ukončené nižšie stredoškolské vzdelanie a certifikát umožňuje štúdium na vysokej škole [19].

Štúdium „Baccalauréat d'enseignement technologique et professionnel“ trvá 3 roky. Prvý ročník je spoločný, od druhého si študenti volia jedno z viacerých zameraní (napr. inžinierstvo, elektrotechnika, strojárstvo, ekonomika). Štúdium je prakticky orientované, podmienkou je ukončené nižšie stredoškolské vzdelanie a absolvent môže pokračovať na vysokej škole [19].

Záverečné skúšky na stredných školách sa skladajú z regionálnej skúšky (stanovenej akadémiou – školský obvod, ktorý má na starosti miestne stredné školy) a centrálnej (celoštátnej) písomnej skúšky. Výsledné známky sa určujú podľa špecifického vzorca [19]:

- 25 % tvorí priemer známok z posledného ročníka,
- 25 % získava študent za regionálnu skúšku,
- 50 % za celoštátnu písomnú skúšku.

2.3.3. Vysokoškolské vzdelanie

Vysokoškolské vzdelávanie v Maroku zabezpečujú rôzne inštitúcie, medzi ktoré patria *univerzity, neuniverzitné inštitúcie vysokoškolského vzdelávania a „grandes écoles“* [19].

Univerzity v Maroku poskytujú študijné programy zamerané na vedu a výskum. Každá univerzita sa skladá najmenej z troch fakúlt a ďalších oddelení. Univerzity sú verejné alebo súkromné [19]. Okrem univerzít existujú v Maroku neuniverzitné inštitúcie vysokoškolského vzdelávania, ktoré nie sú s univerzitami prepojené. Tieto inštitúcie sú známe pod označením *établissements d'enseignement supérieur ne relevant pas des universités* (EESNRPU). Neuniverzitné inštitúcie sú verejné a súkromné [19].

V Maroku existujú aj inštitúcie vyššieho vzdelávania, ktoré sa odlišujú od univerzít a vysokých škôl. Tieto

inštitúcie, známe ako *Grandes écoles*, sa zameriavajú na prípravu budúcich vedúcich pracovníkov prostredníctvom kombinácie odborného a akademického vzdelávania. Po úspešnom absolvovaní študenti získajú certifikáty, akým je napríklad *Diplôme d'Ingénieur d'État* [19].

Marocké ministerstvo školstva aktuálne plánuje integráciu stredoškolského a vysokoškolského vzdelávania do jednotného 6-ročného cyklu, ktorý bude pozostávať z dvoch stupňov: vysokoškolského sekundárneho cyklu a kvalifikačného sekundárneho cyklu [21].

V Maroku absentuje celoživotné vzdelávanie a vzdelávanie „Univerzita tretieho veku“ tzv. U3V.

2.3.4. Príprava učiteľov geografie v Maroku

V marockom vzdelávacom systéme sa učitelia geografie nepripravujú v rámci samostatného učiteľského študijného programu. Príprava učiteľov prebieha dvojstupňovo.

Najskôr absolvujú univerzitné štúdium v odborevej oblasti, pričom geografia sa najčastejšie študuje na fakultách typu Faculty of Letters and Human Sciences zameraných na humanitné a spoločenské vedy, a následne pedagogickú prípravu v regionálnych centrách. V oblasti prírodných vied sú budúci učitelia pripravovaní najmä v rámci odboru „Life and Earth Sciences (SVT)“, ktorý integruje biológiu a geológiu. Geologické a čiastočne geografické obsahy sú tak súčasťou širšieho predmetu SVT a neexistuje samostatná aprobácia učiteľstva geografie [25].

2.4. Edukácia predmetu geografia v Maroku na primárnom a sekundárnom stupni vzdelávania

V Maroku sa učebné osnovy geografie zameriavajú na fyzickú geografiu, ktorá zahŕňa témy ako klimatické zmeny a prírodné vlastnosti krajiny (najmä samotného Maroka), a na humánnu geografiu (Maroka), ktorá sa zaoberá obyvateľstvom, urbanizáciou a kultúrnou krajinou. Dôležitou súčasťou je aj environmentálna výchova, ktorá sa zameriava na témy ako klimatické zmeny [3,4,5,6].

Vyučovanie geografie v Maroku je ovplyvnené globalizáciou a reformami, ktoré podporujú inovatívne metódy a aktívne zapájanie študentov. Dôležitou úlohu zohráva aj kultúrna dimenzia, najmä v súvislosti s jazykom a identitou Amazigh [3,4,5,6].

V Maroku sa geografia na základných školách vyučuje v 5. a 6. ročníku spolu s históriou a občianskou výchovou (tab. 2).

Na stredných školách je geografia súčasťou predmetu *sociálne vedy*, ktorý zahŕňa aj históriu a občiansku výchovu. Týždenná dotácia je 1 hodina a 30 minút [22].

Ukážky mapových zobrazení územia štátu Maroko v rôznych marockých učebniciach (obr. 1). Obrázok 1A

až 1C sú z učebníc určené pre základné školy. (Obr. 1D až 1F) sú mapové výrezy z učebnice predmetu „Sociálne vedy“ (SŠ) v rámci ktorého sa vyučuje aj geografia.

Podľa štúdie od Chentoufiho, Anissa a Mamdouha [23] nie je vzdelávanie v Maroku formálne rozdelené podľa pohlavia, no autori poukazujú na výraznú rodovú nerovnosť medzi chlapcami a dievčatami. Táto nerovnosť je dôsledkom sociálnych a kultúrnych noriem. Tradičné predstavy o úlohe žien v marockej spoločnosti často obmedzujú dievčatá na domáce povinnosti, čím im bránia v plnohodnotnom vzdelávaní. V dôsledku toho sú dievčatá v školách menej zastúpené a častejšie predčasne ukončujú školskú dochádzku v porovnaní s chlapcami.

Na základe ďalšej štúdie od Bendrau a Sakale [24] sme zistili, že v Maroku vstupuje do popredia kritická pedagogika, ktorá rozvíja schopnosť kritického myslenia a prehodnocuje zažitú normu a zároveň posilňuje rovnosť mužov a žien vo vzdelávacom prostredí. Taktiež táto pedagogika prispieva k budovaniu inkluzívneho vzdelávacieho prostredia.

3 Inšpirácia marockým vzdelávaním geografie

V kontexte tvorby nového štátneho vzdelávacieho programu predkladáme odporúčania na zlepšenie edukácie geografie na Slovensku, vychádzajúce z inšpirácií marockým modelom geografického vzdelávania, s ohľadom na nadchádzajúcu reformu:

- 1) Zlúčiť viac tém, ktoré podporujú globálne občianstvo, ako sú medzikultúrne vzťahy, migrácia, globálne výzvy (klimatické zmeny, chudoba).
- 2) Zvýšiť dôraz na environmentálnu geografiu, najmä na témy ako klimatické zmeny a ochrana prírody.
- 3) Zaviesť viac praktických aktivít, ako sú exkurzie, výlety a terénne cvičenia, ktoré by umožnili študentom aplikovať teoretické poznatky v praxi.
- 4) Viac prepojiť geografiu s kultúrnymi a historickými aspektmi, podobne ako to robí Maroko s jazykom a identitou Amazigh.
- 5) Prepojiť geografiu s ďalšími predmetmi, ako sú dejepis, biológia a environmentalistika, podobne ako to robí Maroko v rámci predmetu sociálne vedy.
- 6) Zvýšiť hodinovú dotáciu geografie v jednotlivých ročníkoch

Záver

Vzdelávanie sa považuje za kľúčovú stratégiu na dosiahnutie trvalo udržateľného rozvoja a spôsoby, akými vyučovacie systémy fungujú formujú identity jednotlivcov. Z výsledkov nášho výskumu vyplynuli tieto závery:

- 1) V Maroku je vyučovací systém francúzskeho typu.
- 2) Geografia je súčasťou humanitných vied.

- 3) Geografia sa na základných školách **nevyučuje** ako samostatný predmet, ale vyučuje sa spolu s občianskou výchovou a dejepisom. Na stredných školách je súčasťou predmetu sociálne vedy, ktorý zahŕňa dejepis a občiansku výchovu.
- 4) Vyučovanie má silný náboženský motív.
- 5) Vyučovacia hodina trvá **60 minút**.
- 6) V marockých školách čoraz viac využívajú **moderné didaktické pomôcky**, ako sú prezentácie, interaktívne hodiny a vizuálne ukážky, čo prispieva k efektívnejšiemu vyučovaniu.
- 7) Príprava učiteľov geografie v Maroku má **integrovaný charakter** a **neprebíha** ako samostatný študijný program.
- 8) Počas roka majú **76 dní** prázdnin

Edukácia geografie v Maroku zdôrazňuje význam miestnej krajiny a kladie dôraz na kritické myslenie, environmentálnu výchovu a globálne občianstvo. Geografia, hoci nie je samostatným predmetom, je významnou súčasťou učebných osnov, integrovanou do predmetov ako „sociálne vedy“. Študenti sa prostredníctvom nej učia nielen o miestnych špecifikách Maroka, ale aj o globálnych súvislostiach, čo prispieva k lepšiemu pochopeniu migračných procesov. Je zrejmé, že edukácia naprieč rôznymi spoločnosťami musí reflektovať dynamické interakcie medzi priestorovými procesmi a vzdelávaním.

Použitá literatúra

- [1] DAY, T. and SPRONKEN-SMITH, R., (2017). Geography education: Fieldwork and contemporary pedagogy. In *International Encyclopedia of Geography: People, the Earth, Environment and Technology*; Richardson, D., Castree, N., Goodchild, M.F., Kobayashi, A., Liu, W., Marston, R.A., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2017
- [2] EUROSTAT. (2026). *Migration*. Database. Date of update 2025-02-15. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database> [viewed 2026-02-01].
- [3] CORNWELL, G. and ATIA, M., (2012). Imaginative geographies of Amazigh activism in Morocco. *Social & Cultural Geography*, vol. 13, no. 3, pp. 255 – 274. Available from: <https://doi.org/10.1080/14649365.2012.677471> [viewed 2026-02-01].
- [4] SALMI, H., (2024). Global threads in Moroccan education: weaving identities and bridging disparities. *The Review of Contemporary Scientific and Academic Studies*, vol. 4, no. 2, pp. 1 – 7. Available from: <https://doi.org/10.55454/rcsas.4.02.2024.005> [viewed 2026-02-01].
- [5] MLILESS, M.; LAROUZ, M. and ISAMIL, M., (2018). An ecolinguistic analysis of environment texts in Moroccan English language teaching textbooks. *International Journal of Research in Environmental*

Studies, vol. 5, no. 7, pp. 103 – 116. ISSN 2059-1977.

[6] MOUSSAOUY, A.; ABDERBI, J. and DAOUDI, M., (2014). Environmental education in the teaching and the learning of scientific disciplines in Moroccan high schools. *International Education Studies*, vol. 7, no. 4, pp. 33 – 46. Available from: <https://doi.org/10.5539/ies.v7n4p33> [viewed 2026-02-02].

[7] PAULÍK, I., (2004). *Maroko*. Praha: Freytag & Berndt, 191 s. ISBN 80-7316-149-4.

[8] FISCHER. (2026). *Dôležité informácie pred dovolenkou v Maroku*. Online. Dostupné z: <https://www.fischer.sk/maroko> [citované 2026-03-29].

[9] FILIP, J.; MUZIKÁŘ, J.; HRBEK, I.; FILIPOVÁ, B.; STRAKA, M. a ďalší, (1981). *Maroko*. PRAHA: PRESSFOTO, 190 s.

[10] UNITED NATIONS. (2026). *Population Change*. Database. Date of update 2024-12-20. Available from: <https://population.un.org/dataportal/data/indicators/50/locations/12,818,434,504,788,732/start/2019/end/2024/table/pivotbylocation?df=82e9bd99-631f-41ec-8232-b6e3fc44d8ab> [viewed 2026-02-04].

[11] WIKIPÉDIA. (2026). *Maroko*. Online. Dostupné z: <https://sk.wikipedia.org/wiki/Maroko> [citované 2026-02-04].

[12] MOOD'S ANALYTICS. (2026). *Marocco – Economic Indicators*. Online. Available from: <https://www.economy.com/morocco/indicators> [viewed 2026-02-7].

[13] GROWTH LAB. (2026). *The atlas of economic complexity*. Online. Available from: <https://atlas.hks.harvard.edu/> [viewed 2026-02-9].

[14] BRATH, B., (2024). Špecifiká migrácie zo severnej Afriky do Európskej únie. In: *Študentská vedecká konferencia*. Nitra: 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, 155 – 162 s. ISBN 978-80-557-2147-7.

[15] FRONTTEXT. (2026). *Migratory Routes*. Online. Available from: <https://www.frontex.europa.eu/what-we-do/monitoring-and-risk-analysis/migratory-routes/migratory-routes/> [viewed 2026-02-11].

[16] EUROSTAT. (2026). *Migration*. Database. Date of update 2025-02-15. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database> [viewed 2026-02-13].

[17] SCRIBD. (2026). *Morocco*. Online. Available from: <https://www.scribd.com/document/793130320/Morocco> [viewed 2026-02-13].

[18] LE PETIT JOURNAL. (2026). *The School System in Morocco: A Complete Guide*. Online. Available from: <https://lepetitjournal.com/casablanca/education/systeme-scolaire-maroc-guide-complet-360535> [viewed 2026-02-14].

[19] NUFFIC. (2026). *Morocco*. Online. Available from: <https://www.nuffic.nl/en/education->

[systems/morocco](https://www.nuffic.nl/en/education-systems/morocco) [viewed 2026-02-14].

[20] KINGDOM OF MOROCCO MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION PRESCHOOL AND SPORTS. (2026). *Preschool and primary education*. Online. Available from:

<https://www.men.gov.ma/Fr/Pages/enseignement-presco-prim.aspx> [viewed 2026-02-14].

[21] KINGDOM OF MOROCCO MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION PRESCHOOL AND SPORTS. (2026). *Secondary and higher education*. Online. Available from: <https://www.men.gov.ma/Fr/Pages/Ensc-collegial.aspx> [viewed 2026-02-14].

[22] WIKIMEDIA OUTREACH. (2026). *Education in Morocco*. Online. Available from: <https://outreach.wikimedia.org/wiki/Education/RW/Morocco/Curriculum> [viewed 2026-02-14].

[23] CHENTOUFI, M.; ANISS, A. and MAMDOUH, N., (2024). Impact of Gender Inequalities on Education in Morocco: An Economic Analysis of Barriers and Opportunities. *International Journal of Civilizations Studies & Tolerance Sciences*, vol. 1, no. 1, pp. 18 – 27. Available from: <https://www.emiratesscholar.com/system/publish/100524110559691.pdf> [viewed 2026-02-14].

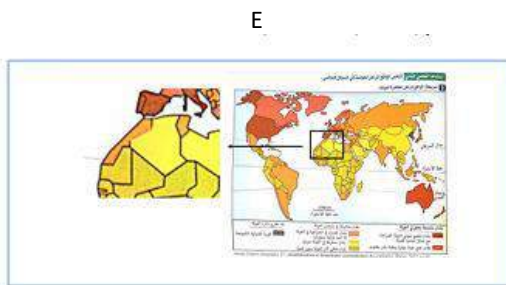
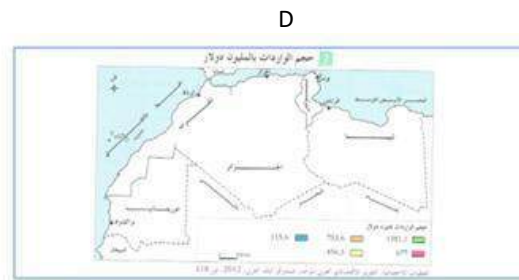
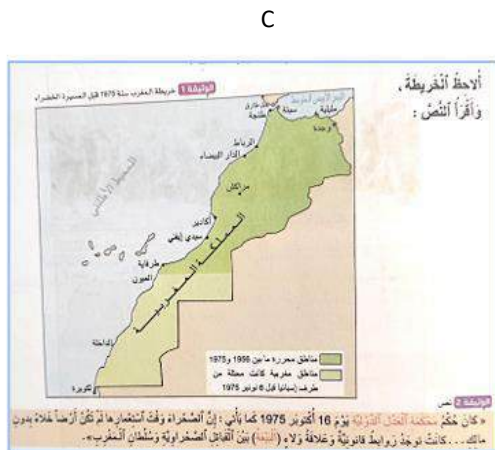
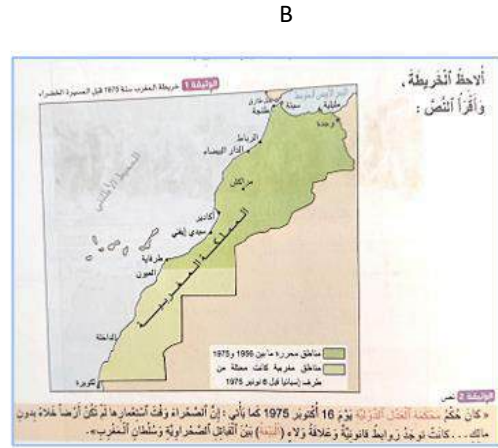
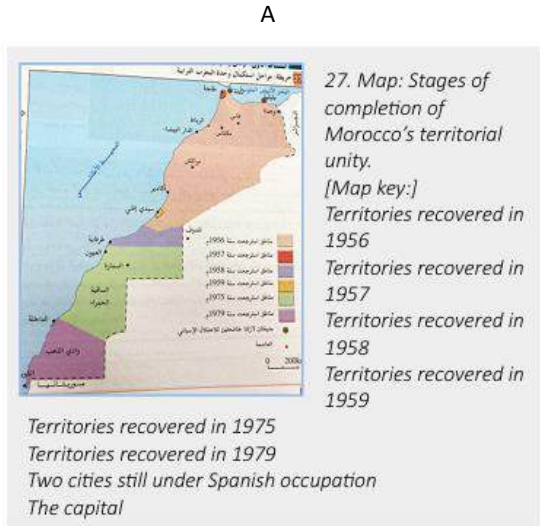
[24] BENDRAOU, R. and SAKALE, S., (2024). Critical pedagogy and gender norms: insights from Moroccan educational settings. *Society Register*, vol. 8, no. 4, pp. 51 – 66. Available from: <https://doi.org/10.14746/sr.2024.8.4.03> [viewed 2026-02-14].

[25] CHAKIB, A. and TALIBI, M., (2025). Teaching geology at the secondary college in Morocco: difficulties and remedies. Online. *Advances in geosciences*, vol. 66, no. 1, pp. 1 – 9. Available from: <https://doi.org/10.5194/adgeo-66-1-2025> [viewed 2026-03-29].

[26] IMPACT-SE. (2026). *The Moroccan Curriculum: Education in the Service of Tolerance*. Online. Available from: <https://www.impact-se.org/wp-content/uploads/Education-in-the-Service-of-Tolerance-The-Moroccan-Curriculum-2013-2022-IMPACT-se-Report.pdf> [viewed 2026-02-16].

Prílohy

Obr. 1 Ukážky mapových zobrazení územia Maroka v rôznych učebniciach



Zdroj: [26]

Zdroj: [26]

Dokumentácia krasových javov v kontexte geohazardov v lokalite Šmýkanec

Documentation of karst phenomena in the context of geohazards in the Šmýkanec locality

Ján Laco¹ - Matej Masný²

^{1,2}Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹jlaco@student.umb.sk ²matej.masny@umb.sk

Abstrakt

Práca sa zaoberá dokumentáciou krasových javov – krasových jám na poli v lokalite Šmýkanec, neďaleko Kráľovej Lehoty. Tieto javy so sebou prinášajú isté riziko pre poľnohospodársku činnosť. Práca obsahuje mapové zobrazenie skúmaných javov, morfológickú charakteristiku a pravdepodobnú genézu krasových jám. Súčasťou je aj veľmi stručný náhľad do problematiky krasu so zameraním sa na klasifikácie a problematiku krasových jám.

Cieľom práce bolo zdokumentovať krasové jamy v lokalite Šmýkanec. V teréne dokumentácia prebehla s využitím GNSS roveru. V prípade jednej krasovej jamy, ktorú je možné klasifikovať ako jaskyňu, bola použitá metóda polygónového ťahu v jaskyni. Následne boli vyhotovené mapové podklady a vytvorená morfológická charakteristika týchto javov. Súčasťou je aj charakteristika územia, pričom na genéze javov sa podieľa najmä geologické podložie a jeho hydrogeologické vlastnosti.

Kľúčové slová: Liptovská kotlina, krasová jama, jaskyňa

Abstract

The thesis deals with the documentation of karst phenomena – sinkholes located in a field in the Šmýkanec area, near Kráľova Lehota. These phenomena pose a certain risk to agricultural activities. The thesis includes a map representation of the investigated features, their morphological characteristics, and the probable genesis of the sinkholes. It also provides a very brief overview of karst issues, focusing on classifications and the problematics of sinkholes. The aim of the thesis was to document the sinkholes in the Šmýkanec locality. Field documentation was carried out using a GNSS rover. In the case of one sinkhole that can be classified as a cave, the cave polygon method was used. Subsequently, map documentation was

prepared and a morphological characterization of these features was created. The thesis also includes a description of the area, with the geological bedrock and its hydrogeological properties playing a key role in the genesis of the phenomena.

Key Words: Liptovská kotlina, sinkhole, cave

Úvod

Slovenská republika má rôzne geologické podložie, čoho dôsledkom je vznik rôznych typov reliéfu. Na rozpustných horninách vzniká krasový reliéf[1]. Krasovatenie prebieha na povrchu aj v podzemí, kde sa vytvárajú morfológicky pestré formy, od malých nepreliezných dutín až po jaskynné systémy, dlhé desiatky kilometrov. Tieto procesy prebiehajú najčastejšie v karbonátoch. Krasovatenie sa môže prejavíť aj na území, kde na povrch nevystupujú horniny vhodné na krasovatenie. Pokiaľ sa tak deje v poľnohospodársky využívannej kotlinovej krajine môže to so sebou prinášať aj rôzne riziká.

1 KRAS - TEORETICKÁ ČASŤ

Krasový reliéf, tak isto ako aj ostatné formy reliéfu sú odrazom geologického podkladu. Tento reliéf je tvorený formami, ktoré vznikli vplyvom vody, resp. vody obohatenej najčastejšie o CO₂ v prostredí karbonátov či v niektorých prípadoch aj iných rozpustných hornín [1]. Pre kras sú typické špecifické morfológické a hydrologické javy. Medzi formy, ktoré svedčia o povrchovom krasovatení patria: škrapy, závrtvy, úvaly, polja a ďalšie. Príkladom podzemných krasových foriem sú jaskyne a rôzne krasové dutiny. Po morfológických znakoch je druhou základnou črtou krasu špecifická hydrologia/hydrogeológia. Pre kras je typický systém ponorov, podzemných tokov a vyvieraciek. Na formovaní reliéfu v krase sa podieľajú popri korózných procesoch aj ďalšie, akými sú napr. mechanické zvetrávanie, gravitačné procesy, fluvialná erózia, kryogénne procesy, ako aj v niektorých

prípadoch antropogénna činnosť. Reliéfne formy krasu nachádzajúce sa na povrchu sú následkom procesov, ktoré vedú k celkovému znižovaniu nerovnosti zemského povrchu. Je dôležité spomenúť, že procesy krasovatenia nemusia prebiehať len na odkrytom skalnom povrchu, ale aj pod pokryvom sedimentov, kde ich priepustnosť a hrúbka nebráni a ešte umožňuje infiltráciu meteorických priesakových vôd[2].

Jaskyňa je prírodný jav, ktorý je typický pre kras, no nemusí byť výlučne viazaný iba na kras. Príkladmi nekrasových jaskýň sú napr. vulkanické, tektonické, eolické, medzivrstvové, či príbojové. Jaskyňa je najčastejšie definovaná ako dutina v zemskej kôre, ktorej šírka alebo výška pričného profilu na okraji nadložných hornín je menšia ako dĺžka a zároveň je prístupná pre človeka[3]. Podobne definuje jaskyňu aj zákon o ochrane prírody a krajiny s tým, že minimálna dĺžka jaskyne musí byť 2 m [4].

1.1 Závrtv (krasové jamy)

Pod závrtom rozumieme uzavretú depresiu terénu rôznych rozmerov, ktorá vo väčšine prípadov býva širšia ako hlbšia. Sú to formy veľmi rozšírené na povrchu krasových území[1]. Klasifikáciou krasových jám sa zaoberalo viacero autorov. Klasifikácia závrtov je možná jednak na základe morfológických znakov a jednak na základe genézy.

Na základe genézy rozlišujeme tieto typy krasových jám:

- *disolučné krasové jamy* - sú dôsledkom rozpúšťania krasovatejúcej horniny vodou. Uhlíčan vápenatý sa v rozpustenej forme dostáva hlbšie do podzemia a cez pramenné oblasti častokrát vyviera opäť na povrch v inej lokalite. Ubúda tak horniny na povrchu. Tento proces prebieha zhora nadol, a tak vzniká depresia.

- *prepadové krasové jamy* - vznikajú pôsobením gravitačných síl odrobovaním, odlamovaním až prepadnutím podzemných dutín. Tento proces prebieha zdola nahor. Proces sa najčastejšie viaže na tektonicky značne porušené miesta – križovatky tektonických puklín.

- *aluviálne krasové jamy* - vznikajú v teréne, kde karbonáty prekryvajú nadložné sedimenty. Krasové procesy prebiehajú pod pokrývkou nadložných vrstiev na styku s krasovou horninou. Rozširujú sa pukliny v krasovej hornine, do ktorých sa následne splavujú aj nadložné sedimenty a úbytok sedimentov sa následne prejavuje na povrchu terénu. Pre tento typ závrtov sú časté lievikovité morfológické formy.

- *sufózne krasové jamy* sa vytvárajú v krasových územiach, kde karbonátové horniny ležia pod nadložnými nerozpustnými vrstvami. Podzemná voda rozpúšťa krasové horniny, čím vytvára priestor na to, aby povrchové vrstvy postupne sadali a na povrchu vznikajú depresie.

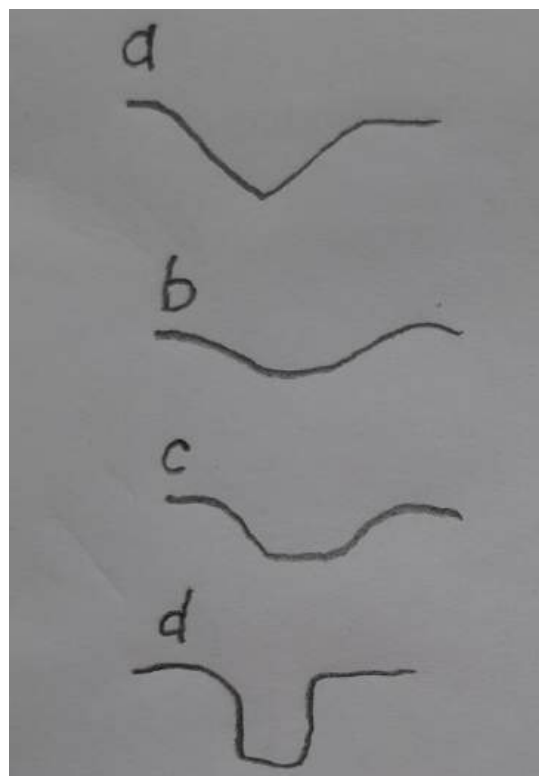
Na základe tvaru závrtov je postavená klasifikácia podľa morfológických kritérií. Základom tejto klasifikácie je sklon svahov závrtu a pomer pôdorysu k hĺbke.

- *Miskovité krasové jamy* sa vyznačujú pomerom pôdorysu k hĺbke v rozsahu 5:1 až 10:1 a sklonom svahov 12° až 15°.

- *Lievikovité krasové jamy* - pomer pôdorysu k hĺbke sa pri tomto type pohybuje v rozsahu 2:1 až 3:1 a sklon svahov sa pohybuje okolo 30° až 45°.

- *Kotlovité krasové jamy* - jedná sa o prechodný typ medzi oboma predchádzajúcimi typmi, sklon svahov sa pohybuje v rozsahu 15° až 30°.

- *Studňovité krasové jamy* svojim tvarom môžu pripomínať studňu. Majú kruhový pôdorys a strmé steny, zvyčajne skoro kolmé[2]. Jednotlivé morfológické typy krasových jám je možné vidieť na Obr. 1.



Obr. 1 Morfológické typy krasových jám. a – lievikovitá, b – miskovitá, c – kotlovitá, d – studňovitá
Zdroj: [2]

2 Metodika práce

Východiskom práce bola terénna práca/dokumentácia krasových javov v lokalite Šmýkanec. Jednalo sa o javy, ktorými sa zaoberá táto práca, ale aj o ďalšie jaskyne, ktoré sa nachádzajú v blízkom okolí a spomínané sú v charakteristike územia. Následne boli údaje získané v teréne, softvérovo spracované, najmä v programe arcMap 10.8.1.

2.1 Práca v teréne

K dokumentácii krasových jám na poli pri Kráľovej Lehote došlo v súvislosti s dokumentáciou jaskýň v blízkom okolí, kde sme boli informovaní miestnymi znalcami o výskyte týchto javov. Pri prehliadke poľa a príslušných trvalých trávnatých porastov bolo objavených celkovo 15 krasových jám. Tie boli priebežne zamerané GNSS roverom. Pri každej krasovej jame bola odmeraná jej hĺbka a priemer vchodu. Najhlbšia krasová jama s hĺbkou 3 m spĺňa podmienky, aby mohla byť považovaná za jaskyňu[5]. Táto jaskyňa/krasová jama dostala názov Prepad na poli pri ceste (v skrátenej podobe Pri ceste). Bola zameraná metódou otvoreného polygónového ťahu v jaskyni, ktorá v súčasnosti spočíva v poznaní polohy prvého bodu, od ktorého na základe vzdialenosti sklonu a orientácie voči svetovým stranám je odvodená poloha bodov nasledujúcich[6]. V dnešnej dobe sa najčastejšie pri zameriavaní využíva upravená verzia zariadenia Disto x. Terénne práce boli robené spolu a na základe skúseností a odporúčaní členov Slovenskej speleologickej spoločnosti, resp. zamestnancov Slovenského múzea ochrany prírody a jaskyniarstva, najmä Ing. Petra Holúbeka. Dokumentáciu Prepada na poli pri ceste je možné vidieť na Obr.2.



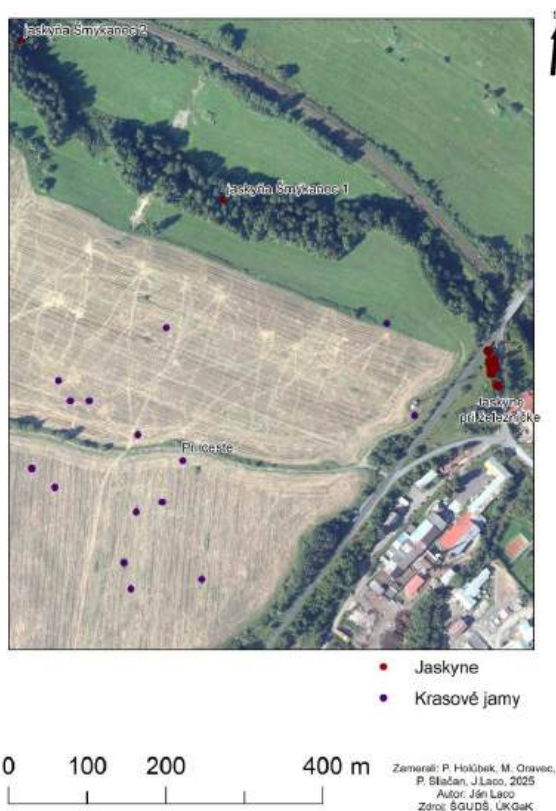
Obr. 2 Okolie vchodu do Prepada na poli pri ceste
Zdroj: [5]

2.2 Spracovanie údajov

Pri spracovaní údajov z terénu sme údaje z GNSS roveru a z terénneho zápisníka (údaje namerané Disto x) previedli do podoby počítačových dát. V prostredí arcMap 10.8.1. sme z nameraných údajov GNSS roveru vytvorili vrstvu bodov. Následne sme tieto údaje doplnili o údaje, ktoré poskytuje Úrad geodézie, kartografie a katastra, konkrétne o vrstvu web mapového serveru s ortofotomozaikou. Mračno bodov bolo najprv v prostredí programu CloudCompare upravené z formátu .LAZ na formát .LAS. Následne bol v programe arcmap 10.8.1 s využitím nástroja Create LAS Dataset vytvorený príslušný dátový súbor. Územie bolo prezreté, či niektoré body z laserového leteckého skenovania nezachytili krasové jamy. Z mračna bodov bol potom s využitím nástroja LAS Dataset To Raster vytvorený digitálny model reliéfu (DMR) s rozlíšením pixelu 0,5m x 0,5m, z ktorého bola následne pomocou nástroja Hillshade vygenerovaná vrstva tieňovaného reliéfu. Geologickú mapu sme vytvorili na základe dát, ktoré poskytuje Štátny geologický ústav Dionýza Štúra[7].

3 Vymedzenie a charakteristika územia

Samotné závrty, ale aj blízke jaskyne, ktoré boli dokumentované, sa nachádzajú na ploche približne 0,5 km². Samotné závrty (aj jaskyňa Pri ceste) sa nachádzajú na ornej pôde, resp. v jej tesnej blízkosti ako to dokumentuje aj mapa na obr. 3. Plocha sa nachádza juhozápadne od sútoku Bocianky a Váhu, západne od obce Kráľova Lehota a južne od železničnej trate Žilina-Košice. Polohu voči ním je taktiež možné vidieť na obr. 3. Z administratívneho hľadiska sa územie nachádza v Žilinskom samosprávnom kraji, v okrese Liptovský Mikuláš, na katastrálnom území Liptovská Porúbka. Hranicu medzi Liptovskou Porúbkou a Kráľovou Lehotou predstavuje vodný tok Boca[8].



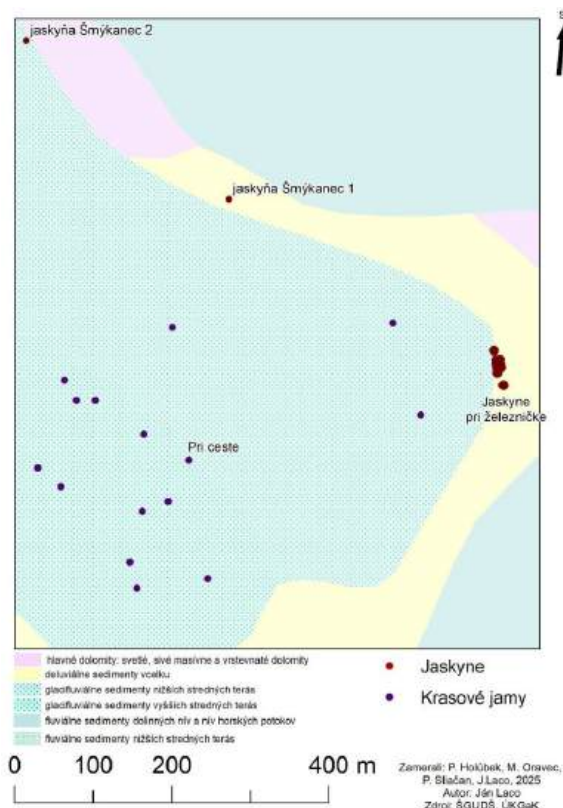
Obr. 3 Ortofotomapa územia

3.1 Geologická charakteristika

I keď s geomorfologického hľadiska sa územie nachádza v Podtatranskej kotline, z dôvodu výskytu karbonátov hronika je z geologického hľadiska možné územie priradiť k pásnu jadrových pohorí [9], [10], [11]. Liptovská kotlina je ako celok budovaná najmä sedimentami centrálne karpatského paleogénu. Miestami najmä vo východných častiach kotliny však vystupujú aj mezoické karbonáty obklopené paleogénnymi a kvartérnymi sedimentami [12].

Na území prevažujú najmä kvartérne sedimenty, ktoré obklopujú druhohorné dolomity. Paleogénne sedimenty sa v okolí nevyskytujú. Hlavné dolomity sa občas vyskytujú na svahu medzi strednou a nižšou terasou Váhu. V teréne je však ich výskyt možné pozorovať častejšie ako je to možné vidieť na mape – obr. 4. Dolomity náležia k bielovážskému vývoju hronika. Fluviálne sedimenty sa nachádzajú najmä na nižšej, ale aj strednej terase, kde prevládajú glaci-fluviálne sedimenty. Pre svah medzi nižšou a strednou riečnou terasou Váhu sú charakteristické deluviálne sedimenty. Práve na svahu medzi nižšou a strednou riečnou terasou bolo evidovaných 11 jaskýň, pre ktoré materskou horninou sú hlavne

dolomity. Mapu geologických pomerov je možné vidieť na obr. 4 [10].



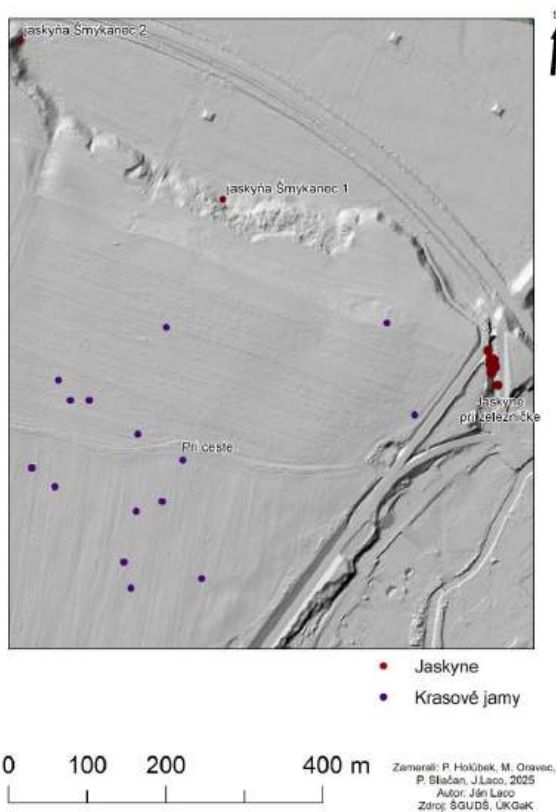
Obr. 4 Geologická mapa územia

3.2 Geomorfologická charakteristika

Z hľadiska geomorfologického členia Slovenska patrí územie do geomorfologického celku Podtatranská kotlina, podcelku Liptovská kotlina, a do geomorfologickej časti Liptovské nivy [9]. Rovinatý reliéf strednej riečnej terasy dokumentuje aj obr. 2.

Isté zásahy do reliéfu v tejto oblasti priniesla výstavba považskej lesnej železnice. Výstavba železnice na úseku Liptovský Hrádok – Čierny Váh začala v júli 1914 a dokončená bola v novembri 1916 [13]. Práve železničná trať sa zarezávala nielen cez kvartérne sedimenty, ale aj do dolomitov hronika, kde aj prešla niekoľko jaskynných chodieb. Vďaka tomu bolo možné evidovať v záreze železnice 9 fluvikrasových jaskýň, ďalšie dve boli evidované v blízkosti – nižšie po toku Váhu. Dĺžka týchto jaskýň sa pohybuje od 2 m do 22 m (prítomné sú aj viaceré dutiny, ktoré nespĺňajú kritéria jaskyne). Denivelácia jaskýň sa pohybuje od jaskýň horizontálnych zo zanedbateľným sklonom až po 4 m (celková dĺžka

jaskyne s najväčšou deniveláciou je 6,49 m) [5]. Reliéf je možné výraznejšie vidieť na mape s tieňovaným digitálnym modelom reliéfu na obr. 5. Polohu jaskýň je možné vidieť na obr. 3, 4 a 5. Morfológiu krasových jám sa bližšie zaoberáme vo výsledkoch práce.



Obr. 5 Mapa územia s tieňovaním DMR

3.3 Klimatické pomery

Klimatické pomery odpovedajú vertikálnej zonálnosti územia Slovenska. Z hľadiska klimatických oblastí sa územie nachádza v mierne chladnom, veľmi vlhkom klimatickom okrsku[14].

3.4 Hydrologické a hydrogeologické pomery

Oblasť náleží k povodiu Váhu. Lokalita sa nachádza v blízkosti ústia Boce (tok 3. rádu) do Váhu (tok 2. rádu). Z hľadiska režimu odtoku územie patrí k snehovo-dažďovému typu[16].

Z hydrogeologického hľadiska je možné v lokalite vyčleniť tri relatívne rozdielne hydrogeologické prostredia[17].

Najstaršie je karbonátový komplex Kráľovej Lehoty, ktorý je tvorený najmä vrchnotriasovými dolomitmi, menej aj dachsteinskými vápencami

(južne od lokality) bielovážskej série. Podložie tvorí hydrogeologicky nepriepustné súvrstvie lunzských pieskocov a bridlíc. Na severe sa komplex ponára pod paleogénnu výplň Liptovskej kotliny. Značne popukané dolomity vytvárajú podmienky najmä pre puklinovú a lokálne aj pre krasovú priepustnosť[15].

Štrkové fluviálne sedimenty Váhu s najväčším koeficientom prietochnosti v lokalite tu tvoria spolu s hlavnými dolomitmi kolektor podzemných vôd, ktorý je využívaný ako jeden zo zdrojov vody pre Liptovský Mikuláš[18].

Glacifluviálne sedimenty majú najnižší koeficient prietochnosti v lokalite a nachádzajú sa na strednej terase Váhu[17][10].

3.5 Pedologické pomery

Na základe údajov z Atlasu krajiny Slovenskej republiky by sa mala lokalita nachádzať na rozhraní fluvizemí okolia Váhu a rendziny[19], údaje sú tu však značne generalizované. Na základe terénnych pozorovaní je možné konštatovať, že na poli, kde sa nachádzajú krasové jamy, je pôda ovplyvnená poľnohospodárskymi aktivitami (umelý humusový horizont a pod.).

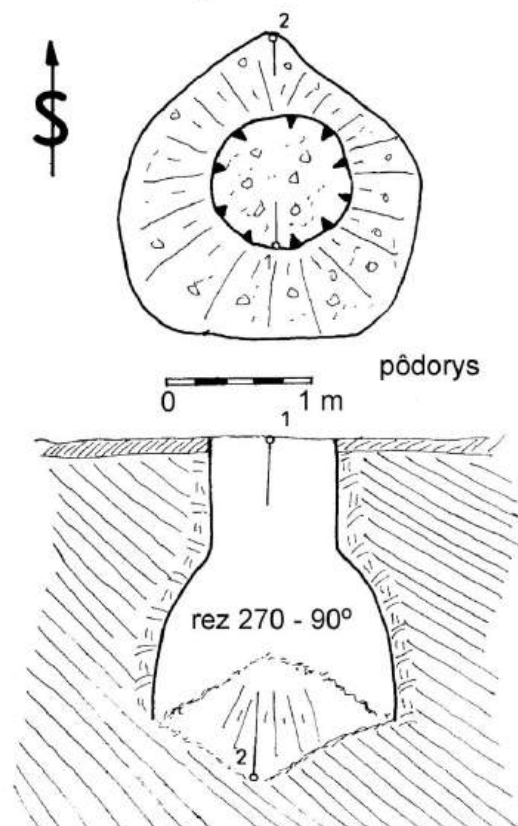
3.6 Biogeografické pomery

Oblasť je využívaná na poľnohospodárske účely, najmä ako orná pôda, menej sú prítomné aj trvalé trávnaté porasty. Miestami je zastúpená aj krovinatá a stromová vegetácia. Krajinnú pokrývku je možné vidieť na obr.3.

4 Výsledky a diskusia

V rámci práce bolo zameraných 15 krasových jám. V práci sa používa pojem krasové jamy v širšom zmysle, nakoľko jedna z jám spĺňa podmienky, aby mohla byť klasifikovaná ako jaskyňa. Jedná sa o jamu – Prepad na poli pri ceste, ktorého hĺbka dosahuje 3 m a priemer vchodu je 1 m. Pôdorys a bokorys tohto útvaru je možné vidieť na obr. 6. Rozmery ostatných evidovaných jám sa pohybujú od hĺbky 1,6 m po 0,3 m a priemeru vchodu od 1 m po 1,8 m.

Kaverna pri ceste



Obr. 6 Prepad na poli pri ceste (neoficiálny/starší názov aj Kaverna pri ceste alebo len Pri ceste)
Zdroj: Peter Holúbek

Z hľadiska triedenia krasových jám podľa morfografických kritérií náležia väčšina jám k sudňovitému typu, najmä na základe toho, že steny jám sú zväčša kolmé, v niektorých prípadoch miestami až v previse ako to dokumentuje aj rez na obr. 6. a fotografia na obr. 7. Z hľadiska genézy sa s veľkou pravdepodobnosťou jedná o sufózne krasové jamy[2]. Vzhľadom na to, že väčšina krasových hornín v lokalite leží pod glacifluviálnymi sedimentami, ktoré majú oproti dolomitom horšiu priepustnosť a sú nerozpustné, v žiadnej z krasových jám nie je vidno dolomitický masív. Ten je miestami na povrchu iba na svahu medzi nižšou a strednou terasou Váhu. Z nameraných údajov boli vyhotovené aj mapy, ktoré je možné vidieť na obr. 3, 4 a 5. Namerané údaje a aj vyhotovené mapy boli odovzdané aj pánovi P. Krajčuškov, mechanizátorovi na Poľnohospodárskom dvore v Liptovskej Porúbke, ktorý nás aj informoval o skutočnosti, že na jednej z jám sa prepadol traktor a polámala sa mu náprava.



Obr. 7 Jedna z menších krasových jám na konci novembra 2025

Na výskyt podobných javov sú náchylnejšie najmä teplé klimatické oblasti, avšak takéto javy sa vyskytujú aj v miernom klimatickom pásme. Častými sú v oblastiach, kde sa vyskytuje sadrovec. Príkladmi takto sa vyskytujúcich javov je okolie Halle v Nemeckej spolkovéj republike[2]. V meste Kungur na Urale v Ruskej federácii sa podobné prepady objavujú aj na asfaltových cestách a chodníkoch[5].

Výskyt podobných javov, ktoré by sa prejavovali aj ako geohazardy na území Slovenskej republiky sa v literatúre nepodarilo dohľadať. Obdobná situácia je však podrobne zdokumentovaná z Českého krasu z okresu Beroun, kde sa medzi obcami Tobolka a Měňany roku 1981 prepadlo zadné koleso kombajnu. Speleologická skupina Tetín sa tomuto územiu v nasledujúcich rokoch venovala. Prepad nazvali Pluto a pôvodne mal hĺbku 2 m a podobnú fľaškovitú morfológiu ako Prepad pri ceste. V rámci prieskumu sa v Českom krase realizovali výkopové práce, vďaka ktorým sa v hĺbke 5 m objavila puklina v skalnom masíve, ktorej hĺbka bola 16 m a následne sa zužovala do neprelezna. V súvislosti s prepacom Pluto sa uskutočnili aj geofyzikálne merania, avšak bez uspokojujúcich výsledkov[20][21].

Záver

Lokalita Šmýkanca s doteraz zaznamenanými 15 krasovými jamami, ale aj 11 riečnymi jaskyňami je oblasť so zaujímavou morfológiou a špecifickou

hydrogeologickou situáciou. Zaujímavá je aj zo speleologického hľadiska. Tieto javy však so sebou prinášajú aj isté riziká, o čom svedčí aj odtrhnutá náprava traktora.

Prínosy práce pre prax sú najmä vo forme presného zamerania a zistenie morfológických vlastností krasových jám a poskytnutie týchto informácií na Poľnohospodárskom dvore v Liptovskej Porúbke. Ďalším prínosom sú nové informácie o geomorfologických špecifikách krajiny na hornom Liptove. Vhodné je, aby sa lokalita ďalej sledovala, jednak z dôvodu, či sa nevyskytujú nové krasové jamy a zároveň aj pre sledovanie rozmerov už existujúcich krasových jám. Zaujímavý bude v tomto prípade aj výsledok práve prebiehajúceho laserového leteckého skenovania a s tým spojeného vyhotovenia Digitálneho modelu reliéfu 6.0, ale najmä mračna bodov 2.0, a to konkrétne v tom, či dokáže a v akej kvalite zachytiť tieto krasové javy.

PodĎakovanie

Ďakujem pánovi školiteľovi RNDr. Matejovi Masnému, PhD. za odborné vedenie pri tvorbe práce, cenné rady a typy pri jej spracovaní. Veľká vďaka patrí zamestnancom Slovenského múzea ochrany prírody a jaskyniarstva v Liptovskom Mikuláši, najmä Ing. Petrovi Holúbekovi, ale aj Michalovi Oravcovi, s ktorými boli robené terénne práce. Ďakujem za ich cenné rady, ochotu, usmernenia, pripomienky, fotografie, mnohé ďalšie podklady k téme a možnosť podieľať sa na dokumentácii týchto javov. Je potrebné vyzdvihnúť prácu mnohých členov Slovenskej speleologickej spoločnosti v tejto lokalite.

Časť práce bola robená v rámci projektu Mapovanie a monitoring jaskynných biotopov a modernizácia softvéru národnej databázy jaskýň, spolufinancovaného z programu Slovensko 2021-2027

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] DZUROVČIN, Ladislav; (2000). *Geomorfológia*. Prešov: Prešovská univerzita, 252 s. ISBN 80-88885-79-5.
- [2] JÁKÁL, Jozef. a kol; (1982). *Praktická Speleológia*. Martin: Osveta, 377 s.
- [3] BELLA, Pavel; (2008). *Jaskyne ako prírodné geosystémy*. Liptovský Mikuláš: Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky, Správa slovenských jaskýň, 166 s. ISBN 978-80-8064-329-4.
- [4] SLOV-LEX. Zákon č. 543/2002 Z. z. o ochrane prírody a krajiny (§ 24 Jaskyňa a prírodný vodopád) [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné na internete: www.slov-lex.sk.
- [5] Holubek, Peter; Laco, Ján; Oravec, Michal; (2025). *Speleologická situácia v záreze čiernovážskej železničky a v oblasti Šmykanec pri Kráľovej Lehote v Podtatranskej kotline*. *Spravodaj slovenskej speleologickej spoločnosti*, roč. 56, č. 3, s. 26-30. ISSN 1335-5023.
- [6] HOCHMUTH, Zdenko; (1995). *Mapovanie jaskýň*. Liptovský Mikuláš: Slovenská speleologická spoločnosť, 80 s. ISBN 80-966963-1-9
- [7] VOJTEKOVÁ, Jana; ŽONCOVÁ, Miroslava; (2021). *Geografické informačné systémy – tvorba vybraných tematických máp*. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 89 s. ISBN 978-80-558-1696-8.
- [8] ÚRAD GEODÉZIE, KARTOGRAFIE A KATASTRA SR. *Mapový klient ZBGIS* [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné na internete: zbgis.skgeodesy.sk.
- [9] MAZÚR, Emil; LUKNIŠ, Michal; (1978). *Regionálne geomorfologické členenie SSR*. *Geografický časopis*, roč. 30, č. 2, s. 101-125. ISSN 0016-7193.
- [10] ŠTÁTNY GEOLOGICKÝ ÚSTAV DIONÝZA ŠTÚRA. *Geologická mapa SR M 1 : 50 000* [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné na internete: <https://app.geology.sk/gm50/>.
- [11] HÓK, Jozef; KAHAN, Štefan; AUBRECHT, Roman; (2001). *Geológia Slovenska*. Bratislava: Univerzita Komenského, 47 s. ISBN 80-223-1592-3.
- [12] GROSS, Pavol a kol; (1980). *Geológia Liptovskej kotliny*. Bratislava: Štátny geologický ústav Dionýza Štúra (ŠGÚDŠ), 242 s.
- [13] BIZUB, František; (2012). *Považská lesná železnica*. Banská Bystrica: Lesy SR, 184 s. ISBN 978-80-9710-531-0.
- [14] LAPIN, Milan; MELO, Marián; ŠTASTNÝ, Pavel; TOMLAIN, Ján; (2002). *Klimatické oblasti*. Mapa č. 27. In: *Atlas krajiny Slovenskej republiky*. Bratislava: Ministerstvo životného prostredia SR; Banská Bystrica: Slovenská agentúra životného prostredia, s. 95. ISBN 80-88833-27-2.
- [15] HANZEL, Vladimír; (1977). *Puklinovo-krasové vody severovýchodných svahov Nízkych Tatier a vplyv skrasovatenia na ich režim*. *Slovenský kras*, Liptovský Mikuláš, roč. 15, s. 31-52.
- [16] PEKÁROVÁ, Pavla; SZOLGAY, Ján; (2005). *Scenáre zmien vybraných zložiek hydrosféry a biosféry v povodí Hrona a Váhu v dôsledku klimatickej zmeny*. Bratislava: Veda, 496 s. ISBN 80-224-0884-0.
- [17] ŠTÁTNY GEOLOGICKÝ ÚSTAV DIONÝZA ŠTÚRA. *HYDROGEOLOGICKÉ MAPY V MIERKE 1 : 50 000* [online]. [cit. 2024-05-22]. Dostupné na internete: <https://app.geology.sk/hydrogeol/>.

- [18] HANZEL, Vladimír; NEUPAUER, Ľubomír; REHOROVSÁ, Kamila; (1984). Podzemné vody mezozoika a riečnej nivy Váhu a ich využitie. Hydrogeologický sprievodca VIII. Celoštátna hydrologická konferencia, Račkova dolina, Západné Tatry, s. 52-56.
- [19] ŠÁLY, Rudolf; ŠURINA, Bohumil; (2002). Pôdy – mapa č. IV/78. In: Atlas krajiny Slovenskej republiky. Bratislava: Ministerstvo životného prostredia SR; Banská Bystrica: Slovenská agentúra životného prostredia, s. 106-107. ISBN 80-88833-27-2.
- [20] PLOT, Jaroslav; (1982). Zpráva o výzkumné a průzkumné činnosti speleologické skupiny Tetín za rok 1981. Propad Pluto. Český kras, Beroun, roč. 7, s. 59-61.
- [21] PLOT, Jaroslav; (1985). Zpráva o výzkumné a průzkumné činnosti speleologické skupiny Tetín za rok 1984. Propad Pluto. Český kras, Beroun, roč. 11, s. 76-77.

Monitoring drevinovej vegetácie s využitím GIS technológií na príklade Mestského parku na Tajovského ulici v Banskej Bystrici

Monitoring of wood vegetation using GIS technologies on the example of city park on Tajovský street in Banská Bystrica

Egor Markov¹ – Tomáš Šuvada²

^{1,2}Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica,

¹emarkov@student.umb.sk, ²tšovada@umb.sk,

Abstrakt

Táto práca je zameraná na proces odlesňovania v Mestskom parku v Banskej Bystrici, ktorý je aktuálnou témou v období spracovania tohto článku (február 2026). V priebehu najbližších dní až týždňov sa predpokladá výrub značného množstva stromov aj v dobrom zdravotnom stave. Táto téma je pre nás zaujímavá, pretože má výraznú spoločenskú odozvu medzi obyvateľmi mesta a zároveň môže prispieť k lepšiemu pochopeniu skúmanej problematiky.

Cieľom práce je ísť do minulosti a predstaviť historicko-geografický význam Mestského parku a taktiež analyzovať a porovnať stav územia pred a po realizácii výrubu prostredníctvom vybraných geoinformačných nástrojov. Súčasťou spracovania bude aj tvorba trojrozmerných (3D) vizualizácií a štatistík, ktoré umožnia detailnejšie zhodnotenie zmien v priestorovej organizácii vegetačnej pokrývky parku.

Kľúčové slová: Mestský park, vizualizácia, výrub, ArcGIS Pro.

Abstract

This work focuses on the deforestation process in the City Park in Banská Bystrica, which is a current topic at the time of writing this article (february 2026). In the coming days and weeks, a significant number of trees, even those in good health, are expected to be cut down. This topic is interesting to us because it has a significant social response among the city's residents and can also contribute to a better understanding of this issue.

The aim of the work is to go back in time and present the historical and geographical significance of the City Park, as well as to analyze and compare the state of the area before and after the cutting down using selected geoinformatics tools. The work will also include the

creation of three-dimensional (3D) visualizations and statistics that will allow a more detailed assessment of changes and spatial organization of vegetation cover of the park.

Key Words: Urban park, visualization, deforestation, ArcGIS Pro

Úvod

Zaujímavá lokalita sa nachádza v Banskej Bystrici, v blízkosti centra, na Tajovského ulici.

Vybrané územie predstavuje park s rozlohou 8 hektárov (vrátane športového areálu) [1]. Na celom území parku je vysadených 691 stromov, pričom do tohto počtu nie sú zahrnuté veľmi mladé stromy s výškou do 1 metra a ani nízke kríky.

Obrysy Mestského parku sú zachytené už na druhom vojenskom mapovaní z roku 1839 [2], avšak systematická starostlivosť o toto územie a výsadba drevín v koncepcne usporiadanom režime sa začali realizovať až na konci 19. storočia.

Nepochybne ide o historicky významnú lokalitu (od roku 1994 je zaradený do zoznamu národných kultúrnych pamiatok), ktorá zohráva dôležitú úlohu nielen v procese urbanistického vývoja a formovania priestorovej štruktúry mesta, ale aj v jeho sociálno-kultúrnom kontexte.

Prvým cieľom mojej práce bude podrobnejšie predstaviť historický, geografický a sociálny význam Mestského parku, resp. analyzovať dostupnú historickú dokumentáciu a fotografické materiály.

Hlavný cieľ práce bude formulovaný v ďalšej časti článku, kde na základe zozbieraných údajov a s využitím rôznych softvérových nástrojov vytvoríme 3D model územia zachytávajúci stav pred začiatkom výrubu drevín a po ukončení tohto procesu.

Súčasťou práce bude aj spracovanie vlastnej štatistickej analýzy počtu vyrúbaných stromov, ktorú následne porovnáme s oficiálnymi údajmi

publikovanými v rámci projektu a znaleckých posudkov.

1 Historický exkurz

Za riekou Bystrica sa po mnohé stáročia rozprestieralo územie známe ako Dolné lúky, resp. Špitálske lúky. Neskôr, konkrétne v prvej polovici 19. storočia, sa táto lokalita využívala na vojenské účely, a to ako strelnica a priestor na vojenské cvičenia. Na území, kde sa v súčasnosti nachádza časť ulíc Martina Hattalu a Záhradná, sa konali rôzne verejné zhromaždenia, prevažne politického charakteru [3,4]. V 40. rokoch 19. storočia sa zásluhou miestnej mládeže žijúcej v blízkosti začalo na Dolných lúkach so zakladaním parku. Išlo o tú istú skupinu iniciatívnych obyvateľov, ktorá realizovala výsadbu aleje na Hornom námestí a podieľala sa aj na výstavbe kamenného divadla vo dvore radnice. Parkom pôvodne prechádzali diagonálne len dve komunikácie. Systematická a koncepcná výsadba zelene sa začala až koncom 19. a začiatkom 20. storočia [4].

Využitie Dolných lúk, alebo Mestského parku, bolo v minulosti predmetom záujmu viacerých skupín obyvateľov mesta, ktoré predkladali rôzne návrhy na jeho využitie, hoci nie všetky sa podarilo zrealizovať. Napríklad v roku 1887 miestny vojenský dôstojník požiadal o povolenie na vybudovanie jazdeckej dráhy na Dolných lúkach. V roku 1900 sa začali prvé kroky smerujúce k získaniu pozemku na výstavbu tenisových kurtov a zázemia pre športový klub. V 20. storočí tenisové kurty počas zimy slúžili ako klzisko [Obr. 1].



Obr. 1 Tenisové kurty v období zimy, rok 1939

Zdroj: [4]

Od toho istého roku sa v parku konali vystúpenia vojenských hudieb a park sa postupne stal miestom, kde sa zhromažďovalo väčšie množstvo ľudí pri rôznych spoločenských a kultúrnych podujatiach [Obr. 2].



Obr. 2 Zhromaždenie ľudí v parku oproti súčasnej budove ekonomickej fakulty UMB, rok 1914

Zdroj: [4]

V roku 1884 bol v jeho centre postavený drevený altánok a v roku 1914 bol celý Mestský park elektrifikovaný [5] [Obr. 3].



Obr. 3 Elektrifikovaný Mestský park, pred rokom 1931

Zdroj: [3]

V období po druhej svetovej vojne, až do 90. rokov 20. storočia, toto územie plnilo funkciu parku a bolo premenované na „Leninov park“, po páde socialistického režimu dostal názov Park Tajovského, alebo Mestský Park [4].

2 Metodika

Metodika práce pozostávala z troch etáp. Prvou etapou bol terénny prieskum. V novembri 2025 boli na stromy v Mestskom parku nanesené body rôznych farieb [Obr. 4], ktoré podľa našej vtedajšej hypotézy označovali odlišné informácie o stave drevín (napríklad oranžový bod – potenciálne nebezpečný strom, modrý bod – odumretý strom a pod.).



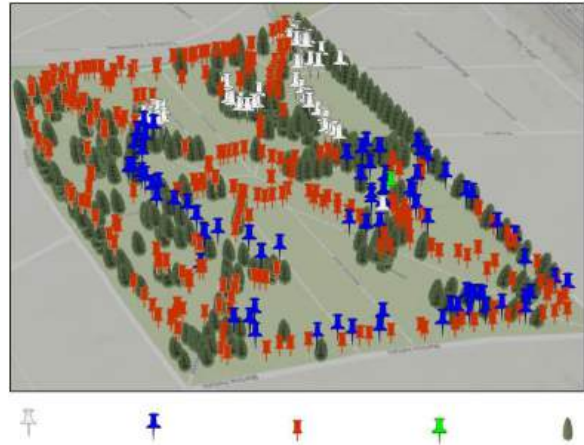
Obr. 4 Príklady označených stromov
Zdroj: Vlastné spracovanie

Prvotným terénnym prieskumom (v novembri 2025) oblasti, ktorý pozostával z mapovania a zaznačovania stromov do aplikácie Mapy.com [6], pričom sme evidovali farebné označenie jednotlivých stromov vo všetkých častiach územia mestského parku, celkovo bolo takto zaevidovaných 691 stromov, z ktorých 406 bolo farebne označených. Po vykonaní výrubových prác boli terénnym prieskumom (26. februára 2026) zmapované pne stromov, ktoré boli vyrúbané v prvej fáze projektu.

Druhou etapou bol export údajov do softvéru ArcGIS Pro pomocou nástroja „GPX to Features“ [7] a ich následné spracovanie a vizualizácia vo forme 3D modelu. Poslednou etapou bola práca s archívnymi údajmi dostupnými na oficiálnej webovej stránke mesta Banská Bystrica [8], konkrétne s dokumentom „nezávislý posudok“ [9], ktorý obsahuje štatistické údaje o drevinovom zložení vegetácie a počte vyrúbaných stromov v jednotlivých fázach projektu. Tieto dáta boli následne porovnané s vlastnými zistenými výsledkami.

2.1 Výsledky

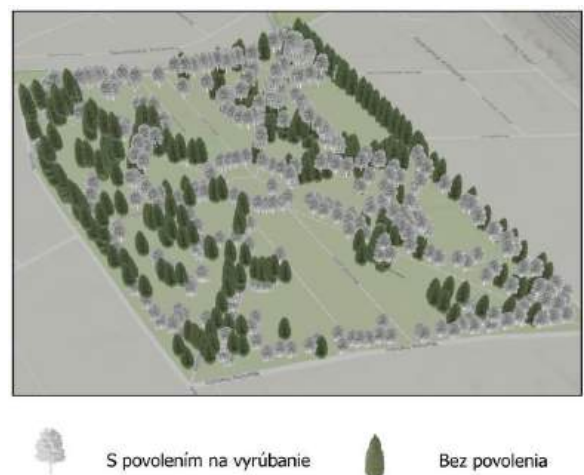
Prvou vytvorenou vizualizáciou bol 3D model parku s vyznačenými farbami značiek na jednotlivých stromoch [Obr. 5].



Obr. 5 Zmapované, poznačené stromy rôznymi farbami, pohľad SZ – JV

Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA. vlastné spracovanie

Kľúčový nedostatok prvého modelu spočíval v tom, že až v neskoršej fáze analýzy sa preukázalo, že farebné označenie stromov nereflektuje význam v súlade s pôvodne formulovanou hypotézou o zdravotnom stave drevín. Preto správny prístup v tejto situácii nie je rozdeľovať ich podľa farieb, ale spojiť ich všetky dohromady, čím získame 406 stromov [Obr. 6], na ktoré bolo udelené povolenie na výrub do februára 2029 [10].



Obr. 6 Zmapovanie stromov označených na výrub, pohľad SZ – JV.

Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA, vlastné spracovanie.

Čo sa týka druhov drevín, podarilo sa nám získať informácie a vypracovať stručnú tabuľku, ktorá uvádza počet a percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov drevín pred začiatkom výrubu [Tab. 1] (do februára 2026).

Názov druhu	Počet (ks)	Zastúpenie (%)
Lipa veľkolistá	196	27,6
Javor mliečny	78	11,0
Javor horský	71	10,0
Smrek obyčajný	71	10,0
Jaseň štíhly	42	5,9
Platan javorolistý	30	4,2
Smrek pichľavý	28	3,9
Lipa malolistá	24	3,4
Tuja západná	20	2,8
Fagaštan kónský	17	2,4
Ostatné druhy spolu	132	18,8

Tab.1 Druhové zloženie stromov v Mestskom parku
Zdroj: [9]

Pomocou uvedených dát môžeme pozorovať, že prevažná väčšina stromov je listnatého charakteru. Najvyšší percentuálny podiel zaujímajú lipy (rod *Tilia*) a poddruhy javorov (rod *Acer*). Z ihličnatých drevín sú vo významnejšom zastúpení prítomné iba smrek (rod *Picea*) a tuje (rod *Thuja*).

Po ukončení výrubu stromov sme realizovali druhú fázu terénneho prieskumu, po ktorej boli vyhotovené ďalšie 3D vizualizácie. V rámci týchto vizualizácií sú zaznamenané všetky vyrúbané stromy do konca februára 2026, resp. do ukončenia 1. fázy [Obr. 7].



● zvyšky vyrúbaných stromov, pne

Obr. 7 Vyrúbané stromy vo februári 2026, pohľad SZ – JV

Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA, vlastné spracovanie

Celkovo sme identifikovali 118 čerstvých pňov, napriek tomu, že na oficiálnej webovej stránke mesta a v nezávislom posudku sa uvádza 149 vyrúbaných stromov v 1. fáze [9]. Nesúlad medzi výsledkami mojich dát a oficiálnymi môže byť spôsobený tým, že ako v novembri 2025, tak aj vo februári 2026 sme nezapočítavali kríky a veľmi nízke stromy do výšky 1 m.

Záverečné vizualizácie zobrazujú územie Mestského parku a priestorové rozloženie stromov pred výrubom drevín a po ňom, z dvoch protiľahlých strán [Obr. 8, 9, 10, 11].



Obr. 8 Mestský park do februára 2026, pohľad SZ – JV
Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA, NASA, vlastné spracovanie



Obr. 9 Mestský park do februára 2026, pohľad JV – SZ
Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA, vlastné spracovanie



Obr. 10 Mestský park v marci 2026, pohľad SZ – JV
Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA, vlastné spracovanie



Obr. 11 Mestský park v marci 2026, pohľad JV – SZ
Zdroj: ESRI, Vantor, USGS, NGA. NASA, vlastné spracovanie

Záver

Práca sa zameriavala na analýzu zmien vegetačnej pokrývky Mestského parku na Tajovského ulici v Banskej Bystrici s využitím GIS technológií, konkrétne prostredia ArcGIS Pro. Cieľom bolo porovnať stav územia pred realizáciou výrubu drevín so stavom po realizácii výrubu a zhodnotiť rozsah zásahu pomocou terénneho mapovania a 3D vizualizácií.

Historický exkurz potvrdil význam parku ako dôležitého urbanistického a spoločenského priestoru mesta.

Terénnym prieskumom bolo zaevidovaných 691 stromov, pričom pre 406 z nich bolo vydané povolenie na výrub do roku 2029. Po prvej fáze výrubu bolo identifikovaných 118 pňov, čo sa líši od oficiálne uvádzaného počtu 149 stromov. Rozdiel poukazuje na význam presnej metodiky a jasného vymedzenia drevín určených na výrub.

Vytvorené 3D modely názorne zobrazili zmenu priestorovej štruktúry porastu a preukázali prínos GIS nástrojov pri dokumentovaní a interpretácii zásahov do krajiny.

Záverom možno konštatovať, že kombinácia historicko-geografického výskumu, terénneho mapovania a 3D vizualizácií v prostredí GIS poskytuje komplexný pohľad na transformáciu priestoru Mestského parku v Banskej Bystrici a predstavuje významný podklad pre odborné rozhodovanie a vizualizovanie stanovísk vydaných mestom Banská Bystrica v rámci realizovaného projektu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ÚRAD GEODÉZIE, KARTOGRAFIE A KATASTRA SR. (2026). ZBGIS – Mapový klient. [online]. Dostupné na internete: <https://zbgis.skgeodesy.sk/>
- [2] E-LABS, s.r.o. (2010). Staré mapy – historické mapy slovenských miest. [online]. Dostupné na internete: <https://www.staremapy.sk/>
- [3] BALÁŽ, J., (1993). *Banská Bystrica v minulosti*. Banská Bystrica: SCM spol. s r. o., 224 s.
- [4] BALÁŽ, J., (2004). *Banská Bystrica v premenách času*. Banská Bystrica: Baja, 277 s. ISBN 978-80-968-9078-1.
- [5] ČLÁNOK V ZBORNÍKU: KODOŇOVÁ, M. (1988). *Stavebno-historický vývoj Banskej Bystrice*. Monumentorum Tutela 13, s. 206–250. ISBN 978-80-8196-058-1
- [6] ČERVENKA, P., BŘINDA, K., HANOUSKOVÁ, M., HOFMAN, P., & SEIFERT, R. (2016). Blind Friendly Maps: Tactile Maps for the Blind as a Part of the Public Map Portal (Mapy.cz). Proceedings, Lecture Notes in Computer Science: Computers Helping People with Special Needs. DOI: 10.1007/978-3-319-41267-2_18.
- [7] ARNELL, R. et al., (2020). Flexible GIS Workbook – Import GPS Data. In: ARNELL, R. et al. *Flexible GIS Workbook for ArcGIS Pro*. MLLP Press, [online]. Dostupné ako voľne dostupný materiál, Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Licencia.
- [8] [8] MESTO BANSKÁ BYSTRICA. (2026). Dendrologické posúdenia – Mestský park. [online]. Dostupné na internete: <https://www.banskabystrica.sk/samosprava/otvor-ena-samosprava-ogp-local/realizovane-participativne-projekty/mestsky-park/dendrologicke-posudenia/>
- [9] [9] MESTO BANSKÁ BYSTRICA. (2025). Mestský park Banská Bystrica – dendrologický posudok (finálna

verzia). [online]. Dostupné na internete:
<https://mestobbweb01storage.blob.core.windows.net/production/2025/12/Mestsky-park-BB-posudok-final-cd.pdf>

- [10] MESTO BANSKÁ BYSTRICA. (2026). Odstraňovanie nebezpečných stromov. [online]. Dostupné na internete:
<https://www.banskabystrica.sk/aktuality/2026/od-stranovanie-nebezpecnych-stromov>

Supergénne minerály U–Mo mineralizácie na lokalite Hnilčik (Spišsko-gemerské rudohorie)

Supergene Minerals of U–Mo Mineralization at the Hnilčik Locality (Spišsko-Gemer Ore Mountains)

¹Martina Pavlikovská – ²Štefan Ferenc

^{1,2} Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici

Katedra geografie a geológie, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica

¹ martina.pavlikovska@student.umb.sk, ² stefan.ferenc@umb.sk

Abstrakt

Predkladaná práca prezentuje čiastkové výsledky mineralogického štúdia uránovej mineralizácie v permských vulkanosedimentárnych komplexoch severného gemerika. Študované územie patrí medzi významné uránonosné oblasti Slovenska. Cieľom práce je systematický výskum U–Mo mineralizácie vo vzorkách z vybraných lokalít a charakterizovať ich základné morfológické a mineralogické vlastnosti. Študovaný materiál tvorili archívne vzorky a vzorky odobraté počas terénnych prác. Na ich štúdium boli použité mikroskopické metódy a prášková röntgenová difrakcia. Výsledky potvrdili prítomnosť viacerých supergénnych minerálov (iriginit, metatorbernit, sadrovec), ktoré vznikli počas zvetrávacích procesov v oxidačnej zóne mineralizácie.

Kľúčové slová: uránová mineralizácia, severné gemerikum, perm, supergénne minerály

Abstract

The presented study provides partial results of a mineralogical investigation of uranium mineralization within the Permian volcano-sedimentary complexes of the Northern Gemeric Unit. The studied area belongs to one of the significant uranium-bearing regions of Slovakia. The aim of the study is the systematic investigation of U–Mo mineralization in samples from selected localities and the characterization of their basic morphological and mineralogical properties. The studied material consisted of archival samples as well as samples collected during fieldwork. Microscopic methods and powder X-ray diffraction were used for their analysis. The results confirmed the presence of several supergene minerals (iriginite, metatorbernite, gypsum), which formed during weathering processes in the oxidation zone of the mineralization.

Key Words: uranium mineralization, Northern Gemericum, Permian, supergene minerals

Úvod

Severné gemerikum patrí medzi významné metalogenetické oblasti Slovenska, kde sa v permských vulkanosedimentárnych komplexoch vyskytuje stratiformná uránová až uránovo-molybdénová mineralizácia. Najvýznamnejšie ložiská predstavujú Novoveská Huta a Košice – Kurišková, avšak v regióne je známy aj celý rad menších výskytov.

Mineralizácia je viazaná najmä na vulkanoklastické horniny a pieskovce petrovohorského súvrstvia. Urán bol mobilizovaný zo zvetrávajúcich vulkanických hornín a následne akumulovaný v redukčnom prostredí sedimentárnych paniev.

Významnou súčasťou výskumu týchto ložísk je štúdium sekundárnych minerálov uránu, ktoré vznikajú počas supergénnych procesov v oxidačnej zóne.

Cieľom príspevku je charakterizovať vybrané minerálne fázy identifikované vo vzorkách z oblasti severného gemerika a prispieť k poznaniu mineralogického zloženia supergénnej alterácie uránovej mineralizácie.

1 Geologická charakteristika územia

Severné gemerikum je súčasťou Slovenského rudohoria a patrí k vnútorným Západným Karpatom. Geologický vývoj oblasti je spojený s variskou orogenezou aj alpínskou orogenezou. V tomto období vznikali rozsiahle sedimentárne panvy, ktoré boli vyplnené terigénnymi sedimentmi a produktmi bimodálneho vulkanizmu. Sedimentačné prostredie bolo prevažne fluviálne až jazerné a sprevádzané intenzívnym prevažne kyslým vulkanizmom. Významnou litostratigrafickou jednotkou je permotriasová krompašská skupina, ktorá pozostáva z knolského, petrovohorského a novoveského súvrstvia.

Stratiformná uránová mineralizácia je viazaná najmä na vulkanosedimentárne komplexy petrovohorského súvrstvia [1,2,3].

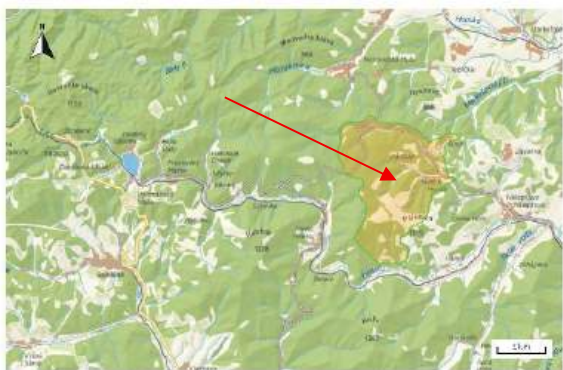
2 Stratiformná U–Mo mineralizácia

Stratiformná uránovo-molybdénová mineralizácia je typická tým, že približne kopíruje vrstevnatosť hostiteľských hornín. Zdrojom uránu boli najmä ryolity a ryolitové tufy permského veku. Počas diagenézy dochádzalo k uvoľňovaniu uránu v dôsledku devitrifikácie vulkanického skla a k jeho transportu v oxidačných roztokoch. V redukčných podmienkach sa následne vyzrážal (tvorba uranitu, branneritu a coffinitu) a vytváral stratiformné koncentrácie.

Primárne minerály sú najmä uraninit a brannerit. Ich zvetrávaním sa tvoria sekundárne (supergénne) uranylové minerály, napríklad autunit alebo torbernit [4, 5].

3. Hnilčík

Lokalita Hnilčík sa nachádza v okrese Spišská Nová Ves v Košickom kraji, v severnej časti Volovských vrchov, ktoré patria do Slovenského rudohoria (Obr.1). Oblasť je súčasťou gemerského pásma vnútorných Západných Karpát a predstavuje významný metalogenetický región Slovenska. Územie je oddávna známe výskytom rôznych typov rudných mineralizácií, najmä Cu, Fe a U. Horninové prostredie širšieho okolia tvoria najmä mladopaleozoické vulkanosedimentárne komplexy, tiež aj metamorfované bázické vulkanity a sedimenty rakoveckej skupiny. Na lokalite sa vyskytujú permské metaryolity, metadacity, tufy, tufity a rôzne typy sedimentárnych hornín, ktoré boli postihnuté alpínskou regionálnou metamorfózou a hydrotermálnymi procesmi .



Obr. 1 Lokalita Hnilčík

Zdroj : [ZBGIS]

4 Metodika

Študovaný materiál tvorili archívne vzorky odobraté počas terénnych prác na lokalite Hnilčík. Vzorky boli najskôr pretriedené a bola zameraná ich rádioaktivita. Na základe týchto údajov boli vybrané vzorky vhodné na ďalšie štúdium.

Petrografické pozorovania boli realizované pomocou polarizačného mikroskopu v prechádzajúcom aj odrazenom svetle. Pozornosť bola venovaná identifikácii minerálnych fáz, ich textúrnym vzťahom a morfológii. Vybrané minerály boli následne separované a analyzované pomocou práškovej röntgenovej difrakcie (PXRD), ktorá umožnila ich presnú identifikáciu.

5 Výsledky

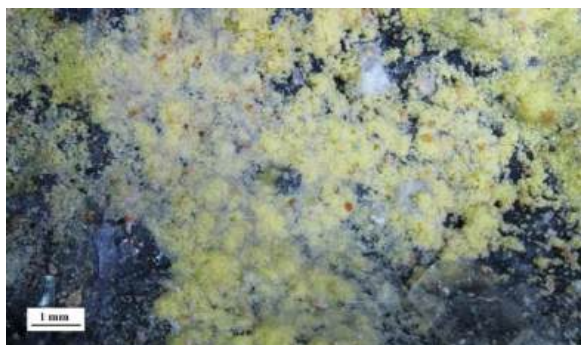
Mineralogické štúdium vzoriek z lokality Hnilčík potvrdilo v zvetraných U rudách prítomnosť viacerých sekundárnych minerálnych fáz.

Identifikované boli nasledovné minerály:

- iriginit
- metatorbernit
- sadrovec

5.1 Iriginit

Iriginit má svetložltú až sivožltú farbu a vyskytuje sa najmä vo forme jemnozrnných až prachovitých agregátov. Tie vytvárajú nepravidelné povlaky a tenké kôry na povrchu zvetranej hostiteľskej horniny (obr. 2). Agregáty sú veľmi jemnozrnné a bez zreteľných kryštálových tvarov. Povrch má matný až mierne zemitý charakter. Minerál nevykazuje výraznú vnútornú textúru ani známky kryštalickej orientácie či zonálnosti. Jeho výskyt súvisí najmä so zvetrávacími a oxidačnými procesmi, pričom vyplňa drobné nerovnosti, pukliny a mikropóry na povrchu horniny. Difrakčný záznam Iriginitu z Hnilčíka (tab. 1) vykazuje veľmi dobrú zhodu s publikovanými referenčnými údajmi pre túto minerálnu fázu. Vypočítané mriežkové parametre metatorbernit (tab.2) sú porovnateľné s hodnotami uvádzanými pre metatorbernit z iných svetových lokalít.



Obr. 2 Svetložltý až sírovožltý iriginit tvorí jemnozrnné prachovité povlaky a tenké kôry na povrchu zvetranej horniny, bez zreteľných kryštálov.

Zdroj : [Martina Pavlikovská]

			Táto práca		Števko et al. (2019)	
h	k	l	d	l	d	l
1	0	0	6.69898	1.3	6.6903	2.1
0	2	0	6.38948	87.1	6.3859	0
0	0	2	5.76109	1.3	5.7626	3.5
0	2	1	5.58524	1.1	5.5892	1.1
1	1	1	5.27022	2.1	5.2704	10
1	0	2	4.36794	0.4	4.3653	3.3
0	2	2	4.27867	1.2	4.2789	6.2
1	2	2	3.60472	0.7	3.6033	3.8
1	3	1	3.42908	1.0	3.4296	4.7
2	0	0	3.34528	1.2	3.3446	14.5
1	1	3	3.22272	3.7	3.2229	42.5
0	4	0	3.19406	11.7	3.1953	16.7
2	1	1	3.11321	1.7	3.1144	14.7
0	4	1	3.07839	0.7	3.0792	2.1
2	2	0	2.96918	0.5	2.9627	8.1
2	0	2	2.89061	0.5	2.8918	2.9
0	4	2	2.79454	0.3	2.794	1.3
1	0	4	2.6459	0.3	2.6454	1.4
2	2	2	2.63089	1.3	2.6335	3.1
1	3	3	2.62393	1.0	2.6238	6.7
2	3	1	12.561	1.0	2.564	1.8
1	5	1	2.33721	0.4	2.337	1.5
2	4	0	2.30913	0.4	2.309	1.5
3	1	1	2.15844	0.4	2.157	2.8
1	1	5	2.14888	0.6	2.148	3.6
2	4	2	2.14319	0.8	2.143	2
0	6	0	2.12631	3.1	2.126	1.8
0	6	1	2.0961	0.4	2.096	0.6
3	0	2	2.07912	0.6	2.079	3.9
2	2	4	2.06592	0.4	2.065	1

			Táto práca		Števko et al. (2019)	
h	k	l	d	l	d	l
1	5	3	2.02823	0.8	2.028	3.5
2	5	1	1.99929	0.7	1.999	1.4
3	2	2	1.97758	0.6	1.977	3.4
3	3	1	1.94787	0.4	1.947	0.7
1	3	5	1.93945	0.6	1.939	1.1
0	0	6	1.92061	0.3	1.92	2.9
3	1	3	1.90656	0.5	1.906	1
2	1	5	1.8777	0.5	1.877	1.3
0	2	6	1.83955	0.7	1.839	3.7
2	6	0	1.79662	0.5	1.796	1.2
3	0	4	1.76384	0.6	1.763	2.4
3	4	2	1.74252	0.5	1.742	1.6
1	7	1	1.74012	0.8	1.74	0.3
2	3	5	1.73356	0.6	1.733	0.5
2	6	2	1.71594	0.5	1.715	0.3
3	2	4	1.69985	0.5	1.699	2.1
2	0	6	1.66542	0.5	1.665	1.3
1	5	5	1.6584	0.5	1.658	0.7
0	4	6	1.64615	0.4	1.646	0.8
4	1	1	1.64141	0.7	1.641	3.1
2	2	6	1.61109	0.6	1.611	1.1
1	7	3	1.6006	0.9	1.6	1.6
3	4	4	1.54222	0.7	1.542	2.3
2	6	4	1.52384	0.6	1.523	0.5
3	6	2	1.48815	0.6	1.488	0.6
2	4	6	1.47614	0.7	1.476	0.8
2	1	7	1.46719	0.6	1.467	1.2
3	6	3	1.43033	0.7	1.43	0.3
0	6	6	1.42616	0.6	1.426	0.6

Tab. 1 Difrakčný záznam iriginitu z Hnilčíka

Zdroj : [Števko et. al. 2019]

	a [Å]	b [Å]	c [Å]	v [Å ³]
Táto práca	6.6950	12.776	11.520	985.40
Števko et al. (2019)	6.6871	12.775	11.5212	984.22
Krivovichev a Burns 2000b)	6.7050	12.731	11.524	983.60

Tab. 2 Mriežkové parametre iriginitu z Hnilčíka

Zdroj : [Števko et. al. 2019, Krivovichev a Burns 2000b]

5.2 Metatorbernit

Metatorbernit sa vyskytuje najmä vo forme nepravidelných povlakov a nátekov, ktoré miestami prechádzajú do drobných guľôčkovitých agregátov svetlozelenej až žltozelenej farby (obr. 3). Vyplňuje drobné dutiny a nerovnosti v zvetranej hostiteľskej hornine a lokálne vytvára tenké súvislé povlaky na jej povrchu. Minerál má prevažne matný, miestami sklený lesk. Minerál sa vyskytuje v asociácii so starším sadrovcom, ktorý vytvára ihličkovité až lúčovité agregáty prerastajúce zelené povlaky metatorbernitu. Minerál bol identifikovaný pomocou práškovej röntgenovej difrakčnej analýzy (PXRD). Difrakčný záznam metatorbernit z Hnilčíka (tab. 3) vykazuje veľmi dobrú zhodu s publikovanými referenčnými

údajmi pre túto minerálnu fázu. Vypočítané mriežkové parametre metatorbernit (tab.4) sú porovnateľné s hodnotami uvádzanými pre metatorbernit z iných svetových lokalít.



Obr. 3 Metatorbernit vytvára svetlozelené až žltozelené povlaky, náteky a drobné guľôčkovité agregáty vyplňujúce nerovnosti zvetranej horniny, miestami prerastané ihličkovitým sadrovcem.

Zdroj : [Martina Pavlikovská]

HC-Z					Locock (2003)	
h	k	l	l	d	l	d
0	0	1	269.0	17.23591	1.26	17.257
0	0	2	675.0	8.62708	95.04	8.6285
1	0	1	97.0	6.45270	4.42	6.4508
1	0	2		42.84	5.4149	
1	1	0	163.0	4.91961	65.44	4.9179
0	0	4	84.0	4.31473	6.44	4.3142
1	1	2	212.0	4.27470	26.35	4.2727
1	0	4	243.0	3.66743	100	3.6662
2	0	0	116.0	3.47782	63.91	3.4775
2	0	2	73.0	3.22495	47.55	3.2254
2	1	1	236.0	3.06229	3.33	3.061
2	1	2	63.0	2.92661	13	2.9261
1	2	2		11.34	2.9261	
2	0	4	51.0	2.70798	4.96	2.7075
1	0	6	59.0	2.65778	15.7	2.6579
2	1	4	87.0	2.52356	12.04	2.523
1	2	4		14.88	2.523	
1	1	6	50.0	2.48278	2.98	2.4827
2	2	0	35.0	2.45973	14.82	2.459
2	2	2	42.0	2.36487	17.24	2.3648
3	0	2	47.0	2.23831	7.07	2.2389
3	1	0	60.0	2.19960	13.28	2.1994
1	3	0		15.38	2.1994	
0	0	8	80.0	2.15748	8.06	2.1571
2	2	4	66.0	2.13659	1.84	2.1363
3	1	2	57.0	2.13191	7.13	2.1312
1	3	2		6.07	2.1312	
2	1	6	59.0	2.11155	8.72	2.1117
1	2	6	56.0	2.11063	8.01	2.1117
1	0	8	56.0	2.06069	5.39	2.0603
3	1	3	81.0	2.05463	1.25	2.0543
3	0	4	65.0	2.04261	23.46	2.0422
1	1	8	76.0	1.97599	13.63	1.9754
3	2	2		3.83	1.8825	
2	3	2	80.0	1.88268	3.31	1.8825
2	0	8	47.0	1.83347	8.02	1.8331
3	0	6	70.0	1.80503	7.61	1.805
2	1	8	86.0	1.77253	2.04	1.7726
1	2	8		2.2	1.7726	
3	2	4	64.0	1.76137	9.13	1.761
2	3	4		9.98	1.761	

HC-Z					Locock (2003)	
h	k	l	l	d	l	d
3	1	6	63.0	1.74734	1.36	1.7471
1	3	6			1.1	1.7471
4	0	0	61.0	1.73832	8.98	1.7387
0	0	10	56.0	1.72587	1.84	1.7257
4	0	2	60.0	1.70441	5.22	1.7045
1	4	2	56.0	1.65572	1.42	1.6555
4	1	2	68.0	1.65519	1.35	1.6555
3	3	0	90.0	1.63931	5.67	1.6393
1	1	10	82.0	1.62840	7.39	1.6284
2	2	8	82.0	1.62173	2.98	1.6216
3	3	2	83.0	1.61058	3.35	1.6105
3	2	6	79.0	1.60209	4.54	1.602
2	3	6			3.97	1.602
3	0	8	71.0	1.57914	2.59	1.5792
1	4	4	75.0	1.57102	5.98	1.571
4	1	4	69.0	1.55507	6.11	1.571
2	4	0			5.1	1.5552
4	2	0			5.19	1.5552
2	0	10	69.0	1.54587	4.92	1.5458
3	1	8			7.74	1.54
1	3	8	69.0	1.54040	8.7	1.54
2	4	2	70.0	1.53050	3.12	1.5305
4	2	2	76.0	1.53006	3.24	1.5305
1	4	6			2.05	1.4551
4	1	6	64.0	1.45518	1.98	1.4551
3	2	8	48.0	1.43798	1.42	1.4379
2	3	8	62.0	1.43760	1.47	1.4379
2	2	10	83.0	1.41271	3.06	1.4126
1	0	12	52.0	1.40830	3.23	1.4083
1	1	12	61.0	1.38041	2.48	1.3803
4	3	2	52.0	1.37348	1.08	1.3733
5	0	2			1.17	1.3733
3	4	2			1.05	1.3733
5	1	0	60.0	1.36425	1.82	1.364
1	5	0			1.53	1.364
3	1	10	78.0	1.35785	4.99	1.3577
1	3	10	60.0	1.35751	4.58	1.3577
4	0	8	64.0	1.35384	3.23	1.3537
5	1	2	61.0	1.34723	1.05	1.3473
1	5	2	41.0	1.34690	1.33	1.3473

Tab. 3 Difrakčný záznam metatorbernit z Hnilčíka

Zdroj : [Locock A. J., Burns P. C., 2003]

	a [Å]	c [Å]	v [Å ³]
Táto práca	7.1049	17.3213	874.38
Locock A. J., Burns P. C., 2003	6.9550	6.9550	17.257
Stubbs J E., 2010	6.9652	6.96519	17.3102
Sejkora, Vavřín (2014)	6.9702	17.329	841.8
Vrtiška et al. (2013)	6.96681	17.3240	840.84

Tab. 4 Mriežkové parametre metatorbernit z Hnilčíka

Zdroj : [Locock A. J., Burns P. C., 2003, Locock A. J., Burns P. C., 2003, Stubbs J E., 2010, Sejkora, Vavřín (2014), Vrtiška et al. (2013)]

5.3 Sdrovec

Minerál vytvára agregáty žltohnedých kryštálov. Majú prevažne tenkoprizmatický habitus a sú usporiadané do výraznej radiálnej štruktúry. Základ agregátu tvoria väčšie a lepšie vyvinuté kryštály, ktoré sú geneticky staršie. Tieto kryštály sú miestami čiastočne priehľadné a vyznačujú sa výraznejším skleným leskom. V centrálnej časti agregátu naopak prevažujú jemnejšie, husto nahromadené tenkoprizmatické kryštály, ktoré sú prevažne nepriehľadné a ich lesk je menej výrazný (obr. 4).

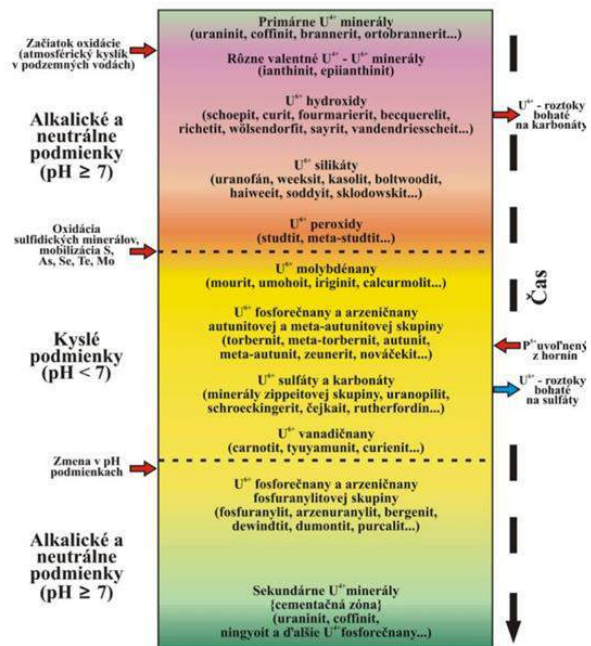


Obr. 4 Agregát žltohnedých tenkoprizmatických kryštálov sadrovca usporiadaných do radiálnej štruktúry, s väčšími, lesklejšími kryštálmi na okrajoch a jemnejšími, hustejšími kryštálmi v centrálnej časti.

Zdroj : [Martina Pavlikovská]

Diskusia

Študovaná U–Mo mineralizácia na lokalite Hnilčík patrí do stratiformnej uránovej mineralizácie severného gemerika, viazanej na permské vulkanosedimentárne komplexy petrovohorského súvrstvia. Identifikovaná mineralogická asociácia (iriginit, metatorbernit, sadrovec) poukazuje na vznik v oxidačných, kyslých podmienkach (obr.5). V dôsledku zvetrávania primárnej mineralizácie dochádzalo k mobilizácii prvkov a ich následnej precipitácii vo forme sekundárnych minerálov. Vznik metatorbernit (fosforečnan) naznačuje prítomnosť fosforu, pravdepodobne z hostiteľských hornín, zatiaľ čo iriginit (molybdénan) poukazuje na mobilitu molybdénu počas supergénnych procesov. Prítomnosť sadrovca (síran) indikuje zvýšenú aktivitu síranových iónov v roztokoch. Vzhľad minerálov (povlaky, náteky, jemnozrné agregáty) naznačuje ich vznik precipitáciou z cirkulujúcich roztokov v povrchových podmienkach.



Obr. 5 Schematické znázornenie paragenetickej postupnosti vylučovania U minerálov v oxidačnej zóne U ložísk.

Zdroj : [Krivovichev a Plášil, 2013]

Záver

Predkladaný príspevok sa zaoberá mineralogickým štúdiom uránovej mineralizácie v permských vulkanosedimentárnych komplexoch severného gemerika. Zameranie práce je na sekundárne minerály vzniknuté v oxidačnej zóne U-Mo mineralizácie. Mineralogickým výskumom vzoriek z lokality Hnilčík boli identifikované minerály iriginit (molybdénan), metatorbernit (fosfát) a sadrovec (síran). Tieto minerály sa vyskytujú najmä vo forme povlakov, nátekov a jemnozrných agregátov. Ich vznik je spojený so supergennými procesmi, ktoré prebiehali počas zvetrávania primárnej uránovej mineralizácie. Identifikácia minerálov bola potvrdená pomocou práškovej röntgenovej difrakcie (PXRD), pričom získané difrakčné záznamy vykazujú dobrú zhodu s publikovanými referenčnými údajmi. Zistené výsledky prispievajú k lepšiemu poznaniu mineralogických pomerov uránovej mineralizácie v oblasti severného gemerika a rozširujú doterajšie poznatky o sekundárnych mineráloch uránu v tejto oblasti.

PodĎakovanie

Tento mineralogický výskum bol podporený projektmi Ministerstva školstva Slovenskej republiky VEGA-1/0574/25 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-22-0092.

Literatúra

[1] GRECULA, P. (ed.), 1995. *Ložiská nerastných surovín Slovenského rudohoria*. Bratislava: Geocomplex, 829 s. ISBN 80-967018-3-1.

[2] ROJKOVIČ, I., 1997. *Uranium mineralization in Slovakia*. Acta Universitatis Comenianae, Monografia, Bratislava, 1–117.

[3] NOVOTNÝ, L., MIHÁL, F., 1987. Nové litostratigrafické jednotky v krompašskej skupine. *Mineralia Slovaca*, 2, 97–113.

[4] ROJKOVIČ, I., MIHÁL, F., 1991. Geologická stavba a uránové zrudnenie v perme severovýchodnej časti Slovenského rudohoria. *Mineralia Slovaca*, 23, 123–132. ISSN 0369-2086.

[5] ROJKOVIČ, I., NOVOTNÝ, L., 1993. Uránové zrudnenie v gemeriku. *Mineralia Slovaca*, 25, 368–370.

[6] LOCOCK, A. J., BURNS, P. C., 2003. Crystal structures and synthesis of the copper-dominant members of the autunite and meta-autunite groups: Torbernite, zeunerite, metatorbernite and metazeunerite. *The Canadian Mineralogist*, 41, 489–502. ISSN 0008-4476.

[7] ZBGIS, 2024. Základná báza geografického informačného systému. Dostupné online: <https://zbgis.skgeodesy.sk/>

Geológia a mineralizácia hydrotermálne – žilného ložiska polymetalických rúd Jasenie – Soviansko (Tatrikum, Západné Karpaty, Stredné Slovensko)

Geology and mineralogy of the hydrothermal – vein base metals deposit Jasenie – Soviansko (Tatric Unit, Western Carpathians, Central Slovakia)

Marek Ratkovský¹ - Štefan Ferenc¹

Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
mratkovsky@student.umb.sk, stefan.ferenc@umb.sk

Abstrakt

Ložisko Jasenie – Soviansko, situované severne od obce Jasenie v južnej časti pohoria Nízke Tatry, predstavuje historicky významnú lokalitu polymetalickej Pb-Zn mineralizácie viazanej na hydrotermálne žily v kryštalíniku tatrickej jednotky Západných Karpát. Cieľom práce je charakterizovať geologicko-mineralogické pomery ložiska a prezentovať nové nálezy supergénnych minerálov zistené počas výskumu v rokoch 2024–2025. Rudná mineralizácia je tvorená najmä galenitom so sprievodnými sulfidmi, pričom supergénne procesy viedli k vzniku bohatej asociácie sekundárnych minerálov. Výskum nadväzuje na predchádzajúce práce a je založený na štúdiu materiálu z historických banských diel a hald. Zistené výsledky rozširujú doterajšie mineralogické poznatky, prispievajú k objasneniu genézy mineralizácie a potvrdzujú význam ložiska z hľadiska výskumu supergénnych procesov polymetalických ložísk.

Kľúčové slová: hydrotermálna polymetalická mineralizácia, supergénna zóna, supergénne minerály, kryštalínikum, tatrikum, Západné Karpaty

Abstract

The Jasenie – Soviansko deposit, located north of the Jasenie village in the southern part of the Nízke Tatry Mts., represents a historically significant base metals Pb-Zn hydrothermal vein mineralization occurrence in the crystalline of the Tatric Unit. This work is devoted to the characterize the geological and mineralogical setting of the deposit and report new supergene minerals identified during the 2024–2025 survey. The ore mineralization is dominated by galena with accompanying sulfides, while supergene processes have produced a diverse suite of secondary minerals. The research builds on previous studies and is based on

material from historical mine work and tailings dump. The findings expand current mineralogical knowledge, contribute to understanding the genesis of the mineralization, and confirm the deposit's significance for studying supergene processes in the base metals deposits.

Key words: hydrothermal base metals mineralization, supergene zone, supergene minerals, crystalline basement, Tatric Unit, Western Carpathians

Úvod

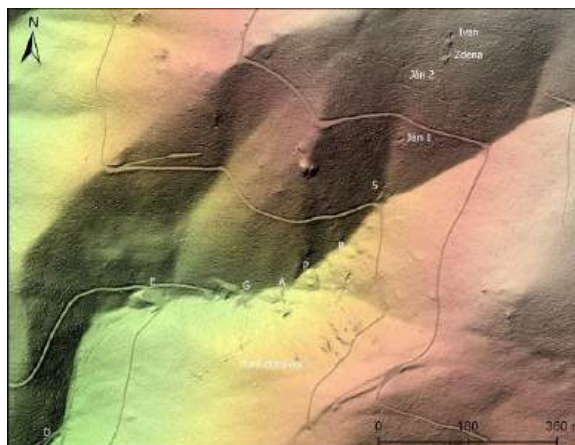
Článok je zameraný na charakteristiku geologicko-mineralogických pomerov ložiska polymetalických rúd Jasenie - Soviansko a opis výskytu nových nálezov supergénnych minerálov z oxidačnej časti ložiska počas mineralogického výskumu v rokoch 2024-2025. Ložisko Jasenie – Soviansko je historicky známa lokalita olovených rúd, ktoré bolo opisované už v roku 1638 a spomínané v práci Pécha z roku 1887. Zásoby striebornosých olovených rúd sa však ukázali ako nerentabilné s nízkou kovnosťou, oproti súdobo ťaženým Hodruško-Štiavnickým rudám. Detailný geologický prieskum ložiska bol realizovaný v rokoch 1949 až 1958 [1,2]. Neskôr bol vykonaný detailný mineralogický výskum Luptákovou a Pršekom (2004). Výskyt supergénnych minerálov na ložisku Jasenie-Soviansko ako prvý uvádza začiatkom 19. storočia Zipser [3], ktorý opísal pyromorfit a ceruzit. Novšia práca Luptákovej a Chovana [4] dokumentuje na tejto lokalite prítomnosť ceruzitu, hemimorfitu, aragonitu, jarositu, Fe-oxyhydroxidov a sekundárnych Cu minerálov, konkrétne covellitu a azuritu. Z haldového materiálu štôlne G následne Števkou a Ozdín [5] uviedli výskyt supergénneho striebra a akantitu. Števkou [6] opisuje výskyt kryštalických kôr mimetit. Najnovšie charakterizovali Ratkovský a Števkou [7] supergénne minerály zo starých banských prác: ceruzit, anglesit, mimetit, azurit, malachit, oxyplumboroméit a linarit.

Rudná mineralizácia sa viaže na hydrotermálne žily v kryštaliniku tatrika a je reprezentovaná primárnymi sulfidickými minerálmi (galenit, minerály skupiny tetraedritu, bournonit...), ktoré podliehajú supergénnym procesom vedúcim k vzniku sekundárnych minerálov [2]. Predkladaný článok nadväzuje na predchádzajúce poznatky a jeho cieľom je poskytnúť detailný pohľad na ložisko Jasenie – Soviansko, vrátane charakteristiky geologickej stavby, typu a genézy mineralizácie a jej vzťahu k supergénnym minerálom.

1 Lokalizácia a geologicko-mineralogická charakteristika ložiska



Obr. 1 Staré banské práce na hlavnej žile. Stav október 2025. Foto: [Marek Ratkovský]



Obr. 2 Mapa banských prác na ložisku Jasenie – Soviansko. Upravil v ArcGIS Pro: [Marek Ratkovský]

Ložisko Soviansko sa nachádza 7 km severne od obce Jasenie v Jasenskej doline na južných svahoch Ďumbierskych Nízkych Tatier. Banské práce sú situované JZ svahu kóty Struhár (1741 m n. m.) v nadmorskej výške 750 až 1215 m n. m. Širšie okolie ložiska je tvorené páskovanými a okatými pararulami a migmatitmi, ktoré sú často tektonicky postihnuté a postupne k centru ložiska a podliehajú granitizácii [2]. Mineralizácia na ložisku vznikala v niekoľkých štádiách. Hydrotermálna polymetalická mineralizácia na ložisku Soviansko formuje komplexný žilný systém pozostávajúci z hlavnej žily a deviatich podložných odžilkov. Celková dĺžka tohto žilného systému presahuje 800 m, jeho hrúbka sa pohybuje v intervale 50 až 150 m a jeho uklonná hĺbka dosahuje približne 200 m. Mocnosť jednotlivých rudných telies je premenlivá, od niekoľkých centimetrov až po 2 m, pričom priemerná hrúbka žíl je 0,45 m [1]. Dominantným minerálom je galenit, sprevádzaný menším množstvom sfaleritu, tetraedritu, pyritu a bournonitu. Nerudné minerály sú reprezentované kremeňom, barytom a karbonátmi [2]. Vzácnnejšie sa vyskytuje boulangerit, meneghinít a argentotetraedrit-(Fe) [8].

Na lokalite Soviansko sú dodnes v teréne zreteľne identifikovateľné pozostatky historických banských prác viazané na Hlavnú žilu: povrchové dobývky a zárezy, menšie haldy, krátke prieskumné štôlne, ako aj rozsiahlejšími haldovými akumuláciami pochádzajúcimi z prieskumných prác realizovaných v 50. rokoch 20. storočia (obr. 1, 2). Výrazná oxidácia povrchových častí rudných žíl vytvorila priaznivé podmienky pre vznik bohatej supergénnej mineralizácie [7].

2 Charakteristika hlavných minerálov ložiska



Obr. 3 Priehľadné až biele agregáty anglesitu v asociácii s galenitom (sivý a lesklý). Rozmery záberu sú 4 x 3 cm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.1 Anglesit - PbSO_4

Kryštalizuje v rombickej sústave. Na lokalite vzniká zvetrávaním galenitu v puklinách a dutinách kremennej žiloviny (obr. 3). Tvorí priehľadné až biele agregáty s masným leskom, veľkosti do 3 x 3 cm. Zriedkavejšie boli nájdené aj dobre vyvinuté prizmatické kryštály anglesitu veľké do 5 mm. Na lokalite je to relatívne zriedkavý minerál.

2.2 Azurit - $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$

Kryštalizuje v monoklickej sústave. Vzniká v oxidačných častiach rudného ložiska. Tvorí tenké modré povlaky na puklinách barytovej žiloviny so zvetranými sulfidmi. Vystupuje v asociácii s malachitom. Vyskytuje sa zriedkavo. Nájdený bol najmä na haldách dobývok na Hlavnej žile.



Obr. 4 Agregát tabuľkovitých kryštálov barytu. Veľkosť vzorky je 13 x 10,5 cm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.3 Baryt - BaSO_4

Kryštalizuje v rombickej sústave. Na ložisku má najčastejšie biele, menej modrasté, alebo až ružové sfarbenie. Patrí k najmladšiemu paragenetickému štádiu polymetalických žíl. Je hojným minerálom. Na lokalite je cukrovo zrnitý alebo tvorí tabuľkovité kryštály do niekoľkých cm (obr. 4).



Obr. 5 Oloveno-sivé agregáty bournonitu v kremennej žilovine. Rozmery záberu sú 12 x 9 cm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.4 Bournonit - PbCuSbS_3

Kryštalizuje v rombickej sústave. Farba je olovenosivá. Tvorí masívne agregáty veľkosti do niekoľkých cm (obr. 5), nachádza sa spolu s galenitom. Je hojným minerálom na lokalite, hlavne na halde štôlne G.



Obr. 6 Agregáty ceruzitu. Šírka záberu je 12 mm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.5 Ceruzit - PbCO_3

Kryštalizuje v rombickej sústave. Je najrozšírenejší supergénnym minerál na lokalite. Vyskytuje sa vo forme bielych povlakov a kôr na zvetranej žilovine s vysokým obsahom galenitu. V dutinách a puklinách žiloviny, ako aj v okolitých alterovaných horninách, vytvára dobre vyvinuté prizmatické až tabuľkovité kryštály (ich zrasty a agregáty) s výrazným skleným leskom. Veľkosť kryštálov sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí 2–3 mm, výnimočne dosahujú až 1 cm (obr. 6).



Obr. 7 Sýtomodré kryštalické agregáty linaritu v asociácii spolu so žltým oxyplumboroméitom. Šírka záberu je 5 mm. Foto: [Martin Števko].

2.9 Linarit - $\text{PbCuSO}_4(\text{OH})_2$

Kryštalizuje v monoklinickej sústave. Na lokalite patrí medzi vzácne minerály. Vyskytuje sa vo forme sýtomodrých kryštalických povlakov a agregátov s rozmermi približne 3×2 mm (obr. 7), ktoré sa nachádzajú na puklinách kremeňovo-barytovej žiloviny. Vystupuje v asociácii s oxyplumboroméitom a sprevádza zvetraný bournonit a galenit.



Obr. 8 Zelené, vejárovité agregáty prizmatických kryštálov malachitu v dutine kremeňa. Šírka záberu je 2 mm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.6 Malachit - $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$

Kryštalizuje v monoklinickej sústave. Na lokalite je bežne sa vyskytujúci minerál. Najčastejšie sa nachádza vo forme svetlozelených až sýtozelených povlakov. Zriedkavo boli v puklinách kremeňa pozorované aj radiálne agregáty prizmatických kryštálov do 2 mm (obr. 8).



Obr. 9 Žltozelený mimetit v asociácii spolu s bielym ceruzitom. Šírka záberu je 20 mm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.7 Mimetit - $\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$

Kryštalizuje v hexagonálnej sústave. Tvorí agregáty žltozelenej až žltej farby. Na lokalite je pomerne rozšíreným minerálom. V starých banských prácach na Hlavnej žile sa mimetit najčastejšie vyskytuje v asociácii s ceruzitom vo forme žltých polguľovitých agregátov dosahujúcich veľkosť do 2 mm (obr. 9). Výnimočne boli v ľavej časti haldy štôlne G nájdené bohatšie vzorky

mimetitu s agregátmi do 3 mm, ktoré pokrývali plochy až 3 × 3 cm.



Obr. 10 Bohatá galenitová žilovina. Veľkosť vzorky je 9 x 6,5 cm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.8 Galenit – PbS

Kryštalizuje v kubickej sústave, má olovenosivú farbu. Je hlavným rudným a najrozšírenejším minerálom na lokalite. Tvorí bohaté akumulácie v kremennej žilovine. V drúzových dutinách často býva dokonalo idiomorfný a jeho kryštály majú veľkosť do 3 mm (obr. 10).



Obr. 11 Žltý oxyplumboroméit v asociácii s ceruzitom (biely) v kmeni. Šírka záberu je 14 mm Foto: [Marek Ratkovský]

2.10 Oxyplumboroméit - $Pb_2Sb_2O_6(O,OH)$

Kryštalizuje v kubickej sústave. Na lokalite patrí medzi pomerne bežné minerály, najmä na haldách starých dobývok. V kmeni so zvetranými sulfidmi sa vyskytuje vo forme žltých práškovitých až zemitých agregátov

(obr. 11), pričom často vytvára aj pseudomorfózy po agregátoch sulfosolí veľkosti do 2 × 2 cm.



Obr. 12 Sfalerit (hnedožltý) v asociácii s galenitom (tmavšie sivý) a bournonitom (svetlosivý) v kmeni. Veľkosť vzorky je 10 x 9 cm. Foto: [Marek Ratkovský]

2.11 Sfalerit - ZnS

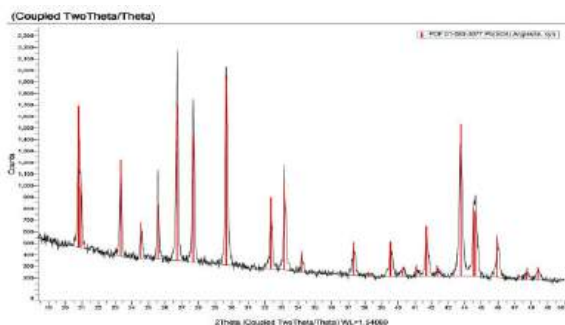
Kryštalizuje v kubickej sústave, má hnedožltý farbu so žltkastým odtieňom (obr. 12). Zriedkavo vytvára hypidomorfné kryštály s maximálnou veľkosťou do 1 cm, častejšie sa však vyskytuje vo forme nepravidelne ohraničených jemnozrnných agregátov. Je pomerne častým minerálom vystupujúcim v asociácii spolu s galenitom.

3 Výsledky a diskusia

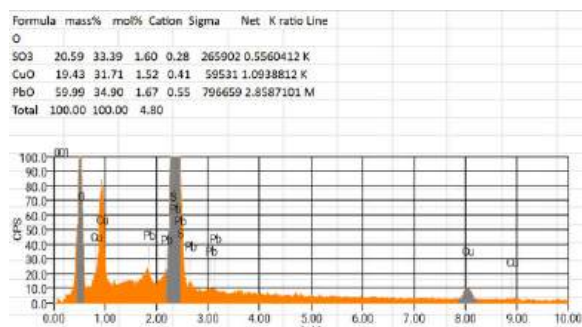
Mineralogický výskum realizovaný v rokoch 2024–2025 na lokalite Jasenie – Soviansko potvrdil prítomnosť bohatej supergénnej mineralizácie v supergénne alterovaných častí polymetalických hydrotermálnych žíl a navetraný haldový materiál. Počas terénneho výskumu boli na haldových akumuláciách a v odkryvoch rudných žíl identifikované aj primárne minerály (galenit, sfalerit, bournonit a baryt). Ich určenie bolo realizované na základe makroskopického štúdia, predovšetkým podľa typických morfológických znakov, fyzikálnych vlastností a vzájomných paragenetických vzťahov.

Supergénne minerály (anglesit, azurit, ceruzit, malachit, mimetit, linarit a oxyplumboroméit) boli identifikované pomocou práškovej röntgenovej difrakcie (PXRD) a kvalitatívnej chemickej analýzy metódou EDS. Merania robil Martin Števkó a Tomáš Mikuš. Metóda PXRD (graf 1) je založená na difrakcii röntgenového žiarenia na kryštálových rovinách analyzovanej látky a umožňuje ich presnú identifikáciu

podľa charakteristického difrakčného záznamu, zatiaľ čo EDS analýza (graf 2), realizovaná v elektrónovom mikroanalýzátore, poskytuje informácie o prvkovom zložení na základe detekcie charakteristického röntgenového žiarenia jednotlivých prvkov.



Graf 1 PXRD záznam anglesitu. Autor: [Martin Števkó]



Graf 2 EDS spektrum anglesitu. Autor: [Tomáš Mikuš]

Záver

Ložisko Jasenie - Soviansko predstavuje významnú historickú lokalitu polymetalickej hydrotermálne žilnej mineralizácie v kryštaliniku tatrika na južných svahoch Nízkych Tatier. Mineralizácia je sústredená v žilnom systéme s dominanciou galenitu, sprevádzaného ďalšími sulfidmi a sulfosolami, pričom nerudnú zložku tvoria najmä kremeň, baryt a karbonáty. Supergénne procesy spojené so zvetrávaním primárnych sulfidov vytvorili pestrú asociáciu sekundárnych minerálov. Výskum z rokov 2024–2025, založený na štúdiu materiálu z hald a starých banských diel potvrdil významnú úlohu sepergénnych premien polymetalických rúd aj vysokú mineralogickú diverzitu oxidačnej zóny. Nové nálezy a ich charakteristika rozširujú doterajšie poznanie lokality a prinášajú ucelenejší pohľad na jej genézu a vývoj. Výsledky zároveň potvrdzujú, že ložisko je aj po ukončení ťažby významnou mineralogickou lokalitou s vedeckým potenciálom, najmä pre výskum sepergénnych procesov obdobného typu ložísk.

Podakovanie

Autor ďakuje svojmu školiteľovi, Štefanovi Ferencovi, za odborné vedenie a cenné pripomienky pri príprave článku. Zároveň ďakuje Martinovi Števkovi za spoluprácu pri terénnom výskume, analýze, fotodokumentácii časti minerálov a tiež poskytnutie analýzy od Tomáša Mikuša.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] LISÝ, Emil; SOBOLIČ, Peter, (1959). Záverečná správa s výpočtom zásob Jasenie-Pb, so stavom k 1.1.1959. Manuskript, archív ŠGÚDŠ, Bratislava, s. 1-261, archívne číslo: 8337.

[2] POUBA, Zdeněk; VEJNAR, Zdeněk, (1955). Polymetalické rudní žily u Jasenie v Nízkych Tatrách. Sborník Ústředního ústavu geologického, 22, s. 485-530.

[3] ZIPSER, Christian Andreas, (1817). Versuch eines topographisch-mineralogischen Handbuches von Ungern. Oedenburg: Carl Friedrich Wigand, s. 1-440.

[4] LUPTÁKOVÁ, Jarmila; CHOVAN, Martin, (2003). Sekundárne minerály Pb-Zn ložiska Jasenie-Soviansko v Nízkych Tatrách. Mineralia Slovaca, 35, 2, s. 141-146.

[5] ŠTEVKO, Martin; OZDÍN, Daniel, (2012). Supergénne striebro a akantit z polymetalického ložiska Jasenie-Soviansko v Nízkych Tatrách (Slovenská republika). Bulletin mineralogicko-petrologického oddelení Národního muzea v Praze, 20, 1, s. 47-51.

[6] ŠTEVKO, Martin, (2020). Výskyt minerálov mimetit-pyromorfitovej série na území Slovenskej republiky. Minerál, 28, 1, s. 11-18.

[7] RATKOVSKÝ, Marek; ŠTEVKO, Martin, (2026). Nové nálezy sekundárnych minerálov na Pb-Zn ložisku Jasenie - Soviansko. ZA MINERÁLMI, 2, 01, s. 43-49.

[8] LUPTÁKOVÁ, Jarmila; PRŠEK, Ján, (2004). Sulfosoli z Pb-Zn mineralizácie na ložisku Jasenie-Soviansko (Nízke Tatry). Mineralia Slovaca, 36, 3-4, s. 286-290.

Zaujímavosti územia MAS Bebrava

Attractions of the MAS Bebrava area

Ľuboš Sokol¹ - Hilda Kramáreková²

^{1,2} Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja,

FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹ lubos.sokol@student.ukf.sk, ²hkramarekova@ukf.sk

Abstrakt

MAS Bebrava je mikroregión nachádzajúci sa na západnom Slovensku, konkrétne v Trenčianskom kraji, v okrese Bánovce nad Bebravou. K členstvu v tejto miestnej akčnej skupine sa hlási okresné mesto Bánovce nad Bebravou a 23 obcí. Disponuje mnohými kultúrno-historickými pamiatkami, prírodnými, ale aj inými zaujímavosťami, ktoré predstavujú potenciál pre rozvoj cestovného ruchu.

Cieľom príspevku je predstaviť zaujímavosti územia MAS Bebrava so snahou dostať do povedomia aj také, ktoré by mohli byť pre turistov atraktívne, ale nepatria medzi tie najnavštevovanejšie. V závere sa preto venujeme aj aktuálnemu stavu marketingu MAS Bebrava a predstavujeme aj návrhy na jeho rozvoj.

Pri vypracovávaní článku boli použité viaceré metódy. Okrem metódy terénneho výskumu sme použili metódu vysvetľujúceho opisu, komparatívnu, štatistickú i kartografickú metódu. Na základe systémovej metódy sme článok rozdelili do jednotlivých kapitol a podkapitol.

Kľúčové slová: MAS Bebrava, zaujímavosti, pamiatky, rozvoj marketingu

Abstract

MAS Bebrava is a microregion located in western Slovakia, specifically in the Trenčín Region, in the district of Bánovce nad Bebravou. The district town of Bánovce nad Bebravou and 23 municipalities are members of this local action group. It boasts numerous cultural and historical landmarks, natural attractions, as well as other points of interest that represent potential for tourism development.

The aim of this paper is to present the attractions of the MAS Bebrava area, with an effort to highlight also those that may be appealing to tourists but are not among the most frequently visited. In the conclusion, we therefore also address the current state of marketing in MAS Bebrava and present proposals for its further development.

Several methods were used in the preparation of the article. In addition to field research, we applied the method of explanatory description, as well as comparative, statistical, and cartographic methods. Based on the systems approach, the article was divided into individual chapters and subchapters.

The article focuses on presenting the points of

interest of the MAS Bebrava region, with the aim of raising awareness about attractions that may be appealing to tourists but are not among the most frequently visited.

Key Words: MAS Bebrava, attractions, heritage sites, marketing development

Úvod

Miestna akčná skupina (MAS) Bebrava sa nachádza na západnom Slovensku, v Trenčianskom kraji, v okrese Bánovce nad Bebravou. Túto MAS tvorí okresné mesto Bánovce nad Bebravou a 23 obcí. V predmetnom území sa nachádza množstvo kultúrno-historických pamiatok, prírodných zaujímavostí a konajú sa tu rôzne podujatia, ktoré sú predpokladom pre rozvoj cestovného ruchu. Marketing územia mikroregiónu je jednou z možností rozvoja cestovného ruchu.

Cieľom príspevku je priblížiť zaujímavosti územia MAS Bebrava a upozorniť aj na menej známe miesta, ktoré by mohli byť pre turistov atraktívne, hoci nepatria medzi najviac navštevované. Zameriame sa aj na zhodnotenie aktuálneho stavu marketingu územia a navrhujeme možnosti jeho ďalšieho rozvoja.

1 Teoreticko-metodické východiská

Informácie o mikroregióne sme získavali z rôznych informačných zdrojov, pričom viaceré sme overili vlastným terénnym výskumom, počas ktorého sme zhotovili aj fotografie zaujímavostí.

Základné informácie o MAS sme čerpali najmä zo Stratégie CLLD [1] a z oficiálnej webovej stránky mikroregiónu [2]. Údaje o rozlohe, počte obyvateľov a hustote zaľudnenia sme získali z online databázy Štatistického úradu SR [3]. Geomorfologické členenie sme spracovali podľa Mazúra a Lukniša [4]. MAS sme zaradili do regiónu cestovného ruchu podľa Atlasu krajiny SR dostupného na geoportáli [5]. Informácie o zaujímavostiach v meste Bánovce nad Bebravou sme čerpali z webovej stránky mesta [6]. Doplnujúce informácie sme získavali zo spravodajského portálu SME [7], z internetovej stránky Krížom-krážom Slovenskom [8] z webových stránok obcí [9], [10], [11]. Prírodné zaujímavosti sme spracovali na základe zdrojov [12], [13] a [14]. Informácie o kultúrnom dianí v meste Bánovce nad Bebravou sme získali zo zdrojov [15], [16]. Podujatia, ktoré organizuje Klub slovenských turistov v Bánovciach nad Bebravou, sme predstavili vďaka informáciám z webových stránok [17], [2], [18]

a [19]. Ďalšie zaujímavosti o vodných nádržiach, resp. termálnom kúpalisku sme spracovali na základe informácií zo zdrojov [20], [21] a [22]. Prehľad o aktuálnom stave marketingu MAS Bebrava sme získali najmä z oficiálnej webovej stránky MAS [2] a z platformy YouTube [23].

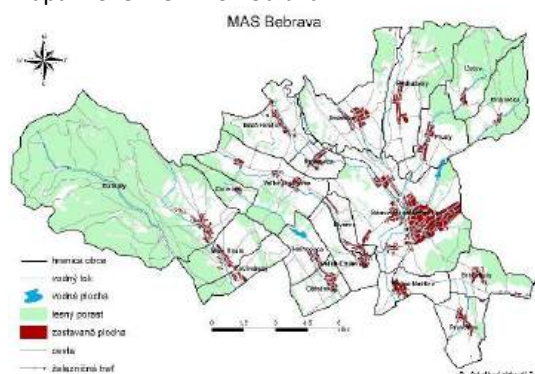
Pri vypracovávaní článku boli použité viaceré metódy [24]. Okrem metódy terénneho výskumu sme použili metódu vysvetľujúceho opisu, komparatívnu, štatistickú i kartografickú metódu. Na základe systémovej metódy sme článok rozdelili do jednotlivých kapitol a podkapitol.

2 Základné informácie o mikroregióne

MAS Bebrava sa nachádza na západnom Slovensku v južnej časti Trenčianskeho kraja, v okrese Bánovce nad Bebravou (mapa 1).

MAS Bebrava je občianske združenie, ktoré vzniklo v roku 2014, kedy priamo nadviazalo na predchádzajúce fungovanie mikroregiónu Združenie obcí Bánovecko. Dôvodom rozhodnutia založiť občianske združenie MAS Bebrava bola potreba zabezpečiť ďalší rozvoj územia prostredníctvom spolupráce verejného, súkromného a neziskového sektora [1]. Do tejto MAS patrí okresné mesto Bánovce nad Bebravou a 23 obcí: Borčany, Brezolupy, Cimenná, Dežerice, Dolné Naštice, Dubnička, Dvorec, Haláčovce, Chudá Lehota, Ľutov, Malá Hradná, Malé Hoste, Otrhánky, Podlužany, Pochabany, Pravotice, Prusy, Ruskovce, Šišov, Veľké Držkovce, Veľké Hoste, Veľké Chlievany, Zlatníky. Obce Borčany, Chudá Lehota, Šišov a Veľké Hoste sa k združeniu pridali v roku 2026 [2].

Mapa 1 Územie MAS Bebrava



Zdroj: [2]

Rozloha územia MAS je 478,88 km² a žije tu 25 450 obyvateľov (31.12.2024), z toho 12 482 mužov (49,05%) a 12 968 žien (50,95%). Priemerná hustota obyvateľstva je 53,14 obyvateľa na km² [3]. Najväčšiu rozlohu 50,44 km² má obec Zlatníky, ktorá má 694 obyvateľov. Rozlohou najmenšia obec je Dvorec s 2,6 km². Najmenej obyvateľov (100) žije v obci Cimenná a naopak najviac obyvateľov (16 103) v meste Bánovce nad Bebravou [3]. Základné informácie o MAS Bebrava k 31.12.2024 sú uvedené v tabuľke 1.

Podľa Mazúra a Lukniša (1986) územie MAS patrí do geomorfologických celkov Podunajská pahorkatina, Považský Inovec a Strážovské vrchy, podcelkov Nitrianska pahorkatina, Nitrianska niva, Vysoký Inovec, Nízky Inovec a Zliechovská hornatina a častí Bánovská pahorkatina, Bebravská niva a Kňaží stôl [4].

Obec	Rozloha (km ²)	Počet obyvateľov	Hustota zaľudnenia (obyv./ km ²)
Bánovce nad Bebravou	26,55	16103	611,38
Brezolupy	6,34	521	81,02
Cimenná	3,60	100	27,93
Dežerice	13,03	1150	87,72
Dolné Naštice	4,64	596	129,19
Dubnička	8,11	123	15,23
Dvorec	2,66	513	188,1
Haláčovce	4,68	349	74,73
Ľutov	8,58	176	20,58
Malá Hradná	7,91	407	51,53
Malé Hoste	6,81	403	59,07
Otrhánky	4,66	394	83,33
Podlužany	14,02	964	68,9
Pochabany	4,31	275	63,85
Pravotice	6,09	369	60,76
Prusy	7,52	666	87,37
Ruskovce	3,36	518	154,69
Veľké Držkovce	12,79	637	50,47
Veľké Chlievany	5,15	492	96,38
Zlatníky	50,44	694	13,71
Spolu	201,25	25450	53,14

Tabuľka 1 Základné informácie o MAS Bebrava k 31.12.2024

Zdroj: [3]

3 Zaujímavosti územia MAS Bebrava

Mikroregión MAS Bebrava disponuje mnohými zaujímavosťami rôzneho druhu. V meste Bánovce nad Bebravou, ale aj v jednotlivých obciach, možno nájsť viacero kultúrno-historických pamiatok a prírodných zaujímavostí. Rovnako sa tu organizujú kultúrne a športové podujatia charakteristické pre tento mikroregión a nájdeme tu aj viaceré športové a rekreačné areály. Z hľadiska cestovného ruchu patrí MAS Bebrava do Hornonitrianskeho regiónu [5].

3.1 Kultúrno-historické pamiatky

Kostol Najsvätejšej Trojice (obr. 1) pravdepodobne existoval už v 17. storočí. Hoci bol viackrát poškodený

požiarmi, vždy bol následne opravený. Predstavuje úzky kamenný zaklenutý chrám so severojužnou orientáciou, tromi oltármi, chórami, organom, hudobnými nástrojmi a dvoma kryptami. Bol vysvätený v roku 1803. Výstavbu financovali najmä župní a cirkevní hodnostári, čo pripomína aj latinský nápis na priečelí, ktorý v preklade znamená - zasvätený Trojjedinému Bohu. V roku 1929 bol do kostola doplnený betlehem od rezbára B. Reka z Kutnej Hory. Pred hlavným vstupom stojí kamenný kríž s ukrižovaným Kristom. Farnosť Bánovce nad Bebravou každoročne organizuje krížové cesty, ktoré prechádzajú aj členskými obcami MAS Bebrava (Bánovce nad Bebravou, Prusy a Dubnička) [6].



Obr. 1 Kostol Najsvätejšej Trojice
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Pamätný dom Janka Jesenského (obr. 2) sa nachádza v Bánovciach nad Bebravou na Jesenského ulici. Je venovaný pôsobeniu JUDr. Janka Jesenského v Bánovciach, ktorý tu býval v rokoch 1905 – 1914, čo je uvedené aj na pamätnej tabuli (obr. 3) na dome od akademického sochára M. Tomášku. Ide o samostatne stojaci prízemný rodinný dom, postavený na začiatku 20. storočia, ktorého fasádu zdobí secesné ornamentálne tvaroslovie. Bánovské gymnázium, ktoré nesie Jesenského meno, desiatky rokov jeho dom využívalo ako učebne, nakoľko priestory v škole sú nepostačujúce. Na Pamätnom dome Janka Jesenského už dlhšiu dobu prebiehajú rekonštrukčné práce, v budúcnosti by mal slúžiť ako múzeum [7].



Obr. 2 Pamätný dom Janka Jesenského
Autor: Ľuboš Sokol, 2026



Obr. 3 Pamätná tabuľa na dome J. Jesenského
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Synagóga (obr. 4) bola postavená v roku 1862 v historizujúcom slohu. Nachádza sa taktiež na spomínanej Jesenského ulici. V roku 1963 prešla budova rozsiahlou prestavbou z dôvodu zmeny na predajňu nábytku. Pôvodné polkruhovým oblúkom ukončené okná boli zmenené a namiesto nich boli vsadené dvojité drevené jednokrídlové a dvojkrídlové okná. Taktiež vzniklo aj druhé podlažie obmurovaním pôvodných liatinových stĺpov. Od roku 1990 patrí budova evanjelickej cirkvi a. v., ktorá tu realizovala komplexnú obnovu [6].



Obr. 4 Synagóga
Autor: Ľuboš Sokol, 2025

Pamätník Ľudovíta Štúra (obr. 5) bol postavený v roku 1936 a je dielom akademického sochára Jozefa Pospíšila. Stojí v centre Bánoviec nad Bebravou na Námestí Ľudovíta Štúra juhovýchodne od Kostola Najsvätejšej Trojice. Ľudovít Štúr, hlavná postava pamätníka, je zahalený v dlhom plášti až k základni podstavca. Vedľajšie plastiky sú vytesané z pieskovca a v dynamickom postoji sa ženú vpred pod vlajúcou zástavou. Zaujímavosťou je, že tento pamätník je prvým pamätníkom Ľudovíta Štúra na Slovensku a v roku 1963 bol vyhlásený za národnú pamiatku. Doteraz prešiel pamätník už tromi rekonštrukciami, konkrétne v rokoch 1991, 2005 a 2015 [6], [8].



Obr. 5 Pamätník Ľudovíta Štúra
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Budova mestského úradu (obr. 6) v Bánovciach nad Bebravou bola postavená v roku 1861. Významné postavenie mala počas SNP. Dňa 2.9.1944 sa tu konalo ustanovujúce zasadnutie 12-členného revolučného okresného národného výboru. S budovou sú spojené aj tragické udalosti nemeckej okupácie, kedy jej pivnice slúžili ako väznice pre civilistov a partizánov a o ich osudoch rozhodovalo Gestapo. Najtemnejším dňom mestského domu, ale aj histórie Bánoviec, bol 29. november 1944, keď Gestapo odviezlo ťažko zbitých väzňov na popravu. Na budove sa nachádzajú pamätne tabule z roku 1951 (obr. 7) pripomínajúce padlých partizánov a pôsobenia revolučného výboru. Dnes slúži ako sídlo mestského úradu a primátora mesta [6].



Obr. 6 Mestský úrad v Bánovciach nad Bebravou
Autor: Ľuboš Sokol, 2026



Obr. 7 Pamätná tabuľa na budove mestského úradu
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Kaplnka Panny Márie (obr. 8) býva popisovaná ako vstupná brána do obce Prusy. Pôvodná jaskynka, kde bola uložená socha Panny Márie, prešla v rokoch 1990 až 1991 vďaka pruským veriacim dôkladnou rekonštrukciou. Po obnovení ju 24.5.1992 posvätil Mons. Ján Sokol trnavský arcibiskup a metropolita Slovenska. Kaplnka slúži aj ako príjemné oddychové miesto s lavičkami na sedenie a tieňom troch vrb, ktoré rastú dookola [9].



Obr. 8 Kaplnka Panny Márie
Autor: Ľuboš Sokol, 2025

Dvorecký kaštieľ (obr. 9) sa často označuje za dominantu obce, nakoľko predstavuje významnú historickú pamiatku postavenú v druhej polovici 19. storočia Jurajom Csaradom. Je to neorokokový objekt letohrádkového charakteru, postavený na vysokej architektonickej úrovni. Pôvodne bol kaštieľ zariadený nábytkom z Talianska, Francúzska a Anglicka. Časť z neho možno ešte dnes vidieť v Smolenickom zámku. Súčasťou kaštieľa bola aj knižnica, ktorá sa dodnes zachovala ako súčasť fondov Univerzitetnej knižnice v Bratislave [10].



Obr. 9 Kaštieľ vo Dvorci
Autor: Ľuboš Sokol, 2025

V roku 2023 sa v obci Veľké Chlievany uskutočnila rekonštrukcia rodného domu PhDr. Cyrila Mariána Guniša, popredného širiteľa taliančiny na Slovensku, vďaka čomu vzniklo **Múzeum Veľké Chlievany** (obr. 10). Ide o budovu s architektonickými znakmi pôvodných domov obce. Služi na výstavu historických fragmentov slávnych rodákov obce a zbierky starých predmetov. Vďaka tomu vznikla turistická infraštruktúra malých rozmerov na verejné využitie, nakoľko v obci ani v jej blízkosti sa takéto múzeum nenachádzalo [11].



Obr. 10 Múzeum vo Veľkých Chlievanoch
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

3.2 Prírodné zaujímavosti

V území mikroregiónu sa z hľadiska záujmov európskej ochrany prírody NATURA 2000 nachádzajú 3 územia európskeho významu, ktoré prechádzajú viacerými obcami, 1 prírodná rezervácia, 1 národná prírodná rezervácia, 1 chránený strom a 1 chránený areál (tab. 2).

Obec	Kategória a názov
Podlužany Prusy Ľutov	ÚEV Kňaží stôl
Zlatníky	ÚEV Livinská jelšina
Dubnička	ÚEV Dubnička
Ľutov	NPR Bradlo
Podlužany	PR Ľutovský Drieňovec
Zlatníky	CHA Kulháň
Podlužany	CHS Rákociho dub

Tabuľka 2 Prírodné zaujímavosti na území MAS Bebrava
Zdroj: [13]

ÚEV Kňaží stôl sa nachádza v územiach obcí Podlužany, Prusy a Ľutov. Má výmeru 4 251 ha. Územie bolo vyhlásené za chránené v roku 2004. Je v správe CHKO Ponitrie a poskytuje nádherné výhľady do okolitých dolínok od hrebeňa Závadskej Poľany cez Kamenné vráta, Skalný vrch až po vrcholy Drieňovca, Smradľavého vrchu, Bradla a samotného Kňažieho stola. Predmetom ochrany v tejto časti sú napríklad lipovo-javorové sutinové lesy, eurosibírske dubové lesy na spraši a piesku alebo kyslomilné bukové lesy. V jarných mesiacoch tu možno vidieť poniklece prostredné a veľkokveté [12].

Prírodná rezervácia Ľutovský Drieňovec sa nachádza v obciach Ľutov a Podlužany. Má rozlohu 260 ha a je vyhlásená za chránenú od roku 1993. Predmetom ochrany je výskyt veľkého množstva xerothermnej vegetácie (na južných svahoch Vysokaj a Drieňovca) so vzácnymi druhmi rastlín aj živočíchov. Z lesných spoločenstiev sú na hrebeňoch zastúpené bučiny, miestami aj voľné dúbravy [13].

ÚEV Livinská jelšina sa nachádza v obci Zlatníky. Územie o rozlohe 13 ha bolo vyhlásené za chránené v roku 2004. Je v správe CHKO Ponitrie a z chránených biotopov európskeho významu sa tu nachádzajú jaseňovo-jelšové podhorské lužné lesy a bukové a jedľovo-bukové kvetnaté lesy. Z chránených živočíšnych druhov európskeho významu sa tu vyskytuje kunka červenobruchá (*Bombina bombina*) a pásikavec veľký (*Cordulegaster heros*), ktorý je najväčšou vážkou žijúcou na území Slovenska [14].

Národná prírodná rezervácia Bradlo sa nachádza v obci Ľutov. Vyhlásené za chránené je od roku 1988 a má rozlohu 97 ha. Predmetom ochrany je ochrana xerotermej vegetácie, vzácných horských a dealpínskych druhov rastlín (aj vstavačovitých) v Strážovských vrchoch na mezozoickom podklade (vápence, dolomity, kremence, kremité pieskovce). Na severných svahoch sa nachádzajú bučiny, na južných dúbavy a lesostepné spoločenstvá [13].

ÚEV Dubnička sa nachádza v rovnomennej obci s rozlohou 197 ha. Správca je CHKO Ponitrie a za chránené bolo vyhlásené v roku 2017. V tomto lesnatom území sa vyskytuje biotop európskeho významu dubové nátržníkové lesy, ktorý dopĺňa biotop bukové a jedľovo-bukové kvetnaté lesy [13].

ÚEV Kulháň o rozlohe 129 ha sa nachádza v obci Zlatníky. Správcom je CHKO Ponitrie. K biotopom, ktoré sú predmetom ochrany v tomto území, môžeme zaradiť napríklad jaseňovo-jelšové podhorské lužné lesy, dubové nátržníkové lesy, vlhko a kyslomilné brezovo-dubové lesy. Zo živočíšnych druhov európskeho významu tu môžeme nájsť napr. roháča obyčajného (*Lucanus cervus*) alebo kunku červenobruchú (*Bombina bombina*) [14].

Rákociho dub, ktorý bol vyhlásený za chránený strom v roku 2005, sa nachádza v obci Podlužany. Dôvod ochrany je vedecko-výskumný, náučný a kultúrno-výchovný. Jeho aktuálny vek sa odhaduje na 344 rokov. Má mohutný estetický vzhľad a navyše aj historickú spojitosť s Rákociho povstaním v rokoch 1703 - 1711 [13].

3.3 Kultúrne a športové podujatia, rekreačné areály

O kultúrne vyžitie sa v meste Bánovce nad Bebravou stará najmä **mestské kultúrne stredisko**, ktoré pravidelne organizuje divadelné predstavenia, koncerty, spoločenské akcie a zábavy [15].

V MAS pôsobí aj **folklórny súbor Drienovec**, ktorý vznikol v roku 1976 a pôvodne niesol názov Tatrovák. Pri jeho zrode stáli mladí ľudia, pracovníci závodu TATRA, za ktorého podpory folklórny súbor vznikol. Pri 15. výročí založenia došlo k oficiálnemu premenovaniu na Folklórny súbor Drienovec. Aktuálne pôsobí pri Základnej umeleckej škole Dezidera Kardoša v Bánovciach nad Bebravou. Skladá sa z tanečnej, speváckej a hudobnej zložky a v súčasnosti v ňom

pôsobí približne 20 členov. Zúčastňuje sa podujatí, ktoré usporadúva mesto Bánovce nad Bebravou a samostatne pravidelne organizuje fašiangový sprievod mestom a tanečnú zábavu spojenú s pochovávaním basy [16].

Klub slovenských turistov (KST) Bánovce nad Bebravou každoročne organizuje tradičný cestovateľský festival s názvom **Hory, cesty, ľudia**, ktorý ponúka rozprávania domácich aj hosťujúcich cestovateľov o ich zážitkoch z ciest takmer z celého sveta [2]. Okrem toho KST organizuje pravidelne najmä v jarných, letných a jesenných mesiacoch rôzne turistické a športové aktivity nielen priamo v meste, ale aj v okolí [17]. Taktiež v réžii KST sa každoročne od roku 1998 prvú septembrovú nedeľu koná cykloturistické podujatie **Bánovecká parenica**, ktoré priaznivcom cyklistiky ponúka potulky okolím mesta. Toto športové podujatie je vhodné pre všetky vekové kategórie, nakoľko ponúka 5 trás rôznej dĺžky a náročnosti [18].

V obci Veľké Držkovce sa od roku 2011 každoročne konajú majstrovstvá vo varení držkovej polievky pod názvom **Držkovská držka**. Podujatie býva okrem samotnej súťaže vo varení tradičnej špeciality spojené s bohatým sprievodným a kultúrnym programom v podobe koncertov, vystúpení miestnych kapiel, tomboly, atrakcií pre deti a večernej zábavy so živou hudbou [2].

V júni 2025 sa mesto Bánovce nad Bebravou a jeho okolité obce stali dejiskom významného podujatia **Spoločných majstrovstiev Slovenskej a Českej republiky v cestnej cyklistike**. Trasa prechádzala cez mesto a viaceré členské obce MAS Bebrava - Veľké Chlievany, Otrhánky, Haláčovce, Malé Hoste, Zlatníky, Cimenná, Dvorec, Veľké Držkovce a Dvorec [19].

Tradičným miestom na oddych pre domácich i návštevníkov okresného mesta je **vodná nádrž Prusy** (obr. 11), ktorá sa od Bánoviec nad Bebravou nachádza približne 4 km. Bola vybudovaná v rokoch 1987 – 1988 na potoku Dubnička. Rozprestiera sa na ploche 38 ha, pričom najhlbšie miesto pri hrádzi má až 14 metrov. K vodnej nádrži sa návštevníci môžu pohodlne dostať nielen z mesta Bánovce nad Bebravou, ale aj z neďalekej obce Prusy. Zaujímavosťou pritom je, že leží na území oboch – mesta aj obce. Vodná nádrž však od vybudovania nesie názov obce Prusy. Predovšetkým v letnom období sa stala cieľom víkendových prechádzok, no odvážni plavci z miestnej skupiny ľadové medvede ju využívajú aj počas zimy. Vodná plocha praje aj rybolovu, nakoľko slúži ako kaprový lovný revír. Od roku 2024 sa v tesnej blízkosti vodnej nádrže nachádza zábavný park pre rodiny, ktorý organizuje rôzne podujatia, ako napríklad vianočné trhy s názvom Vianočný les či koncerty rôznych interpretov [20].



Obr. 11 Vodná nádrž Prusy
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Druhá **vodná nádrž** územia MAS Bebrava sa nachádza severne od intravilánu obce **Haláčovce** (obr. 12), necelých 7 km od mesta Bánovce nad Bebravou. Bola vybudovaná v rokoch 1987 – 1990 na vodnom toku Haláčovka a má plochu 16 ha. Slúži ako lovný kaprový revír a jej okolie miestni obyvatelia využívajú ako miesto pre oddych, ale rovnako aj šport. V nádrži je možné sa kúpať na vlastné nebezpečenstvo a v zimných mesiacoch sem mnohí ľudia prichádzajú kvôli korčuľovaniu. Za pekného počasia je z hrádze možné vidieť Inovec (1 042 m n. m.), najvyšší vrch pohoria Považský Inovec. K vodnej ploche je dostupný prístup z obce od obecného úradu po panelovej ceste [21].



Obr. 12 Vodná nádrž Haláčovce
Autor: Ľuboš Sokol, 2026

Termálne kúpalisko Pažiť (obr. 13) v Bánovciach nad Bebravou začalo slúžiť verejnosti v roku 1978, odkedy bolo viackrát rekonštruované a modernizované. V roku 1990 tu bol zavedený prívod termálnej vody z Biskupíc v dĺžke 2600 metrov. V súčasnosti má kúpalisko kapacitu 1700 návštevníkov a obľubujú ho najmä rodiny s deťmi, ktoré sem prichádzajú aj z okolitých miest Trenčín, Partizánske a Prievidza. Teplota vrtu termálnej vody je 43°C, ale pri napúšťaní bazénov sa ochladzuje na 28 až 30°C [22].



Obr. 13 Termálne kúpalisko Pažiť
Zdroj: [22]

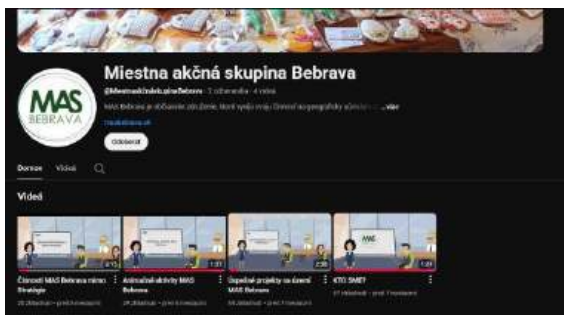
4 Marketing MAS Bebrava a možnosti jeho rozvoja

Marketing mikroregiónu zohráva dôležitú úlohu pri jeho rozvoji, nakoľko väčšia informovanosť o fungovaní a jednotlivých aktivitách MAS zvyšuje u ľudí záujem o predmetné územie. V súčasnosti marketing územia spočíva do veľkej miery v elektronických zdrojoch. Najviac informácií sa môže návštevník dozvedieť na webovej stránke MAS Bebrava (obr. 14) www.masbebrava.sk [2]. Nachádzajú sa tu základné informácie o vzniku združenia, členoch a ich histórii, ale aj priorít a projektov v rámci MAS. Webová stránka zároveň poskytuje informácie o výzvach a schválených projektoch. Taktiež tu možno nájsť informácie a fotografie z podujatí, ktoré MAS Bebrava organizovala alebo bola ich súčasťou.



Obr. 14 Webová stránka MAS Bebrava
Zdroj: [2]

Prostredníctvom siete YouTube, na kanáli Miestna akčná skupina Bebrava (obr. 15), mikroregión dosiaľ zverejnil štyri krátke videá o MAS, úspešných projektoch, animačných aktivitách a činnostiach mimo stratégie CLLD [23].



Obr. 15 YouTube kanál MAS Bebrava
Zdroj: [23]

MAS Bebrava sa zúčastňuje na rôznych podujatiach za účelom propagácie mikroregiónu. Ako príklad možno uviesť účasť na medzinárodnej poľnohospodárskej a potravinárskej výstave Agrokomplex v Nitre (obr. 16), kde sa predstavili remeselníci z územia MAS [2].



Obr. 16 MAS Bebrava na Agrokomplexe 2025
Zdroj: [2]

Zástupcovia MAS Bebrava sa taktiež zúčastňujú rôznych podujatí svojich členských obcí, ako napríklad oslavy výročia prvej písomnej zmienky. Mikroregión sa tu prezentuje svojím transparentom a rôznymi reklamnými predmetmi (obr. 17) [2].



Obr. 17 Propagačné predmety MAS Bebrava
Zdroj: [2]

V roku 2025 sa v priestoroch MAS Bebrava konal Deň otvorených dverí, kde mali záujemcovia možnosť vidieť ako MAS prispieva k rozvoju regiónu a stretnúť ľudí, ktorí stoja za projektami, ktoré MAS podporila napríklad v oblasti budovania infraštruktúry, podpory miestnych komunít a podnikania alebo rozvoja cestovného ruchu [2].

Od roku 2025 vydáva MAS Bebrava dvakrát ročne svoj newsletter (obr. 18), v ktorom čitateľov informuje o svojom dianí, zrealizovaných projektoch, aktivitách a podujatiach členov MAS Bebrava [2].



Obr. 18 Newsletter MAS Bebrava
Zdroj: [2]

Nakoľko sa MAS Bebrava neprezentuje na sociálnych sieťach, ako sú Facebook a Instagram, vidíme možnosť využívať tieto kanály pre pridávanie pravidelného obsahu o aktivitách - nadchádzajúcich, ale aj uskutočnených podujatiach. V kontexte rozvoja cestovného ruchu by mohla MAS Bebrava

prostredníctvom fotografií a videí na týchto sociálnych sieťach propagovať zaujímavosti svojho územia.

Čo sa týka printových zdrojov, mikroregión nedisponuje žiadnou ucelenou publikáciou, ktorá by ho komplexne charakterizovala. Vidíme preto príležitosť vo vypracovaní brožúry, ktorá by zahŕňala informácie o mikroregióne a jeho členoch. Prostredníctvom takejto brožúry by bolo možné obyvateľom, ale aj potenciálnym turistom, predstaviť mikroregión a jeho zaujímavosti z geografického, historického a kultúrneho hľadiska. Okrem reklamných predmetov by sa MAS Bebrava na podujatiach, ktoré navštevuje mohla prezentovať aj touto brožúrou.

Vzhľadom na to, že MAS Bebrava neorganizuje žiadne samostatné podujatie za účelom propagácie mikroregiónu, bolo by zaujímavé zaviesť každoročné podujatie typické pre tento mikroregión. Išlo by o podujatie s názvom „Bebrava žije!“, zamerané na prezentáciu činnosti miestnej akčnej skupiny, ktoré by sa konalo každoročne v júni vždy v inej členskej obci. Nachádzal by sa tu informačný stánok MAS Bebrava s reklamnými predmetmi a brožúrou o mikroregióne, no taktiež by sa tu prezentovali realizované projekty a prebiehala by diskusia o výzvach. Lokálni výrobcovia by v rámci podujatia mali príležitosť ponúkať svoje výrobky prostredníctvom ochutnávok, no taktiež by mohli prebiehať ukážky výroby remeselných produktov. Celé podujatie by sprevádzal bohatý kultúrny a sprievodný program, počas ktorého by sa mohol predstaviť aj miestny Folklorný súbor Drienovec, ale aj miestne hudobné skupiny. Pre rodiny s deťmi by boli pripravené tvorivé dielne a súťaže, ktoré by preverili poznatky o mikroregióne. Širokú verejnosť by MAS Bebrava informovala o podujatí „Bebrava žije!“ prostredníctvom sociálnych sietí či informačných letákov vyvesených v členských obciach.

Záver

Územie MAS Bebrava disponuje množstvom zaujímavostí rôzneho druhu, avšak možno konštatovať, že z hľadiska zastúpenia prevažujú kultúrno-historické pamiatky nad prírodnými zaujímavosťami. Nachádza sa tu množstvo sakrálnych stavieb, kostolov, kaštieľ, múzeum, ale aj iné pamiatky, ktoré oslovia najmä milovníkov histórie a kultúry. V mikroregióne sa zároveň organizuje množstvo výnimočných podujatí, ktoré majú potenciál prilákať návštevníkov z celého Slovenska. Zviditeľnenie atraktivít tohto mikroregiónu môže významne prispieť k rozvoju cestovného ruchu. Organizovanie podujatí, ako sú napríklad majstrovstvá v cestnej cyklistike, zvyšuje povedomie o regióne aj mimo jeho hraníc. V oblasti propagácie sa MAS snaží zviditeľňovať najmä prostredníctvom svojej webovej stránky, videí na platforme YouTube a účasťou na rôznych podujatiach, kde sa prezentuje aj svojimi reklamnými predmetmi. Naše návrhy na rozvoj marketingu sa preto orientujú

predovšetkým na formy propagácie, ktoré MAS Bebrava v súčasnosti nevyužíva. Na záver možno už len konštatovať, že MAS Bebrava má vhodné predpoklady pre ďalší rozvoj cestovného ruchu.

Poďakovanie

Príspevok vznikol v rámci riešenia projektu KEGA 032UKF-4/2024 Religiózný cestovný ruch na Slovensku a jeho potenciál pre regionálny rozvoj.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] Miestna akčná skupina Bebrava, o. z. (2014). *Stratégia CLLD*. Online. Dostupné z: <https://www.masbebrava.sk/dokumenty-2/strategia-clld/> [citované 2026-02-10].
- [2] MAS BEBRAVA. (2026). *MAS Bebrava*. Online. Dostupné z: <https://www.masbebrava.sk/> [citované 2026-02-10].
- [3] ŠTATISTICKÝ ÚRAD SR. (2026). *DATAcube*. Databáza. Aktualizácia 2020-03-04. Dostupné z: <https://datacube.statistics.sk/> [citované 2026-02-10].
- [4] MAZÚR, E. a LUKNIŠ, M., (1986). *Geomorfologické členenie Slovenska*. Online mapa. Dostupné z: <http://apl.geology.sk/temapy/> [citované 2026-02-10].
- [5] GEOPORTÁL. (2026). *Regióny cestovného ruchu*. Online. Dostupné z: https://geoportal.gov.sk/maps/default/feature/88ff0a96-5ad7-4e3e-9fb2-efd076cb7ab0/E06117_01.18?view=-476981,-1232346,152.3943800199&loc=-475688,-1235090,100&adhoc-dataset-id=88ff0a96-5ad7-4e3e-9fb2-efd076cb7ab0 [citované 2026-03-20].
- [6] BÁNOVCE NAD BEBRAVOU. (2026). *Kultúrne pamiatky*. Online. Dostupné z: <https://www.banovce.sk/kulturne-pamiatky.html> [citované 2026-02-12].
- [7] SME. (2024). *MY Trenčín*. Online. 2024-11-21. Dostupné z: <https://my.sme.sk/trencin/c/dom-janka-jesenskeho-bude-sluzit-ako-muzeum-obnovu-dokoncia-do-konca-leta> [citované 2026-02-13].
- [8] KRÍŽOM-KRÁŽOM SLOVENSKOM. (2021). *Pamätník Ľudovíta Štúra v Bánovciach nad Bebravou*. Online. 2021-06-02. Dostupné z: <https://www.krizom-krazom.online/pomnik-l-stura-v-banovciach-nad-bebravou/> [citované 2026-02-13].
- [9] OBEC PRUSY. (2026). *Pamiatky*. Online. Dostupné z: <https://www.prusy.sk/obec-2/pamiatky/> [citované 2026-02-13].
- [10] DVOREC. (2026). *História*. Online. Dostupné z: <https://www.dvorec.sk/historia> [citované 2026-02-13].
- [11] VEĽKÉ CHLIEVANY. (2026). *Projekty*. Online.

- Dostupné z: <https://velkechlievany.com/aktuality/projekty/rekonstrukcia-budovy-na-muzeum-velke-chlievany-so-02-rekonstrukcia-budovy/> [citované 2026-02-14].
- [12] BEBRAVSKÁ DOLINA (2026). *Územie európskeho významu*. Online. Dostupné z: <https://www.bebravskadolina.sk/predstavujeme-uzemie-europskeho-vyznamu-knazi-stol/> [citované 2026-02-14].
- [13] ŠOP SR. (2026). *Zoznam chránených objektov*. Online. Dostupné z: <https://data.sopsr.sk/chranene-objekty/> [citované 2026-02-18].
- [14] MŽP SR. (2026). *Prehľad chránených území Slovenskej republiky*. Online. Dostupné z: <https://www.minzp.sk/ochrana-prirody/uzemna-ochrana/prehľad-chronenych-uzemi-slovenskej-republiky/> [citované 2026-02-18].
- [15] MSKS. (2026). *Mestské kultúrne stredisko v Bánovciach nad Bebravou*. Online. Dostupné z: <https://www.kulturabn.sk/> [citované 2026-02-18].
- [16] SLOVENSKÉ TRADÍCIE. (2026). *Folklórny súbor Drienovec*. Online. Dostupné z: <https://www.slovensketradicie.sk/slovensky-folklor/folklorny-subor-drienovec/> [citované 2026-02-18].
- [17] KST BN. (2026). *Klub slovenských turistov Bánovce nad Bebravou*. Online. Dostupné z: <https://www.kstbanovce.sk/> [citované 2026-02-18].
- [18] BÁNOVCE REGIÓN. (2026). *Bánovecká parenica*. Online. Dostupné z: <https://banovceregion.sk/nie-preteky-ale-zazitok-28-rocnik-banoveckej-parenice-laka-cykliztov/> [citované 2026-02-18].
- [19] BÁNOVCE NAD BEBRAVOU. (2026). *Spoločné majstrovstvá SR a ČR v cestnej cyklistike*. Online. Dostupné z: <https://www.banovce.sk/mid/532456/akcia/spolocne-majstrovstva-sr-a-cr-v-cestnej-cyklistike.html> [citované 2026-02-18].
- [20] SIPTÁK, M.; KMEŤ, M. a kol., (2022). *Čarovné Bánovce nad Bebravou a okolie*. Banská Bystrica: CBS spol. s.r.o., 141 s. ISBN 978-80-8144-332-9.
- [21] KRÍŽOM-KRÁŽOM SLOVENSKOM. (2021). *Vodná nádrž v Haláčovciach*. Online. 2021-06-02. Dostupné z: <https://www.krizom-krazom.online/vodna-nadz-v-halacovciach/> [citované 2026-02-18].
- [22] BORSZÉKOVÁ, A., (2018). Termálne kúpalisko Pažiť má štyridsať rokov. *Bánovské noviny*, roč. 13, č. 31, s. 1-1.
- [23] YOUTUBE. (2026). *Miestna akčná skupina Bebrava*. Online. Dostupné z: <https://www.youtube.com/@Miestnaak%C4%8Dn%C3%A1skupinaBebrava> [citované 2026-02-18].
- [24] DUBCOVÁ, A.; CHRASTINA, P. a KRAMÁREKOVÁ, H., (2003). *Vademecum literárnej a vedeckej činnosti geografa*. Nitra: UKF FPV, 38 s.

Nemšová – V zrkadle skla a zelene

Nemšová – In the mirror of glass and greenery

Patrícia Štefánková¹ - Hilda Kramáreková²

^{1,2}Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja, FPVaI UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹ patricia.stefankova@student.ukf.sk, ² hkramarekova@ukf.sk

Abstrakt

Článok sa zaoberá geografickou charakteristikou mesta Nemšová z pohľadu stručných fyzickogeografických podmienok, krátkej histórie, priemyselnej tradície a súčasného cestovného ruchu.

V prvej časti je predstavená poloha a prírodné pomery územia. Nasledujúca kapitola približuje historický vývoj mesta so zameraním na sklársku výrobu – Vetropack s.r.o., ktorá významne ovplyvnila jeho socioekonomickú štruktúru a regionálny rozvoj. Záverečná časť poukazuje na rekreačný potenciál mesta reprezentovaný lokalitami Poľovnícky zámok Antonstál a westernové mestečko Ranch 13. V tejto kapitole sú popísané aj ďalšie zaujímavosti nachádzajúce sa v meste, napr. cirkevná udalosť – Púť k Fatimskej Panne Márii a ostatné.

Pri spracovávaní článku boli využité webové stránky, knižné publikácie, štatistické údaje, mapu spracované v prostredí GIS, fotodokumentácia z vlastného terénneho prieskumu či krátke rozhovory s ľuďmi pracujúcimi v danej oblasti.

Cieľom článku je priblížiť čitateľovi sklársku tradíciu, stúpajúcu popularitu cestovného ruchu aj aktuálne projekty rozvoja mesta.

Kľúčové slová: Nemšová, geografická charakteristika, sklárska tradícia, príroda, cestovný ruch

Abstract

The article deals with the geographical characteristics of the town of Nemšová from the perspective of brief physical-geographical conditions, short history, industrial tradition and current tourism.

The first part presents the location and natural conditions of the area. The following chapter describes the historical development of the city with a focus on glass production – Vetropack s.r.o., which significantly influenced its socio-economic structure and regional development. The final part points out the recreational potential of the city represented by the Antonstál Hunting Chateau and the western town of Ranch 13. This chapter also describes other interesting places in the city, such as the church event - the Pilgrimage to Our Lady of Fatima and many others.

When preparing the article, websites, book publications, statistical data, map processed in a GIS

environment, photo documentation from our own field research, and short interviews with people working in the area were used.

The aim of the article is to introduce the reader to the glassmaking tradition, the growing popularity of tourism, and current city development projects.

Key Words: Nemšová, geographical characteristics, glassmaking tradition, nature, tourism

Úvod

Mesto Nemšová predstavuje zaujímavý príklad menšieho regionálneho mesta, ktorého vývoj bol výrazne ovplyvnený kombináciou prírodných podmienok a hospodárskych aktivít. Jeho poloha na rozhraní llavskej kotliny a Bielych Karpát, pri sútoku riek Váh a Vlára, vytvorila priaznivé predpoklady pre osídlenie, rozvoj poľnohospodárstva, priemyslu i cestovného ruchu.

Osobitnú úlohu v transformácii mesta zohrala sklárska výroba, ktorá od začiatku 20. storočia formovala ekonomickú štruktúru územia a významne ovplyvnila jeho sociálno-demografický vývoj. Popri priemyselnej tradícii však Nemšová disponuje aj významným prírodným, kultúrno-historickým i náboženským potenciálom, najmä vďaka Poľovníckemu zámku Antonstál, modernému westernovému stredisku - Ranch 13 či každoročne organizovanej cirkevnej púti.

Cieľom článku je priblížiť čitateľovi sklársku tradíciu, stúpajúcu popularitu cestovného ruchu aj aktuálne projekty rozvoja mesta.

1 Teoreticko-metodické východiská problematiky

Podkladom pre spracovanie článku boli knižné publikácie - monografia mesta Nemšová [3], rigorózna práca p. Milana Trnku [2] a viaceré webové zdroje: Slovensko v kocke - Nemšová [1], Farnosť Nemšová [4], Kostol sv. Michala archanjela Nemšová [5], Apl.Geology.Sk. - Geologické a hydrogeologické mapy Slovenska [6], Štátna ochrana SR - Zoznam osobitne chránených častí prírody SR [7], PHSR mesta Nemšová 2009 [9], Vetropack, s.r.o. Nemšová [10], Poľovnícky zámok Antonstál [11], Údolie Antonstál [12], Zimný festival jedla 2025 [13], Ranch 13 Nemšová [14], Púť k Panne Márii Fatimskej v Trenčianskej Závade [15], Náučné chodníky na Slovensku [16], Rozhľadňa Malý

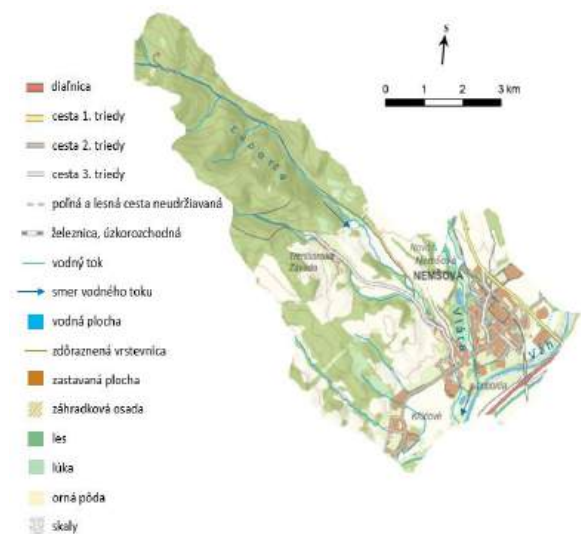
Jelenec [17] a SPHSR Dubnicko-Ilavsko 2023-2030 [18]. Demografické údaje k r. 2024 sme získali z databázy Štatistického úradu SR [8]). Pri vymedzení územia sa využili mapu spracovanú v prostredí GIS.

Súčasťou metodického postupu bol aj vlastný terénny prieskum realizovaný formou priameho pozorovania a fotodokumentácie vybraných lokalít. Doplnkovým zdrojom informácií boli krátke neformálne rozhovory s osobami pôsobiacimi v sledovaných objektoch. Získané údaje boli následne spracované. Výsledkom je zhodnotenie významu priemyselnej tradície mesta a jeho krajinného potenciálu, ktorý vytvára predpoklady pre lepší budúci rozvoj rekreačných, turistických a náboženských aktivít.

2 Poloha mesta Nemšová

Mesto leží na severozápadnom Slovensku, v blízkosti hranice s Českou republikou, v západnej časti Ilavskej kotliny, na úpäť Bielych Karpát, pri sútoku riek Váh a Vlára. Administratívne patrí do Trenčianskeho kraja, do okresu Trenčín. Mesto má výmeru cca 33,4 km² [1]. Nadmorská výška stredu mesta je 225 m n. n. Najvyšší bod sa nachádza v Bielych Karpatoch pod Hladným vrchom pri hraniciach s Českou republikou (750 m n. m.). Najnižším bodom je údolie rieky Váh (220 m n. m.), prevýšenie je tak 530 m [2].

Územie Nemšovej tvoria aj nasledujúce štyri mestské časti: Nemšová (centrálna časť + Nová Nemšová), Ľuborča, Klúčové a Trenčianska Závada (mapa 1). Susedných obcí mesta je sedem - Horné Srnie, Borčice, Dubnica nad Váhom, Trenčianska Teplá, Skalka nad Váhom, Dolná Súča a Horná Súča [2].



Mapa 1: Vymedzenie územia mesta Nemšová
Zdroj: Spojitá vektorová mapa 1:50 000

2.1 Z histórie mesta

Územie dnešnej Nemšovej patrí k starším sídelným oblastiam Považia. Využívané bolo vďaka svojej

výhodnej polohe pri sútoku riek Váh a Vlára, na dôležitej obchodnej a komunikačnej trase smerujúcej na Moravu. Prvá písomná zmienka o Nemšovej pochádza z roku 1242, kde sa obec uvádza pod názvom *Villa Neusuva* v listine týkajúcej sa vymedzenia hraníc s obcou Ľuborča [3].

V stredoveku patrilo toto mesto pod panstvo hradu Súča, neskôr pod Trenčianske panstvo. Postupne sa vyprofilovalo ako významná obec regiónu. Dôležitou súčasťou historického vývoja bol aj cirkevný život. Dominantou a najvýznamnejšou historickou pamiatkou mesta je dodnes rímskokatolícky Kostol sv. Michala archanjela (obr. 1), postavený v rokoch 1762 – 1766 na podnet grófa Jozefa Illesházyho v neskorobarokovom štýle [4].

V roku 1976 došlo k administratívne zlučeniu obcí Nemšová, Ľuborča, Klúčové a Trenčianska Závada. Tento krok vytvoril základ pre vznik moderného mestského celku. Štatút mesta získala Nemšová v roku 1989, čím sa oficiálne zaradila medzi mestá Slovenska. Odvtedy sa rozvíja ako menšie priemyselné a obytné mesto Trenčianskeho kraja [3].



Obr. 1: Kostol sv. Michala archanjela v Nemšovej
Zdroj: [5]

2.2 Z geografie mesta

Z geologického hľadiska sa mesto nachádza na rozhraní flyšového pásma Bielych Karpát a fluvialno-deluviálnych sedimentov doliny rieky Váh [6]. Do územia zasahujú dva geomorfologické celky – Považské podolie (geomorfologické podcelky Ilavská kotlina a Bielokarpatské podhorie) a Biele Karpaty (geomorfologický podcelok Sučanská vrchovina).

Priemerná ročná teplota sa pohybuje okolo 8,8 °C. Zrážky sú počas roka rozložené rovnomerne, priemerný ročný úhrn v Ilavskej kotlině je 630 - 700 mm, v pohorí Bielych Karpát 800 - 900 mm [2].

Hlavným vodným tokom je rieka Váh (obr. 2), do ktorého sa v Nemšovej vlieva rieka Vlára pritekajúca z Českej republiky.

Najrozšírenejšie pôdne typy sú: luvizeme, kambizeme, pseudogleje kultizemné, rendziny modálne či fluvizeme kultizemné [6].

Do mesta Nemšová zasahuje chránená krajinná oblasť CHKO Biele Karpaty s 2. stupňom ochrany a chránené vtáčie územie CHVU Dubnické Štrkovisko, ktorého cieľom je zachovanie biotopov rybára riečného a zabezpečenie jeho prežitia a rozmnožovania [7].



Obr. 2: rieka Váh

Zdroj: vlastný terénny prieskum, 21.04.2025

Počet obyvateľov mesta Nemšová podľa údajov ŠÚ SR [8] k 31.12.2024 bol 6172. Najviac ľudí žije v mestskej časti Nemšová, najmenej v Trenčianskej Závade. Od konca minulého storočia má celkový vývoj obyvateľstva stúpajúci charakter, no v posledných rokoch (konkrétne od roku 2020) populácia klesá. Ide o následky sťahovania ľudí za prácou do väčších miest/zahraničia kvôli rýchlemu rastu cien (nehnutelnosti, celkové náklady na život,...), ekonomickej nestabilite. Taktiež pozorujeme aj súčasný trend starnúcej spoločnosti (nízka natalita + vysoká mortalita).

3 Súčasná hospodárska štruktúra mesta

Ekonomika mesta je silne ovplyvnená priemyselnou výrobou, pričom najvýznamnejšími zamestnávateľmi sú Vetropack, s.r.o. Nemšová a Lidl – logistické centrum Nemšová. Okrem priemyslu sa v meste uplatňuje aj poľnohospodárstvo vďaka chmeľu, ktorý sa tu stále pestuje a spracúva. Taktiež tu nájdeme aj mnohé podniky venujúce sa službám, remeslám a lokálnemu obchodu.

3.1 Sklárska tradícia – Vetropack Nemšová

Sklárska výroba v Nemšovej má veľmi dlhú a kontinuálnu históriu, ktorá siaha až do roku 1902, kedy bola v meste založená sklárska továreň – Dreherova skláraň (obr. 3) kvôli dostupným prírodným zdrojom a strategickej polohe. Nájdeme ju v južnej rovinatej časti mesta pri hlavnom dopravnom ťahu, kde je priama blízkosť železničnej trate a diaľnice. Vznik sklárne inicioval barón Anton Dreher (1849 - 1921), významný podnikateľ sklárskeho priemyslu tej doby [3]. Továreň sa začala stavať na poliach 11.3.1902. Dňa 25.11. toho roku bola po vysviacke zapálená pec a 15.12. sa v Nemšovej vyrobilo prvé sklo.

Základné suroviny na výrobu sklenej hmoty sa museli dovážať. Piesok bol z Nemecka a Čiech, vápno

z Púchova a sóda z Maďarska (neskôr z Čiech). Práca so sklom bola vysoko odborná činnosť, ktorú mohli dobre urobiť len majstri – odborníci na sklo. Vzhľadom na to, že Nemšová takýchto odborníkov nemala, museli prísť majstri sklári z blízkeho i ďalekého okolia [9].



Obr. 3: Dreherova skláraň

Zdroj: [3]

Počas prvých desaťročí sklárne prešla viacerými zmenami. V období hospodárskej krízy v 30. rokoch 20. storočia sa výroba výrazne obmedzila a v roku 1932 sa dokonca zastavila z dôvodu zadĺženia sa a veľkých daňových nedoplatkov. Znovu sa rozbehla až v polovici 30. rokov, keď začala vyrábať aj obalové sklo poloautomatickými metódami, čím si zabezpečila životaschopnosť aj v ťažších časoch.

Po druhej svetovej vojne bola sklárska výroba znárodnená (ako mnohé iné podniky v Československu) a postupne prešla modernizáciou. Znárodný závod bol v roku 1949 začlenený do národného podniku Spojené sklárne so sídlom v Lednických Rovniach [3]. V tomto roku začali stavať aj novú výrobnú halu a v nej pec, ktorá vyrábala lisované sklo. V 60. rokoch sa začali používať modernejšie výrobné linky a sklársky priemysel mesta sa zamerlal na výrobu skla pre potravinársky a chemický priemysel pod názvom SKLOOBAL, n. p. Nemšová.

Nové dejiny sklárne datujeme od 4.11.2002. Švajčiarsky Vetropack Holding AG, popredný európsky výrobca obalového skla, vstupuje do spoločnosti ako jej jediný vlastník [3]. Vetropack Nemšová, s.r.o. (obr. 4) sa preto stáva jedným z technologicky najvyspelejších výrobcov v Európe.



Obr. 4: Vetropack, s.r.o. Nemšová v súčasnosti

Zdroj: [10]

V súčasnosti závod poskytuje prácu 417 zamestnancom, prevažne domácim, má 2 taviace vane a 7 výrobných liniek. Špecializuje sa na výrobu, predaj a distribúciu sklenených obalov na Slovensku a vybraných exportných trhoch - Česká republika, Švajčiarsko, Rakúsko, Chorvátsko a Ukrajina [9].

Vetropack Group má aj do budúcnosti veľké plány. Vytvoril plán Strategy 2030+, ktorý zahŕňa jasnú udržateľnosť (neustále znižovanie emisnej stopy, zlepšovanie recyklácie), rozšírenie pôsobnosti (expandovanie na vybrané trhy), maximalizáciu hodnoty (nové služby pre posilňovanie vzťahov so zákazníkmi), podporu inovácií (trendy v dizajne sklenených obalov) a líderstvo v oblasti kvality (Vetropack ako „zamestnávateľ prvej voľby“) [10].

4 Cestovný ruch - zaujímavosti

Rozvoj cestovného ruchu v Nemšová je podmienený kombináciou priaznivých lokalizačných faktorov, najmä prírodného prostredia Bielych Karpát, ako aj kultúrno-historických objektov. Tieto predpoklady sú dopĺňané materiálno-technickou základňou, ktorú predstavujú ubytovacie zariadenia (napr. Ranch 13, Gazdovstvo Uhliská), reštaurácie, športové a rekreačné areály, cyklotrasy či dopravná dostupnosť do mesta. Vzájomná kombinácia prírodného potenciálu a infraštruktúrneho zabezpečenia vytvára podmienky pre rozvoj turistického, zážitkového aj náboženského cestovného ruchu.

4.1 Poľovnícky zámok Antonstál

Poľovnícky zámok Antonstál (obr. 5) je významný kultúrno-historický objekt mesta, ktorý nájdeme v pohorí Biele Karpaty (v mestskej časti Ľuborča). Historický názov „Antonštál“ má nemecký pôvod a skladá sa z dvoch slov - Anton (meno bývalého majiteľa Antona Drehera) a Thal/Tal (dolina/údolie).



Obr. 5: Poľovnícky zámok Antonstál
Zdroj:

História zámku je spätá s rozsiahlym Brumovským panstvom, ktoré sa rozkladalo na území Moravy a Považia už od 13. storočia a vystriedalo viacerých vlastníkov. Prvé organizované lesné hospodárstvo tu

zriadili Illesházyovci a neskôr modernú lesnícku koncepciu položil Juraj Simon Sina v roku 1835. Panstvo a jeho lesné revíry sa stali vyhľadávaným miestom pre poľovačky a chov zveri [3].

Tento zámoček bol postavený v rokoch 1937 - 1943 podľa návrhu architekta Augustína Danielisa na mieste pôvodnej poľovníckej chaty v Ľuborčianskej zvernici. Architektúra sa nesie v znamení romantického sídla s drevenými prvkami, vyrezávanými interiéromi a rôznymi detailmi - oblúkové niky na vystavovanie ulovenej zveri [12]. Zámok slúžil ako miesto stretávania šľachty, poľovníkov a podnikateľov, najmä počas zimných poľovačiek, a predstavoval akési centrum spoločenského života v prírode.

Po druhej svetovej vojne bol Antonstál skonfiškovaný československým štátom a objekt slúžil ako učňovská škola pre drevorubačov, čo odrážalo praktickú transformáciu pôvodného sídla na vzdelávacie a lesnícke účely. Následne prešiel viacerými stavebnými úpravami v povojnovom období [3].

Dnes zámok neslúži ako pôvodná poľovnícka rezidencia, ale ako centrum lesnej pedagogiky a environmentálneho vzdelávania, kde sa organizujú programy pre školy, rodiny i verejnosť, zamerané na spoznávanie lesnej prírody. V areáli je možnosť vidieť živú zver (napr. diviaky, bažanty), úle so včelami, mini arborétum s drevinami a navštíviť miestne náučné chodníky. Novinkou ponuky je degustačné menu, kedy je možné prísť na Zimný festival jedla (v stanovenom termíne) a ochutnať netradičné zvieracie špeciality pripravené uznávanými šéfkuchármi (obr. 6).



Obr. 6: minuloročná pozvánka na Zimný festival jedla
Zdroj: [13]

V roku 2015 bol Antonstál slávnostne zaradený medzi významné lesnícke miesta Slovenska, čo podčiarkuje jeho historickú, kultúrnu aj environmentálnu hodnotu. Pri tejto príležitosti bola odhalená aj bronzová busta Antona Drehera (1849 - 1921), ktorá pripomína jeho zásluhy pri budovaní tohto jedinečného sídla [3].

4.2 Westernové mestečko – RANCH 13 Nemšová

Ranch 13 (obr. 7) je rodinný, westernovo orientovaný ranč a zážitkové centrum situované v Antonstálskej doline, v mestskej časti Ľuborča. Ide o tematické miesto inšpirované Divokým západom, ktoré v sebe spája jazdecké aktivity, rodinnú rekreáciu, eventové podujatia a taktiež aj netradičné ubytovanie v štýle „western“ prostredia [3].



Obr. 7: RANCH 13, Nemšová
Zdroj: [14]

Ranč ponúka pohodu, zábavu a oddych či už s rodinou alebo priateľmi v prírode a umožňuje zažiť pravú atmosféru westernu. Pravidelne sa tu organizujú westernové a ródeo podujatia, ktorých súčasťou môže byť napríklad adrenalínová disciplína bull riding (jazda na divokých býkoch). Tento šport patrí medzi vyhľadávané atrakcie ranča a prilákal už najlepších jazdcov z rôznych krajín strednej Európy [14].

Jazda na koni je jednou z najvyhľadávanejších atrakcií medzi návštevníkmi. Začiatovníci sa môžu zoznámiť s jazdením v jazdiarni pod vedením skúsených inštruktorov, zatiaľ čo skúsenejší jazdci majú možnosť zúčastniť sa vychádzok do prírody, kde si môžu vychutnať krásu okolitých lúk, lesov a kopcov. Nemenej navštevovanými sú aj sezónne a kultúrne podujatia – napríklad „Vianočná ulička“ (obr. 9) s vianočnou atmosférou, programom a rodinným sprievodom, ktoré tak rozširujú turistickú ponuku mimo jazdeckých aktivít.



Obr. 9: Vianočná ulička na RANCH 13
Zdroj: [14]

Zážitkové ubytovanie v tematicky zariadených izbách, ktoré majú vlastné príbehy (napríklad postavy ako Kováč Wiki alebo Sedlár Chris) podčiarkujú celkový zážitok z návštevy tohto neobyčajného miesta [3].

Vďaka kombinácii jazdeckta, eventov, rodinných atrakcií a ubytovacích služieb vytvára Ranch 13 v meste Nemšová príťažlivý turistický bod. Jeho prítomnosť podporuje rozvoj aktívneho cestovného ruchu a dopĺňa ponuku atraktívnych voľnočasových aktivít v Trenčianskom kraji.

4.3 Ďalšie zaujímavosti

Cirkevnou zaujímavosťou je púť k Panne Márii Fatimskej v Trenčianskej Závade. Slávnosť sa začína putovaním z hlavného Kostola sv. Michala archanjela v tradičných krojoch, sprevádzaná je modlitbou posvätného ruženca a dychovou hudbou. Kaplnku postavili miestni obyvatelia v rokoch 1947 - 1949 ako vďaka Panne Márii za ochranu počas 2. sv. vojny. Ide o najstaršiu sakrálnu stavbu na Slovensku zasvätenú Panne Márii Fatimskej [15]. V mestskej časti Klúčové sa nachádza Kaplnka sv. Anny, neogotická stavba z 19. storočia s charakteristickou fasádou a vitrážami, ktorá je popri miestnom kaštieli výraznou historickou pamiatkou [3]. Okrem týchto stavieb sú v okolí aj ďalšie menšie kaplnky ako Kaplnka sv. Antona Paduánskeho v Ľuborči či rôzne kríže a drobné sakrálné stavby, ktoré dotvárajú duchovnú krajinu mesta.

V meste sa nachádzajú aj mnohé náučné chodníky. Najväčším je Náučný poľovnícky a lesnícky chodník Nemšová v Ľuborčianskej doline, ktorý je nenáročný, dlhý 8,5 km, má 20 zastávok s celkovým časom prechodu cca 3,5 h [16]. Najzaujímavejšou je zastávka číslo 5 – Košáre kaplnka, kde sa každoročne koná na slávnosť sv. Huberta (sv. omša pre poľovníkov), ktorý je ich patrónom. Včelársky náučný chodník Ľuborča má 12 zastávok, celkový čas prechodu je približne jedna hodina. Je využiteľný pre terénne vyučovanie, informačné panely obsahujú otázky pre deti a zaujímavé riešené obrázky s opisom rastlín a živočíchov [16].

Zaujímavým podnikom je aj Gazdovstvo Uhliská. Ide o rodinnú farmu a agroturistické stredisko situované v prírodnom prostredí v mestskej časti Trenčianska Závada. Ponúka komplexné služby vrátane ubytovania vo vidieckom štýle, dve reštaurácie s domácimi špecialitami, chov zvierat (následne výroba vlastných mliečnych produktov a kozích syrov) a priestory na rôzne podujatia. V tejto mestskej časti je postavená aj vyhliadková drevená veža Malý Jelenec vo výške takmer 26 metrov. Vyjsť až hore na rozhľadňu naozaj stojí za to. Z najvyššieho podlažia veže vidno vrchy: Javorník, Chotuč, Biely vrch, Ostrý vrch, Skalka, Inovec, Kalište, Strážov, Vápeč a ďalšie [17].

Pre milovníkov športu je popri Váhu vybudovaná

cyklotrasa – Vážska cyklomagistrála, z Nemšovej sa na bicykli dá dostať až do Piešťan. Opačným smerom na Horné Srnie, popri rieke Vlára, vedie cyklotrasa až do českého mestečka Brumov-Bylnice, kde je možné navštíviť hrad či iné pamiatky mesta.

V centre Nemšovej sa nachádza aj letné kúpalisko s dvoma bazénmi, šmykľavkami, volejbalovým ihriskom a bufetmi pre občerstvenie. Počas horúcich letných dní je to určite príjemné osvieženie a regenerácia. Mesto disponuje aj športovou halou, ktorá je hneď vedľa kúpaliska a futbalovými ihriskami v každej mestskej časti.

Nemšová tak ponúka rozmanité možnosti cestovného ruchu a trávenia voľného času. Stačí si len vybrať!

5 Z rozvojových projektov mesta

Mesto Nemšová sa vo svojich rozvojových plánoch zameriava na prepojenie priemyselnej tradície so zachovaním a zveľaďovaním prírodného prostredia. V oblasti „zelene“ podporuje revitalizáciu verejných priestranstiev či výsadbu stromov, čím zvyšuje kvalitu životného prostredia a aj atraktivitu mesta pre obyvateľov a návštevníkov. Zároveň sa rozvíja aj infraštruktúra cestovného ruchu – budovanie a údržba cyklotrás (nové napojenia na Vážsku cyklomagistrálu), podpora náučných chodníkov v okolí Ľuborčianskej doliny či environmentálne vzdelávacie aktivity v areáli Poľovníckeho zámku Antonstál. Priemyselný pilier mesta, reprezentovaný sklárskou výrobou, je smerovaný k modernizácii technológií a podpore recyklácie skla, čo korešponduje s princípmi udržateľného rozvoja [18]. Mesto tak systematicky prepája svoju identitu „mesta skla a zelene“ s environmentálnymi a turistickými aktivitami.

6 Záver

Nemšová potvrdzuje svoju povest' „mesta skla a zelene“. Dominantným prvkom ekonomickej identity mesta sa historicky stala sklárka výroba, ktorá formovala jeho urbanistickú štruktúru, zamestnanosť a regionálne postavenie.

Napriek miernemu demografickému poklesu v posledných rokoch si mesto udržiava hospodársku stabilitu vďaka technologicky vyspelej výrobe v závode Vetropack, s.r.o.. Súčasne však Nemšová nie je len priemyselným mestom, ale okolité lesné komplexy vytvárajú významný rekreačný potenciál, ktorý sa prejavuje v rozvoji environmentálneho vzdelávania (Poľovnícky zámok Antonstál) a zážitkového cestovného ruchu (Ranch 13). Tieto aktivity predstavujú modernú formu využívania krajiny, nadväzujúcu na historické tradície poľovníctva a hospodárenia v lesoch. Nesmie sa zabudnúť ani na cirkevný život obyvateľstva, keď sa každoročne organizuje púť do Trenčianskej Závady. Aj takáto forma aktivity zvyšuje povedomie o meste.

Nemšová tak ostáva dôležitým regionálnym centrom s veľkým rozvojovým potenciálom do budúcnosti, ktoré dokáže spájať svoju priemyselnú sklársku tradíciu s prírodou i duchovným životom.

Poďakovanie

Príspevok vznikol v rámci riešenia projektu KEGA 032UKF-4/2024 Religiózný cestovný ruch na Slovensku a jeho potenciál pre regionálny rozvoj.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SLOVENSKO V KOCKE. (2026). *Nemšová*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: <https://slovenskovkocke.sk/nemsova> [citované 2026-02-12].
- [2] TRNKA, M., (2002). *Regionálny rozvoj mesta Nemšová*. Rigorózna práca. Nitra: UKF, 107 s.
- [3] KORVAS, V., FAJNOR, J., PRNOVÁ, I., KRÁLIKOVÁ, J., GAJDOŠ, V. a ďalší, (2017). *Monografia mesta Nemšová*. Nemšová: Mesto Nemšová, 330 s. ISBN 978-80-972759-4-5.
- [4] FARNOSŤ NEMŠOVÁ. (2026). *Kostol sv. Michala archanjela*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: [Farnosť Nemšová](#) [citované 2026-02-12].
- [5] KOSTOL SV. MICHALA ARCHANJELA (NEMŠOVÁ). (2026). *Súbor: Kostol sv. Michala archanjela*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: [Súbor:Kostol svätého Michala Archanjela \(Nemšová\).jpg - Wikipédia](#) [citované 2026-02-12].
- [6] APL.GEOLOGY.SK. (2026). *Geologické a hydrogeologické mapy Slovenska*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: <https://apl.geology.sk/mp/> [citované 2026-02-12].
- [7] ŠTÁTNA OCHRANA SR. (2026). *Zoznam osobitne chránených častí prírody SR*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: [Zoznam osobitne chránených častí prírody SR](#) [citované 2026-02-12].
- [8] ŠTATISTICKÝ ÚRAD SR. (2026). *DATAcube*. Databáza. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: <https://datacube.statistics.sk/> [citované 2026-02-12].
- [9] MESTO NEMŠOVÁ. *Program hospodárskeho rozvoja a sociálneho rozvoja mesta Nemšová v roku 2009*. Nemšová: Mesto Nemšová. Dostupné z: [strategia-mesta-PHSR-31.01.09](#) [citované 2026-02-12].
- [10] VETROPACK GROUP. (2026). *Vetropack s.r.o. Nemšová*. Online. Aktualizácia 2026-02-12. Dostupné z: [Výrobca sklenených obalov | Vetropack Group](#) [citované 2026-02-12].
- [11] BRIDEE.SK. (2026). *Poľovnícky zámok Antonstál*. Online. Aktualizácia 2026-02-13. Dostupné z: [Poľovnícky kaštieľ Antonstál | Bridee.sk](#) [citované 2026-02-13].
- [12] REGISTER-ARCHITEKTURY.SK. (2026). *Údolie*

- Antonstál. Online. Aktualizácia 2026-02-13. Dostupné z: [Hunting lodge | Register of modern architecture in Slovakia](#) [citované 2026-02-13].
- [13] LESY SR, Š. P. (2026). *Zimný festival jedla 2025*. Online. Aktualizácia 2026-02-13. Dostupné z: [LESY | LESY SR, štátny podnik](#) [citované 2026-02-13].
- [14] RANCH 13. (2026). *Ranch 13*. Online. Aktualizácia 2026-02-14. Dostupné z: [Westernový ranch Nēmšová - Slovensko | RANCH 13](#) [citované 2026-02-14].
- [15] BISKUPSTVO-NITRA.SK (2026). *Púť k Panne Márii Fatimskej v Trenčianskej Závade*. Online. Aktualizácia 2026-02-14. Dostupné z: [Púť k Panne Márii Fatimskej v Trenčianskej Závade - Biskupstvo Nitra](#) [citované 2026-02-14].
- [16] NAUCNECHODNIKY.EU (2026). *Náučné chodníky na Slovensku*. Online. Aktualizácia 2026-02-14. Dostupné z: [Náučné chodníky na Slovensku](#) [citované 2026-02-14].
- [17] VISIT.TRENCIN.SK (2026). *Rozhľadňa Malý Jelenec*. Online. Aktualizácia 2026-02-14. Dostupné z: [Rozhľadňa Malý Jelenec » Visit Trenčín](#) [citované 2026-02-14].
- [18] MESTO NEMŠOVÁ. *Spoločný program hospodárskeho rozvoja a sociálneho rozvoja strategicko-plánovacieho regiónu Dubnicko-Ilavsko (miest a obcí okresu Ilava, mesta Nemšová a obce Horné Srnie) na roky 2023-2030*. Nemšová: Mesto Nemšová. Dostupné z: [sphsr-spr-dubnicko-ilavsko-2023-2030-2023-06-27-verzia-2-0.pdf](#) [citované 2026-02-14].

Spotrebiteľské správanie pri nákupoch potravín: príklad z Myjavskej kopaničiarskej oblasti

Consumer behavior when purchasing food: an example from the Myjavská dispersed settlement region

Xénia Zajaková¹– Miroslava Trembošová²

^{1,2}Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 94 901 Nitra,

¹xenia.zajakova@student.ukf.sk; ²mtrembosova@ukf.sk

Abstrakt

V malých horských obciach zohráva prítomnosť vitálnych komerčných potravinárskych predajní kľúčovú úlohu v obývateľnosti oblastí, potravinovej udržateľnosti, zdravia a blahobytu obyvateľov. Tieto podniky však vplyvom príchodu zahraničných reťazcov a ich silnej konkurencii v cenotvorbe potravín – majú tendenciu klesať v ich počte, čo prispieva k marginalizácii miestnych komunití. Dochádza tak k prehľbovaniu rozdielov voči hustejšie urbanizovaným oblastiam. Aj medzinárodné štúdie sa čoraz častejšie zaoberajú podporou udržateľných potravinových systémov. Okrem toho sa miesta nákupu a spoločný výber potravín na konzumáciu stali sieťovým systémom pre rodiny. Cieľom tejto práce je analyzovať preferencie a nákupnú orientáciu spotrebiteľov, faktory výberu istej predajne a spôsob prepravy za nákupom potravín v rozptýlenom osídlení metódou analýzy sociálnych sietí SNA na príklade obyvateľov Myjavskej kopaničiarskej oblasti.

Kľúčové slová: spotrebiteľské návyky, maloobchodná sieť s potravinami, analýza sociálnych sietí (SNA), modely nákupného správania, rozptýlené osídlenie

Abstract

In small mountain villages, the presence of vital commercial food outlets plays a key role in the livability of the areas, food sustainability, health and well-being of the inhabitants. However, due to the arrival of foreign chains and their strong competition in food pricing, these businesses tend to decline in number, which contributes to the marginalization of local communities. This leads to a deepening of the differences compared to more densely urbanized areas. International studies are also increasingly dealing with the support of sustainable food systems. In addition, the places of purchase and the joint selection of food for consumption have become a network system for families. The aim of this work is to analyze consumer preferences and food purchase motivations in dispersed settlements using the SNA method on the example of Myjavská dispersed settlement area.

Keywords: consumer habits, food retail network, social network analysis (SNA), patterns of purchasing behavior, dispersed settlement

Úvod

Komunity žijúce v krajine s rozptýleným osídlením sú postihnuté procesom starnutia či emigrácie obyvateľstva, s obmedzeným verejným aj individuálnym dopravným spojením. Môžeme ich označiť ako úpadkové, resp. vnútorné periférie regiónov. V týchto oblastiach často dochádza k zániku tradičných obchodov príchodom silného konkurenta, najčastejšie supermarketu zahraničného reťazca, ktorý svoj kamenný obchod umiestňuje do mestských sídel najčastejšie s počtom obyvateľov nad 10 000 [1]. Tieto procesy prispievajú k obmedzenému prístupu k čerstvým a cenovo dostupným potravinám. Zásobovanie obyvateľstva potravinami v rozptýlenom osídlení tak zabezpečujú spravidla rodinný príslušníci, susedia, v lepšom prípade osvietený starosta formou pravidelných nahlasovaných donášok potravín z najbližších mestských centier.

Najviac ohrozené sú práve vidiecke regióny s rozptýleným osídlením s výrazným procesom starnutia, napríklad Myjavská kopaničiarska oblasť s indexom starnutia 167 [2] (r. 2023). To poukazuje na čoraz väčší podiel obyvateľstva s obmedzenou mobilitou a závislosťou od miestnej dostupnosti služieb. Dostupnosť potravín pritom nie je len otázkou fyzickej vzdialenosti, ale aj dopravnej obslužnosti, sociálno-ekonomických charakteristík obyvateľstva a typológie osídlenia.

1 Metodický postup

Zdrojom dát spotrebiteľských návykov nákupu potravín bol dotazníkový prieskum. V tejto práci sme z rozsiahleho dotazníka vybrali 5 okruhov a ich premenné (Tab. 1). Spolu bolo oslovených 564 respondentov nad 18 rokov vo všetkých sídlach regiónu.

Tab. 1: Ukazovatele behaviorálneho prieskumu

Okruh	Premenné
Faktor výberu predajne	cena, šírka sortimentu, kvalita, lokalita, otváracie hodiny, atmosféra predajne,
Spôsob dopravy	Chôdza, auto, autobus, bicykel
Nákupný typ respondenta	ovplyvniteľný, náročný, mobilný, konzervatívny, sporivý, lojálny, nenáročný

1.1 Dotazníkový prieskum

Aby sme najlepšie pozorovali spôsoby, akými spotrebiteľia organizujú svoje nákupy potravín použili sme priame rozhovory so spotrebiteľmi prostredníctvom osobného podávania (s ľuďmi dostupnými na rozhovor) formou pološtruktúrovaného dotazníka s otvorenými a/alebo vopred pripravenými odpoveďami. Dotazník bol aplikovaný v obciach Myjavskej kopaničiarskej oblasti v období od apríla do júna 2024 na celkovej vzorke 564 osôb nad 18 rokov. Respondenti boli zachytení a oslovení na obzvlášť preplnených miestach, kde sa dala nájsť vzorka s rôznymi charakteristikami, ako sú hlavné cesty, autobusové terminály, oblasti v blízkosti maloobchodných predajní, stravovacích zariadení (pohostinstvá). Skúmali sme aj úlohu, ktorú zohrávajú obľúbené miesta nákupu spotrebiteľov (zahraničné a domáce reťazce), aby sme preskúmali atraktivitu a silu rôznych predajných miest. V tomto prípade sme sa zamerali aj na typ väzieb (silných alebo slabých) spotrebiteľa s obchodom vo vzťahu k frekvencii nákupov, k radám predajcu, dopravným prostriedkom použitým na dosiahnutie a stimulačným faktorom, ktorý ľudí núti vybrať si jedno alebo druhé z rôznych predajných miest.

1.2 Metóda SNA

Získané informácie a dáta o preferenciách obyvateľov MKO predstavujú modalitu, ktoré chceme merať v rámci skúmanej reality. SNA vizualizovaná v programovacom jazyku Python v prostredí PyCharm (2025.3.3) s využitím knižnice NetworkX [3], nám umožňuje vidieť súvislosti medzi preferenciami, ktoré vyjadřili spotrebiteľia, aby sme pochopili modalitu, ktoré viac či menej charakterizujú ich výbery. SNA bol použitý na získanie meraní vzťahov medzi spotrebiteľmi, typom a predajnými miestami, ktoré sme rozdelili do 2 skupín, preferencie zahraničných reťazcov Tesco, Billa a Lidl lokalizované v 3 mestách Myjava, Brezová pod Bradlom a Stará Turá. Druhú skupinu preferencií boli odpovede respondentov ktorí v odpovedi uviedli slovenské predajne potravín. Podľa tohto prístupu je sieť množinou vrcholov (uzlov), hrán

(prepojení) a spôsobu, akým sú prvky prepojené. V našom prípade boli prepojenia detegované pomocou matíc výskytu a následne boli znovu vytvorené matice susedstva. V matici pridruženia, ktorú sme vytvorili, čiary označujú aktérov/spotrebiteľov a body kamenné miesta predaja/spotreby (zahraničné reťazce typu hypermarket a supermarket a domáce slovenské reťazce typu supermarket a špecializovaná predajňa potravín. SNA bola použitá na meranie vzťahov medzi spotrebiteľmi a trhami. Táto metóda nám umožnila študovať relačný systém v dvojitej perspektíve: z pohľadu spotrebiteľov a z pohľadu trhov. Znalosť typu väzieb prítomných v sieti a ich charakteristík môže umožniť zlepšenie marketingu s cieľom zvýšiť alebo udržať konkurenčnú výhodu a primerané postavenie na trhu [4 - 7].

2 Výsledky a diskusia

2.1 Skúmané územie

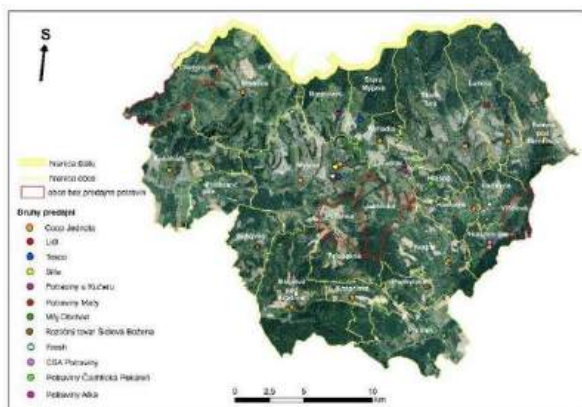
Skúmaná oblasť patrí do skupiny špecifických oblastí s rozptýleným osídlením. Tento typ osídlenia, typický pre horské oblasti Slovenska nachádzame na hraniciach s Českou republikou (Obr. 1). Územie Myjavskej kopaničiarskej oblasti (ďalej MKO) tvorí 26 obcí (z toho 3 mestá Myjava, Brezová pod Bradlom a Stará Turá) a 315 rozptýlených osád – kopaníc s rozlohou 490,20 km². K 31.12.2025 tu žilo **35 727** obyvateľov [2], teda má hustotu 90,11 obyv./km², ktorá je nižšia ako priemer SR (110 obyv./km²). Oblasť netvorí jedno prepojené funkčné územie, pretože administratívne obce Myjavskej kopaničiarskej oblasti patria do 2 krajov Trenčianskeho a Trnavského a do 4 okresov konkrétne Myjava, Nové Mesto nad Váhom, Senica a Piešťany (Obr. 1).



Obr. 1: Skúmané územie

V regióne poskytuje predaj potravín 50 kamenných predajní (Obr. 2) s celkovou plochou 17 160 m², (0,48 m² na obyvateľa). Pomer mestské a vidieckej predajne bol proporčný 25/25. Na 1 000 obyvateľov tak pripadalo 1,3 výdajov potravín. Zahraničné reťazce podnikajú s formátom hypermarket (Tesco) a supermarket (Billa a Lidl) a celkovo v regióne funguje 7 zahraničných veľkoplošných predajní. Ostatné

slovenské, o počte 43 fungujú v rámci reťazcov - COOP Jednota, CBA, Fresh, Môj obchod alebo patria súkromným podnikateľom. Ich lokalizácia je v centrách obcí a miest, najvyššia hustota je na ulici Viestova v meste Myjava, kde sídlia všetky 3 zahraničné predajne potravín (Obr. 2).



Obr. 2: Maloobchodná sieť kamenných predajní potravín v roku 2025

2.2 Charakteristika respondentov

Opýtaní respondenti - spotrebitelia sú vo veku od 18 do 90 rokov. Z tabuľky 2 vyplýva, že väčšina opýtaných respondentov malo vek od 31 do 50 rokov (39 %), s miernou prevahou žien (51,5 %). ¼ opýtaných sú absolventi VŠ, pričom 46,7 % opýtaných pracuje ako zamestnanec a 30% sa identifikovalo v roli dôchodcu z toho 12 % uviedlo pozíciu pracujúci dôchodca.

Tab. 2: Deskriptívna štatistika respondentov

Indikátor		MKO	
		abs.	%
pohlavie	ženy	286	51,5
	muži	269	48,5
vek	18-30	57	10,3
	31-50	217	39
	51-65	149	26,8
	≥ 66	142	25,6
vzdelanie	SOŠ	118	21,4
	SŠ	302	54,2
	VŠ	135	24,4
zamestnanie	zamestnanec	258	46,7
	SZČO	70	12,6
	študent	21	3,8
	dôchodca	166	30
	nezamestnaný	17	3,1
	iné	23	3,8

Zdroj: dotazníkový prieskum, autorky

Indikátory spotrebiteľských preferencií nákupov potravín a ich premenné uvádzame v Tab. 3. Cena, kvalita a lokalita sú najdôležitejšie faktory výberu konkrétnej predajne. Uprednostňovanie zahraničných

reťazcov sa objavilo prevládajúcim množstvom pozitívnych odpovedí pre Tesco, Billa a Lidl predajne v regióne, a v pomere 64,5 : 35,5 sú víťazi. Automobil je najčastejší dopravný prostriedok využívaný pri nákupoch v MKO, keďže ho uviedlo takmer 70% opýtaných. Na druhom mieste je chôdza a najmenej sa používa bicykel. Podrobná analýza priznanej mesačnej sumy domácností ktorú používali na nákup potravín sme rozdelili na skupinu odpovedí za zahraničné a domáce reťazce. Kým v skupine respondentov ktorí nakupujú v zahraničných reťazcoch sa odpovede pohybovali od 25 do 1200 € v slovenských predajniach od 60 do 1000 €. V zahraničných v priemere minú 377,5 € v domácich len 280,5 €. Najčastejšie odpovede myjavských zákazníkov v zahraničných reťazcoch bolo 500 € a v slovenských 250 €. Medián bol prekvapivo u oboch súborov odpovedí zhodný a to 300 € (Tab. 3).

Tab. 3: Preferencie respondentov vo vzťahu k nákupom potravín

Indikátor		MKO	
		abs.	%
spôsob dopravy	pešo	97	17,1
	auto	391	69,1
	bicykel	26	4,5
	autobus	52	9,1
faktor výberu predajne	cena	191	32,7
	šírka sortimentu	66	11,3
	lokalita	126	21,4
	kvalita	149	25,5
	atmosféra	37	6,3
	otváracie hodiny	16	2,7
lokálpatriotizmus	domáce	199	35,5
	zahraničné	356	64,5
nákupný typ spotrebiteľa	ovplyvniteľný	50	7,5
	náročný	84	12,6
	mobilitný	205	30,2
	konzervatívny	31	4,6
	sporivý	52	7,8
	lojálny	18	2,7
	nenáročný	46	6,9
mesačná suma domácnosti na nákup potravín v zahraničnom reťazci	≤ 250 €	120	33,7
	251 - 500	183	51,4
	501 - 750	38	1,1
	751 - 1000	14	0,4
	≥ 1001	1	0,2
	∅	377,5	
	^modus	500	
~medián	300		
mesačná suma domácnosti na nákup potravín v slovenskej predajni	≤ 250 €	95	48
	251 - 500	97	48,9
	501 - 750	5	2,5
	751 - 1000	1	0,5
	≥ 1001	0	0
	∅	280,5	
^modus	250		

	~medián	300	
--	---------	-----	--

Zdroj: dotazníkový prieskum, autorky

2.3 Analýza sociálnych sietí SNA metódou

Použitím programu PyCharm a knižnice NetworkX sme vytvorili dva modely spotrebiteľských preferencií pre zahraničné reťazce predajní potravín a domáco-slovenské predajne potravín (Príloha 1 a 2). Modrá farba znázorňuje riešené predajne, ktoré sú zadefinované adresou, oranžová farba sú najčastejší spôsob prepravy za nákupom, tzn. pešo, auto, bicykel a autobus. Zelené body znázorňujú prioritný faktor výberu konkrétnej predajne a tyrkysové body je súbor premenných vystihujúce nákupný typ konkrétneho respondenta. Tieto respondenti sebahodnotením určujú na základe charakteristiky v zmysle metodiky [8]. Prvé tri typy ovplyvniteľný, náročný a mobilný typ patria do skupiny modernej nákupnej orientácie a ostatné sú súčasťou tradičnej orientácie, teda konzervatívny, sporivý, lojálny a nenáročný. Všetky tieto premenné boli získané analýzou dotazníkov 564 respondentov.

2.3.1 Zahraničné predajne potravín

Až 64,5 % opýtaných respondentov s trvalým pobytom v MKO uprednostňuje pri nákupoch potravín zahraničné reťazce - Tesco, Billa a Lidl. V území funguje 7 týchto kamenných obchodov a všetky boli prioritné pre istého respondenta. Najdôležitejším faktorom výberu je cena a spôsob dopravy automobil. Patria do skupiny spotrebiteľov moderného spôsobu nakupovania a samohodnotením sa identifikovali ako mobilný zákazník. V Prílohe 1 možno identifikovať všetky trajektórie odpovedí respondentov ktorí preferujú zahraničné reťazce a podnikajú vo veľkoplošných predajniach nad 250 m².

Slovenskú maloobchodnú sieť potravín si za prioritné miesto nákupu každodenných nákupov vybralo 35,5 opýtaných obyvateľov MKO. Hoci v regióne ich funguje 43, za prioritné miesto každodenných nákupov potravín respondenti uviedli len 28 z nich. Až 15 predajní slovenských majiteľov má doplnkový charakter a sú v sieti druhoradé. Bližším zisťovaním ide o malé lokálne predajne do 80 m². Aj títo respondenti sa rozhodovali na princípe ceny a kvality a preferovali spôsob dopravy autom. Identifikovali sa nielen s mobilným typom ale aj lojálnou orientáciou (Príloha 2).

Síce možností nákupných miest slovenského pôvodu je niekoľko násobne vyššie, neobstáli v konkurencii so zahraničnými predajňami. Toto poznanie dozaista ovplyvňuje aj iný, neskúmaný element - nakupovanie potravín cez internet, ktoré v tomto území poskytuje reťazec Tesco.

Záver

Predajne potravín patria do skupiny služieb každodennej spotreby, ktoré sú v zmysle hierarchie a nodality lokalizované vo všetkých typoch sídel. V MKO fungovalo 50 predajní potravín, z toho 7 zahraničných a 43 slovenských. Všetky predajne patriace pod zahraničné reťazce (v počte 7) sú pre nejakého respondenta prioritným miestom nákupu potravín. Zo skupiny slovenských predajní o počte 43 predajní len 28 z nich bolo označených ako prioritné miesto nákupu potravín. Teda až 15 predajní majú funkciu doplnkovej maloobchodnej siete predaja potravín a nie sú rozhodujúcim miestom takýchto každodenných nákupov. Sú to malé lokálne predajne od 30 do 80 m². Z výsledkov vyplývajú odporúčania na statickú dopravu a skúmanie parkovacích možností pri nákupoch potravín, keďže až 70 % opýtaných realizujú nákupy automobilom. Metodika SNA realizovaná v programe PyCharm s knižnicou NetworkX vytvorila priestorový dvojrozmerný model, kde vieme identifikovať trajektórie (pri väčšom rozlíšení) odpovedí jednotlivých respondentov.

V rozptýlenom osídlení MKO kde až 19% obyvateľov žije v kopaniciach je logickým východiskom riešenia zhoršenej dostupnosti k základným potravinám rozvoj samozásobovania vlastnou produkciou potravín v predzáhradkách a prídumových sadoch. Takto získané čerstvé a zdravé produkty prispievajú k racionálnej výžive obyvateľov. Pováčšine starší obyvateľ s podlomeným zdravím však na tieto aktivity nemusí mať dostatok energie a vôle. Aj z tohto dôvodu je udržateľný potravinový systém veľmi aktuálnou témou [9]. V decembri 2025 otvorila v Myjave na Viestovej ulici svoju predajňu firma Biedronka. Predpokladáme, že priláka mnohých zákazníkov a zahraničné reťazce ešte viac posilnia svoje postavenie a silu určovať ceny a ponuku potravín.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BÍLKOVÁ, Kristína, KRIŽAN, František, HORŇÁK, Marcel, BARLÍK, Peter and ZUBRICZKÝ, Gabriel, (2018). Food and non-food retail change in a post-communist country: A case study of the Gemer region in Slovakia. *Bulletin of Geography. Socio-economic Series*, vol. 39, no 1, pp. 7–20.
- [2] www.sattistics.sk
- [3] JETBRAINS, s.r.o., (2025). PyCharm. Software. Verzia 2025.3.3. Dostupné z: <https://www.jetbrains.com/pycharm/> [prístup 2026-02-25].
- [4] NICOLOSI, Agata, LAGANÀ, Valentína Rosa, LAVEN, Daniel, MARCIANÒ, Claudio and SKOGLUND, Wilhelm, (2019). Consumer Habits of Local Food: Perspectives from Northern Sweden. *Sustainability*, vol. 11, pp. 6715.
- [5] KVAM, Gunn Turid, BJØRKHAUG, Hilde and PEDERSEN, Ann Charlott, (2017). How relationships can

influence an organic firm's network identity. *European Planning Studies*, vol. 25, no. 1, pp. 1147-1165. ISSN 0965-4313.

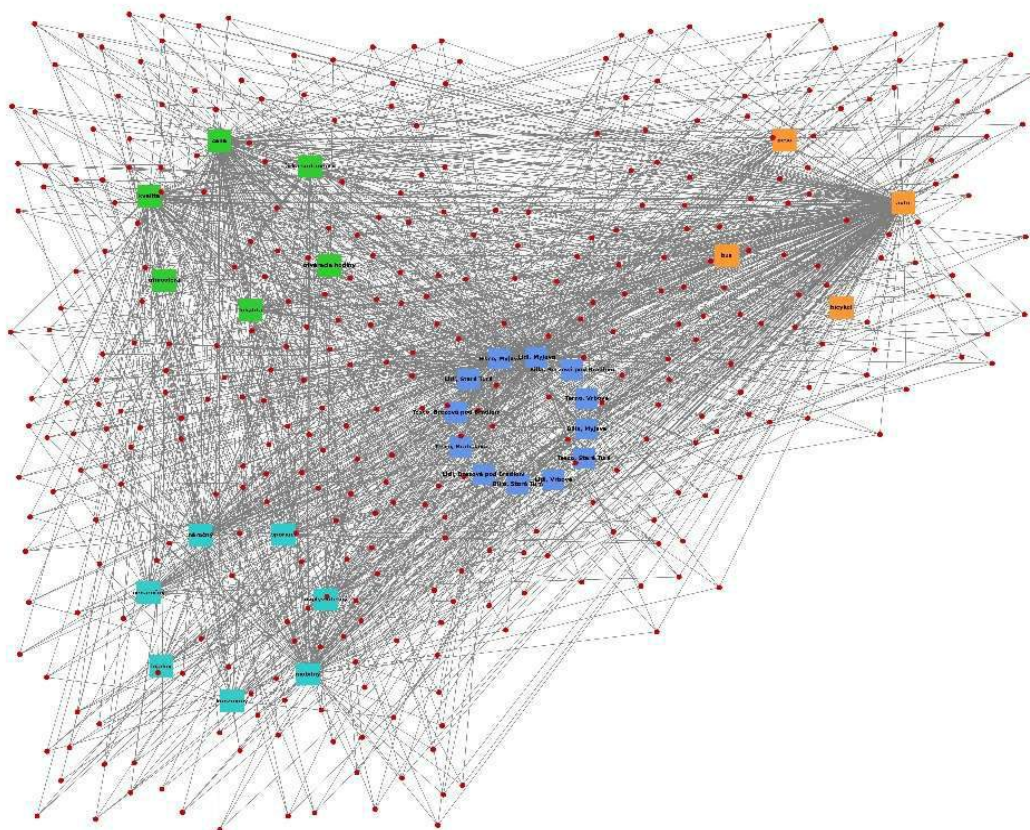
[6] TANG, Jia-Wei, CHEN, Ming-Lun and CHIU, Tsai-Hsin, (2018). An Exploratory Study on Local Brand Value Development for Outlying Island Agriculture: Local Food System and Actor–Network Theory Perspectives. *Sustainability* vol. 10, pp. 4186.

[7] PALLADINO, Monica, CAFIERO, Carlo and MARCIANÒ, Claudio, (2019). The Role of Social Relations in Promoting Effective Policies to Support Diversification Within a Fishing Community in Southern Italy. In: *New Metropolitan Perspectives. ISHT 2019. Smart Innovation, Systems and Technologies*; Calabrò, F., Della Spina, L., Bevilacqua, C., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, vol. 101.

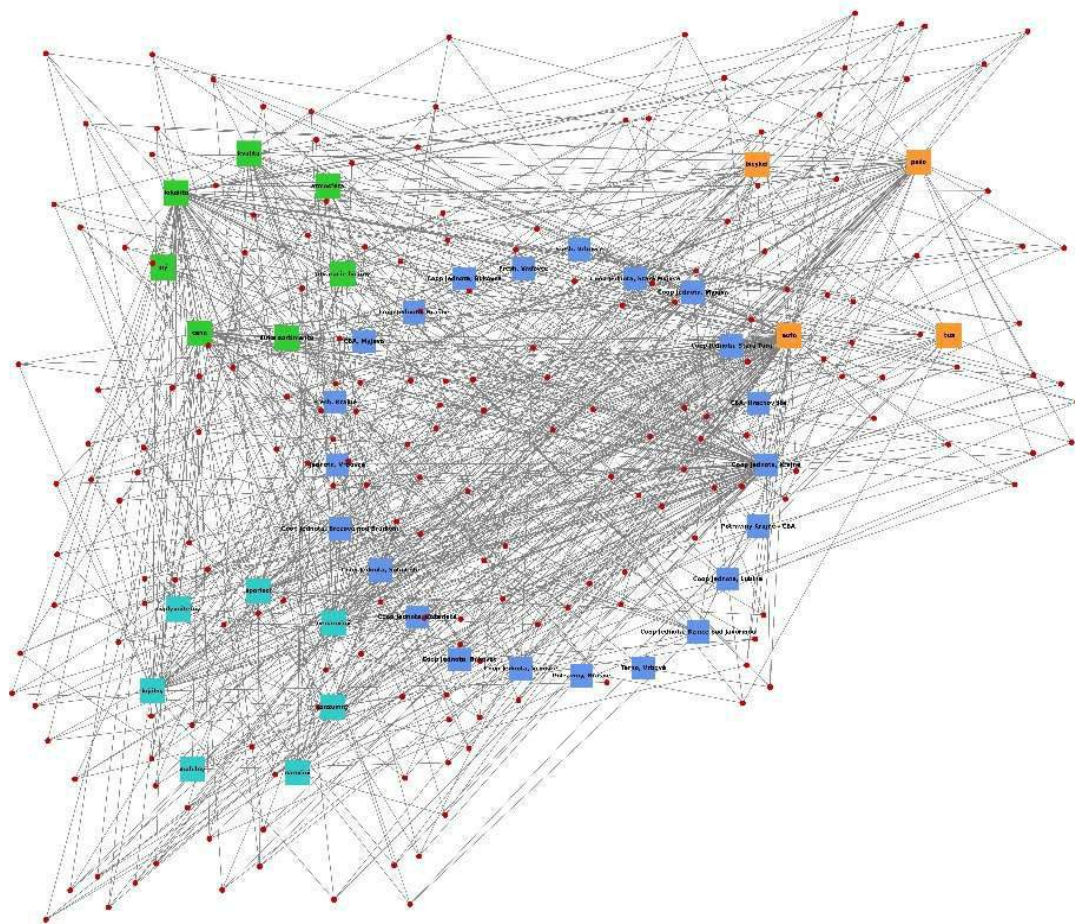
[8] GFK, 2015 [online]. Dostupné na : <http://www.gfk.com/cz/>

[9] TREMBOŠOVÁ, Miroslava, JAKAB, Imrich and FORGÁČ, Pavol, (2023). Shopping Behavior and Access to Food in the Areas of Slovakia with Dispersed Settlements: A Case Study. *European Countryside: Short Supply Chains.*, vol. 15, no. 1, pp. 66-98.

Príloha 1: Analýza sociálnych sietí (SNA) afiliácia siete : atraktivita predajných miest zahraničných reťazcov pre nákup potravín, spôsob dopravy, faktor výberu a nákupný typ spotrebiteľa. Zdroj: Autori.



Príloha 2: Analýza sociálnych sietí (SNA) afiliácia siete : atraktivita predajných miest slovenských predajní potravín, spôsob dopravy, faktor výberu a nákupný typ spotrebiteľa. Zdroj: Autori.



SEKCIA

ODBOROVÁ DIDAKTIKA



Školský model bezdrôtového prenosu energie vhodný pre bádateľsky orientované vyučovanie fyziky

A school model of wireless power transfer for inquiry-based physics education

Ľuboš Bariak¹ – školiteľ Martin Hruška²

^{1,2}Katedra fyziky, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

¹lukos.bariak@student.umb.sk, ²mhruska@umb.sk

Abstrakt

Príspevok predstavuje školský model bezdrôtového prenosu energie založený na princípe elektromagnetickej indukcie a zaoberá sa možnosťami jeho využitia v rámci bádateľsky orientovaného vyučovania fyziky. Zostava s dvojicou cievok umožňuje skúmať vplyv vzdialenosti medzi cievkami, vzájomného natočenia cievok a prítomnosti feromagnetického jadra v cievkach na amplitúdu indukovaného napätia. Namerané závislosti potvrdzujú očakávané fyzikálne správanie systému (pokles napätia so vzdialenosťou medzi cievkami s prítomnosťou jadra a bez jadra, približne kosínusová závislosť od uhla pootočenia) a vytvárajú priestor pre porozumenie Faradayovho zákona a jeho využitie v technológiách bezdrôtového nabíjania. Model podporuje rozvoj experimentálnych zručností žiakov, prácu s premennými, kontrolu podmienok merania, spracovanie dát a diskusiu výsledkov. Je technicky nenáročný a realizovateľný v bežných školských podmienkach, obsahovo nadväzuje na učivo elektromagnetickej indukcie a je vhodný ako rozširujúca bádateľská aktivita v tematickom celku Elektrina a magnetizmus na gymnáziách (ISCED 3A).

Kľúčové slová: bezdrôtový prenos energie, elektromagnetická indukcia, bádateľsky orientované vyučovanie, digitálne meranie, školský experiment

Abstract

This paper presents a school-level model of wireless power transfer based on electromagnetic induction and discusses possibilities for its use in inquiry-based physics education. The setup, consisting of a pair of coils, enables investigation of how the distance between the coils, their relative orientation, and the presence of a ferromagnetic core in the coils affect the amplitude of the induced voltage. The measured relationships confirm the expected physical behaviour of the system (a decrease in voltage with increasing coil

separation both with and without a core, and an approximately cosine dependence on the rotation angle) and provide opportunities for understanding Faraday's law and its application in wireless charging technologies. The model supports the development of students experimental skills, including working with variables, controlling measurement conditions, processing data and discussing results. It is technically undemanding and feasible under typical school conditions, aligns with the curriculum content on electromagnetic induction, and is suitable as an extension inquiry activity within the Electricity and Magnetism topic at grammar schools (ISCED 3A).

Key Words: wireless power transfer, electromagnetic induction, inquiry-based science education (IBSE), digital measurement, school experiment

Úvod

Bezdrôtové nabíjanie mobilných zariadení a inej drobnej spotrebnej elektroniky predstavuje pre žiakov prirodzenú motiváciu na prepojenie abstraktného javu elektromagnetickej indukcie s každodennou skúsenosťou. V školských podmienkach sa elektromagnetická indukcia často demonštruje najmä kvalitatívne, pričom zostáva len obmedzený priestor na systematickú zmenu parametrov a kvantitatívne merania a ich analýzu.

Cieľom príspevku je predstaviť jednoduchý a ľahko realizovateľný model bezdrôtového prenosu energie založený na elektromagnetickej indukcii a ukázať jeho didaktický potenciál pre bádateľsky orientované vyučovanie fyziky. Príspevok vychádza z autorom experimentálne overenej zostavy [1] a zameriava sa na prácu s dátami (tabuľky, grafy) a interpretáciu výsledkov v kontexte Faradayovho zákona, ktorý je súčasťou učiva fyziky v ŠVP pre gymnáziá (ISCED 3A) [14].

1 Didaktické východiská

Experiment plní v didaktike fyziky viacero významných funkcií: motivačnú (aktivuje zvedavosť a vyvoláva otázky), názornú (sprístupňuje „neviditeľné“ javy), overovaciu (umožňuje porovnať model s meraním) a heuristickú (vedie k objaveniu vzťahov na základe dát) [2], [3]. Z didaktického hľadiska je pritom kľúčové, aby žiaci nevystupovali iba ako vykonávatelia predpísaného postupu, ale aby pracovali s premennými, kontrolovali podmienky merania a svoje závery opierali o argumentáciu založenú na dôkazoch. Práve takýto režim práce podporuje prechod od pozorovania efektu k porozumeniu mechanizmu [6].

Bádateľsky orientované vyučovanie (IBSE) je založené na cykle: formulácia výskumnej otázky → hypotéza → návrh postupu → zber a analýza dát → interpretácia a reflexia [4]. Dôležité je, že v bádateľsky orientovanej výučbe nejde iba o praktickú aktivitu, ale o prepojenie manipulácie s objektmi, s reprezentáciami (tabuľka, graf, model) a s vedeckými praktikami, ako sú porovnávanie trendov, identifikácia zdrojov neistoty a vyvodzovanie záverov v hraniciach platnosti merania. Metaanalýzy [12] naznačujú, že bádateľsky a interaktívne orientované vyučovanie môže v porovnaní s tradičným prístupom viesť k lepším učebným výsledkom [5].



Obr. 1. Schéma cyklu bádateľského učenia.

Zdroj: [4]

Softvérové spracovanie dát (tabuľky, grafy, prípadne regresia) skracuje čas medzi meraním a interpretáciou a posilňuje kvalitu diskusie výsledkov. Umožňuje rýchly prechod od merania ku grafu a k vyhodnoteniu záverov, pričom postup merania možno priebežne spresňovať podľa získaných údajov, čo podporuje rozvoj experimentálnych kompetencií a práce s dátami [6]. V príprave budúcich učiteľov fyziky je tento prístup obzvlášť hodnotný, pretože zároveň

modeluje spôsob, ako možno podobnú aktivitu bezpečne a zmysluplne organizovať v školských podmienkach (práca v skupinách, riadenie diskusie, formatívne hodnotenie).

2 Školský model bezdrôtového prenosu energie

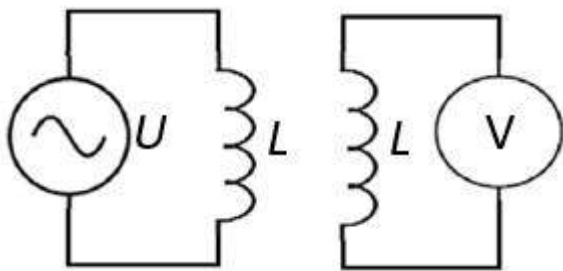
Školský model bezdrôtového prenosu energie je možné využiť predovšetkým na demonštráciu, ako ukazuje obr. 5 nižšie. Kým primárna cievka je napájaná striedavým sínusovým signálom, LED dióda, pripojená k sekundárnej cievke, sa pri nastavení rezonančnej frekvencie rozsvieti. Pokiaľ k primárnej aj k sekundárnej cievke pripojíme senzory napätia, môžeme určiť napr. časové priebehy napätí, ako aj amplitúdy napätia na oboch cievkach.

Meranie priebehu napätí na cievkach sme realizovali pomocou prevodníka VinciLab a softvéru Coach 7. K primárnej aj sekundárnej cievke boli pripojené snímače napätia 0222i (rozsah -10 V až $+10$ V). Do primárnej cievky sme priviedli sínusový signál z generátora harmonického signálu (XR22206). Amplitúda indukovaného napätia (U_{ind}) na sekundárnej cievke sa určovala zo zaznamenaného časového priebehu pre jednotlivé nastavenia vzdialenosti, uhla natočenia a pre konfiguráciu s jadrom alebo bez feromagnetického jadra [1], [7].

Pre porovnateľnosť výsledkov boli počas merania fixované nastavenia zdroja signálu (amplitúda, rezonančná frekvencia) aj geometria cievok a systematicky sa menila vždy iba jedna nezávislá premenná (vzdialenosť medzi cievkami, uhol natočenia sekundárnej cievky alebo prítomnosť feromagnetického jadra v nich).

2.1 Opis experimentálnej zostavy a premenných

Zostava pracuje s nízkym napätím a malým výkonom (v školských podmienkach typicky jednotky voltov), preto je bezpečná aj pri práci žiakov. Z hľadiska využitia školského meracieho systému je veľkou výhodou okamžitá vizualizácia meraných veličín na monitore počítača alebo v systéme Coach 7 (časový priebeh aj amplitúda), ktorá skracuje čas medzi experimentom a interpretáciou a podporuje rýchle porovnanie predpokladov so získanými dátami v rámci bádateľskej aktivity.



Obr. 2. Schéma modelu.
Zdroj: autor podľa [1]

Tabuľka 1. Parametre použitých cievok.

Parameter	Symbol	Primárna cievka	Sekundárna cievka
Počet závitov	N	240	1600
Odpor [Ω]	R	2,24	61,0
Indukčnosť [mH]	L	1,99	78,9

Zdroj: autor podľa [1]

V experimente sa skúmajú závislosti indukovaného napätia na sekundárnej cievke od vzdialenosti d medzi pravou hranou primárnej cievky a ľavou hranou sekundárnej cievky, uhla pootočenia α sekundárnej cievky vzhľadom na primárnu cievku a prítomnosti feromagnetického jadra. Z fyzikálneho hľadiska je dôležité, že každá z týchto premenných má priamu fyzikálnu interpretáciu.

2.2 Fyzikálny model pre interpretáciu meraní

Pre kvalitatívnu interpretáciu postačuje Faradayov zákon elektromagnetickej indukcie: indukované elektromotorické napätie je úmerné záporne vzatej časovej zmene magnetického indukčného toku prechádzajúceho závitmi sekundárnej cievky [8], [9]

$$U_i = -\frac{d\Phi}{dt} \quad (1)$$

Pri napájaní primárnej cievky generátorom harmonického signálu je indukované napätie v sekundárnej cievke tiež harmonické. Magnetický indukčný tok prechádzajúci sekundárnou cievkou možno vyjadriť vzťahom:

$$\Phi = \int \vec{B} \cdot d\vec{S}, \quad (2)$$

kde $d\vec{S}$ je element plochy (prierezu cievky) vzhľadom na magnetické indukčné čiary a \vec{B} je vektor magnetickej indukcie, pričom jeho veľkosť na osi primárnej cievky s rastúcou vzdialenosťou klesá. Zároveň sa magnetické

pole primárnej cievky rozptyľuje do strán, preto sekundárna cievka zachytáva menší magnetický indukčný tok Φ , a podľa vzťahu (1) má indukované napätie menšiu amplitúdu U_{ind} . Predpokladáme teda, že amplitúda klesá so zväčšujúcou sa vzdialenosťou medzi cievkami [8], [10].

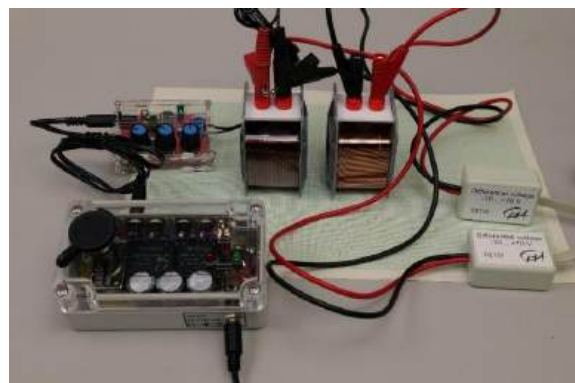
Pri natočení sekundárnej cievky sa mení uhol α medzi osou sekundárnej cievky a vektorom magnetickej indukcie \vec{B} , a tým aj magnetický indukčný tok zachytený cievkou. V jednoduchom modeli predpokladáme kosínusový priebeh magnetického indukčného toku (a teda aj U_{ind}) v závislosti od uhla α :

$$\Phi(t) = \vec{B} \cdot \vec{S} \cdot \cos(\alpha). \quad (3)$$

Reálne magnetické pole v okolí cievok je zložitejšie, avšak porovnanie jednoduchého modelu s reálnymi dátami je didakticky užitočné, pretože vytvára priestor na diskusiu o platnosti aproximácií a predpokladov [11].

3. Experimentálne overenie modelu

V nasledujúcej časti prezentujeme experimentálne overenie navrhnutého školského experimentu bezdrôtového prenosu energie.



Obr. 3. Detail reálneho zapojenia meracej aparatury.
Zdroj: autor podľa [1]

3.1 Metodika meraní a spracovanie údajov

Merania sme realizovali pri konštantných nastaveniach generátora a pri stabilnej polohe primárnej cievky. Na sekundárnej cievke sme pomocou snímača napätia zaznamenávali amplitúdy indukovaného napätia U_{ind} . V prostredí Coach 7 je možné amplitúdu určiť priamo z časového priebehu. Dáta sme následne spracovali do tabuliek a grafov v tabuľkovom editore MS Excel, kde sme získanú závislosť amplitúdy napätia od uhla natočenia sekundárnej cievky preložili kosínusovým priebehom [1], [7].

3.2 Závislosť amplitúdy indukovaného napätia od vzdialenosti

Prvé meranie bolo zamerané na závislosť amplitúdy indukovaného napätia U_{ind} na sekundárnej cievke od vzdialenosti d (0 – 10 mm) pri zarovnaných vinutiach cievok. Meranie sme realizovali najprv bez feromagnetického jadra a následne s jadrom vloženým do oboch cievok, čím sa zvýšil magnetický indukčný tok na sekundárnej cievke [1].

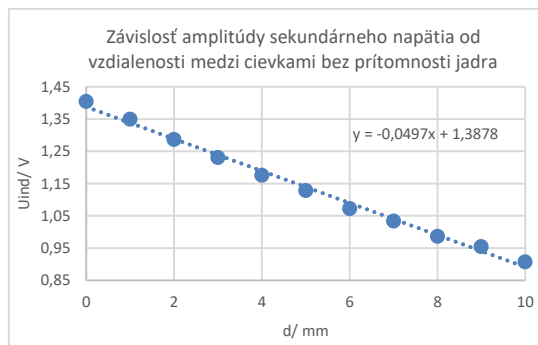
Výsledky potvrdili predpokladaný pokles U_{ind} so zvyšujúcou sa vzdialenosťou medzi cievkami. Bez jadra klesla amplitúda z 1,405 V pri $d = 0$ mm na 0,908 V pri $d = 10$ mm, pričom priemerný pokles medzi susednými bodmi bol približne 0,0497 V/mm. S jadrom bola amplitúda vyššia v celom rozsahu 2,400 V pri $d = 0$ mm a 1,981 V pri $d = 10$ mm a priemerný pokles sa zmenšil na približne 0,0426 V/mm [1].

Relatívne zosilnenie indukovaného napätia po vložení jadra bolo pri $d = 0$ mm približne 1,71-násobné a pri $d = 10$ mm približne 2,18-násobné.

Tabuľka 2. Amplitúda indukovaného napätia v závislosti od vzdialenosti bez/s prítomným jadrom.

Číslo merania	d mm	$\frac{U_{ind}}{V}$ (bez jadra)	$\frac{U_{ind}}{V}$ (s jadrom)
1	0	1,405	2,400
2	1	1,350	2,352
3	2	1,287	2,313
4	3	1,231	2,273
5	4	1,176	2,234
6	5	1,129	2,202
7	6	1,073	2,123
8	7	1,034	2,092
9	8	0,987	2,037
10	9	0,955	2,029
11	10	0,908	1,981

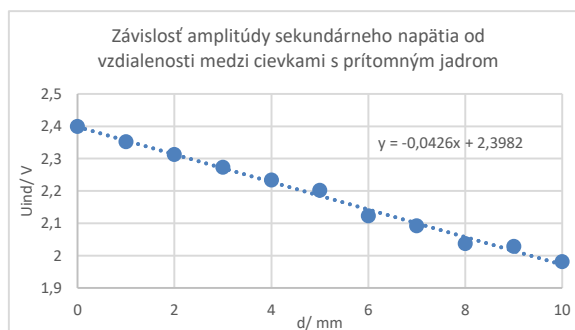
Zdroj: autor podľa [1].



Graf 1. Závislosť amplitúdy indukovaného napätia od vzdialenosti medzi cievkami bez jadra.

Zdroj: autor podľa [1]

Porovnanie meraní bez jadra a s jadrom vytvára prirodzenú bádateľskú otázku: „Prečo sa pri nezmenenej vzdialenosti zmení U_{ind} ?“ Žiaci môžu rozdiel interpretovať ako dôsledok zväčšenia magnetického indukčného toku prechádzajúceho sekundárnou cievkou pri prítomnosti jadra.



Graf 2. Závislosť amplitúdy indukovaného napätia od vzdialenosti medzi cievkami s jadrom.

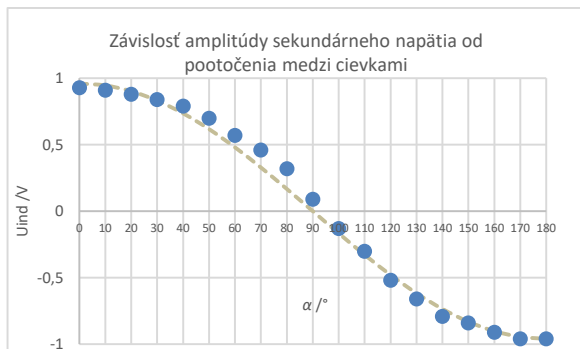
Zdroj: autor podľa [1]

Pre didaktickú interpretáciu je dôležité, že jadro zvyšuje magnetický indukčný tok medzi cievkami, sústreďuje magnetické siločiaru do „spoločného magnetického obvodu“ a znižuje rozptyl magnetického indukčného toku do okolia. V triede je vhodné doplniť meranie o diskusiu, ktoré straty (odpory cievok, rozptyl magnetického poľa, fázové posunutie medzi napätím a prúdom a pod.) vplyvajú na prenos energie elektromagnetickou indukciou a v reálnych zapojeniach je potrebné s nimi počítať.

3.3 Závislosť indukovaného napätia od natočenia cievok

V druhom meraní sme overovali zmenu U_{ind} pri pootočení sekundárnej cievky o uhol α v rozsahu 0° až

180° pri konštantnej vzdialenosti medzi cievkami. Očakávali sme, že magnetický indukčný tok prechádzajúci sekundárnou cievkou je úmerný $\cos(\alpha)$, čo by sa malo prejavíť aj na amplitúde indukovaného napätia [8], [10].



Graf 3. Závislosť amplitúdy indukovaného napätia od uhla pootočenia sekundárnej cievky (porovnanie s priebehom funkcie $\cos(\alpha)$).

Zdroj: autor podľa [1]

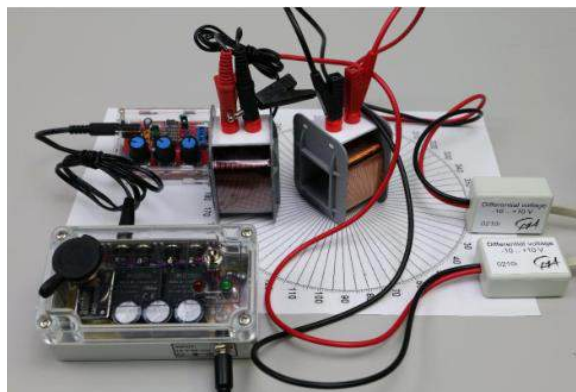
Tabuľka 2. Amplitúda indukovaného napätia v závislosti od natočenia sekundárnej cievky.

Číslo merania	$\alpha / ^\circ$	$\frac{U_{ind}}{V}$
1	0	0,93
2	10	0,91
3	20	0,88
4	30	0,84
5	40	0,79
6	50	0,70
7	60	0,57
8	70	0,46
9	80	0,32
10	90	0,09
11	100	-0,13
12	110	-0,30
13	120	-0,52
14	130	-0,66
15	140	-0,79
16	150	-0,84
17	160	-0,91
18	170	-0,96
19	180	-0,96

Zdroj: autor podľa [1]

Ako sme očakávali, uhlová závislosť vykazuje maximum pri $\alpha = 0^\circ$ (0,93 V), minimum v okolí 90° (≈ 0 V) a zmenu polarity pri $\alpha > 90^\circ$. Pri porovnaní s priebehom funkcie $\cos(\alpha)$ vyšla vysoká zhoda ($R^2 \approx 0.993$).

Odchýlky od ideálnej krivky možno využiť na diskusiu systematických chýb: nepatrné pootočenie primárnej cievky, zmena vzdialenosti medzi cievkami počas otáčania.



Obr. 4. Detail reálneho zapojenia merania amplitúdy indukovaného napätia pri zmene uhla pootočenia sekundárnej cievky.

Zdroj: [1]

4 Využitie prezentovaných experimentov vo vyučovaní fyziky

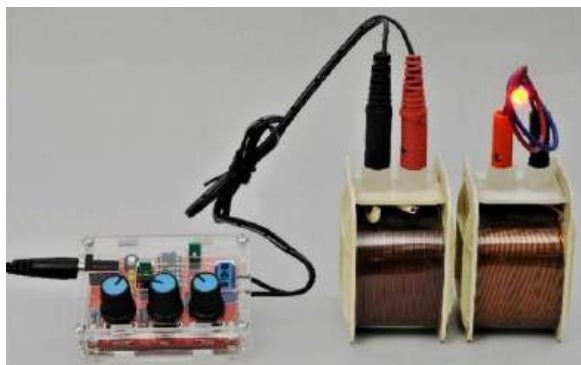
Model bezdrôtového prenosu energie umožňuje formulovať viacero otázok, resp. žiackych hypotéz, založených na kvalitatívnom využití Faradayovho zákona elektromagnetickej indukcie. Príkladom môže byť otázka: „Ako závisí amplitúda indukovaného napätia U_{ind} od vzájomnej polohy cievok?“ Žiaci môžu navrhnúť a následne overovať hypotézy, napríklad:

- (H1) U_{ind} klesá so zväčšujúcou sa vzdialenosťou cievok,
- (H2) U_{ind} je približne úmerné $\cos(\alpha)$,
- (H3) vloženie feromagnetického jadra zvýši U_{ind} pri rovnakej vzdialenosti medzi cievkami.

Každá hypotéza prirodzene vedie k meraniu závislosti amplitúdy indukovaného napätia od jednej premennej pri zachovaní ostatných podmienok.

Súčasťou aktivity je identifikácia premenných, ktoré výsledok ovplyvňujú. Pri meraní uhlovej závislosti môžu žiaci napríklad neúmyselne zmeniť aj vzdialenosť medzi cievkami, čo sa okamžite prejaví v nameraných hodnotách. Učiteľ môže túto situáciu využiť na

precvičenie experimentálneho uvažovania pri plánovaní merania u žiakov.



Obr. 5. Ukážka bezdrôtového nabíjania použitím LED diódy.

Zdroj: [13]

V ďalšom kroku plánujeme pripraviť žiacky pracovný list k uvedeným námetom, ktorého obsah je opísaný nižšie.

Ako motivačný úvod sa môže použiť krátka ukážka bezdrôtovej nabíjačky (prípadne krátke video) resp. ukážka s LED diódou sprevádzaná otázkou: „Prečo sa zariadenie nabíja/svieti iba v určitej polohe?“ V nadväznosti na to nasleduje fáza plánovania, v ktorej žiaci spoločne určia merateľnú veličinu, pomenujú premenné a sformulujú overiteľnú hypotézu. Vo fáze skúmania realizujú meranie (napr. závislosť od vzdialenosti alebo od uhla natočenia sekundárnej cievky), zaznamenajú údaje do tabuľky, vytvoria graf a pokúsia sa vyvodiť všeobecnejší záver podložený dátami.

Tabuľka 3. Návrh štruktúry bádateľsky orientovanej aktivity pre bezdrôtový prenos energie.

Fáza	Typické činnosti a výstupy
Motivácia	Problémová otázka z praxe: identifikácia javov (časovo premenné magnetické pole, magnetický indukčný tok, elektromagnetická indukcia)
Plánovanie	Voľba premenných (d , α), formulácia hypotéz
Skúmanie	Zber dát: kontrola premenných a opakované merania pre spoľahlivosť
Analýza	Grafy, porovnanie trendov: $\cos(\alpha)$ model a argumentácia dátami
Rozšírenie	Úvahy o rozptyle poľa: návrhy vylepšenia zostavy
Reflexia	Sebahodnotenie: hodnotenie práce s dátami

Zdroj 1: autor.

Experiment je možné realizovať buď v rámci práce žiakov v skupinách, prípadne frontálne. Čas potrebný na jednu bádateľskú úlohu (meranie vzdialenostnej alebo uhlovej závislosti) je podľa vlastných skúseností približne 30–40 min vrátane spracovania grafu v softvéri Coach 7 alebo v tabuľkovom editore MS Excel.

Pri hodnotení bádateľsky orientovanej aktivity odporúčame nehodnotiť iba „správnu odpoveď“, ale aj proces: kvalitu hypotézy, kontrolu premenných, čitateľnosť grafu, interpretáciu a argumentáciu.

Na základe vlastných skúseností môžeme konštatovať, že so zostavou sa typicky objavujú dve ťažkosti:

- zámena pojmov magnetické pole – magnetický indukčný tok,
- nastavenie konštantnej vzdialenosti medzi cievkami pri jej otáčaní.

Učiteľ môže tieto situácie využiť na rozvoj vedeckej argumentácie: žiak má uviesť dôkaz, vysvetlenie a obmedzenia.

Zostava zároveň ponúka viacero námetov na ďalšie žiacke experimenty, ktoré nadväzujú na rovnaký princíp a rozširujú interpretáciu výsledkov:

- Realizácia bezdrôtového prenosu energie s využitím cievok s inými parametrami.
- Prenos zvukového signálu elektromagnetickou indukciou.

Takéto rozšírenia sú vhodné najmä v seminároch pre nadaných žiakov alebo v príprave budúcich učiteľov fyziky, kde je priestor na didaktické plánovanie a bezpečnostnú analýzu [2], [4].

Záver

Predstavený školský model bezdrôtového prenosu energie poskytuje atraktívny kontext na výučbu elektromagnetickej indukcie a zároveň umožňuje bádateľské skúmanie parametrov prenosu (vzdialenosť medzi cievkami, natočenie sekundárnej cievky, prítomnosť alebo neprítomnosť jadra). Namerané závislosti sú v kvalitatívnej zhode s teoretickými očakávaniami: U_{ind} klesá so vzdialenosťou, feromagnetické jadro zvyšuje magnetický indukčný tok a uhlová závislosť má približne kosínusový charakter [1].

V príspevku sme diskutovali aj možnosti didaktického využitia experimentu, ktorý umožňuje formuláciu hypotéz, prácu s dátami, grafickú interpretáciu a argumentáciu, pričom prirodzene otvára diskusiu o chybách merania a o limitoch

zjednodušeného fyzikálneho modelu. V ďalšom kroku sa chceme zamerať na prípravu žiackych pracovných listov a metodických materiálov pre učiteľov a experimentálne aktivity overiť na vyučovaní alebo v príprave budúcich učiteľov fyziky.

PodĎakovanie

Ďakujem školiteľovi Mgr. Martinovi Hruškovi, PhD. za odborné konzultácie pri návrhu experimentu a metodické pripomienky k didaktickému spracovaniu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BARIÁK, Ľuboš, (2024). Vybrané experimenty z elektriny a magnetizmu vo výučbe fyziky. Bakalárska práca. Banská Bystrica: Univerzita Mateja Bela, 65 s.
- [2] DEMKANIN, Peter, (2018). Didaktika fyziky pre študentov magisterského štúdia a učiteľov v praxi. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 155 s. ISBN 978-80-223-4374-9. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/328614725_Demkanin_P_Didaktika_fyziky_pre_studentov_magisterskeho_studia_a_ucitelov_v_praxi_Physics_Education_for_Pre-Service_and_In-Service_Physics_Teachers [prístup 2026-02-21].
- [3] VYBÍRAL, Bohumil, (2015). Experimenty ve školské fyzice dříve a nyní. Matematika–Fyzika–Informatika, roč. 24, č. 4, s. 274–292. ISSN 1210-1761. Dostupné z: <https://www.mfi.upol.cz/index.php/mfi/article/view/223> [prístup 2026-02-21].
- [4] JEŠKOVÁ, Zuzana; KIREŠ, Michal a kol., (2016). Bádateľské aktivity v prírodovednom vzdelávaní, časť A. Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné z: https://www.statpedu.sk/files/articles/no_ve_dokumenty/ucebnice-metodiky-publikacie/badatelske-aktivity/01cast_a_web.pdf [prístup 2026-02-21].
- [5] FURTAK, Erin M.; SEIDEL, Tina; IVERSON, Heidi a BRIGGS, Derek C., (2012). Experimental and Quasi-Experimental Studies of Inquiry-Based Science Teaching: A Meta-Analysis. Review of Educational Research, vol. 82, no. 3, pp. 300–329 ISSN 0034-6543. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.3102/0034654312457206> [prístup 2026-02-21].
- [6] LUNETTA, Vincent N.; HOFSTEIN, Avi a CLOUGH, Michael P., (2007). Learning and teaching in the school science laboratory: An analysis of research, theory, and practice. In: ABELL, Sandra K. a LEDERMAN, Norman G. (eds.). *Handbook of Research on Science Education*. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, pp. 393–441. ISBN 978-0-8058-4714-7.
- [7] CMA SCIENCE, (2021). Coach 7 software for STEM education. Softvér. Dostupné z: https://cma-science.com/coach7_en/ [prístup 2026-02-21].
- [8] FEYNMAN, Richard P.; LEIGHTON, Robert B. a SANDS, Matthew, (2022). The Feynman Lectures on Physics. Vol. II. New Millennium Edition. New York: Basic Books, 592 p. ISBN 978-0465024940.
- [9] KLIMA, Richard, (2012). Elektromagnetizmus pre vysoké školy. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 320 s. ISBN 978-80-227-3673-2.
- [10] HALLIDAY, David; RESNICK, Robert a WALKER, Jearl, (2019). Fyzika 1,2. Brno: VUTIUM. ISBN 978-80-214-4125-1.
- [11] TIRPÁK, Andrej, (2004). Elektromagnetizmus (2. verzia). Univerzita Komenského, Katedra fyziky, FMFI Bratislava. Dostupné z: <https://files.gamepub.sk/Bakalar/Fyzika%202/Andrej%20Tirpak,%20Elektromagnetizmus/Andrej%20Tirpak,%20Elektromagnetizmus.pdf> [prístup 2026-02-21].
- [12] LAZONDER, Ard W.; HARMSEN, Ruth, (2016). Meta-Analysis of Inquiry-Based Learning: Effects of Guidance. Review of Educational Research, vol. 86, no. 3, pp. 681–718. ISSN 0034-6543. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.3102/0034654315627366> [prístup 2026-02-21].
- [13] HRUŠKA, Martin (2025). Ako funguje bezdrôtové nabíjanie. Pracovný list PL_FYZa_22. Výstup NP Digitálna transformácia vzdelávania a školy. Dostupné z: <https://www.fpv.umb.sk/katedry/katedra-fyziky/veda-a-vyskum/vystupy-projektov/mikrokontrolery-vo-vyucbe-fyziky/navrhyna-experimenty.html> [prístup 2026-02-24].
- [14] ŠTÁTNY PEDAGOGICKÝ ÚSTAV, (2009). Štátny vzdelávací program: FYZIKA (Vzdelávacia oblasť: Človek a príroda). Príloha ISCED 3A. Bratislava: Štátny pedagogický ústav, 16 s. Dostupné z: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/statny-vzdelavaci-program/fyzika_isced3.pdf [prístup 2026-02-24].

Aktivity z chémie podporujúce chápanie trojrozmernosti molekúl

Chemistry Activities to Support Understanding Molecules as 3-D Objects

Natália Franeková¹ – Marek Skoršepa²

^{1,2}Katedra chémie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹nfrankova@student.umb.sk, ²marek.skorsepa@umb.sk

Abstrakt

Cieľom príspevku je navrhnúť aktivity a k nim prislúchajúce metodické listy a didaktické testy s využitím aplikácie BIOVIA Discovery Studio Visualizer pre žiakov 1., 2. a 3. ročníka gymnázia so štvorročným štúdiom, ktoré budú slúžiť na podporu chápania trojrozmernosti molekúl. V príspevku sa najskôr venujeme stručnej charakteristike priestorových schopností, didaktických pomôcok, fyzických a virtuálnych modelov a prehľadu štúdií zaoberajúcich sa využitím virtuálnych modelov vo vyučovaní. V praktickej časti uvádzame stručný opis aplikácie Discovery Studio a jej najčastejšie používaných nástrojov. Najpodstatnejšiu časť príspevku tvorí návrh aktivít na podporu chápania trojrozmernosti molekúl, ukážka vzorového metodického listu a didaktického testu, ktorý bude v budúcnosti slúžiť na zistenie úrovne porozumenia danej problematiky žiakmi. Pri tvorbe aktivít a metodických listov sme vychádzali zo Štátneho vzdelávacieho programu ISCED 3A. Príspevok predstavuje prípravnú fázu pre pilotné testovanie navrhnutých aktivít a pre ďalší výskum v danej oblasti, vrátane rozšírenia portfólia aktivít.

Kľúčové slová: aktivity, metodické listy, virtuálne 3D modely, aplikácia Discovery Studio, gymnázium

Abstract

The aim of this paper is to design activities, accompanying methodological sheets and didactic tests using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer application for students in the 1st, 2nd and 3rd year of a four-year grammar school programme, which will serve to support the understanding of the three-dimensional structure of molecules. The paper first provides a brief description of spatial abilities, didactic aids, physical and virtual models, and a review of studies on the use of virtual models in teaching. In the practical part, we provide a brief description of the Discovery Studio application and its most commonly used tools. The core

of the paper consists of the design of activities aimed at enhancing students' understanding of three-dimensional structure of molecules, a sample methodological sheet and a didactic test, which will serve in the future to assess students' level of understanding of the given issue. The activities and methodological sheets were developed in accordance with the National Education Programme ISCED 3A. This paper represents a preparatory phase for pilot testing of the proposed activities and for further research in this field, including the expansion of the activity portfolio.

Key words: activities, methodological sheets, virtual 3-D models, Discovery Studio application, grammar school

Úvod

V posledných rokoch čoraz častejšie pozorujeme pokles záujmu žiakov o vzdelávanie v oblasti prírodných vied, vrátane štúdia chémie. Mnohí žiaci totiž považujú chémiu za príliš abstraktnú a majú problém predstaviť si atómy, orbitály či molekuly ako trojrozmerné objekty. Pre lepšie porozumenie týmto konceptom je potrebná ich vizualizácia. Cieľom vizualizácie je znázorniť objekty tak, aby ich žiaci lepšie pochopili a uložili do dlhodobej pamäte. V učebniciach chémie sa najčastejšie vyskytujú dvojrozmerné vizualizácie molekúl, ktoré si žiaci musia mentálne preniesť do trojrozmerného zobrazenia a následne s nimi v myslí manipulovať, napríklad ich rotovať. Na uľahčenie tohto procesu boli vyvinuté fyzické 3D modely, napríklad guľôčkové, tyčinkové alebo kalotové. S rozvojom a väčšou dostupnosťou počítačových technológií sa však do popredia dostávajú rôzne virtuálne 3D modely, ktoré na rozdiel od fyzických modelov umožňujú nielen interakciu s väčším množstvom molekúl, ale aj prácu so zložitejšími molekulovými štruktúrami.

Téma bola zvolená z dôvodu potreby lepšieho pochopenia trojrozmernosti molekúl žiakmi, vďaka čomu sa chémia môže stať konkrétnejšou

a atraktívnejšou. Naším zámerom je oboznámiť žiakov s aplikáciou BIOVIA Discovery Studio Visualizer (ďalej len „aplikácia Discovery Studio“) a pomôcť im lepšie pochopiť prebrané učivo.

Cieľom príspevku je vytvoriť súbor aktivít a k nim prislúchajúcich metodických listov pomocou aplikácie Discovery Studio pre žiakov gymnázia, ktoré podporia chápanie trojrozmernosti molekúl. Sekundárnym cieľom je tvorba didaktických testov na zistenie úrovne zlepšenia porozumenia danej problematiky žiakmi a návrh nástroja na získavanie spätnej väzby od žiakov na kvalitu navrhnutých aktivít.

1 Priestorové schopnosti

Priestorové schopnosti človeka mu umožňujú manipulovať s priestorovými vzťahmi a chápať ich v reálnych aj imaginárnych priestoroch [1]. Zahŕňajú schopnosť mentálne prechádzať medzi dvojrozmernými a trojrozmernými vizualizáciami atómov alebo molekúl [2]. Priestorové schopnosti ľudia využívajú v každodenných činnostiach, napríklad pri navigovaní z jedného miesta na druhé alebo pri skladaní nábytku [1]. Tieto schopnosti nie sú pevne dané, a teda sa môžu počas života človeka vyvíjať a zlepšovať [3]. Pre pochopenie viacerých chemických konceptov je nevyhnutné, aby žiaci mali dostatočne vyvinuté práve tieto priestorové schopnosti, a teda aj schopnosť vizualizovať molekuly v 3D forme [4]. Priestorové schopnosti pozostávajú z troch základných komponentov: priestorovej vizualizácie, priestorovej orientácie a priestorových vzťahov. Priestorová vizualizácia predstavuje schopnosť mentálne prepájať 2D a 3D objekty. Priestorová orientácia je schopnosť predstaviť si, ako by objekt vyzeral z inej perspektívy. Priestorové vzťahy zahŕňajú schopnosť mentálne manipulovať s objektom a rotovať ho [5]. Výskumy naznačujú, že žiaci s lepšie vyvinutými priestorovými schopnosťami dosahujú lepšie študijné výsledky [4]. Samotné 3D modely, či už fyzické alebo virtuálne, umožňujú vizualizovať chemické štruktúry a molekuly aj takým žiakom, ktorých priestorové schopnosti nie sú dostatočne vyvinuté [6].

2 Didaktické pomôcky, modely

Pri pojme didaktické alebo učebné pomôcky sa stretávame s niekoľkými definíciami. Môžu byť definované ako „hmotné prostriedky, ktoré skvalitňujú a uľahčujú vyučovací proces a uľahčujú učebnú činnosť žiakov“ [7] alebo ako „hmotné prostriedky, ktoré pomáhajú pri vyučovaní v škole“ [8]. Vo všeobecnosti však platí, že didaktické pomôcky sú také prostriedky, ktoré umožňujú komplexnejšie, rýchlejšie

a dokonalejšie osvojenie učiva, a zároveň slúžia k názornosti vyučovania [9].

Učebné pomôcky plnia množstvo funkcií: názornú (pôsobia na zmysly, vďaka čomu žiaci získavajú ucelené a konkrétnejšie predstavy o tom, čo sa učia), motivačnú (vzbudzujú u žiakov záujem o učivo), systematizujúcu (pomáhajú triediť a zaraďovať vedomosti do určitého systému), inštrumentálnu (predstavujú nástroje, pomocou ktorých žiaci získavajú nové vedomosti a zručnosti), formatívnu (formujú zmyslové poznávacie procesy žiakov), informatívnu (informujú žiakov o súvislostiach a o tom, ako učivo chápu), racionálnu a ekonomickú (zefektívňujú a racionalizujú vyučovanie a učenie) [9].

Učebné pomôcky môžeme rozdeliť do niekoľkých skupín: pôvodné predmety, zvukové a textové pomôcky, relácie a programy, špeciálne pomôcky, dvojrozmerné zobrazenia a modely [10].

V našej práci sa zaoberáme práve modelmi, ktoré sú definované ako trojrozmerné pomôcky, ktoré sú na rozdiel od pôvodných predmetov zámerne zjednodušené, aby sa uľahčilo vnímanie tých informácií, ktoré sú pre poznávanie rozhodujúce. Môže ísť o funkčné modely, ktoré verne zobrazujú princíp alebo stavbu predmetu, pričom zobrazenie funkcie môže byť statické alebo dynamické [10]. Ako didaktické pomôcky sa využívajú dlhodobo, spočiatku najmä na demonštračné účely [6].

Modely umožňujú učenie sa v dvoch fázach, a to pri konštrukcii modelu a pri manipulácii s modelom. Neexistujú žiadne pevné pravidlá ani postupy na ich stavbu, takže už samotná činnosť zisťovania, čo do seba zapadá a akým spôsobom, poskytuje príležitosť učiť sa. Samotnou stavbou modelu a pohľadom naň sa však nedozvieme o jeho vlastnostiach, preto je potrebné s modelom aj manipulovať [11].

Prvý chemický model bol vytvorený už v roku 1813, kedy Frederick Accum vytvoril sadu modelov zobrazujúcich kryštálové štruktúry [6]. V roku 1865 použil chemik Wilhelm August Hoffmann prvýkrát farebné guľôčky na znázornenie atómov. Významný pokrok v chápaní štruktúry atómov dosiahol v 19. storočí John Dalton, ktorý vo svojich prednáškach používal guľôčkové a tyčinkové modely molekúl, patriace medzi fyzické modely [12]. S nástupom počítačových technológií sa do popredia dostávajú aj modely virtuálne [13].

2.1 Fyzické modely

Fyzické modely atómov a molekúl sú „skutočné“ a hmatateľné, vďaka čomu je možné sa ich priamo dotýkať a manipulovať s nimi [6]. Najznámejším

fyzickým modelom je guľôčkový a tyčinkový model (ball-and-stick), ktorý predstavuje analógový model používaný na vysvetlenie nových a abstraktných konceptov [14]. Ďalším fyzickým modelom je kalotový alebo priestorový model (space-filling), ktorý reprezentuje veľkosť a tvar celej molekuly, a teda aj koľko miesta zaberá každý atóm. Pri výučbe chémie sa často používa aj kostrový model (wireframe), v ktorom atómy nie sú zobrazené ako guľôčky, ale predpokladá sa, že sa nachádzajú na priesečníku dvoch alebo viacerých tyčínok, ktoré reprezentujú väzby [12].

Pri používaní fyzických modelov na tvorbu molekúl však nachádzame niekoľko nedostatkov, a to obmedzené množstvo jednotlivých komponentov, malá rôznorodosť farieb a veľkostí [6]. V prípade guľôčkového a tyčinkového modelu relatívny priemer guľôčok síce predstavuje veľkosť rôznych atómov, ale všetky tyčinky majú rovnakú dĺžku, hoci „skutočné“ väzby rovnakej dĺžky nemajú [14].

2.2 Virtuálne modely a počítačové aplikácie

Virtuálne alebo počítačové modely molekúl možno pozorovať vo forme 2D alebo 3D, hoci ide len o projekciu obrazu na obrazovku počítača. Keďže sú virtuálne, sú na rozdiel od fyzických modelov dostupné v neobmedzenom množstve, farbách, polomeroch atómov, dĺžok väzieb a v rôznych typoch modelov pripomínajúcich fyzické modely, ako napríklad virtuálny guľôčkový a tyčinkový, kalotový/priestorový alebo kostrový model [15].

Počítačové programy majú okrem schopnosti tvoriť 3D modely a manipulovať s nimi aj schopnosť predpovedať priestorovú štruktúru pomocou výpočtov minimalizácie energie založených na kvantovej mechanike [14].

3 Prehľad štúdií zaoberajúcich sa využitím virtuálnych modelov vo vyučovaní chémie

Využitiu virtuálnych modelov vo vyučovaní chémie sa venujú mnohí zahraniční odborníci, pričom štúdie ukazujú, že využitie virtuálnych 3D modelov, či už samostatne alebo v kombinácii s fyzickými modelmi, má pozitívny vplyv na pochopenie mnohých konceptov chémie.

Jednou z prvých štúdií zameraných na využitie modelov vo výučbe chémie je výskum autoriek Dori a Barak [14, 15], ktoré skúmali na 276 žiakoch vplyv používania rôznych typov modelov pri vyučovaní organickej chémie. Počas aktivity pracovali s fyzickými aj virtuálnymi modelmi, pričom sa využívali výhody oboch typov modelov a ich nevýhody sa navzájom kompenzovali. Referenčná skupina využívala modely

len na demonštráciu, čo sa prejavilo aj vo výsledkoch – žiaci z experimentálnej skupiny vykazovali lepšie pochopenie učiva a boli schopnejší prechádzať medzi 2D a 3D zobrazeniami.

Využitím rôznych typov modelov vo výučbe sa zaoberali aj Devetak et al. [6], ktorí uskutočnili štúdiu so 170 žiakmi stredných škôl, pričom boli žiaci rozdelení do 3 skupín: skupina využívajúca fyzické modely len formou demonštrácie, skupina využívajúca fyzické modely, ktoré si žiaci sami vytvorili, a skupina využívajúca virtuálne modely. Výsledky ukázali, že žiaci používajúci virtuálne modely dosiahli lepšie výsledky ako tí, ktorí používali fyzické modely, ktoré si sami vytvorili.

Ďalšia štúdia so 64 žiakmi skúmala, ako typ online vyučovania s využitím fyzických alebo virtuálnych modelov ovplyvnil ich učenie v oblasti organickej chémie, stereochemie a reakčných mechanizmov. Žiaci boli rozdelení do 4 skupín: skupina s virtuálnymi modelmi, skupina s fyzickými modelmi, skupina s textovými inštrukciami a skupina bez textových inštrukcií. V tomto prípade výsledky ukázali, že žiaci, ktorí absolvovali online výučbu s využitím fyzických modelov, preukazovali lepšie pochopenie obsahu než žiaci využívajúci virtuálne modely. Žiaci však hodnotili využitie virtuálnych modelov rovnako pozitívne ako využitie fyzických modelov [1].

Využitie digitálnych nástrojov vo výučbe chémie skúmala aj štúdia realizovaná na Národnej univerzite vied a technológií v Islamabadu [5], ktorej sa zúčastnilo 52 žiakov. Cieľom bolo zlepšiť pochopenie štruktúry a vlastností molekúl. Na skúmanie účinnosti bolo vytvorené portfólio materiálov a testov zo stereochemie. Obe skupiny, referenčná aj experimentálna, dostali materiál s daným učivom na 30 minút, pričom experimentálnej skupine bola poskytnutá aj aplikácia, ktorá im pri štúdiu pomáhala. Následne žiaci dostali test. Žiaci z experimentálnej skupiny dosiahli výrazne lepšie skóre než žiaci z referenčnej skupiny.

Virtuálne modely sa vo výučbe chémie využívajú aj prostredníctvom rôznych softvérov. V roku 2019 bola v 1. ročníku na predmete Chemické laboratórium na Mahidolskej univerzite uskutočnená aktivita s využitím programov Avogadro a IQmol [16]. Aktivita pozostávala zo štyroch úloh: vytvorenie základných molekulových štruktúr, vizualizácia orbitálov a elektrónových hustôt, predpovedanie polarít molekúl a priradovanie 3D štruktúr k štruktúrnym vzorcom. Aktivity sa zúčastnilo 31 žiakov a v porovnaní s výsledkami pre- a post-testu sa ich úspešnosť zvýšila až o 11 %.

Ďalším príkladom nástroja podporujúceho prácu s virtuálnymi modelmi je aplikácia MolEdu, ktorá umožňuje žiakom zadávať chemické vzorce alebo zjednodušené lineárne zápisy chemických štruktúr (SMILES), ktoré následne zobrazí v 2D a 3D formáte. Výsledky naznačujú, že aplikácia MolEdu zvyšuje zapojenie žiakov do výučby, zlepšuje presnosť v interpretácii molekulárnych štruktúr a podporuje učenie založené na skúmaní [17].

Virtuálne modely sa najčastejšie využívajú pri výučbe stereochemie, kde je pochopenie priestorového usporiadania molekúl veľmi dôležité. V New Yorku využili žiaci na lepšie pochopenie stereochemie 3D zobrazenia vytvorené pomocou programu Adobe Acrobat 3D v kombinácii s fyzickými modelmi. Na konci aktivity žiaci vyplnili dotazník, na základe ktorého sa zistilo, že až 89 % žiakov, ktorí použili takéto virtuálne 3D zobrazenia, odpovedalo správne, zatiaľ čo zo žiakov používajúcich fyzické modely odpovedalo správne len 50 % [18].

Podobne zameraná štúdia [4] porovnávala účinnosť troch typov molekulárnych reprezentácií podporujúcich chápanie stereochemických konceptov. Žiaci boli rozdelení do 3 skupín: skupina používajúca virtuálne modely, skupina používajúca fyzické modely a skupina používajúca 2D zobrazenia. Výsledky ukázali, že žiaci používajúci virtuálne modely dosiahli o 15 % vyššie skóre než žiaci v zvyšných dvoch skupinách a o 37 % vyššie skóre ako žiaci v referenčnej skupine.

Virtuálne modely majú využitie aj v biochémií. V štúdií McLaughlina [19] absolvovalo výučbu na tému proteínov s využitím programov Coot a PyMOL 91 žiakov biochémie. Očakávaným výsledkom bolo lepšie pochopenie štruktúry bielkovín. Aktivita bola uskutočnená počas laboratórnych cvičení, a preto sa na formatívne hodnotenie využili laboratórne zošity, z ktorých vyplynulo, že žiaci vykazovali lepšie porozumenie štruktúre proteínov.

Na lepšie pochopenie trojrozmernosti molekúl bola uskutočnená aj aktivita s využitím simulátora PhET Molecule Shapes [3]. Aktivita sa zúčastnilo 100 žiakov a 3 lektorí. Žiaci riešili otázky z 3 oblastí: tvar molekúl a ich vlastnosti, kde sa venovali identifikácii a pomenovaniu molekulovej geometrie, viacnásobné reprezentácie, kde žiaci kreslili a prechádzali medzi 2D a 3D reprezentáciami molekúl a mentálna rotácia a perspektíva, kde si žiaci precvičovali identifikáciu molekulových geometrií bez ohľadu na ich orientáciu v priestore.

V súčasnosti sa do popredia dostáva rozšírená a virtuálna realita, ktorá poskytuje nový spôsob skúmania priestorovej štruktúry molekúl. Výhodou

rozšírenej reality je, že žiak nie je obmedzený dvojrozmernou obrazovkou a pre pohlcujúcejší zážitok môže byť obsah umiestnený priamo do prostredia, v ktorom sa práve nachádza [20].

Jedným z príkladov je aj aplikácia MoleculAR Geometry, ktorá využíva tento koncept interaktívneho a trojrozmerného prostredia pri výučbe molekulových geometrií. Umožňuje žiakom aktívne skúmať modely molekúl, vidieť väzbové uhly a vyvodzovať závery o tvare molekúl namiesto pasívneho memorovania údajov. Aplikácia bola testovaná učiteľmi a žiakmi na Štátnej univerzite v Middle Tennessee počas laboratórneho cvičenia. Prieskumy ukázali, že aplikácia mala na respondentov pozitívny vplyv [20].

Ďalšia štúdia s touto aplikáciou bola uskutočnená na približne 900 žiakoch z University of Victoria [21]. Zo 123 odpovedí získaných z dotazníka sa zistilo, že až 88 % žiakov aplikácia pomohla pochopiť 3D geometriu molekúl.

Rozšírenú realitu využíva aj mobilná aplikácia NuPOV (Nucleophile's Point of View), ktorá umožňuje žiakom nielen prezeráť si chemické molekuly, ale aj s nimi interagovať, uskutočňovať chemické reakcie (nukleofilné adície) a sledovať reakčné mechanizmy. Na zistenie úrovne zlepšenia porozumenia učiva žiakmi a kvality aktivity boli uskutočnené dva prieskumy, na základe ktorých sa zistilo, že 45 % žiakov sa cítilo istejšie v chápaní mechanizmu nukleofilnej adície [22].

V rokoch 2018 a 2019 si 40 žiakov precvičovalo priestorové schopnosti pomocou guľôčkového a tyčinkového modelu, rozšírenej a virtuálnej reality [2]. Žiaci vyplnili dotazník, pre- a post-testy, ktoré ukázali, že žiaci vnímajú tieto nástroje ako cenné a užitočné pre rozvoj priestorových zručností.

V roku 2020 bola na Scarborough univerzite v Toronte uskutočnená štúdia [13], v ktorej boli na pochopenie 3D priestorovej vizualizácie molekúl a ich reaktivity použité tri metódy: 3D virtuálne modely, animácie na vizualizáciu 2D a 3D štruktúr a rozšírená realita s využitím aplikácie ARChem. Aplikácia bola vyvinutá s cieľom zlepšiť pochopenie priestorového usporiadania molekúl žiakmi. Na základe dotazníka a výsledkov pre- a post-testov sa zistilo, že všetky tri metódy mali pozitívny vplyv na výsledky žiakov. Aplikácia ARChem zlepšila schopnosť vizualizovať a kresliť molekulárne štruktúry, a preto predstavuje užitočný nástroj pre žiakov na zlepšenie ich priestorových schopností.

Okrem samotného zobrazovania virtuálnych 3D modelov je možné tieto modely využiť aj v kombinácii s pozorovaním vlastností daných molekúl, napríklad teploty topenia. Táto kombinácia umožňuje žiakom

lepšie pochopiť súvis medzi vlastnosťami a štruktúrou molekúl [23].

V roku 2020 bol uskutočnený výskum [21], v ktorom bol vykonaný prehľad štúdií súvisiacich s fyzickými a virtuálnymi modelmi. Zistenia ukázali, že virtuálne modely poskytujú lepšie porozumenie trojrozmernej štruktúre molekúl než fyzické modely.

4 Metodika práce

Cieľom našej práce je prispieť k zlepšeniu porozumenia žiakov v danej oblasti prostredníctvom využitia trojrozmerných vizualizácií molekúl a cielene navrhnutých didaktických aktivít. Za týmto účelom bola s využitím aplikácie Discovery Studio vytvorená séria 3D modelov molekúl, ktoré tvoria základ navrhnutých vzdelávacích aktivít. K jednotlivým aktivitám boli spracované metodické listy pre učiteľov. Pri navrhovaní aktivít a tvorbe metodických listov sme vychádzali zo Štátneho vzdelávacieho programu ISCED 3A. Na overenie miery porozumenia danej problematiky žiakmi sme pre každý ročník vytvorili k daným aktivitám didaktické testy. Didaktické testy nám umožnia posúdiť efektívnosť navrhnutých aktivít. Návrhy aktivít, metodických listov a didaktických testov boli konzultované s vyučujúcimi chémie na gymnáziu a na základe ich postrehov a odborných pripomienok boli upravené. Súčasťou našej štúdie je aj získavanie spätnej väzby od žiakov prostredníctvom dotazníka, ktorý je v súčasnosti vo fáze prípravy.

Navrhnuté aktivity plánujeme pilotne otestovať na vzorke minimálne 30 žiakov a následne na základe výsledkov didaktických testov a získanej spätnej väzby materiály ďalej upravovať a vylepšovať.

4.1 Aplikácia Discovery Studio

Aplikácia Discovery Studio (DS) je bezplatný komplexný softvérový balík distribuovaný spoločnosťou Dassault Systemes BIOVIA [25], ktorý je možné využiť na analýzu a modelovanie molekulových štruktúr, sekvencií a ďalších údajov relevantných pre výskumníkov v oblasti prírodných vied. Aplikáciu možno využiť aj na otváranie údajov generovaných inými softvérmi z produktového radu Discovery Studio.

Aplikácia je navrhnutá tak, aby ponúkala interaktívne prostredie na tvorbu, prezeranie a úpravu sekvencií, údajov z röntgenoštruktúrnej analýzy a najmä na tvorbu, prezeranie a úpravu 3D zobrazení rôznych molekulových štruktúr z oblasti anorganickej a organickej chémie, ako aj biochémie, vďaka čomu je možné aplikáciu využívať ako učebnú pomôcku [26].

Aplikácia Discovery Studio má vo výchovno-vzdelávacom procese rozsiahle využitie. Umožňuje

kresliť jednotlivé atómy a väzby medzi nimi, vytvárať 3D zobrazenia malých molekúl, ale aj makromolekúl. Vytvorené molekuly je možné prezeráť v rôznych 3D zobrazeniach a z rôznych uhlov. Následne možno vytvorené 3D zobrazenia využívať pri príprave na vyučovanie (napríklad v prezentáciách v programe Microsoft PowerPoint), ako aj pri precvičovaní učiva prostredníctvom pracovných listov či testov.



Obr. 1 Popis základných nástrojov aplikácie DS
Zdroj: autor

5 Návrh aktivít na podporu chápania trojrozmernosti molekúl

Navrhnuté aktivity využívajú aplikáciu Discovery Studio a sú rozdelené do jednotlivých ročníkov gymnázia, pričom nadväzujú na obsah učiva chémie a prechádzajú od tvorby jednoduchších modelov anorganických zlúčenín až po komplexné makromolekuly.

V rámci 1. ročníka sú aktivity zamerané na tvorbu a pozorovanie 3D zobrazení rôznych látok, napríklad vody v podobe ľadu, a taktiež na zopakovanie názvoslovía anorganických zlúčenín s využitím vytvorených 3D modelov. Prostredníctvom týchto aktivít si žiaci majú možnosť uvedomiť ako vyzerajú bežné látky v priestore, a že molekuly, ako napríklad voda, nemajú iba rovinnú štruktúru zapísanú vzorcom.

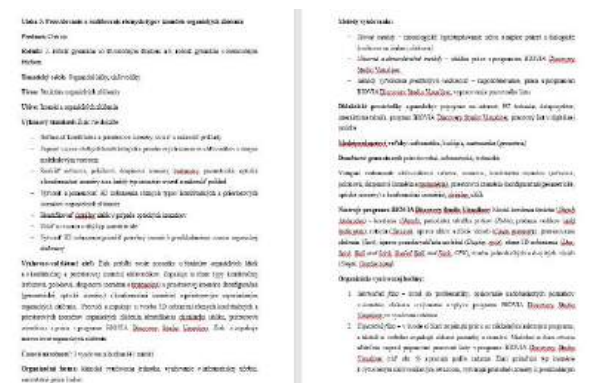
V 2. ročníku sa aktivity týkajú konštitučnej a priestorovej izomérie a samotného opakovania jednotlivých poznatkov z izomérie. Tieto aktivity pomáhajú žiakom uvedomiť si, že molekuly s rovnakým molekulovým vzorcom môžu mať odlišnú štruktúru aj vlastnosti.

V rámci 3. ročníka sú aktivity zamerané na biochémiu, konkrétne na 3D vizualizáciu sacharidov vo Fischerovej a Haworthovej projekcii, na 3D vizualizáciu jednotlivých úrovní štruktúry bielkovín a na 3D vizualizáciu a porovnanie stavby nukleových kyselín. Tieto aktivity umožňujú lepšie pochopenie makromolekúl a ich priestorovej štruktúry, z ktorej vyplývajú aj ich vlastnosti.

Navrhnuté aktivity majú potenciál prispieť k pochopeniu súvislostí medzi štruktúrou a vlastnosťami molekúl. Manipulácia s vytvorenými 3D modelmi zároveň môže podporiť rozvoj priestorových schopností prírodovedných kompetencií.

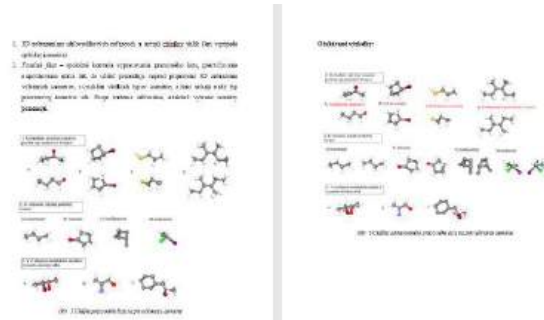
K navrhnutým aktivitám sme s prihliadnutím na Štátny vzdelávací program ISCED 3A vytvorili metodické listy, ktoré pozostávajú z:

- názvu úlohy;
- názvu predmetu;
- ročníka, pre ktorý je daná aktivita určená;
- tematického celku, témy a učiva;
- výkonového štandardu;
- výchovno-vzdelávacích cieľov;
- časovej náročnosti danej aktivity;
- organizačnej formy, ktorou bude daná aktivita prebiehať;
- metód vyučovania uplatnených počas uskutočňovania aktivity;
- didaktických prostriedkov a pomôcok potrebných na uskutočnenie danej aktivity;
- medzipredmetových vzťahov uplatňovaných pri danej aktivite;
- doménových gramotností, ktoré sa danou aktivitou posilňujú;
- vstupných vedomostí, ktoré by žiaci pred začiatkom aktivity mali ovládať;
- nástrojov aplikácie Discovery Studio využívaných počas aktivity;
- organizácie vyučovacej hodiny;
- očakávaných výsledkov žiakov.



Obr. 2 Ukážka metodického listu k aktivite „Precvičovanie a rozlišovanie rôznych typov izomérie organických zlúčenín“ pre 2. ročník (1. časť)

Zdroj: autor



Obr. 3 Ukážka metodického listu k aktivite „Precvičovanie a rozlišovanie rôznych typov izomérie organických zlúčenín“ pre 2. ročník (2. časť)

Zdroj: autor

6 Overenie aktivít a získavanie spätnej väzby

Naša štúdia je aktuálne v štádiu plánovania overovania a získavania spätnej väzby. Spätňú väzbu budeme od žiakov získavať dvoma nástrojmi – prostredníctvom didaktických testov a dotazníka.

Na overenie miery porozumenia trojrozmernosti molekúl žiakmi sme pre každý ročník vytvorili k daným aktivitám didaktické testy, ktoré budú v rámci pilotného overovania využité ako pre- a post-testy. Didaktické testy umožnia objektívne posúdiť zmenu úrovne vedomostí žiakov, pričom predpokladáme, že realizované aktivity prispejú k jej zvýšeniu. Didaktické testy boli vytvorené v súlade s revidovanou Bloomovou taxonómiou kognitívnych funkcií a zahŕňajú rôzne typy úloh, napríklad doplňte do tabuľky, určte, roztriedte, napíšte, usporiadajte, priradte, rozhodnite, pomenujte, nakreslite, nájdite, vyznačte a zdôvodnite.

Test pre 2. ročník gymnázia so štvorročným štúdiom a 6. ročník gymnázia s osemročným štúdiom

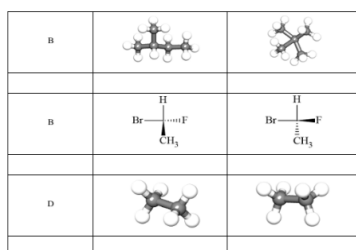
IDENTIFIKAČNÉ ČÍSLO: DÁTUM:

1. K jednotlivým definíciám priradte typ izomérie:

1.	1. Zlúčeniny s rovnakým sumárnym, ale odlišným štruktúrnym vzorcom.	A. Priestorové izomérie
2.	2. Líšia sa spôsobom usporiadania uhľovodíkového reťazca.	B. Konformačné izomérie
3.	3. Líšia sa polohou funkčnej skupiny alebo násobnej väzby.	C. Tautoméry
4.	4. Majú odlišné typy funkčných skupín.	D. Konstitučné izomérie
5.	5. Líšia sa polohou vedľajšieho reťazca.	E. Reťazové izomérie
6.	6. Zlúčeniny s rovnakým sumárnym aj konštitútnym vzorcom, ale líšia sa usporiadaním atómov v priestore.	F. Geometrické izomérie
7.	7. Rôzne priestorové usporiadanie atómov nesúvisí s rotáciou okolo jednoduchých väzby.	G. Polohové izomérie
8.	8. Pokohá atómov/atómových skupín v priestore sa mení rotáciou okolo jednoduchých väzby.	H. Skopínové izomérie
9.	9. Líšia sa umiestnením atómových skupín na atómov uhlíka, ktoré sú viazané dvojitou väzbou.	I. Optické izomérie
10.	10. Molekuly, ktoré obsahujú asymetrický (chirálny) atóm uhlíka, teda atóm uhlíka, na ktorom sú viazané 4 rôzne substituenty.	J. Konfiguračné izomérie

2. Rozhodnite, aký typ izomérie predstavujú dané dvojice zlúčenín a zlúčeniny pomenujte:

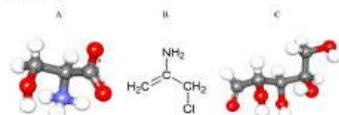
A		



3. K zloženiam doplňte potrebný izomér:

	geometrický	
	skupinový	
	polohový	
	tautomer	

4. V uvedených molekulách organických zlúčenín nájdite a symetru asymetrické (chirálny) atómy:



5. Které z uvedených zlúčenín môžu tvoriť geometrické izoméry (cis-trans)?

- $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}_2$
- $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CH}_2$
- $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCl}$
- $\text{CHCl}=\text{CHCl}$

6. Které dvojice zlúčenín sú regioizoméry kvalitatívne izoméry? Uveďte typ izomérie (označte dvojitku).

- CH_3I $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
- CH_3COOH HOOCCH_3
- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2$ $\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ CH_3COCH_3

7. Které z uvedených zlúčenín sú izoméry? Aký typ izomérie prejavujú?

- Etil - Acetylén
- Cyklohexán - Cyklohexán
- Vinylchlorid (chloroén) - Polystyrén
- Penan - 2,2-dimetylpropan

Vysvetlite:

Obr. 4 Ukážka testu k aktivitám na tému izoméria
Zdroj: autor

Na získanie spätnej väzby od žiakov o kvalite navrhnutých aktivít sme zvolili metódu dotazníka v kombinácii s päťstupňovou Likertovou škálou: (1) úplne súhlasím, (2) skôr súhlasím, (3) nemám názor, (4) skôr nesúhlasím, (5) úplne nesúhlasím.

Primárnym cieľom dotazníka je zistiť, ako žiaci vnímajú realizované aktivity vo vzťahu k zlepšeniu pochopenia trojrozmernosti molekúl. Sekundárnym cieľom je zistiť mieru spokojnosti žiakov s vyučovacou hodinou, počas ktorej boli vytvorené aktivity použité, ako aj s prácou v aplikácii Discovery Studio. Ďalej chceme zistiť, či im aktivity a práca s aplikáciou pomohli pri príprave na testy alebo skúšania a či by mala byť práca s virtuálnymi modelmi molekúl zahrnutá do vyučovacieho procesu častejšie.

Kompletné znenie dotazníka je v súčasnosti vo fáze prípravy a po jeho dokončení bude využité pri pilotnom testovaní.

Záver

V príspevku predstavujeme prípravnú fázu tvorby portfólia chemických aktivít s cieľom podporiť chápanie trojrozmernosti molekúl u žiakov 1. až 3. ročníka gymnázia so štvorročným štúdiom s využitím aplikácie BIOVIA Discovery Studio Visualizer. Navrhnuté aktivity sú určené na využitie vo vyučovaní chémie, pričom sa očakáva zvýšenie miery porozumenia daného učiva.

K navrhnutým aktivitám boli vytvorené metodické listy a didaktické testy vychádzajúce zo Štátneho vzdelávacieho programu ISCED 3A a revidovanej Bloomovej taxonómie kognitívnych cieľov.

Práca má za cieľ položiť základy budúcemu pilotnému testovaniu navrhnutých aktivít a ďalšiemu výskumu v tejto oblasti. Navrhnuté aktivity predstavujú didaktický nástroj zameraný na podporu rozvoja priestorovej predstavivosti a porozumenia trojrozmernej štruktúry molekúl. Ďalším krokom bude pilotné testovanie, úprava súčasných aktivít na základe spätnej väzby získanej od žiakov a následné rozšírenie portfólia aktivít a ich overenie v širšom meradle.

Zoznam bibliografických odkazov

- CASSELMAN, Matthew D.; EICHLER, Jack F. and ATIT, Kinnari, (2021). Advancing Multimedia Learning for Science: Comparing the Effect of Virtual versus Physical Models on Student Learning about Stereochemistry. *Science Education*, vol. 105, no. 6, pp. 1285-1314. ISSN 0036-8326.
- BROMAN, Karolina et al. (2019). Spatial Ability in Organic Chemistry: Can Virtual and Augmented Reality be Valuable? In: *7:e Utvecklingskonferensen för Sveriges ingenjörutbildningar*. Luleå: Luleå tekniska universitet, vol. 7, pp. 143-145. ISBN 978-91-7790-605-6.
- CARPENTER, Yuen-ying and SULLIVAN, Erin R., (2017). The Role of Interactive Digital Simulations in Student Conversations About Visualizing Molecules. *Creating a Learning Culture: Conversations that Matter*, vol. 2, pp. 16-23. ISSN 2560-6050.
- ABRAHAM, Michael; VARGHESE, Valsamma and TANG, Hui, (2010). Using Molecular Representations to Aid Student Understanding of Stereochemical Concepts. *Journal of Chemical Education*, vol. 87, no. 12, pp. 1425-1429. ISSN 1938-1328.
- FATEMATH, Amal; RASOOL, Shahzad and HABIB, Uzma, (2020). Interactive 3D visualization of Chemical Structure Diagrams Embedded in Text to Aid Spatial Learning Process of Students. *Journal of*

- Chemical Education*, vol. 97, no. 4, pp. 992-1000. ISSN 1938-1328.
- [6] DEVETAK, Iztok; HAJZERI, Metka; GLAŽAR, Saša A. and VOGRINC, Janez, (2010). The Influence of Different Models on 15-years-old Students' Understanding of the Solid State of Matter. *Acta Chimica Slovenica*, vol. 57, no. 2, pp. 904-911. ISSN 1580-3155.
- [7] OBDRŽÁLEK, Zdeněk et al., (2004). *Organizácia a manažment školstva*. Bratislava: SPN – Mladé letá, 419 s. ISBN 80-10-00022-1.
- [8] PAVLÍK, Ondrej et al., (1985). *Pedagogická encyklopédia Slovenska 2. zväzok*. Bratislava: VEDA, 702 s.
- [9] PETLÁK, Erich. (1997). *Všeobecná didaktika*. Bratislava: IRIS, 270 s. ISBN 80-88778-49-2.
- [10] TUREK, Ivan. (2008). *Didaktika*. Bratislava: Iura Edition, 595 s. ISBN 978-80-8078-198-9.
- [11] CRISWELL, Brett, (2011). Do You See What I See? Lessons about the Use of Models in High School Chemistry Classes. *Journal of Chemical Education*, vol. 88, no. 4, pp. 415-419. ISSN 1938-1328.
- [12] (2020). Types of Molecular Models. *Whipple Museum of the History of Science* [online]. Cambridge: University of Cambridge. [cit. 2026-18-02]. Dostupné na: <https://www.whipplemuseum.cam.ac.uk/explore-whipple-collections/models/modelling-chemistry/types-molecular-models>
- [13] ABDINEJAD, Maryam; TALAIE, Borzu; QORBANI, Hossain S. and DALIILI, Shadi, (2020). Student Perceptions Using Augmented Reality and 3D Visualization Technologies in Chemistry Education. *Journal of Science Education and Technology*, vol. 30, no. 1, pp. 87-96. ISSN 1573-1839.
- [14] DORI, Yehudit and BARAK, Miri, (1999). Computerized Molecular Modeling as a Collaborative Learning Environment. In: *Proceedings of the Computer Support for Collaborative Learning 1999 Conference*. Palo Alto, CA: International Society of the Learning Sciences, pp. 142-150. ISSN 1819-0146.
- [15] DORI, Yehudit and BARAK, Miri, (2001). Virtual and Physical Molecular Modeling: Fostering Model perception and Spatial Understanding. *Educational Technology and Society*, vol. 4, no. 1, pp. 61-74. ISSN 1436-4522.
- [16] PHANKINGTHONGKUM, Siripreeya and LIMPANUPARB, Taweetham, (2021). A Virtual Alternative to Molecular Model Sets: a Beginners' Guide to Constructing and Visualizing Molecules in Open-source Molecular Graphics software. *BMC Res Notes*, vol. 14, no. 66, pp. 1-7. ISSN 1756-0500.
- [17] SHAFIAN, Shafidah, (2025). MolEdu: Empowering Chemistry Education with Open-Source Cheminformatics for Molecular Drawing. *Progress in Computers and Learning*, vol. 4, no. 1, pp. 49-58. ISSN 3083-8894.
- [18] CODY, Jeremy A. et al., (2012). Design and Implementation of a Self-Directed Stereochemistry Lesson Using Embedded Virtual Three-Dimensional Images in a Portable Document Format. *Journal of Chemical Education*, vol. 89, no. 1, pp. 29-33. ISSN 1938-1328.
- [19] MCLAUGHLIN, Krystle J., (2017). Understanding Structure: A Computer-Based Macromolecular Biochemistry Lab Activity. *Journal of Chemical Education*, vol. 94, no. 7, pp. 903-906. ISSN 1938-1328.
- [20] USELTON, Rachel M., (2020), MolecularAR Geometry: Chemical Visualizations in Augmented Reality. *Sídlo VS: Honors College of Middle Tennessee State University*, 26 s.
- [21] LEVY, Julia et al., (2024). MolecularAR: An Augmented Reality Application for Understanding 3D Geometry. *Journal of Chemical Education*, vol. 101, no. 6, pp. 2533-2539. ISSN 1938-1328.
- [22] AW, Jonah K. et al., (2020). Interacting with Three-Dimensional Molecular Structures Using an Augmented Reality Mobile App. *Journal of Chemical Education*, vol. 97, no. 10, pp. 3877-3881. ISSN 1938-1328.
- [23] JAKOBSCHKE, Charles E. and LE, Anh-Vy, (2023). An Organic Chemistry Activity to Improve Student Understanding of Molecules as 3-Dimensional Objects. *Journal of Chemical Education*, vol. 100, no. 11, pp. 4549-4553. ISSN 1938-1328.
- [24] THAYBAN, Thayban; HABIDDIN, Habiddin and UTOMO, Yudhi, (2020). Concrete Model VS Virtual Model: Roles and Implications in Chemistry Learning. *Jurnal Pembelajaran Kimia*, vol. 5, no. 2, pp. 90-107. ISSN 2579-5945.
- [25] DASSAULT SYSTEMES. *Free Download: BIOVIA Discovery Studio Visualizer* [online]. Dostupné na: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> [cit.2026-18-02].
- [26] MARTINELLI, Adriano. *Introduction to the Discovery Studio Visualizer* [online]. Dostupné na: https://www.adrianomartinelli.it/Fondamenti/Tutorial_0.pdf [cit.2026-19-02].

Múzeum TANAP-u ako priestor pre bádateľsky orientované vyučovanie

The TANAP Museum as a Space for Inquiry-Based Learning

Natália Galliková¹ Ramona Babosová²

^{1, 2}Katedra zoológie a antropológie, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

¹natalia.gallikova@student.ukf.sk, ²rbabosova@ukf.sk

Abstrakt

Cieľom príspevku bolo overiť prínos bádateľsky orientovaného vyučovania realizovaného v prostredí Múzea TANAP-u pre rozvoj environmentálnej gramotnosti žiakov 5. ročníka základnej školy. Edukačná aktivita bola spracovaná formou pátracej hry a jej účinnosť bola hodnotená porovnaním výsledkov pretestu a posttestu pozostávajúcich z 12 úloh rôznej kognitívnej náročnosti. Výsledky poukázali na celkové zlepšenie vedomostnej úrovne žiakov, najmä pri úlohách zameraných na porozumenie ekologickým pojmom. Najvyššiu úspešnosť dosiahli žiaci pri otázkach týkajúcich sa adaptácií kamzíka a významu ochrany prírody, zatiaľ čo najnáročnejšia bola úloha zameraná na vysvetlenie funkcie varovného piskotu svišťa. Výraznejší posun bol zaznamenaný u žiakov s nižšou vstupnou úrovňou vedomostí. Napriek malej výskumnej vzorke výsledky naznačujú, že prepojenie bádateľských metód s múzejným prostredím môže byť efektívnym spôsobom environmentálnej výchovy.

Kľúčové slová: Bádateľsky orientované vyučovanie. Múzeum TANAP-u. Environmentálna výchova. Tatranská fauna. Prírodovedné kompetencie.

Abstract

The aim of the paper was to verify the contribution of inquiry-based learning conducted in the environment of the TANAP Museum to the development of environmental literacy among 5th-grade primary school pupils. The educational activity was designed as a detective game, and its effectiveness was evaluated by comparing the results of a pre-test and post-test consisting of 12 tasks of varying cognitive difficulty. The results indicated an overall improvement in pupils' knowledge, particularly in tasks focused on understanding ecological concepts. The highest success was observed in questions related to the adaptations of the chamois and the importance of nature conservation, while the most challenging task required explaining the warning whistle of the marmot. More significant improvement was found among pupils with lower initial knowledge. Despite the small sample, the

findings suggest that combining inquiry-based methods with a museum environment can effectively support environmental education.

Keywords: Inquiry-based learning. TANAP Museum. Environmental education. Tatra fauna. Science competencies.

Úvod

Tatranský národný park (TANAP) predstavuje jedinečné vysokohorské územie s výskytom mnohých vzácných a chránených druhov rastlín a živočíchov. Nachádzajú sa tu aj druhy, ktoré prežili od dôb zaľadnenia, napríklad kamzík vrchovský tatranský (*Rupicapra rupicapra tatrica*) či svišť vrchovský tatranský (*Marmota marmota latirostris*). Špecifické klimatické podmienky a výrazná výšková členitosť Tatier vytvárajú prostredie, ktoré umožňuje ich prežívanie. V súčasnosti však tieto ekosystémy čelia tlaku klimatických zmien a intenzívneho turizmu, čo zvyšuje ich zraniteľnosť [1].

Práve preto je TANAP vhodným prostredím pre environmentálne vzdelávanie, ktoré vedie žiakov k lepšiemu pochopeniu prírodných súvislostí a k zodpovednému správaniu v prírode.

Múzeum TANAP-u v Tatranskej Lomnici ponúka neformálne vzdelávacie prostredie, kde je možné prepájať teoretické poznatky zo školského prostredia s reálnymi exponátmi a zážitkovým učením. Tematicky usporiadané expozície a diorámy umožňujú žiakovi pozorovať konkrétne druhy a ich prirodzené prostredie, čím podporujú aktívne zapojenie do procesu učenia. Takéto prostredie prirodzene vytvára priestor pre kladenie otázok, hľadanie súvislostí a diskusiu o ochrane prírody.

Na tento princíp nadväzuje bádateľsky orientované vyučovanie (Inquiry-Based Learning, IBL), ktoré kladie dôraz na aktívnu činnosť žiakov, najmä na formulovanie otázok, hľadanie odpovedí a zdôvodňovanie vlastných tvrdení. Namiesto pasívneho prijímania informácií sa žiaci učia pracovať s dôkazmi a vytvárať vlastné závery [2].

Cieľom príspevku je predstaviť túto edukačnú aktivitu realizovanú v prostredí Múzea TANAP-u

a zhodnotiť jej prínos pre vedomosti a environmentálne uvažovanie žiakov.

1 Metodika

Výskum bol realizovaný v septembri 2025 v Múzeu TANAP-u v Tatranskej Lomnici so skupinou 15 žiakov 5. ročníka ZŠ s MŠ Vikartovce (10 dievčat a 5 chlapcov). Skupina mala inkluzívny charakter a zahŕňala aj žiakov z marginalizovaných komunit, čo umožnilo sledovať nielen vedomostný prínos aktivity, ale aj sociálny rozmer spolupráce a zapojenia žiakov počas bádateľských úloh.

Hlavným cieľom výskumu bolo analyzovať prínos bádateľsky orientovaného vyučovania realizovaného v autentickom prostredí múzea na rozvoj environmentálnej gramotnosti žiakov.

V rámci výskumu boli stanovené nasledovné hypotézy:

- **H1:** Bádateľsky orientované vyučovanie realizované v Múzeu TANAP-u zvyšuje úroveň vedomostí žiakov o prírodných hodnotách a ochrane tatranskej prírody.
- **H2:** Realizácia vyučovania v autentickom prostredí múzea pozitívne ovplyvňuje postoje žiakov k ochrane prírody a prispieva k rozvoju ich environmentálneho povedomia.
- **H3:** Aktívna účasť na bádateľských aktivitách zvyšuje záujem žiakov o poznávanie prírody a mieru ich zapojenia do vyučovacieho procesu.

1.1 Edukačná aktivita

Edukačná aktivita bola realizovaná počas návštevy múzea ako súčasť tematického vyučovania zameraného na prírodu Tatier. Hlavným nástrojom bol pracovný list (obrázok 1) spracovaný formou pátracej hry s príbehovým rámcom.

Pri tvorbe pracovného listu sme vychádzali z revidovanej Bloomovej taxonómie [3]. Jednotlivé úlohy boli zoradené od nižších kognitívnych úrovní, ako je zapamätanie a porozumenie (napr. rozpoznanie druhov alebo vysvetlenie pojmov „endemit“ a „relikt“), až po vyššie úrovne, ktoré vyžadovali analýzu prispôbení organizmov, hodnotenie vplyvu človeka na vysokohorské biotopy a návrh možností ochrany biodiverzity.

Aktivita bola zasadená do príbehu kamzíka Tara, ktorého „zabudnuté posolstvo“ mali žiaci počas návštevy múzea postupne odhaliť. Tento príbehový prvok plnil motivačnú funkciu a zároveň prepájal jednotlivé úlohy do uceleného celku.

Realizácia edukačnej aktivity trvala približne 60 minút. Žiaci najprv pracovali individuálne, pričom sa oboznamovali s prostredím múzea a jednotlivými exponátmi a zaznamenávali si informácie o vybraných druhoch tatranskej fauny, najmä o endemických a reliktných druhoch. Následne pracovali v malých zmiešaných skupinách (v trojiciach), v ktorých riešili úlohy z pracovného listu (obrázok 1). Každá skupina mala k dispozícii jeden pracovný list, ktorý spoločne vypracovávala.

5. Krehkí obyvatelia Tatier

„Medzi stovkami krídel sa skrýva taký, ktorý žije len tu. Zistíš jeho meno? A odhalíš, čo mu najväčšie hrozí?“

Úloha: Nájdiť endemického motýľa a zapíšte jeho názov.



Vyber dôvod, prečo je ohrozený.

Tajná indícia: Obálka č. 5 čaká pri veľkom rozprestretom krídle.

Indíciu zapíš:

6. Tichý lovec

„Má ostré oči a uši so štetinkami. Loví potichu. Spoznáš ho podľa stôp? Dobré si ich prezri – nie sú ako vlčie.“

Úloha: Napiš 2 znaky ryasa.



Logická úloha: Porovnaj stopy ryasa a vlka – ako ich odlišíš?

Tajná indícia: Obálka č. 6 sa ukrýva pri odľahku v piesku.

Indíciu zapíš:

7. Skalný akrobat

„Na bralách tancuje majster rovnováhy. Čo mu pomáha žiť tam, kde iní neprežijú? V čom je iný než obyčajná koza?“

Úloha: Zisti, prečo kamzík žije na skalách.



Porovnaj stavbu jeho tela s telom kozy – aspoň 1 rozdiel.

Tajná indícia: Obálka č. 7 je tam, kde sa skaly týčia najvyššie.

Indíciu zapíš:

Obr. 1: Ukážka úloh z pracovného listu

Zdroj: Galliková, 2025

Jednotlivé úlohy ich usmerňovali k tomu, aby si všimli prispôbenia druhov prostrediu, ich potravu, spôsob života či mieru ohrozenia.

Na základe získaných informácií žiaci formulovali odpovede na výskumné otázky, porovnávali znaky jednotlivých druhov, diskutovali o ich ekologickej úlohe a vysvetľovali vplyv človeka na vysokohorské biotopy. Po vyriešení úloh nasledovala spoločná reflexia, počas ktorej skupiny prezentovali svoje zistenia a spoločne overovali správnosť doplneného „posolstva“. Táto fáza podporila diskusiu, argumentáciu a prepojenie vlastného pozorovania s teoretickými poznatkami.

Takto realizovaná aktivita umožnila rozvíjať vedomosti žiakov, spoluprácu v skupine, kritické myslenie aj schopnosť interpretovať ekologické vzťahy v autentickom prostredí múzea.

1.2 Didaktický test

Efektivita edukačnej aktivity bola overovaná pomocou didaktického testu realizovaného formou pretestu a posttestu s identickou štruktúrou. Test obsahoval spolu 12 úloh, z toho 7 uzavretých s výberom správnej odpovede a 5 otvorených, v ktorých žiaci formulovali vlastné odpovede. Pretest a posttest žiaci vypracovali samostatne v triede, pričom časová dotácia na ich vyplnenie bola približne 20 minút. Posttest bol realizovaný s časovým odstupom jedného mesiaca od edukačnej aktivity, aby bolo možné sledovať dlhodobější efekt na vedomosti žiakov.

Úlohy boli zostavené tak, aby pokrývali rôzne kognitívne úrovne. Zameriavali sa na zapamätanie faktov (napríklad identifikáciu druhov alebo ich potravy), porozumenie základným pojmom (endemit, relik), ako aj na aplikáciu a analýzu vzťahov medzi adaptáciou organizmov a prostredím či vplyvom človeka na prírodu.

Na vyhodnotenie výsledkov bol použitý index úspešnosti podľa Vondrákovej a kol. [4], ktorý umožňuje vyjadriť úspešnosť jednotlivých otázok aj celého testu v percentách.

Index úspešnosti jednotlivých otázok:

$$IO[\%] = \frac{\sum p}{n \cdot x_{max}} \times 100$$

kde:

- $\sum p$ – celkový počet bodov získaných za danú otázku,
- n – počet žiakov,
- x_{max} – maximálny počet bodov za otázku.

Index úspešnosti celého testu:

$$I[\%] = \frac{\sum x_i}{n \cdot x_{max}} \times 100$$

kde:

- $\sum x_i$ – celkový počet získaných bodov v teste,
- n – počet žiakov,
- x_{max} – maximálny počet bodov.

Tento postup umožnil porovnať úroveň vedomostí žiakov pred a po realizácii aktivity a identifikovať posun v jednotlivých typoch úloh.

2 Výsledky a diskusia

Účinnosť realizovanej vyučovacej aktivity bola hodnotená porovnaním výsledkov pretestu a posttestu, ktoré mali identickú štruktúru (12 úloh rôznej kognitívnej náročnosti). Cieľom bolo zistiť, či realizácia bádateľsky orientovaného vyučovania v autentickom prostredí Múzea TANAP-u ovplyvnila úroveň vedomostí žiakov a ich environmentálne uvažovanie (Graf 1).

Najvyššiu úspešnosť dosiahli žiaci už v preteste pri otázke č. 7, zameranej na adaptácie kamzíka vrchovského tatranského na vysokohorské prostredie, kde bola zaznamenaná 100 % úspešnosť. Rovnaký výsledok bol dosiahnutý aj pri otázkach č. 11 a 12, orientovaných na význam ochrany prírody a osobný prínos žiakov k ochrane Tatranského národného parku. Tieto výsledky naznačujú, že ide o poznatky a postoje, ktoré mali žiaci osvojené už pred realizáciou vyučovacieho procesu.

Graf 1: Porovnanie indexu úspešnosti v preteste a postteste



Zdroj: Galliková, 2025

Ako najnáročnejšia sa ukázala otázka č. 3, ktorá sa týkala funkcie varovného piskotu svišťa vrchovského. V postteste dosiahla úspešnosť 40 %. Úloha vyžadovala komplexnejšie vysvetlenie viacerých funkcií správania, čo predstavovalo vyššiu kognitívnu náročnosť.

Pri otázkach č. 2 a 6 (potrava medveďa hnedého na jeseň, typické znaky rysa ostrovida) bol v postteste zaznamenaný mierny pokles úspešnosti. Tento jav možno vysvetliť individuálnymi faktormi, ako je únava alebo nižšia pozornosť žiakov pri opakovanom testovaní. Naopak, otázky zamerané na zapamätanie faktografických údajov (napr. rok založenia TANAP-u) vykázali mierne zlepšenie, čo môže súvisieť s upevnením poznatkov prostredníctvom názorného a zážitkového učenia.

Celkový súčet bodov v preteste predstavoval 125 bodov, zatiaľ čo v postteste 144,5 bodu, čo znamená nárast o 19,5 bodu. Priemerné skóre na žiaka sa zvýšilo

z 8,33 bodu v preteste na 9,63 bodu v postteste, teda o 1,30 bodu.

Zlepšenie dosiahlo 13 z 15 žiakov (tabuľka 1). Výraznejší posun bol zaznamenaný najmä u žiakov s nižším vstupným skóre (napr. žiaci č. 4, 6 a 8), čo naznačuje, že bádateľsky orientované vyučovanie môže byť obzvlášť prínosné pre žiakov s nižšou úrovňou vstupných vedomostí. U dvoch žiakov nedošlo k zmene bodového zisku. V niektorých prípadoch sa v postteste objavili neúplné odpovede napriek správnym riešeniam v preteste, čo môže súvisieť s individuálnymi faktormi, ako je únava, nepozornosť alebo špecifické vzdelávacie potreby.

Tabuľka 1: Bodové hodnotenie jednotlivých žiakov v preteste aj v postteste a bodový rozdiel v testovaní

Žiak	Pretest	Posttest	Rozdiel
1	8	9,5	1,5
2	8	9	1
3	11	12	1
4	2	3	1
5	9	11	2
6	10	13	3
7	9	10	1
8	6	8	2
9	9	12	3
10	5	5	0
11	12	12	0
12	10	11	1
13	7	8	1
14	10	11	1
15	9	10	1

Zdroj: Galliková, 2025

Získané výsledky naznačujú, že bádateľsky orientované vyučovanie realizované v autentickom prostredí múzea podporuje nielen zapamätanie faktov, ale aj porozumenie ekologickým súvislostiam. Najvýraznejší posun bol zaznamenaný pri úlohách zameraných na odborné pojmy a vysvetľovanie vzťahov v ekosystéme, čo poukazuje na rozvoj vyšších kognitívnych procesov. Tento trend je v súlade so zisteniami Pedasteho a kol. [2], ktoré zdôrazňujú, že bádateľsky orientované vyučovanie podporuje aktívne vytváranie poznatkov a hlbšie spracovanie informácií. Význam autentického prostredia potvrdzuje aj výskum [5], podľa ktorého učenie mimo triedy prispieva k lepšiemu prepojeniu teórie s realitou a má pozitívny vplyv na vzťah žiakov k prírodným témam. Je však potrebné zohľadniť obmedzenia výskumu, najmä malý počet

účastníkov, čo si vyžaduje opatrnosť pri generalizácii výsledkov.

Prvá hypotéza (H1), ktorá predpokladala zvýšenie úrovne vedomostí žiakov, bola podporená porovnaním výsledkov pretestu a posttestu. Došlo k celkovému nárastu priemerného skóre a k zlepšeniu u väčšiny žiakov.

Druhá hypotéza (H2) sa týkala pozitívneho vplyvu autentického prostredia múzea na postoje žiakov k ochrane prírody. Hoci v rámci výskumu nebol použitý samostatný nástroj na systematické meranie postojov, počas realizácie edukačných aktivít sme zaznamenali pozitívne reakcie zo strany žiakov aj vyučujúcej učiteľky, ktorí uviedli, že takýto spôsob výučby v prostredí múzea považujú za zaujímavý a prínosný. Tento poznatok však má skôr orientačný charakter.

Tretia hypotéza (H3), ktorá predpokladala zvýšenie záujmu a aktivity žiakov, bola podporená pozorovaním počas realizácie vyučovania. Žiaci aktívne spolupracovali, diskutovali a zapájali sa do riešenia úloh, čo je v súlade s teoretickými východiskami bádateľsky orientovaného vyučovania.

Celkovo môžeme konštatovať, že realizovaná aktivita mala pozitívny vplyv na vedomostnú úroveň žiakov a podporila ich environmentálne uvažovanie. Napriek malej výskumnej vzorke výsledky naznačujú, že vyučovanie realizované v prostredí múzea, doplnené o príbeh a úlohy rôznej náročnosti, môže byť vhodným spôsobom environmentálneho vzdelávania.

Záver

Cieľom príspevku bolo overiť prínos bádateľsky orientovaného vyučovania realizovaného v autentickom prostredí Múzea TANAP-u pre rozvoj environmentálnej gramotnosti žiakov 5. ročníka základnej školy.

Porovnanie výsledkov pretestu a posttestu poukázalo na celkové zlepšenie vedomostnej úrovne žiakov, najmä pri úlohách vyžadujúcich porozumenie ekologickým súvislostiam a aplikáciu poznatkov. Výraznejší posun bol zaznamenaný u žiakov s nižšou vstupnou úrovňou vedomostí, čo naznačuje potenciál bádateľských metód podporovať aj menej úspešných žiakov. Realizované aktivity, spracované formou pátracie hry, zároveň podporili spoluprácu, diskusiu a aktívne zapojenie žiakov do učenia.

Výsledky naznačujú, že prepojenie bádateľských metód s prostredím múzea môže byť efektívnym spôsobom realizácie environmentálnej výchovy na

druhom stupni základnej školy. Za limit výskumu možno považovať malú výskumnú.

Napriek uvedeným obmedzeniam sa ukazuje, že múzeum ako neformálne vzdelávacie prostredie má potenciál významne podporiť rozvoj vedomostí, kritického myslenia a environmentálneho uvažovania žiakov a môže predstavovať vhodné doplnenie tradičného školského vyučovania.

PodĎakovanie

Touto cestou sa chcem úprimne poďakovať mojej školiteľke RNDr. Ramone Babosovej, PhD., za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a metodickú podporu pri spracovaní príspevku. Zároveň ďakujem pracovníkom Múzea TANAP-u za umožnenie realizácie pedagogického experimentu a za ochotu spolupracovať pri jeho realizácii.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] HRUŠKA, P.; MALÝ, T., (2020). *Fauna Tatier: Endemity a reliкty*. Košice: Pallas, ISBN 978-80-89245-79-6.
- [2] PEDASTE, M.; MÄEOTS, M.; SIIMAN, L. A.; DE JONG, T.; VAN RIESEN, S. A. N.; KAMP, E. T.; MANOLI, C. C.; ZACHARIA, Z. C. a TSOURLIDAKI, E., (2015). *Phases of inquiry-based learning: Definitions and the inquiry cycle*. Educational Research Review, vol. 14, pp. 47–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.edurev.2015.02.003>
- [3] ANDERSON, L. W.; KRATHWOHL, D. R., (2001). *A Taxonomy for Learning, Teaching, and Assessing: A Revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives*. New York: Longman, 336 s. ISBN 0-321-05656-0.
- [4] VONDRÁKOVÁ, M.; MATEJOVIČOVÁ, B.; SANDANUSOVÁ, A.; SCHLARMANNOVÁ, J.; SLOŠKOVÁ, A.; MARTINIAKOVÁ, M.; PETROVIČOVÁ, I. a JANČOVÁ, A., (2006). *Špecifická spracovania záverečných prác z biológie*. Nitra: UKF, 59 s. ISBN 80-8050-926-3.
- [5] RICKINSON, M.; MORGAN, A.; REID, A.; THOMPSON, K.; TILL, J.; MASON, C.; FISHER, A., (2004). *A Review of Research on Outdoor Learning*. Shrewsbury: National Foundation for Educational Research, 182 s. ISBN 1-85338-760-3.

Praktické využitie laserového gravírovania pri tvorbe vzoriek materiálov

Practical use of laser engraving in the creation of material samples

Jakub Gonda – Petra Kvasnová

Katedra techniky a technológií, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,
jgonda3@student.umb.sk, petra.kvasnova@umb.sk

Abstrakt

Laserové gravírovanie predstavuje modernú technológiu bezkontaktného spracovania materiálov, ktorá umožňuje vytváranie presných a trvalých označení alebo rezov na rôznych druhoch povrchov. Táto technológia sa vyznačuje vysokou presnosťou, opakovateľnosťou a možnosťou spracovania širokého spektra materiálov, ako sú drevo, plast, kov či sklo. Cieľom príspevku je oboznámiť čitateľa s princípom fungovania laserového gravírovania, ako aj prezentovať samotný proces gravírovania pri použití rôznych materiálov a zvoleného technologického postupu. Súčasťou príspevku je aj dokumentácia vytvorených vzoriek, vrátane ich vizuálneho zhodnotenia a posúdenia kvality výsledného gravírovania. Získané výsledky poukazujú na vysokú mieru presnosti, flexibility a spoľahlivosti tejto technológie. Laserové gravírovanie sa tak javí ako efektívny a univerzálny nástroj, ktorý nachádza široké uplatnenie v technickej praxi, priemyselnej výrobe aj v oblasti personalizovanej tvorby výrobkov.

Kľúčové slová: laserové gravírovanie, laserová technológia, spracovanie materiálov, gravírovanie

Abstract

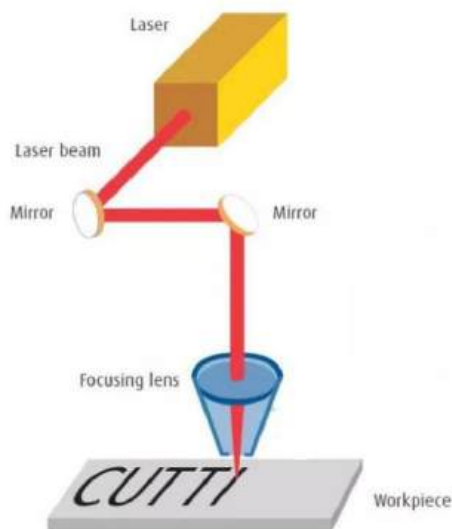
Laser engraving is a modern technology for contactless material processing that allows the creation of precise and permanent markings or cuts on various types of surfaces. This technology is characterized by high precision, repeatability, and the ability to process a wide range of materials, such as wood, plastic, metal, and glass. The aim of this article is to familiarize the reader with the principle of laser engraving and to present the engraving process itself using various materials and selected technological procedures. The article also includes documentation of the samples created, including their visual evaluation and assessment of the quality of the resulting engraving. The results obtained point to the high degree of accuracy, flexibility, and reliability of this technology. Laser engraving thus appears to be an effective and

versatile tool that finds wide application in technical practice, industrial production, and in the field of personalized product creation.

Key Words: laser engraving, laser technology, material processing, engraving

Úvod

Laserové gravírovanie je technológia, ktorá nahrádza ručné gravírovanie a používa sa najmä na vytváranie nápisov, log a ozdobných prvkov na princípe odstraňovania materiálu. Laser možno jednoducho charakterizovať ako úzky, koncentrovaný lúč svetla. V súčasnosti majú lasery nezastupiteľné miesto v priemyselnej výrobe, ale aj pri výrobe personalizovaných predmetov. [1]



Obr. 1 Princíp laserového gravírovania
Zdroj: [7]

Pri gravírovaní laserom sa vytvára popis kombinovaným úberom materiálu, tavením a odparovaním. Pritom je hustota výkonu laserového lúča taká vysoká, že sa materiál počas obrábania

natavuje a čiastočne odparuje. V materiáli vzniká prehĺbenie, tzv. gravírovanie laserom [3]. Bezdotykový, presný nástroj so sebou prináša množstvo výhod pri úbere materiálu a teda aj pri gravírovaní obrobkov. Vďaka flexibilne nastaviteľným frekvenciám pulzov a trvaniu pulzov je možné každé gravírovanie laserom úplne individuálne prispôbiť každému materiálu a akejkoľvek požadovanej kvalite [2].

Laserové gravírovanie sa považuje za:

- rýchle,
- šetrné,
- opakovateľné,
- odolné voči opotrebeniu.

Pre dosiahnutie uspokojujúcich výsledkov pri gravírovaní a rezaní laserovou gravírovačkou je nevyhnutné zvoliť si vhodný pomer medzi výkonom lasera a rýchlosťou pohybu laserovej hlavy.

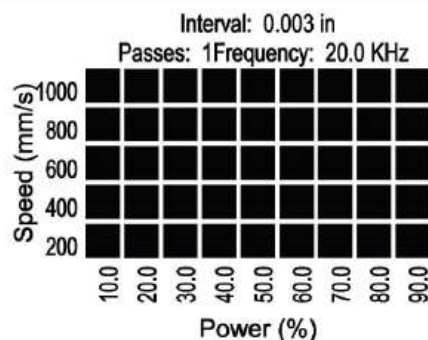
1 Systém laserového gravírovania

Mechanizmus laserového gravírovania zahŕňa laserový zdroj, optiku (ktorú tvoria väčšinou zrkadlá), riadiaci a chladiaci systém. Laser vysiela lúč ktorý je následne vedený optickým systémom, takýto koncentrovaný laserový lúč dokáže vyryť vzory do požadovaného materiálu. Počítač, pomocou ktorého laser ovládame, riadi dráhu lúča, čím zabezpečuje presnosť a rýchlosť [4].

1.1 Metodika

Experimentálna časť práce bola realizovaná na 50W CO2 laserovej gravírovačke s využitím softvéru RD Works. Cieľom bolo analyzovať vplyv vybraných parametrov laserového gravírovania a rezania na kvalitu opracovania rôznych materiálov.

Ako prvý materiál bola použitá drevená preglejka s hrúbkou 4,8 mm a akryl s hrúbkou 5,1 mm. Pred samotným spracovaním boli v programe RD Works vytvorené dve samostatné šablóny, jedna určená na gravírovanie a druhá na rezanie materiálu.



Obr. 2 Vzorka vymodelovanej šablóny na PC programe Zdroj: [5]

Pri gravírovaní boli testované rôzne kombinácie rýchlosti pohybu gravírovacej hlavy a výkonu lasera. Nastavené boli štyri rýchlosti pohybu hlavy: 200 mm/s, 150 mm/s, 100 mm/s a 50 mm/s. Súčasne boli použité štyri úrovne výkonu lasera: 15 %, 25 %, 35 % a 45 %. Cieľom bolo sledovať vplyv nastavených parametrov na intenzitu gravírovania, kontrast a hĺbku zásahu materiálu s cieľom vizualizácie jednotlivých nastavení.

Druhá šablóna bola určená na laserové rezanie. Pri rezaní boli použité nižšie rýchlosti pohybu hlavy, konkrétne 5 mm/s, 10 mm/s a 20 mm/s, pričom výkon lasera bol nastavený na hodnoty 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 90 %. Tieto parametre boli zvolené s cieľom dosiahnuť úplné prerezanie materiálu pri rôznych kombináciách nastavení.

Po realizácii jednotlivých pokusov boli vytvorené vzorky vizuálne vyhodnotené z hľadiska kvality gravírovania a čistoty rezu. Hodnotená bola najmä hĺbka gravírovania, kontrast motívu a prípadné tepelné poškodenie materiálu. Celý proces bol zdokumentovaný videozáznamom, z ktorého bol následne spravený didaktický videoprogram.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Gravírovanie preglejky

Na základe realizovaných experimentov boli vytvorené vzorky gravírovania a rezania na drevenej preglejke s hrúbkou 4,8 mm. Výsledky poukazujú na výrazný vplyv nastavených parametrov, najmä výkonu lasera a rýchlosti pohybu gravírovacej hlavy, na kvalitu výsledného opracovania materiálu.

Pri gravírovaní bolo pozorované, že so zvyšujúcim sa výkonom lasera a súčasným znižovaním rýchlosti pohybu hlavy dochádzalo k výraznejšiemu stmavnutiu gravírovanej plochy a väčšej hĺbke gravírovania. Pri najvyššej rýchlosti 200 mm/s a najnižšom výkone 15 %

bolo gravírovanie veľmi svetlé a málo výrazné, čo naznačuje nedostatočný tepelný účinok laserového lúča na materiál. Naopak, pri najnižšej rýchlosti 50 mm/s a najvyššom výkone 45 % bolo gravírovanie výrazne tmavé, čo poukazuje na vyšší tepelný účinok a hlbší zásah laserového lúča do materiálu.

Pri vyšších výkonoch a nižších rýchlostiach sa zároveň objavili známky tepelného ovplyvnenia materiálu, najmä tmavšie okraje a mierne prepálenie povrchu. Tento jav je spôsobený dlhším pôsobením laserového lúča na jedno miesto, čo vedie k intenzívnejšiemu zahrievaniu a karbonizácii dreveného materiálu.



Obr. 3 Hotová vzorka „gravírovanie“ vypracovaná na preglejke.

2.2 Rezanie preglejky

Výsledky rezania ukázali, že úspešnosť prerezania materiálu závisí najmä od kombinácie výkonu lasera a rýchlosti pohybu hlavy. Pri najvyššej rýchlosti 20 mm/s a nižších výkonoch 40 % a 50 % nedošlo k úplnému prerezaniu materiálu, čo naznačuje nedostatočný výkon laserového lúča pri danej rýchlosti. Naopak, pri nižších rýchlostiach 5 mm/s a 10 mm/s a vyšších výkonoch od 60 % do 90 % došlo k úplnému a čistému prerezaniu materiálu.

Pri vyšších výkonoch bolo možné pozorovať mierne stmavnutie okrajov rezu, ktoré je spôsobené tepelným pôsobením laserového lúča na okolitý materiál. Napriek tomu boli hrany rezu relatívne presné a čisté, čo poukazuje na vysokú presnosť laserového rezania.

Na základe výsledkov je možné konštatovať, že optimálne nastavenie parametrov gravírovania a rezania závisí od požadovanej kvality výsledku. Vyšší výkon a nižšia rýchlosť zabezpečujú výraznejšie gravírovanie a spoľahlivé rezanie, avšak môžu viesť k väčšiemu tepelnému ovplyvneniu materiálu. Naopak,

vyššia rýchlosť a nižší výkon vedú k jemnejšiemu gravírovaniu, čo môže byť užitočné pri jemných detailoch ako napríklad pri gravírovaní obrázkov do dreva, avšak nemusia byť dostatočné na prerezanie materiálu.



Obr. 4 Hotová vzorka „rezanie“ vypracovaná na preglejke.

2.3 Gravírovanie akrylu

Pri spracovaní akrylu s hrúbkou 5,1 mm sa prejavili odlišné vlastnosti materiálu v porovnaní s drevenou preglejkou. Akryl ako polymérny materiál reaguje na laserový lúč najmä tavením a následným odparovaním, čo ovplyvňuje charakter výsledného gravírovania a rezu.

Pri gravírovaní bolo pozorované, že so zvyšujúcim sa výkonom a znižujúcou sa rýchlosťou pohybu hlavy dochádzalo k výraznejšiemu matovaniu povrchu. Na rozdiel od dreva nedochádzalo k stmavnutiu materiálu, ale k jeho zmatneniu, čo je typický prejav tepelného pôsobenia lasera na akryl. Gravírované plochy boli najvýraznejšie pri nižších rýchlostiach (50 mm/s) a vyšších výkonoch (35 % a 45 %), pričom pri vyšších rýchlostiach a nižších výkonoch bolo gravírovanie menej viditeľné.



Obr. 5 Hotová vzorka „gravírovanie“ vypracovaná na akryl.

2.4 Rezanie akrylu

Pri laserovom rezaní sa preukázalo, že rozhodujúcim faktorom je kombinácia nízkej rýchlosti a dostatočne vysokého výkonu. Úplné prerezanie materiálu bolo dosiahnuté iba pri rýchlosti 5 mm/s a výkone 60 %, 70 %, 80 % a 90 %. Pri všetkých ostatných kombináciách parametrov, teda pri vyšších rýchlostiach (10 mm/s a 20 mm/s) alebo nižších výkonoch, nedošlo k úplnému prerezaniu materiálu.



Obr. 6 Hotová vzorka „rezanie“ vypracovaná na akryl

Rezné hrany pri úspešnom prerezaní vykazovali hladký a mierne lesklý povrch, čo je typické pre rezanie akrylu, kde dochádza k lokálnemu roztaveniu materiálu a následnému stuhnutiu. Pri nedostatočnom výkone alebo vyššej rýchlosti bol rez neúplný a materiál zostal čiastočne spojený.

Výsledky poukazujú, že akryl vyžaduje nižšiu rýchlosť pohybu hlavy a vyšší výkon lasera v porovnaní s drevenou preglejkou, aby došlo k úplnému prerezaniu

materiálu. Zároveň je možné konštatovať, že laserové rezanie akrylu môže poskytnúť veľmi presné a esteticky kvalitné hrany pri správne zvolených parametroch. Pri gravírovaní obrázkov do akrylu a následnou ilumináciou akrylu je možné dosiahnuť efekt hologramu.



Obr. 7 Efekt hologramu dosiahnutý ilumináciou po gravírovaní

Zdroj: [6]

Súčasťou experimentu bolo aj testovanie čitateľnosti gravírovaného textu pri rôznych veľkostiach písma. Testované boli veľkosti písma 4 body, 6 bodov a 8 bodov na drevenej preglejke a akryle.

2.5 Čitateľnosť gravírovaného textu na preglejke

Pri gravírovaní na drevenú preglejku bolo pozorované, že text s veľkosťou 4 body bol takmer nečitateľný, pričom jednotlivé znaky neboli dostatočne zreteľné. Text s veľkosťou 6 bodov bol čiastočne čitateľný, avšak kvalita gravírovania nebola optimálna a detaily znakov neboli dostatočne presné. Najlepšiu čitateľnosť poskytol text s veľkosťou 8 bodov, pri ktorom boli jednotlivé znaky jasne rozpoznateľné a gravírovanie bolo dostatočne presné.



Obr. 8 Experiment s textom na preglejke

2.6 Čitateľnosť gravírovaného textu na akryle

Pri gravírovaní na akryl boli výsledky podobné, avšak celková čitateľnosť bola mierne nižšia v porovnaní s drevenou preglejkou. Text s veľkosťou 4 body bol úplne nečitateľný. Text s veľkosťou 6 bodov bol čiastočne čitateľný, avšak jeho kvalita bola nižšia v porovnaní s rovnakou veľkosťou textu na drevenej preglejke. Najlepšiu čitateľnosť opäť poskytol text s veľkosťou 8 bodov, pri ktorom boli znaky dostatočne zreteľné a dobre rozpoznateľné.



Obr. 9 Experiment s textom na akryle

Rozdiel v čitateľnosti medzi materiálmi je spôsobený rozdielnym spôsobom interakcie laserového lúča s materiálom. Pri dreve dochádza ku karbonizácii povrchu, čo vytvára vyšší kontrast medzi gravírovanou a negravírovanou plochou. Naopak, pri akryle dochádza k zmatneniu povrchu, čo vytvára nižší kontrast a zhoršuje čitateľnosť menších detailov.

Na základe výsledkov možno konštatovať, že minimálna odporúčaná veľkosť textu pre zabezpečenie

dobrej čitateľnosti pri laserovom gravírovaní na drevenú preglejku a akryl je približne 8 bodov.

Záver

Cieľom práce bolo oboznámiť sa s princípom laserového gravírovania a rezania a analyzovať vplyv vybraných parametrov, konkrétne výkonu lasera a rýchlosti pohybu gravírovacej hlavy, na kvalitu opracovania drevenej preglejky a akrylu. Experiment bol realizovaný pomocou laserovej gravírovačky a softvéru RD Works, pričom boli vytvorené vzorky gravírovania a rezania pri rôznych kombináciách parametrov. Výsledky experimentu potvrdili, že kvalita gravírovania a rezania je výrazne ovplyvnená nastavením výkonu lasera a rýchlosti pohybu hlavy. Pri gravírovaní drevenej preglejky dochádzalo ku karbonizácii povrchu, čo zabezpečilo dobrý kontrast gravírovania, zatiaľ čo pri akryle dochádzalo k zmatneniu povrchu. Bolo zistené, že vyšší výkon a nižšia rýchlosť vedú k výraznejšiemu gravírovaniu, avšak môžu spôsobiť väčšie tepelné ovplyvnenie materiálu. Pri rezaní materiálov sa preukázalo, že pre úplné prerezanie akrylu s hrúbkou 5,1 mm je potrebné použiť nižšiu rýchlosť pohybu hlavy, konkrétne 5 mm/s, a výkon lasera minimálne 60 %. Drevená preglejka vykazovala vyššiu toleranciu voči parametrom rezania a bolo ju možné prerezávať aj pri vyšších rýchlostiach v porovnaní s akrylom. Experiment zároveň preukázal, že čitateľnosť gravírovaného textu závisí od veľkosti písma a vlastností materiálu. Najlepšia čitateľnosť bola dosiahnutá pri veľkosti textu 8 bodov, zatiaľ čo menšie veľkosti textu boli čiastočne alebo úplne nečitateľné. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že laserové gravírovanie a rezanie predstavujú presnú a efektívnu technológiu spracovania materiálov, pričom správne nastavenie parametrov je rozhodujúce pre dosiahnutie požadovanej kvality výsledku. Získané poznatky majú praktický význam pre využitie laserových technológií v oblasti výroby, označovania materiálov a vzdelávania.

Poďakovanie

Týmto by som sa chcel poďakovať mojej školiteľke Ing. Petre Kvasnovej, PhD. za všetku podporu a poskytnutú príležitosť na zúčastnenie sa na ŠVK 2026.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] Bernátek, V., (2022). VYUŽITÍ LASEROVÝCH STROJŮ PRO GRAVÍROVÁNÍ. Diplomová práca. Brno: VUT v Brne, 65 s.

- [2] TRUMPF. Gravírovanie laserom – princíp funkcie a výhody [online]. [cit. 2026-02-19]. Dostupné na: https://www.trumpf.com/sk_SK/riesenia/aplikacie/po-pis-vytvoreny-laserom/gravirovanie-laserom/
- [3] Leonardo technology SK s.r.o.. Procesy laserového značenia [online]. [cit. 2026-02-20]. Dostupné na: <https://www.lt.sk/e-learning/laser/procesy-laseroveho-znaceni>
- [4] Kirin Laser. How Does Laser Engraving Function? [online]. [cit. 2026-02-21]. Dostupné na: <https://www.kirinlaser.com/cs/how-does-laser-engraving-function/>
- [5] Thunder Laser USA. Legacy Lightburn Material Test File [online]. [cit. 2026-02-22]. Dostupné na: <https://support.thunderlaserusa.com/portal/en/kb/articles/legacy-lightburn-material-test-file>
- [6] Reddit. Diode laser for clear transparent acrylic cutting engraving (image) [online]. [cit. 2026-02-23]. Dostupné na: <https://www.reddit.com/media?url=https%3A%2F%2Fpreview.redd.it%2Fdiode-laser-for-clear-transparent-acrylic-cutting-engraving-v0-ahzs5zkn4ea1.jpg>
- [7] HARSLE. The Principle Classification And Characteristics of Laser Cutting [online]. 2024-12-20 [cit. 2026-02-27]. Dostupné na: <https://www.harsle.com/principle-classification-of-laser-cutting/>

Gamifikácia ako prostriedok podpory motivácie a angažovanosti žiakov vo vyučovaní programovania

Gamification Techniques in Programming Education

Miriam Hrdá¹ – Gabriela Lovászová³

^{1,3}Katedra informatiky, FPVaI UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹ miriam.hrda@student.ukf.sk, ³glovaszova@ukf.sk

Abstrakt

Príspevok sa zaoberá využitím gamifikačných techník vo vyučovaní programovania a ich vplyvom na motiváciu žiakov. Cieľom práce je analyzovať, ako herné prvky ovplyvňujú aktivitu, mieru zapojenia a postoje žiakov k programovaniu, ktoré býva často vnímané ako náročné pre svoj abstraktný charakter.

Teoretické východiská vychádzajú z poznatkov o motivácii, rozvoji logického a abstraktného myslenia, tvorivosti a aktivizujúcich metódach vo vyučovaní. Súčasťou výskumu je návrh a implementácia vlastného gamifikačného systému určeného pre žiakov vyšších ročníkov základnej školy a študentov strednej školy.

Systém bol aplikovaný priamo vo vyučovaní programovania, pričom bolo realizované pedagogické pozorovanie zamerané na správanie žiakov, ich reakcie na herné prvky a mieru angažovanosti. Zistenia poukazujú na potenciál gamifikácie podporiť motiváciu žiakov a pozitívnejšie postoje k učeniu sa programovania.

Kľúčové slová: programovanie, gamifikácia, motivácia, aktivizujúce metódy

Abstract

This paper focuses on the use of gamification techniques in programming education and their impact on student motivation. The aim of the study is to analyse how game elements influence students' activity, engagement, and attitudes toward programming, which is often perceived as challenging due to its abstract nature.

The theoretical background is based on research concerning motivation, logical and abstract thinking, creativity, and activating teaching methods. The study includes the design and implementation of an original gamification system intended for upper-grade elementary school pupils and secondary school students.

The system was applied directly in programming lessons. Participant observation was conducted to examine student behaviour, responses to game

elements, and levels of engagement. The findings indicate that gamification has the potential to enhance student motivation and foster a more positive approach to learning programming.

Key Words: programming, gamification, motivation, activating methods

Úvod

Informatika zohráva v súčasnom vzdelávaní významnú úlohu, keďže prispieva k rozvoju logického a kritického myslenia, tvorivosti a schopnosti riešiť problémy, ktoré sú nevyhnutné pre fungovanie v digitálnej spoločnosti. Osobitné postavenie má programovanie, ktoré rozvíja analytické uvažovanie a systematický prístup k riešeniu úloh.

Napriek tomu býva programovanie žiakmi často vnímané ako náročné a abstraktné. Potreba presnosti a obavy zo zlyhania môžu vyvolávať neistotu, či frustráciu, čo sa následne prejavuje nižšou mierou aktivity a zapojenia do vyučovania.

Z pedagogického hľadiska však programovanie poskytuje priestor na experimentovanie, tvorbu a okamžitú spätnú väzbu. Pri vhodne zvolenom prístupe sa môže stať efektívnou formou zážitkového učenia [1]. V tomto kontexte nadobúdajú význam aktivizujúce metódy a konštruktivistické prístupy, ktoré zdôrazňujú vlastnú činnosť žiaka, riešenie problémov a budovanie poznatkov na základe skúsenosti [2].

Jedným z nástrojov, ktorý môže podporiť angažovanosť žiakov, je gamifikácia. Tá využíva herné prvky a mechanizmy na zvýšenie angažovanosti, podporu pocitu kompetencie a sledovanie vlastného pokroku [3,4]. Pri jej aplikácii je však potrebné dbať na rovnováhu medzi vonkajšou a vnútornou motiváciou. Ak je dôraz nadmerne kladený na externé odmeny, môže dôjsť k oslabeniu dlhodobého záujmu o učenie [5].

Cieľom príspevku je preskúmať možnosti podpory motivácie žiakov pri výučbe programovania prostredníctvom gamifikácie a aktivizujúcich metód. Súčasťou výskumu je návrh a implementácia vlastného

gamifikačného systému, ktorého účinnosť bola sledovaná v reálnom vyučovacom procese.

1 Metodika

Príspevok sa zameriava na skúmanie motivácie žiakov pri výučbe programovania v prirodzenom edukačnom prostredí. Cieľom výskumu bolo overiť, či implementácia gamifikačných prvkov vo vyučovaní programovania môže prispieť k zvýšeniu záujmu, angažovanosti a prejavov vnútornej motivácie žiakov.

Výskum má kvalitatívny charakter a prebiehal v prirodzenom prostredí vyučovacích hodín informatiky. Pri návrhu výskumu sme vychádzali zo základných princípov pedagogicko-psychologického výskumu, najmä z požiadavky prirodzenosti prostredia, systematickosti zberu údajov a kombinácie viacerých metód [6].

1.1 Výskumný zámer

Východiskom výskumu bola identifikácia nízkej motivácie žiakov k učeniu sa programovania a potreba vytvoriť didaktické riešenie, ktoré by podporilo ich aktivitu a zapojenie do vyučovania.

Zamerali sme sa teda na sledovanie zmien v prejavoch aktivity, angažovanosti, spolupráce a prežívania žiakov počas vyučovania.

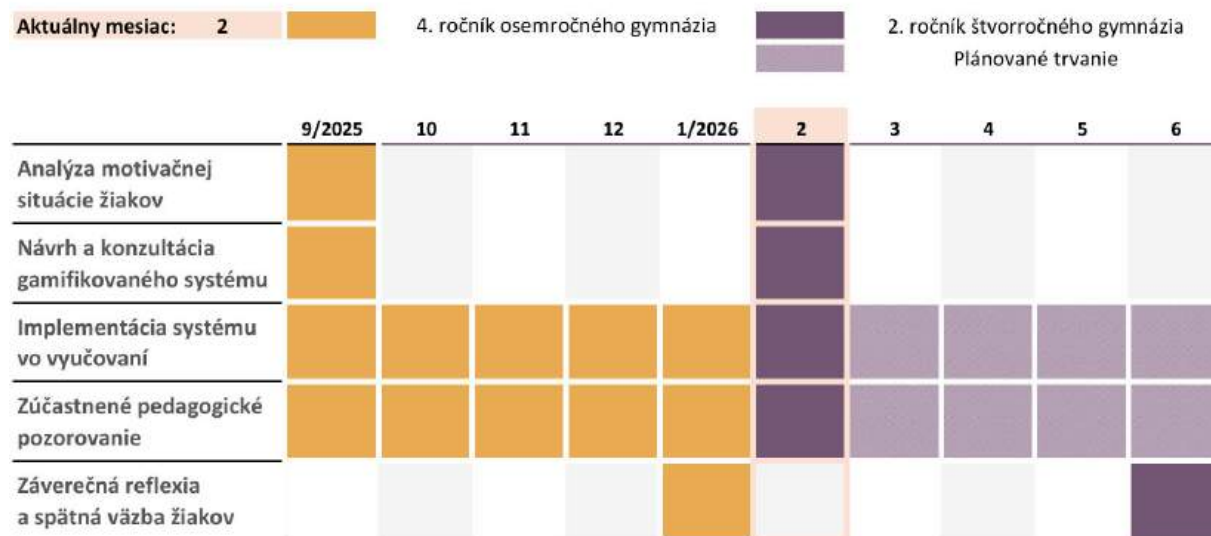
1.2 Výskumný proces

Výskumný proces prebiehal v niekoľkých etapách:

- Analýza motivačnej situácie žiakov (úvodný rozhovor).
- Návrh a konzultácia gamifikovaného systému.
- Implementácia systému vo vyučovaní.
- Zúčastnené pedagogické pozorovanie.
- Záverečná reflexia a spätná väzba žiakov.

Jednotlivé etapy výskumného procesu na seba nadväzovali a umožnili postupné overovanie navrhnutého riešenia v praxi.

Etapy výskumného procesu



Graf 1 Ganttov diagram etáp výskumného procesu

1.3 Výskumný súbor

Výskumnú vzorku tvoria žiaci 4. ročníka osemročného gymnázia a žiaci 2. ročníka štvorročného Gymnázia Janka Matúšku v Galante.

Výskum prebieha počas hodín informatiky zameraných na výučbu programovania v jazyku Python v období september 2025 – marec 2026.

V prípade mladších žiakov bola gamifikácia implementovaná v plnom rozsahu počas celého tematického celku programovania. V prípade starších žiakov je implementácia v čase spracovania príspevku stále v procese, preto sú výsledky z tejto skupiny priebežné a orientačné.

1.4 Návrh gamifikovaného systému

Gamifikovaný systém bol navrhnutý tak, aby reagoval na nízku mieru motivácie žiakov pri výučbe programovania. Jednou z možných príčin nedostatočnej motivácie žiakov môže byť tradičné transmisívne poňatie výučby, založené prevažne na pasívnom prijímaní poznatkov [1,2]. V takomto prostredí žiaci často nevnímajú praktický význam učiva a nemajú dostatočný priestor pre vlastnú iniciatívu, či prežívanie úspechu. Výskumy zároveň poukazujú na to, že programovanie môže vyvolávať negatívne emócie, ako sú neistota, úzkosť, či frustrácia, ktoré súvisia s jeho abstraktným charakterom a obavami zo zlyhania [7].

Koncept navrhovaného systému preto vychádza z teoretických poznatkov o motivácii žiakov v edukačnom procese, najmä z dôrazu na podporu **autónómie**, **kompetencie** a **sociálnej interakcie**, ktoré sú podľa **teórie sebaurčenia** [5] kľúčovými faktormi prispievajúcimi k podpore vnútornej motivácie žiakov [4,8]. **Autónómia** vyjadruje potrebu voľby a kontroly nad vlastným učením. V gamifikácii ju možno podporiť umožnením výberu úloh, tempa práce, či rôznych ciest k cieľu. **Kompetencia** súvisí s pocitom zvládania úloh a vnímaním pokroku. Gamifikované prostredie ju podporuje primeranými výzvami, jasnými cieľmi a priebežnou spätnou väzbou. **Prepojenosť**

predstavuje pocit spolupatričnosti a kvalitných vzťahov v skupine. Gamifikácia ju môže posilniť tímovou prácou, spoluprácou, spoločnými cieľmi, či rozdelením rolí.

Pri tvorbe úloh sme zároveň vychádzali aj z princípov **Bloomovej taxonómie** [9]. Aktivity boli vytvárané tak, aby rozvíjali všetky úrovne kognitívnych procesov. Od porozumenia, až po tvorbu vlastných riešení.

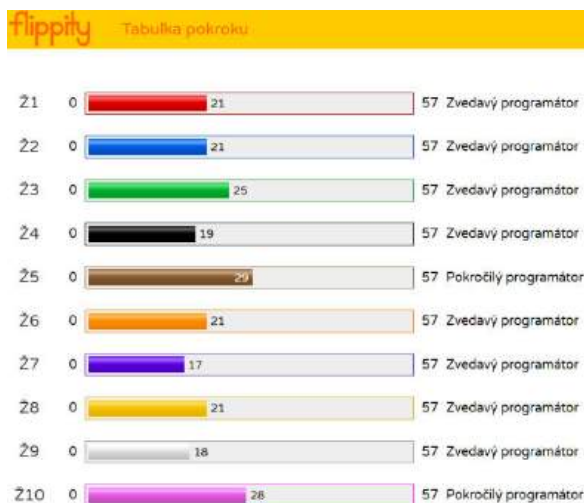
Teoretické východiská boli doplnené o poznatky získané prostredníctvom úvodných rozhovorov so žiakmi, v ktorých reflektovali svoje skúsenosti s učením sa programovania, formy práce, ktoré uprednostňujú a faktory, ktoré považujú za motivujúce alebo, naopak, demotivujúce.

Na základe týchto zistení bol vytvorený gamifikovaný systém s cieľom overiť, či takto poňaté gamifikačné prvky prispievajú k zvýšeniu motivácie žiakov.

Systém sme aplikovali počas vyučovacích hodín programovania. Systém pozostáva zo spoločného digitálneho nástroja a diferencovaných prvkov prispôbených vekovým špecifikám žiakov. Digitálny nástroj vo forme dokumentu v prostredí Google obsahuje bodové hodnotenie (Obrázok 1) a vizualizovaný graf progresu (Obrázok 2), čím umožňuje priebežné sledovanie pokroku a poskytuje prehľadnú spätnú väzbu.

Tabuľka pokroku					
Meno	Začiatok	Pokrok	Cieľ	Level	Farba
Ž1	0	21	57	Zvedavý programátor	red
Ž2	0	21	57	Zvedavý programátor	blue
Ž3	0	25	57	Zvedavý programátor	green
Ž4	0	19	57	Zvedavý programátor	black
Ž5	0	29	57	Pokročilý programátor	brown
Ž6	0	21	57	Zvedavý programátor	orange
Ž7	0	17	57	Zvedavý programátor	purple
Ž8	0	21	57	Zvedavý programátor	yellow
Ž9	0	18	57	Zvedavý programátor	white
Ž10	0	28	57	Pokročilý programátor	pink

Obrázok 1 Tabuľka pokroku



Obrázok 1 Graf pokroku

U mladších žiakov bol systém doplnený o fyzické kartičky určené na získavanie nálepiek reprezentujúcich konkrétne roly správania. Žiaci mohli získať nálepky za roly *mladý programátor*, *lovec chýb*, *čistič kódu*, *tímový hráč*, *poradca*, *ochotný zlepšovať sa* alebo *zvedavý vývojár* (Obrázok 3, Obrázok 4).



Obrázok 3 Karta s rolami



Obrázok 4 Ukážka kariet s udelenými nálepkami

Hodnotenie sa nezameriavalo výlučne na správnosť riešenia úloh, ale aj na proces učenia, snahu, aktivitu, spoluprácu a ochotu pomáhať spolužiakom. Hoci mladší žiaci nemali možnosť voľby úloh, mohli kontrolovať svoj prístup k riešeniu a aktívne prispievať k výsledku práce.

Pri starších žiakoch bol systém doplnený o súbor úloh s rôznou náročnosťou, ktoré si žiaci môžu vyberať podľa vlastného tempa a schopností. Majú možnosť rozhodovať o poradí riešenia a organizácii vlastnej práce, čím sa podporuje zodpovednosť za učenie. Gamifikačné prvky plnia predovšetkým motivačnú a orientačnú funkciu.

1.5 Metódy zberu a spracovania dát

Na získanie údajov boli využité viaceré kvalitatívne metódy, ktoré umožnili zachytiť proces učenia, prežívanie žiakov a zmeny v ich motivácii v prirodzenom edukačnom prostredí.

Počas zavedenia gamifikovaného systému bolo realizované systematické zúčastnené **pozorovanie**. Pozornosť bola zameraná na mieru aktivity a zapojenia žiakov, iniciatívu pri riešení úloh, prejavy spolupráce a vzájomnej pomoci, reakcie na spätnú väzbu a emocionálne prejavy, ako vytrvalosť, radosť z úspechu, či frustráciu.

Pozorovania boli priebežne zaznamenávané formou **pedagogických poznámok a zápiskov** počas jednotlivých vyučovacích hodín. Zaznamenávali sme celkový priebeh vyučovacej hodiny, reakcie žiakov na konkrétne gamifikačné prvky, situácie podporujúce alebo oslabujúce motiváciu a vlastnú reflexiu učiteľa,

ako výskumníka. Tieto zápisy umožnili zachytiť kontext, faktory a vývoj motivačnej situácie žiakov.

Realizované boli aj **rozhovory** so žiakmi. Úvodný rozhovor slúžil na analýzu motivačnej situácie a postoja žiakov k informatike a programovaniu. Diskusia zahŕňala otázky ako:

- Ako vnímate informatiku?
- Keď ste niekedy programovali, čo vás bavilo alebo nebavilo?
- Kedy ste sa cítili úspešne?
- Čo vás niekedy odradilo alebo frustrovalo?
- Ako najradšej pracujete, samostatne, v skupine, s pomocou učiteľa?
- Čo vás najviac motivuje pracovať?

Po návrhu gamifikovaného systému prebehol rozhovor formou konzultácie jednotlivých prvkov. Zamerali sme sa na obsahovú, motivačnú a vizuálnu stránku systému.

Záverečný rozhovor pomohol hlbšie porozumieť prežívaniu žiakov. Sústredili sme sa na motiváciu, angažovanosť a možné nevýhody gamifikácie:

- Ako ste vnímali gamifikovaný systém?
- Pomohol vám viac sa zapojiť do práce?
- Zvýšil vašu motiváciu?
- Ktoré prvky hodnotíte najefektívnejšie?
- Čo sa vám na systéme nepáčilo?

Na doplnenie kvalitatívnych údajov bol použitý krátky **dotazník** so škálovými, otvorenými otázkami a možnosťou výberu odpovedí.

Škálové otázky, pri ktorých žiaci mali vyjadriť mieru súhlasu s tvrdením:

- Systém rolí a nálepiek ma motivoval viac sa zapájať do hodiny.
- Snažil/a som sa viac, keď som mohol/mohla získať rolu alebo nálepku.
- Častejšie som pomáhal/a spolužiakom.
- Viac som sa pýtal/a, keď som niečomu nerozumel/a.
- Programovanie ma počas tohto obdobia bavilo viac ako predtým.

Žiaci mali možnosť vybrať si roly, ktoré ich najviac oslovili a vysvetliť, prečo si ich vybrali.

Záver dotazníka obsahoval otvorené otázky týkajúce sa pozitívnych skúseností s gamifikáciou a návrhov na jej vylepšenie:

- Prečo si vybral/a túto rolu?
- Čo sa ti na tomto systéme páčilo?
- Je niečo, čo by si na tomto systéme zmenil/a alebo zlepšil/a?

Súčasťou zberu údajov bola aj analýza konkrétnych výstupov: počet a typ získaných rolí, bodové

hodnotenie a progres v digitálnom nástroji, výsledky dotazníka a kvalita vypracovaných úloh. Kombinácia pozorovania, rozhovoru, dotazníka a analýzy výstupov na karte s nálepkami umožnila tzv. **metodologickú trianguláciu**, ktorá zvyšuje vierohodnosť zistení prostredníctvom porovnania údajov získaných z viacerých zdrojov [6].

Získané údaje boli spracované kombinovaným spôsobom. Najprv boli všetky odpovede manuálne prečítané a zaznamenané relevantné poznámky a kľúčové body. Takto bolo možné identifikovať opakujúce sa vzory, motivačné faktory a problémové oblasti.

Na podporu systematizácie odpovedí bol využitý nástroj **Notebook LM**, ktorý umožnil efektívne vytriediť odpovede do kategórií, identifikovať dominujúce vyjadrenia a zhrnúť často sa opakujúce postrehy žiakov [10].

Výsledkom tejto analýzy bol prehľad najčastejšie uvádzaných motivačných faktorov, identifikácia prvkov gamifikácie, ktoré žiakom najviac pomohli k angažovanosti a kategorizácia pripomienok a návrhov na zlepšenie systému.

2 Výsledky a diskusia

Údaje prezentované v tejto kapitole boli získané prostredníctvom dotazníka pozostávajúceho z položiek Likertovej škály a otvorených otázok. Položky Likertovej škály umožnili žiakom vyjadriť mieru súhlasu s jednotlivými tvrdeniami týkajúcimi sa vplyvu gamifikačného systému na ich motiváciu a správanie počas vyučovania.

Odpovede boli spracované kvantitatívne vo forme percentuálnych vyjadrení, otvorené odpovede sa analyzovali kvalitatívne prostredníctvom kategorizácie opakujúcich sa významových tém. Výsledky sú preto prezentované ako kombinácia kvantitatívnych a kvalitatívnych zistení.

Pri hodnotení tvrdení prevažovali pozitívne odpovede (73 %), zatiaľ čo negatívne odpovede tvorili 27 %.

Najvyššiu mieru súhlasu dosiahli tvrdenia týkajúce sa vyššej angažovanosti vo výučbe, zvýšenej motivácie prostredníctvom gamifikačných prvkov, väčšej ochoty pýtať sa na nejasnosti a zvýšeného záujmu o programovanie. Nižšiu mieru súhlasu zaznamenalo tvrdenie o častejšej vzájomnej pomoci medzi spolužiakmi, čo naznačuje výraznejší dopad systému na individuálnu aktivitu než na spoluprácu.



Graf 2 Miera súhlasu s tvrdeniami

Otvorené odpovede poskytli hlbší pohľad na prežívanie systému. Žiaci uvádzali, že sa počas hodín viac zapájali, častejšie sa pýtali a boli aktívnejší. Ich vyjadrenia poukazujú na vnútornú zmenu prístupu k vyučovaniu a pocit osobného uspokojenia:

- „Cítila som sa byť motivovaná k zapájaniu a vylepšovaniu.“
- „Viac ma motivoval.“
- „Bavilo ma to aj robiť, aj sa pýtať. Bol som na seba pyšný.“
- „Nenávidím informatiku, ale tento systém ma aspoň trochu motivoval snažiť sa.“

Priebežná spätná väzba a zníženie obáv zo známkovania prispeli k zníženiu stresu a väčšej otvorenosti v komunikácii:

- „Vedel som, čo robím dobre a čo zle.“
- „Nebolo hneď všetko známkované, takže sme sa nemuseli obávať, čo nám vyjde za známku.“

Aj keď kvantitatívne údaje ukázali nižšiu mieru súhlasu pri tvrdení o vzájomnej pomoci, niektoré citácie naznačujú pozitívne prežívanie tejto oblasti:

- „Pomáhala som kamarátke... bolo zaujímavé pomáhať jej s vedomím, že chcem aj nálepky.“
- „Cítila som sa dobre, keď som poradila správne.“

Individuálne rozdiely ukazujú, že gamifikácia neovplyvňuje všetkých žiakov rovnako. U žiaka s negatívnym vzťahom k predmetu sa ukázalo, že hoci priznal čiastočný motivačný efekt, jeho odpovede v Likertovej škále boli prevažne nesúhlasné. Zaujímavé však bolo, že pri tvrdení o častejšej pomoci spolužiakom uviedol úplný súhlas, čo naznačuje, že sociálny rozmer systému mal pre neho väčší význam než individuálne odmeny.

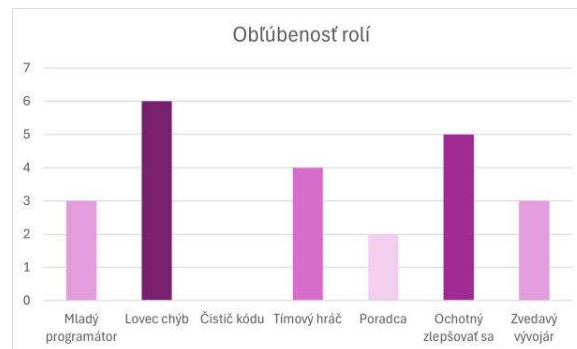
Naopak u žiačky s vysokou kompetenciou systém predstavoval len doplnok k jej existujúcej vnútornej

motivácii. Nevnímala odmeny ako motivačný prvok a nebola si istá, za čo konkrétne ich získava.

Ďalším zistením bolo, že pri otázke, ktoré roly v systéme žiakov najviac zaujali, najviac hlasov získal *Lovec chýb*. Tento výsledok môže súvisieť s tým, že žiaci prežívali radosť z odhalenia chyby v kóde alebo z pomoci spolužiakom pri oprave chýb, čo podporuje samostatné riešenie problémov a rozvoj analytických schopností.

Druhá najviac zvolená bola rola *Ochotný zlepšovať sa*, ktorá môže reflektovať motiváciu k postupnému učeniu, otvorenosť k spätnej väzbe a ochotu zdokonaľovať vlastné riešenia.

Rolu *Čistič kódu* si nikto nevybral, čo môže súvisieť s tým, že žiaci sú začiatočníci, ktorí ešte nedokážu alebo nevnímajú potrebu optimalizovať existujúci kód. Táto rola vyžaduje väčšiu skúsenosť, precíznosť a porozumenie širšiemu kontextu programu.



Graf 3 Oblíbenosť rolí

Kombinácia kvantitatívnych a kvalitatívnych zistení ukazuje, že systém podporoval individuálnu angažovanosť, motiváciu a zníženie stresu. Tieto zistenia možno interpretovať aj v kontexte teórie sebaurčenia [5], z ktorej návrh systému vychádzal. Zvýšená angažovanosť a ochota pýtať sa môže súvisieť s podporou kompetencie prostredníctvom jasných cieľov a priebežnej spätnej väzby. Zníženie stresu a pozitívne prežívanie hodnotenia môže reflektovať podporu autonómie, keďže žiaci nevnímali okamžité známkovanie ako ohrozenie. Hoci spolupráca nedosiahla najvyššiu mieru súhlasu, jednotlivé prejavy pomoci medzi spolužiakmi naznačujú potenciál rozvoja prepojenosti ako tretej základnej potreby.

U niektorých žiakov však bol účinnok systému limitovaný osobnostnými charakteristikami, úrovňou kompetencie alebo predchádzajúcim vzťahom k predmetu.

Keďže v čase spracovania príspevku prebiehala implementácia gamifikačného systému aj v skupine starších žiakov, avšak zatiaľ len v úvodnej fáze, nie sú k dispozícii dotazníkové údaje a zistenia vychádzajú výlučne zo systematického pedagogického pozorovania počas prvých vyučovacích hodín.

Pri predstavení systému žiaci reagovali prevažne rezervovane, bez výraznej emocionálnej odozvy. Ich reakcie boli skôr neutrálne, čo môže súvisieť s vekom a opatrnejším prijímaním nových prvkov vo vyučovaní. U starších žiakov sa totiž motivačné zmeny často prejavujú skôr v pracovnom správaní než v otvorenej emocionálnej reakcii. Napriek tomu sa počas samotnej práce prejavili jemné zmeny v správaní. Žiaci pôsobili sústredenejšie a prejavovali väčšiu snahu dokončiť zadania.

Výraznejší posun bol pozorovaný u žiačky, ktorá dlhodobo vykazovala nižšiu mieru spolupráce. Po zavedení systému pracovala aktívnejšie, vyhľadala pomoc a následne sama poskytla radu spolužiačke. Tento moment možno interpretovať ako náznak posilnenia sociálnej angažovanosti a otvorenosti v triede.

Keďže ide o krátke časové obdobie, nie je možné formulovať jednoznačné závery o vplyve systému na motiváciu starších žiakov. Predbežné zistenia však naznačujú, že aj pri zdržanlivej vonkajšej reakcii môže dochádzať k miernym zmenám v správaní a interakcii medzi žiakmi.

Záver

Cieľom výskumu bolo overiť, či implementácia gamifikačných prvkov vo vyučovaní programovania môže prispieť k zvýšeniu záujmu, angažovanosti a prejavov vnútornej motivácie žiakov. Výsledky výskumu poukazujú, že implementácia gamifikačných prvkov vo vyučovaní programovania môže prispieť k zvýšeniu záujmu, angažovanosti a prejavov vnútornej motivácie žiakov.

Zaradenie prvkov gamifikácie malo pozitívny vplyv nielen na celkovú aktivitu žiakov počas vyučovania, ale aj na kvalitu ich zapojenia. Zvýšený záujem o riešenie úloh sa prejavoval ochotou pracovať aj nad rámec základných požiadaviek, spontánnym skúšaním alternatívnych riešení a vytrvalosťou pri riešení náročnejších problémov.

Prejavov vnútornej motivácie sa neukázali iba v dotazníkových odpovediach, ale aj priamo počas pozorovania vyučovacích hodín. Žiaci si navzájom pomáhali bez vyzvania, diskutovali o postupoch, porovnávali riešenia a aktívne sa pýtali doplňujúce

otázky. Ich otázky často nesmerovali len k splneniu úlohy, ale k lepšiemu pochopeniu problému. V niektorých situáciách bolo možné pozorovať aj vnútorné stotožnenie sa s rolou „programátora“. Napríklad keď žiak spontánne zisťoval, či za konkrétnu aktivitu získa rolu „zvedavý vývojár“. Tento moment naznačuje, že herné prvky neboli vnímané iba ako externá odmena, ale ako súčasť samotného procesu učenia.

Vnútorňá motivácia sa prejavovala aj zvýšenou mierou sústredenosti, iniciatívou pri začínaní úloh bez potreby opakovaných inštrukcií, záujmom o spätnú väzbu a ochotou pokračovať v práci aj po splnení minimálnych požiadaviek.

Takéto prejavy poukazujú na napĺňanie potrieb autonómie, kompetencie a prepojenosti, ktoré sú, podľa teórie sebaurčenia [5], rozhodujúce pre rozvoj vnútornej motivácie žiakov.

Možno konštatovať, že implementácia gamifikačných prvkov vo vyučovaní programovania bola pre žiakov prínosná z hľadiska podpory ich motivácie, aktivity a zapojenia do učenia. Zároveň sa ukázalo, že môže prispieť k vytváraniu podmienok pre zmysluplnejšie a angažovanejšie učenie.

Podakovanie

Úprimne ďakujem mojej školiteľke doc. RNDr. Gabriele Lovászovej PhD. za odborné vedenie, cenné rady, podnetné pripomienky a trpezlivosť počas celého spracovania práce.

Moje podakovanie patrí aj žiakom, ktorí sa zapojili do výskumu a ochotne spolupracovali počas celej realizácie výskumu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MAŇÁK, J., ŠVEC, V., (2003). *Výukové metódy*. Brno: Paido. ISBN 80-7315-093-5.
- [2] KOTRBA, T., LACINA, L., (2007). *Praktické využití aktivizačních metod ve výuce*. Brno: Barrister & Principal. ISBN 978-80-87029-12-1.
- [3] DETERDING, S. a iní, (2011). From Game Design Elements to Gamefulness: Defining "Gamification". In: *Proceedings of the 15th International Academic MindTrek Conference: Envisioning Future Media Environments*. New York. Dostupné na: <https://dl.acm.org/doi/10.1145/2181037.2181040>. [prístup 2026-01-08]
- [4] BUCKLEY, P., DOYLE, E., (2014). *Gamification and Student Motivation, Interactive Learning Environments*. Írsko: University of Limerick, 14 s. Dostupné na:

- <http://dx.doi.org/10.1080/10494820.2014.964263>.
[prístup 2026-01-08]
- [5] RYAN, R. M., DECI, E. L., (2000). Self-determination theory and the facilitation of intrinsic motivation, social development, and well-being. *American Psychologist*. New York: University of Rochester, s. 68-78. Dostupné na: <https://psycnet.apa.org/doiLanding?doi=10.1037%2F0003-066X.55.1.68>. [prístup 2026-01-27]
- [6] BAČÍKOVÁ, M., JANOVSÁ, A., (2018). Základy metodológie pedagogicko-psychologického výskumu. Sprievodca pre študentov učiteľstva. Košice: ŠafárikPress. ISBN 978-80-8152-695-4.
- [7] USLU, N. A., ONAN, A., (2025). Exploring students' emotions towards programming: Analysing sentiments using concurrent conversion mixed methods. Turecko. Dostupné na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10639-025-13482-z>. [prístup 2026-02-11]
- [8] KURUC, M., (2017). Motivácia k učeniu sa a k prosociálnemu správaniu sa v kontexte teórie sebaurčenia. In: *Je potrebné žiakov do učenia sa nútiť?*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, pp. 54-60. ISBN 978-80-223-4468-5.
- [9] BLOOM, B. S., (1956). Taxonomy of Educational Objectives: The Classification of Educational Goals. Vol. Handbook I: Cognitive domain. New York: David McKay Company, 207 s.
- [10] GEORGE, R. F., (2025). Leveraging Notebook LM for Effective Qualitative Data Analysis: A Contemporary Exploration. In: *Everything Academic Online*. Dostupné na: <https://everythingacademiconline.com/2025/04/leveraging-notebook-lm-for-effective-qualitative-data-analysis-a-contemporary-exploration-2/> [prístup 2026-02-27].

Tvorba a pedagogické overenie metodologickej príručky pre učiteľov ekonomiky v prvom ročníku SŠ

Creation and pedagogical verification of a methodological manual for economics teachers in the first year of secondary school

Lucia Krellová¹ – Jarmila Hudáková²

^{1,2}Ústav ekonomiky a manažmentu, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹ lucia.krellova@student.ukf.sk, ² jhudakova@ukf.sk

Abstrakt

Publikácia sa zaoberá tvorbou a pedagogickým overením metodologickej príručky pre učiteľov ekonomiky v prvom ročníku stredných odborných škôl. V prvej časti publikácie sa sústreďujeme na teoretické východiská z oblasti moderného vyučovania, aktivizačných metód a didaktických a metodických materiálov, spracovaných na základe analýzy, interpretácie a prepájania poznatkov z odborných zdrojov. Následne článok podrobne opisuje proces tvorby príručky – od analýzy tematických plánov viacerých škôl, cez ich syntézu a vytvorenie jednotnej sústavy, až po logickú štruktúru kapitol a spracovanie jednotlivých tém s dôrazom na prehľadnosť, flexibilitu a praktickú využiteľnosť. Praktická časť zahŕňa kvalitatívny výskum zameraný na získanie spätnej väzby od deviatich učiteľov s rôznou dĺžkou pedagogickej praxe, realizovaný elektronickým dotazníkom. Výsledky poukázali na vysoký praktický prínos príručky, podporu aktivizácie a zapojenia žiakov do vyučovania, uľahčenie pedagogickej prípravy a identifikovali možnosti ďalšieho rozvoja materiálu, vrátane rozšírenia pracovných listov a aktivít.

Kľúčové slová: ekonomika, metodická príručka, moderné vyučovanie, didaktické materiály

Abstract

The publication deals with the creation and pedagogical verification of a methodological manual for economics teachers in the first year of secondary vocational schools. In the first part of the publication, we focus on theoretical foundations in the field of modern teaching, activation methods and didactic and methodological materials, processed on the basis of analysis, interpretation and linking of knowledge from professional sources. Subsequently, the article describes in detail the process of creating the manual - from the analysis of thematic plans of several schools,

through their synthesis to create a unified system, to the logical structure of the chapters and the processing of individual topics with an emphasis on clarity, flexibility and practical usability. The practical part includes qualitative research aimed at obtaining feedback from nine teachers with different lengths of teaching experience, carried out by an electronic questionnaire. The results pointed to the high practical benefit of the manual, support for the activation and involvement of students in teaching, facilitation of pedagogical training and identified possibilities for further development of the material, including the expansion of worksheets and activities.

Key Words: economics, methodological manual, modern teaching, teaching materials

Úvod

Vzdelávanie v 21. storočí prechádza dynamickými zmenami, ktoré kladú zvýšené nároky na kvalitu vyučovania i na samotných učiteľov. Od tradične orientovanej výučby založenej najmä na sprostredkovaní poznatkov sa postupne presúva pozornosť aj k rozvoju kompetencií žiakov, ich kritického myslenia, schopnosti riešiť problémy a aktívne sa zapájať do procesu učenia. Významnú úlohu v tomto kontexte zohráva aj vyučovanie ekonomiky, ktoré pripravuje žiakov na fungovanie v reálnom hospodárskom a spoločenskom prostredí.

Učitelia ekonomických predmetov sú konfrontovaní s potrebou využívať moderné, aktivizačné a didakticky premyslené metódy vyučovania tak, aby zabezpečili komplexný rozvoj žiakov. Jedným z predpokladov úspešnej implementácie týchto metód je existencia kvalitných metodických materiálov, ktoré učiteľom poskytujú oporu pri plánovaní a realizácii vyučovania. Tých je však v praxi nedostatok. Práve absencia prakticky orientovaných metodických príručiek predstavuje jednu z výziev súčasnej pedagogickej

praxe, čo odôvodňuje potrebu ich tvorby a následného pedagogického overenia.

1 Metodika

V prvej časti publikácie sa sústreďujeme na teoretické východiská moderného vyučovania, aktivizačných metód a využitia didaktických a metodických materiálov. Táto časť bola spracovaná na základe analýzy, interpretácie a syntézy poznatkov z odborných zdrojov, ktoré sa venujú pedagogickým oblastiam.

Ďalšia časť publikácie opisuje proces tvorby metodickéj príručky a jej následnú evaluáciu. Je tu popísaný postup od analýzy východiskových podkladov, cez syntézu tematických plánov až po spracovanie jednotlivých tém.

Na overenie využiteľnosti príručky bol realizovaný kvalitatívny výskum, ktorý sa zamerlal na získanie spätnej väzby od učiteľov z praxe. Výskum prebiehal prostredníctvom elektronického dotazníka s jednou zatvorenou otázkou zisťujúcou dĺžku pedagogickej praxe a deviatimi otvorenými otázkami sústredenými na skúsenosti s príručkou, jej prínos a návrhy na zlepšenie.

Respondenti boli vybraní zámerne, aby bola zabezpečená rovnomerná reprezentácia učiteľov s rôznou dĺžkou praxe. Do testovania bolo zapojených deväť učiteľov vyučujúcich predmet ekonomika v prvom ročníku stredných odborných škôl, rozdelených do troch kategórií podľa praxe: začínajúci (do 5 rokov), so strednodobou praxou (5–10 rokov) a s dlhodobou praxou (nad 10 rokov).

Metodická príručka bola učiteľom k dispozícii približne päť mesiacov, pričom spätná väzba bola zbieraná elektronicky a participácia bola neintervenčná – do vyučovania sme nevstupovali, zaznamenávali sme iba názory, skúsenosti a hodnotenia učiteľov. Vyhodnotenie spätnej väzby prebehlo prostredníctvom analýzy dokumentov a vzájomnej komparácie odpovedí, čo umožnilo identifikovať opakujúce sa názory, spoločné hodnotenia a rozdiely medzi jednotlivými kategóriami respondentov.

2 Teoretické východiská

2.1 Vyučovanie súčasnosti

Pedagogické inovácie sú charakterizované ako nové formy prístupov a interakcií medzi učiteľom a žiakom, ktoré prispievajú k efektívnejšiemu napĺňaniu cieľov vyučovania. Predstavujú metódy podporujúce nielen osvojovanie vedomostí, ale aj aktívne zapájanie žiakov,

rozvoj ich samostatného myslenia a celkové skvalitňovanie vzdelávacieho procesu [1]. Súčasťou inovatívneho vzdelávania sú aj aktivizačné metódy, ktoré možno definovať ako postupy založené na heuristickej báze, ktoré v sebe nesú výrazný motivačný potenciál pre žiakov. Tieto metódy výrazne podporujú záujem o učenie, stimulujú myslenie, prežívanie a aktívnu činnosť žiakov. Napĺňajú tak princípy uvedomelého učenia sa a prispievajú k rozvoju flexibility, kreativity a kritického myslenia [2].

Súčasnú zmeny a nové výzvy vo vzdelávaní si od učiteľov vyžadujú otvorenosť a ochotu prijímať nové prístupy. Základným predpokladom ďalšieho rozvoja školstva nie sú len inovatívne metódy, ale aj pripravenosť pedagógov neustále sa profesijne rozvíjať, či už prehľbovaním všeobecných a odborných poznatkov, alebo zdokonaľovaním didaktických zručností. Tento rozvoj môžu podporovať účasťou na vzdelávacích programoch, pravidelným samoštúdiom a zdieľaním skúseností s kolegami. Moderný a inovatívny učiteľ by mal byť informovaný nielen o aktuálnom dianí vo svojom odbore, ale aj o širších súvislostiach, ktoré ovplyvňujú vzdelávanie [3].

2.2 Didaktické a metodické materiály

Súčasťou moderného vyučovania nie sú iba aktivizačné metódy, inovatívne postupy a otvorený, profesijne sa rozvíjajúci učiteľ, ale významnú úlohu zohrávajú aj kvalitné didaktické materiály pre žiakov a metodické materiály určené na podporu práce učiteľa.

Metodickú príručku možno vnímať ako sprievodcu pre učiteľa. Predstavuje podporný materiál, ktorý pedagógovi ponúka usmernenie pri práci so žiakmi v konkrétnom predmete alebo ročníku a napomáha mu efektívne využívať učebné osnovy, učebnice a rozličné didaktické pomôcky [4]. Metodické príručky pre učiteľov by nemali byť koncipované ako striktné predpísané materiály s presne stanoveným postupom krok za krokom. Takto vysoko skriptované materiály sa v praxi ukazujú ako menej efektívne než jednoduchšie príručky, ktoré síce poskytujú jasné usmernenia, no zároveň ponechávajú učiteľovi priestor na úpravy podľa konkrétnej situácie. Pedagógovia totiž často potrebujú pôvodné návrhy prispôbovať, najmä s ohľadom na rozmanité potreby žiakov a ich aktuálnu pripravenosť. Z tohto dôvodu sa odporúča, aby metodické príručky umožňovali prirodzenú modifikovateľnosť a flexibilitu. Kvalitné metodické materiály by mali zároveň podporovať schopnosť učiteľa vnímať reakcie žiakov, porozumieť ich potrebám a na základe toho upravovať priebeh vyučovania. Ich cieľom je skvalitňovať

vzdelávací proces, poskytovať pedagógovi odbornú oporu a zároveň mu ponechávať dostatok priestoru pre vlastné pedagogické rozhodovanie a tvorivú prácu [5].

Didaktické materiály zahŕňajú rozmanité fyzické a digitálne prostriedky, ktoré učiteľ využíva na podporu vyučovacieho procesu a učenia žiakov. Patria sem napríklad prezentácie, pracovné listy, textové podklady, obrázky, videá, modely a ďalšie pomôcky. Kvalitne spracované materiály významne prispievajú k zvýšeniu názornosti učiva a k jeho lepšiemu osvojeniu. Základné zásady pri tvorbe didaktických materiálov:

- Jasný účel** – materiál má mať definovanú funkciu; napr. prezentácia podporuje výklad učiteľa a obsahuje len kľúčové slová, obrázky či schémy.
- Primeranosť** – lepšie menší počet kvalitných materiálov než veľa preplnených alebo nevhodných.
- Prehľadnosť a čitateľnosť** – materiály by mali byť logicky usporiadané a zvyrazňovať dôležité informácie.
- Zrozumiteľný jazyk** – obsah prispôsobený cieľovej skupine; jednoduché vety, bez náročnej odbornej terminológie.
- Názornosť** – využívanie obrázkov, grafov, tabuliek či schém pre lepšie pochopenie učiva.
- Zapojenie účastníka** – materiály by mali podporovať aktivitu žiakov.
- Estetika** – jednotný štýl, prehľadnosť, kvalitné obrázky, dostatok miesta na poznámky; základné grafické zásady ako vyhýbanie sa preplnenému pozadiu a nesúrodým farbám [6].

Súčasťou nami vytvorenej metodické príručky pre učiteľa ekonomických predmetov sú aj pracovné listy, ktoré patria medzi didaktické materiály a možno ich definovať ako materiály využiteľné v rôznych fázach vyučovacieho procesu – či už ako podporný prostriedok, alebo na doplnenie a aktualizáciu informácií z hlavného učebného zdroja, napríklad učebnice či učiteľovho výkladu. Pracovné listy pritom spájajú možnosti učebného textu s aktívnym zapojením žiaka, čím podporujú jeho samostatnú prácu a interakciu s obsahom učiva [7].

3 Výsledky a diskusia

3.1 Vytvorenie metodické príručky

Výsledkom našej činnosti je metodická príručka pre učiteľov ekonomiky v prvom ročníku SŠ. Pred jej samotnou tvorbou sme analyzovali tematické plány viacerých stredných odborných škôl s jednohodinovou (33 hodín) aj dvojhodinovou (66 hodín) týždennou dotáciou, aby sme získali prehľad o rozdieloch v témach

a hĺbke ich spracovania. Porovnaním sme identifikovali spoločné tematické celky a pravidelne sa opakujúce témy. Na základe tejto analýzy sme vytvorili jednotný tematický plán, ktorý slúžil ako základ štruktúry kapitol a jednotlivých tém v príručke.

Pri tvorbe metodické príručky boli stanovené ciele vychádzajúce z potrieb učiteľov ekonomiky a praktickej využiteľnosti materiálu. Hlavným cieľom bolo poskytnúť učiteľom podporu pri vyučovaní prvého ročníka, uľahčiť prípravu a realizáciu hodín a slúžiť ako inšpirácia pre výber vhodných metód a foriem práce so žiakmi. Ďalším cieľom bolo podporiť využívanie moderných vyučovacích metód a aktívne zapojenie žiakov, umožniť prácu s učivom rôznymi spôsobmi a rozvíjať tvorivosť, spoluprácu a praktické myslenie žiakov. Príručka má byť ucelená, prehľadná, čitateľná a flexibilná, s jasnou štruktúrou a jednotným spracovaním tém, aby učiteľ mohol efektívne reagovať na potreby triedy, časové možnosti a svoj pedagogický štýl.

Príručka je koncipovaná na úrovni samostatných tém, nie jednotlivých hodín, čo učiteľovi umožňuje flexibilne rozhodovať o rozsahu a hĺbke preberania podľa časových možností, potrieb žiakov či dôležitosti tém. Jedna téma tak môže byť spracovaná v rámci jednej hodiny alebo rozšírená na viac vyučovacích jednotiek. Zároveň sme zabezpečili jednotné grafické spracovanie každej témy, aby bola príručka prehľadná a ľahko použiteľná.

Každá téma v metodické príručke začína úvodnou časťou, ktorá poskytuje učiteľovi základné informácie pre prípravu a realizáciu danej hodiny. Úvod obsahuje:

- **Ciele témy** – stručne vyjadrujú, čo by mal žiak po prebratí témy vedieť a zvládnuť.
- **Odporúčané metódy výučby** – navrhované spôsoby práce s triedou, ktoré učiteľ môže využiť, pričom ich použitie nie je povinné, slúžia ako inšpirácia.
- **Didaktické zásady** – pripomínajú overené zásady, ktoré sú vhodné pri realizácii témy.

Každá téma obsahuje aj základný teoretický prehľad zameraný na podstatné pojmy a vzťahy. Tento teoretický základ umožňuje učiteľovi rýchlo sa zorientovať v problematike, pripomenúť si hlavné východiská a zvoliť vhodný spôsob ich sprostredkovania žiakom vo vyučovaní. Súčasťou každej témy sú aj prakticky orientované aktivity, ktoré žiakom umožňujú upevniť, precvičiť a prehĺbiť porozumenie učiva. Pri ich návrhu bol kladený dôraz na využívanie aktivizačných a moderných vyučovacích metód podporujúcich zapojenie žiakov do diskusie a rozvoj ich myslenia,

komunikácie, argumentácie a schopnosti vytvárať vzťahy medzi poznatkami. Aktivity neslúžia iba na opakovanie teoretických informácií, ale smerujú k rozvíjaniu komplexných zručností potrebných pre praktické uplatnenie ekonomických poznatkov.

Aktivity sú spracované jednotne, pričom každá obsahuje jasne stanovený cieľ a podrobný opis postupu realizácie, aby učiteľ vedel, aký výsledok sa očakáva a ako aktivitu uskutočniť.

Príručka obsahuje aj upozornenia a odporúčania, ktoré predstavujú praktickú oporu pri samotnej realizácii vyučovania. Ich cieľom nie je stanovovať presný postup práce, ale upozorňovať na podstatné pedagogické aspekty, na ktoré môže byť v priebehu vyučovacej hodiny ľahké zabudnúť. Ide o drobné, no z nášho pohľadu dôležité podnety, ako je povzbudzovanie žiakov, oceňovanie ich úsilia, poskytovanie spätnej väzby či vytváranie bezpečnej atmosféry, v ktorej sa žiaci neboja vyjadriť vlastný názor. Upozornenia zároveň smerujú k potrebe zapájať aj menej aktívnych žiakov, rešpektovať rozdielne tempo práce v triede a citlivo reagovať na odlišnosti v schopnostiach a vedomostiach žiakov.

Na konci každého tematického celku je zaradená reflexia určená pre učiteľa, ktorá vytvára priestor na spätné posúdenie priebehu a kvality vyučovania v danom celku. Táto časť je tvorená súborom otvorených otázok, na ktoré si učiteľ odpovedá pre vlastnú potrebu, bez nutnosti písomného zaznamenávania odpovedí.



Obrázok č.1 – QR kód s odkazom na príručku

3.2 Spätná väzba z testovania v praxi

Na základe analýzy údajov získaných z kvalitatívneho výskumu, do ktorého bolo zapojených deväť učiteľov s rozdielnou dĺžkou pedagogickej praxe, možno konštatovať, že metodická príručka bola hodnotená ako veľmi užitočný a prínosný didaktický materiál. Všetci respondenti vyjadrili pozitívne hodnotenie jej spracovania a vyzdvihli jej význam pre skvalitnenie a zefektívnenie vyučovacieho procesu.

Z odpovedí respondentov vyplynulo, že jeden z oslovených učiteľov príručku síce priamo na vyučovaní nevyužil, avšak oboznámil sa s jej obsahom a plánuje niektoré návrhy a aktivity uplatniť v budúcnosti. Ostatní respondenti uviedli, že príručku aktívne využívali na viacerých hodinách, či už v podobe celých tém, alebo výberom konkrétnych aktivít a pracovných listov. Zistenia tak potvrdzujú jej praktickú využiteľnosť priamo vo vyučovacom procese.

Ďalšou otázkou v dotazníku sme sa snažili zistiť, čo učiteľov na metodické príručke najviac zaujalo. Respondenti najčastejšie ocenili praktický charakter materiálu, prepojenie teórie s praxou a prehľadnú štruktúru tém. Všetci učители zároveň vyzdvihli rozmanité aktivity, pričom väčšina z nich osobitne ocenila aj pracovné listy ako užitočný doplnok vyučovania.

Z odpovedí respondentov – učiteľov, v ďalšej otázke, ktorá bola zameraná na reakcie žiakov, vyplynulo, že zavedenie aktivít z metodickej príručky viedlo k vyššej aktivite žiakov, väčšiemu zapájaniu sa do vyučovania a pozitívnemu hodnoteniu nových podnetov. Niektoré úlohy, najmä tie vyžadujúce kritické myslenie, boli spočiatku pre časť žiakov náročné, avšak celkovo učители hodnotili zapojenie žiakov pozitívne a potvrdili, že príručka podporila interaktivitu, motiváciu a záujem o tému.

V ďalších otázkach respondenti hodnotili, čo považujú za najprínosnejšie a aké sú slabé stránky metodickej príručky. Z odpovedí vyplynulo, že najviac ocenili aktivity prepájajúce teóriu s praxou. Zaujímavé bolo, že po prvý a zároveň jedinýkrát sa prejavili rozdiely podľa dĺžky pedagogickej praxe – učители s praxou do 5 rokov zvlášť vyzdvihli upozornenia a praktické tipy, ktoré im pomáhajú plánovať hodiny a predchádzať nedorozumeniam pri výučbe. Medzi slabšie stránky učители zaradili menšie jazykové a gramatické nedostatky, chýbajúcu časovú dotáciu pri aktivitách a potrebu diferencovania úloh podľa úrovne žiakov. Traja respondenti pritom nevnímali žiadne negatívne stránky a nič by nemenili. Hoci boli odpovede na slabé stránky a nedostatky stručné, poskytujú cenný podklad pre budúce aktualizácie a rozšírenia príručky.

Pri otázkach zameraných na návrhy na zlepšenie metodickej príručky, mali respondenti, ako skúsenejší pedagógovia, priestor poskytnúť svoje odporúčania. Cieľom bolo získať konkrétne podnety pre budúcu aktualizáciu alebo rozšírenie príručky. Učители navrhovali rozšíriť príručku o väčší počet pracovných listov, doplniť riešenia pre učiteľa v jednotlivých aktivitách, zahrnúť viac medzipredmetových prepojení

a úlohy s rôznou náročnosťou pre diferencovanú výučbu. Štyria respondenti uviedli, že by bolo vhodné rozšíriť príručku aj o ďalšie ročníky, čím by sa zabezpečila kontinuita a jednotný prístup k vyučovaniu ekonomických predmetov. Respondenti tiež uviedli, že by bolo vhodné zakomponovať viac úloh a cvičení zameraných na rozvoj finančnej gramotnosti, témy osobných financií, aktivity realizovateľné na viacerých hodinách a viac návrhov na projektové vyučovanie.

Záver

Moderné vyučovanie je čoraz aktuálnejšou témou, pričom v pedagogickom prostredí sa čoraz väčší dôraz kladie na aktivizujúce metódy, podporujúce samostatné myslenie žiakov, ich aktívne zapájanie do vyučovacieho procesu a praktické využitie nadobudnutých poznatkov. Hoci učitelia vnímajú potrebu takýchto inovatívnych prístupov, často im chýbajú konkrétne nápady alebo čas na ich implementáciu. Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metodická príručka ktorú sme vytvorili efektívne podporila prípravu a realizáciu vyučovania ekonomiky a umožnila učiteľom zakomponovať do výučby nové, moderné metódy. Poskytla konkrétne návody, materiály a podklady priamo použiteľné v pedagogickej praxi, čím prispela k zefektívneniu vyučovacieho procesu. Zároveň identifikované pripomienky a návrhy respondenti naznačujú možnosti ďalšieho rozvoja, vrátane doplnenia väčšieho množstva pracovných listov, aktivít a rozšírenia obsahového zamerania príručky.

PodĎakovanie

Rada by som vyjadrila svoju úprimnú vďaku mojej školiteľke Mgr. Jarmile Hudákovej, PhD., MBA za odborné vedenie, cenné rady a podporu. Oceňujem jej profesionálny prístup, trpezlivosť a konštruktívne usmernenie, ktoré mi významne pomohli pri spracovaní metodickej príručky a výskumu v danej oblasti.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BEKMANOVA, Z. A. (2019). Pedagogical innovations in the modern education system. *European Journal of Research and Reflection in Educational Sciences*, vol 7 (12), ISSN 2056-5852 1070 1073. Available from: <https://lnk.sk/gl126>
- [2] MAŇÁK, J., (2024). *Nárys didaktiky*. 4. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 277 str. ISBN 978-80-280-0629-7.

- [3] SIEGLOVÁ, D., (2019). *Konec školní nudy: Didaktické metody pro 21. století*. Praha: Grada, 208 s. ISBN 978-80-271-2140-5
- [4] PRUCHA, J., WALTEROVA, E., MAREŠ, J. 2003. *Pedagogický slovník*. 4., aktualizované vydanie. Praha : Portál, 2003. 322 s. ISBN 80-7178-772-8.
- [5] SMART, A. 2021. Teachers' guides: isn't that what they should be? *In IARTEM E-Journal* [online]. 2021, vol. 13, no. 1 [viewed 2026-02-01]. DOI: 10.21344/iartem.v13i1.971. ISSN: 1837-2104
- [6] BATOŠ, P., MORAVOVÁ, B. 2025. *Pedagogika a didaktika v teorii a praxi pro učitele a lektory: komplexní příručka pro DPS a kvalifikační zkoušky Instruktor odborného výcviku a Lektor dalšího vzdělávání*. [online]. Evropská akademie vzdělávání SE, 2025. ISBN 978-80-5305-133-0. [cit. 2026-01-03]. Dostupné z: <https://lnk.sk/vbvww9>
- [7] LÁSZLÓ, K.; OSVALDOVÁ, Z., (2014). *DIDAKTIKA*. Online. BELIANUM Banská Bystrica: Univerzita Mateja Bela, 162 str. ISBN 978-80-557-0690-0. Dostupné z: <https://lnk.sk/iqe4> [citované 2026-02-13].

Didaktická analýza pracovného zošita Hravá geografia 8 v kontexte zmien vo vzdelávaní

Educational analysis of the workbook Hravá geografia 8 in the context of changes in education

Patrik Ľupták¹ – Martina Škodová²

¹Katedra geografie a geológie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

² Katedra geografie a geológie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ patrik.luptak@student.umb.sk, ² martina.skodova@umb.sk

Abstrakt

Príspevok analyzuje pracovný zošit Hravá geografia 8. Analýza sa zameriava primárne na didaktickú kvalitu danej učebnej pomôcky. Cieľom príspevku je priniesť čo najkomplexnejší pohľad na úlohy v spomenutom pracovnom zošite. Skúmané boli jednotlivé aspekty učebnej knihy. Výsledky analýz sú prezentované prostredníctvom grafov, ktoré zobrazujú napríklad pomer úloh zameraných na nižšie a vyššie kognitívne procesy, divergentné a konvergentné myslenie či zaradenie prierezových tém do obsahu pracovného zošita. Celkovo boli úlohy analyzované zo siedmich hľadísk. K vizualizácii výsledkov prispieva aj SWOT analýza autora príspevku. Učebné úlohy nachádzajúce sa v pracovnom zošite sú vhodné pre tradičných učiteľov preferujúcich encyklopedický typ vzdelávania. Podľa novej verzie ŠVP, ktorá vyžaduje zmenu v pedagogickom myslení učiteľov a forme vzdelávania nemusia pracovný zošit učiteľom vyhovovať.

Kľúčové slová: pracovný zošit, Hravá geografia 8, didaktika geografie, didaktická analýza

Abstract

The article analyzes the workbook Hravá geografia 8. The analysis focuses primarily on the educational quality of the teaching aid. The aim of the article is to provide the most comprehensive view of the tasks in the aforementioned workbook. Individual aspects of the workbook were examined. The results of the analysis are presented in graphs showing, for example, the ratio of tasks focused on lower and higher cognitive processes, divergent and convergent thinking, and the inclusion of cross-curricular topics in the workbook. Overall, the tasks were analyzed from seven perspectives. The author's SWOT analysis also contributes to the visualization of the results. The

learning tasks found in the workbook are suitable for traditional teachers who prefer an encyclopedic type of education. According to the new version of the State Educational Program, which requires a change in the pedagogical thinking of teachers and the form of education, the workbook may not be suitable for teachers.

Keywords: workbook, Hravá geografia 8, geography teaching, educational analysis

Úvod

Veda a technika postupujú v 21. storočí míľovými krokmi dopredu. Napriek vedecko-technologickému pokroku však paradoxne neevoluujeme zmeny v oblasti, ktorá by mala vytvárať nových vedcov či vynálezcov. Odborníci na pedagogiku a didaktiku z Českej republiky a Slovenska [1, 2, 3] sa zhodujú na tom, že v posledných desaťročiach sa napriek úsiliu školstvo v našom geografickom priestore viditeľne nemení. Kritici tradičného vzdelávania hovoria o stagnovaní a tom, že škola pripomína skôr stredoveké univerzity ako dielne nových nápadov [3]. Napriek neustálemu pokroku v oblasti psychológie, pedagogiky či didaktiky sa nedarí prepájať teóriu kvalitného a moderného vyučovania s pedagogickou praxou na základných, stredných i vysokých školách. Zmena v obsahu a forme vzdelávania, ktorá sa aplikuje do praxe v súčasnosti, by mala reflektovať požiadavky doby, v ktorej sa žiaci učia a tiež ich pripravovať na cestu životom [4, 5].

Pri predstave, ako fungoval svet pred osemdesiatimi, tridsiatimi či desiatimi rokmi zistíme, že pokrok nielen, ale najmä, v oblasti internetu, virtuálnej reality a umelej inteligencie (AI) je rapídny [6]. Svet technológií sa mení rýchlejšie, ako sme si doteraz vedeli predstaviť. Škola musí žiakov pripravovať na budúcnosť, pretože s poznaním doterajších informácií

si žiak v budúcnosti nevystačí [7]. Sú však omnoho dôležitejšie oblasti výchovno-vzdelávacieho procesu ako informácie. Súčasný svet potrebuje tvrdé i mäkké zručnosti, rozvoj afektívnych cieľov a kontinuitu vzdelávania počas celého života. S tým, že by škola mala predstavovať inštitúciu pripravujúcu žiakov na reálny život súvisí aj využívanie poznatkov z rôznych vyučovacích predmetov počas životnej dráhy.

Zelina tvrdí, že v školách sa v 95% prípadov stretávajú žiaci s úlohami zameranými na nižšie kognitívne procesy, pričom len v minimálnej miere ide o zadania, ktoré rozvíjajú divergentné myslenie [8].

Učebné pomôcky by mali učiteľom pomôcť k tomu, aby bol dosiahnutý optimálny výsledok vzdelávania, a teda žiak, ktorý disponuje vedomosťami, zručnosťami, návykmi, postojmi či schopnosťami [1]. Škola by mala žiakov rozvíjať komplexne a v rovnováhe výchovnej a vzdelávacej zložky.

V praxi sa podľa Petláka zužuje vnímanie učebných pomôcok iba na význam v lepšom pochopení učiva žiakmi. Zabúda sa pritom na ostatné funkcie, akými sú napríklad formatívna, motivačná, inštrumentálna, či systematizujúca funkcia pomôcok a didaktickej techniky. Učebné pomôcky samy o sebe nemusia skvalitňovať vyučovací proces, rovnako spomenuté funkcie nepôsobia automaticky. Dôležité je, ako s učebnými pomôckami pracuje učiteľ. Správne využívanie učebných pomôcok však dokáže pomôcť k dosiahnutiu cieľov vzdelávania [2]. Napriek tomu učiteľ pre dosiahnutie kvalitného vzdelávania musí disponovať kvalitnými pomôckami (ani najlepší automobilový pretekár na svete by nevyhral preteky, ak by jazdil na päťdesiatročnom aute). Veľmi dôležité je, aby si učiteľ uvedomoval dôležitosť používania rôznych vhodných metód práce žiakov [2, 9]. To platí i pre učebné pomôcky. V našej práci sa zameriavame na analýzu pracovného zošita z vyučovacieho predmetu geografia. V rámci analýzy sme vybrali produkt od vydavateľstva Taktik Hravá geografia 8 [10], ktorý je bežne používaný na základných školách. Cieľom práce je poskytnúť čitateľovi čo najkomplexnejší didaktický pohľad na pracovný zošit Hravá geografia 8, posúdiť silné a slabé stránky a zhodnotiť, či by mal byť využívaný aj po zmenách v obsahu a forme vzdelávania na Slovensku.

1 Metodika

Príspevok má reagovať na trendy v oblasti vzdelávania a teóriu prepojiť s praxou skúmaním aplikácie dôležitých zložiek vyučovacieho procesu do praxe.

Vzhľadom na didaktickú podstatu článku sa príspevok zameriava primárne na analýzu učebných úloh v rámci učebnej pomôcky. V príspevku analyzujeme pracovný zošit pre 8. ročník z predmetu geografia – Hravá geografia 8 [10]. Pracovný zošit bol vybraný zámerné spomedzi ponuky učebných kníh z vyučovacieho predmetu geografia. Dôvodom bolo najmä vydavateľstvo, ktoré má tradíciu v oblasti učebných pomôcok.

Príspevok má na základe čo najkomplexnejšieho didaktického pohľadu na jednotlivé zadania v pracovnom zošite posúdiť didaktickú kvalitu učebnej pomôcky. V rámci analýzy boli použité kvalitatívne metódy analýzy obsahu pracovného zošita s kvantifikovaním výsledkov. Pracovný zošit Hravá geografia 8 má celkovo 240 úloh, zadania boli analyzované jednotlivo. Príspevok skúma, do akej miery dokážu úlohy rozvíjať vyššie kognitívne procesy, zručnosti či divergentné myslenie.

Rovnako sa zameriava aj na oblasť prierezových tém (gramotností) [11] a myšlienkové operácie pri vypracovávaní zadaní. Analýzu a kategorizáciu realizoval autor príspevku.

V prvom kroku analyzujeme percentuálne rozloženie úloh zameraných na kognitívnu a afektívnu zložku osobnosti žiaka. Analýza kognitívnych úloh skúma úroveň kognitívnych procesov. Pri tomto kroku bola využitá revidovaná taxonómia B. Blooma [12]. Z dôvodu prehľadnosti a zrozumiteľnejšieho prezentovania výsledkov sme napokon rozdelili úlohy do dvoch kategórií – zadania zamerané na nižšie kognitívne procesy a zadania zamerané na vyššie kognitívne procesy. Za nižšie kognitívne procesy považujeme zapamätanie a porozumenie. Vyššie kognitívne procesy sú: aplikácia, analýza, hodnotenie a tvorivosť. Úlohy boli zaradované do kategórií podľa kognitívnej náročnosti, ktorú čiastočne vyjadrujú slovesá v jednotlivých zadaniach. V prípade nejasnej kategorizácie prebiehala opakovaná analýza.

Nasledovala analýza úloh z pohľadu rozvoja mäkkých a tvrdých zručností. Za tvrdé zručnosti sme považovali v kontexte konkrétneho pracovného zošita zručnosti súvisiace s odborom geovied. Vychádzame z britského kurikula, ktoré zaraduje medzi geografické zručnosti napr. mapové zručnosti, interpretácia geografických grafov a tabuliek, GIS gramotnosť, terénne geografické zručnosti [13]. Medzi mäkké zručnosti zaradujeme

sociálne zručnosti, ktoré sú potrebné pre život, akými sú napr. komunikácia, vedenie tímu, time-manažment či stresový manažment či riešenie problémov [14]. Je pravdepodobné, že v 21. storočí sú (prípadne ešte len budú) potrebnejšie mäkké zručnosti – soft skills, čím nechceme znevažovať ani podceňovať dôležitosť odbornosti, vedomostí či tvrdých zručností. V príspevku skúmame, či sa v pracovnom zošite nachádza viac úloh na rozvoj tvrdých zručností, alebo mäkkých zručností.

Za dôležitý považujeme rozvoj divergentného myslenia, preto sme sa v analýze zamerali aj na to, aká je frekvencia úloh, ktoré potenciálne vyžadujú od žiakov využitie divergentného myslenia. Do kategórie úloh, ktoré rozvíjajú divergentné myslenie, sme zaraďovali zadania, ktoré nemali striktné dané jediné správne riešenie, pri plnom rešpektovaní významu pojmu divergentné myslenie. Analýza mala za úlohu potvrdiť, či vyvrátiť tvrdenie Zelinu [8] o minimálnom rozvoji divergentného myslenia u žiakov.

Tollingerová rozdelila učebné úlohy do piatich kategórií – úlohy vyžadujúce pamäťovú reprodukciu poznatkov, úlohy vyžadujúce jednoduché myšlienkové operácie s poznatkami, úlohy vyžadujúce zložité myšlienkové operácie s poznatkami, úlohy vyžadujúce odovzdávanie poznatkov, úlohy vyžadujúce tvorivé myslenie [15]. V našom príspevku zjednodušujeme klasifikáciu na tri úrovne – úroveň reprodukcie informácií, úroveň myšlienkových operácií, úroveň tvorivých operácií. V rámci analýzy zaraďujeme úlohy do jednotlivých kategórií.

Neodmysliteľnou súčasťou vyučovacieho procesu by mali byť i prierezové témy (podľa najnovšej verzie ŠVP prierezové gramotnosti), preto skúmame aj to, či sa v úlohách nachádza spojitost' s prierezovými témami, ktoré sú definované v iŠVP pre ISCED 2 [11]. Do kategórie úloh s prierezovou témou sa zaraďovali aj zadania, ktoré sa týkali prierezových tém len implicitne a pri vhodnej práci učiteľa majú potenciál pre plnohodnotnú realizáciu vyučovania prierezovej tematiky.

V závere analýzy jednotlivých zadaní posudzujeme štyri kategórie zadaní úloh – 1. zadania s uzavretou odpoveďou a/alebo jednoduchou odpoveďou, 2. otvorené zadania, 3. praktické a/alebo problémové zadania, 4. zadania s prvkom hry. Ak sa vyskytli úlohy, ktoré sa dali zaradiť do viacerých kategórií, zaradili sme

zadanie do vyššej úrovne kategorizácie. Kategorizácia bola vytvorená autorom príspevku pre účely analýzy učebných úloh. Úlohy s uzavretou odpoveďou sú časovo najmenej náročné, častokrát nie sú pre žiakov atraktívne a je pravdepodobné, že sú zamerané na nižšie kognitívne procesy. Pri otvorených otázkach potrebuje žiak na vypracovanie väčší priestor, zapojenie určitej miery schopnosti formulovať odpoveď, čím sa rozvíja a kultivuje jazyk, približuje sa tým žiak každodenným situáciám, v ktorých je potrebné zosumarizovať poznatky do myšlienky. Praktické zadania sú prepojené so životnými situáciami, ktoré sa dejú v bežnom živote a dokážu žiakovi pomôcť v každodenných situáciách. Zadania s prvkom hry by mali mať potenciál k zábavnejšiemu vyučovaniu s elementami motivácie, čím v súlade s neurodidaktikou, možno dosahovať vyučovacie ciele efektívnejšie [2, 3, 16].

Pre vyhodnotenie výsledkov analýz a ich interpretáciu bol využitý program Microsoft Excel. Výsledky sú prezentované grafmi.

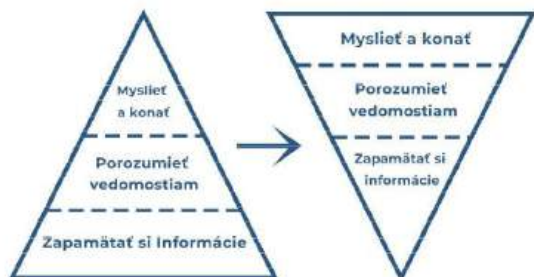
K zvýšeniu komplexnosti vizualizácie analýzy by mala prispieť záverečná SWOT analýza pracovného zošita Hravá geografia 8. Ide o syntetizáciu pohľadu na danú učebnú pomôcku. Pri hodnotení silných stránok, slabých stránok, príležitostí a ohrození sme sa zamerali nielen na jednotlivé úlohy, ale i marketingovú stránku pracovného zošita. SWOT analýza je subjektívnym vnímaním autora a má za účel nielen vizualizovať výsledky, ale aj vyvolať diskusiu o problematike didaktickej kvality pracovných zošitov. Vizualizácia SWOT analýzy bola tvorená v programe Canva.

2 Výsledky a diskusia

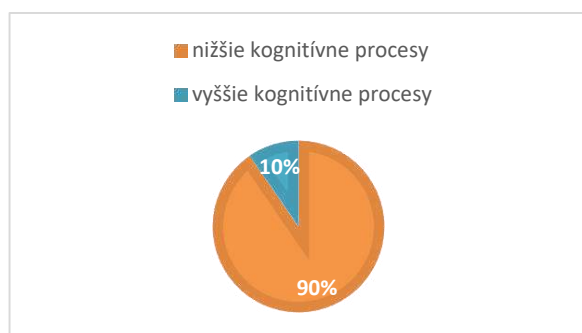
Pracovný zošit Hravá geografia 8 je v súlade s iŠVP [17] a obsahuje úlohy, ktoré sú súčasťou obsahového a výkonového štandardu pre 8. ročník základných škôl. V pracovnom zošite sa nachádzajú výlučne úlohy zamerané na kognitívne ciele. Počas analýzy sme nenašli zadania, ktoré by boli zamerané na rozvoj postojov či názorov žiakov. Úlohy sú zamerané na obsah geografického vzdelávania.

Vykonaná analýza potvrdzuje potrebu zmien v obsahu a forme vzdelávania, ktorá je vyjadrená v najnovšej verzii ŠVP „obrátenej kurikulum“ (obrázok 1), ktoré vyjadruje zmenu z doterajšieho ťažiska vo forme zapamätania si vedomostí na ťažisko v podobe

myslenia a konania žiakov. V našej analýze sme zistili, že pracovný zošit Hravá geografia 8 má ťažisko práve v nižších kognitívnych procesoch – zapamätanie, prípadne porozumenie informáciám, čo možno sledovať v rámci grafu 1.



Obr. 1 Obrátané kurikulum
Zdroj: [4]

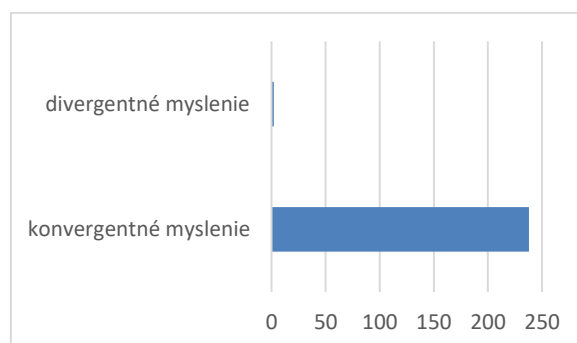


Graf 1 Výsledky analýzy úloh z hľadiska nižších a vyšších kognitívnych procesov

V rámci analýzy rozvoja zručností v pracovnom zošite Hravá geografia 8 sme zistili, že pracovný zošit rozvíja tvrdé zručnosti spojené s vyučovacím predmetom geografia, a to v pomerne vysokej miere. Na tvrdé zručnosti sa zameriava 19,5 % úloh. Mäkké zručnosti sa nerozvíjajú.

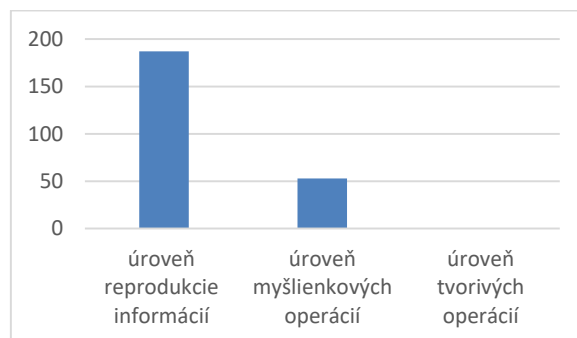
Zelina [6] tvrdí, že v škole prevládajú otázky zamerané na konvergentné myslenie – v miere 95 %. V rámci našej analýzy potvrdzujeme, že aj v pracovnom zošite Hravá geografia 8 prevládajú úlohy, ktoré vyžadujú konvergentné myslenie. Divergentné myslenie žiaci môžu využiť iba v 1 % úloh, čo je znázornené v grafe 2. Za úlohu zameranú na divergentné myslenie sme vybrali zadanie č. 7 zo str. 15, ktoré znie: „Začleň správne rieku v blízkosti tvojej školy. Rieka – Povodie - Úmorie“. Pri tejto úlohe si môžu žiaci teoreticky

v niektorých prípadoch v praxi vybrať rôzne rieky a mali by uvažovať nad viacerými alternatívami. Rovnako sme do tejto kategórie zaradili úlohu zo str. 35 č. 13: „Uved turisticky vyhľadávané oblasti Slovenska. Pohorie – jaskyňa – rieka – vodopád – vodná plocha – kúpele – historická pamiatka – skanzen.“ Úloha bola vybratá do kategórie divergentného myslenia z dôvodu možnosti rôzneho pohľadu na riešenie zadania. Žiakov zväzda k zvažovaniu viacerých možností a vyberaniu spomedzi alternatív. Ostatné úlohy v pracovnom zošite nemali náznak možnosti zapojenia divergentného myslenia.



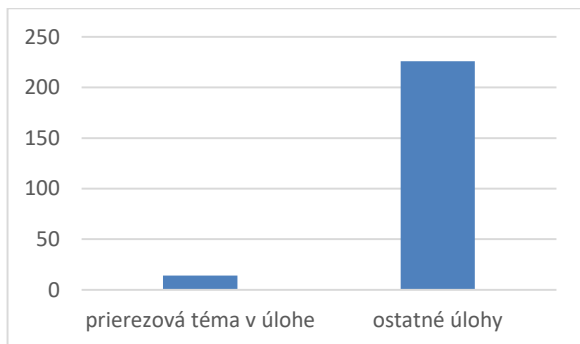
Graf 2 Rozdelenie úloh v pracovnom zošite Hravá geografia 8 podľa zapojenia myslenia žiakov. Zvislá os reprezentuje počet úloh.

V rámci analýzy učebných zadaní z pohľadu zjednodušenej taxonómie úloh podľa Tollingerová [15] sme zistili, že väčšina úloh je zameraná na reprodukciu informácií. Úroveň myšlienkových operácií, či už jednoduchých, alebo zložitých bola iba v 22 % analyzovaných zadaní. Najvyššie úrovne sa v pracovnom zošite Hravá geografia neobjavili. Výsledky sú prezentované v grafe 3.



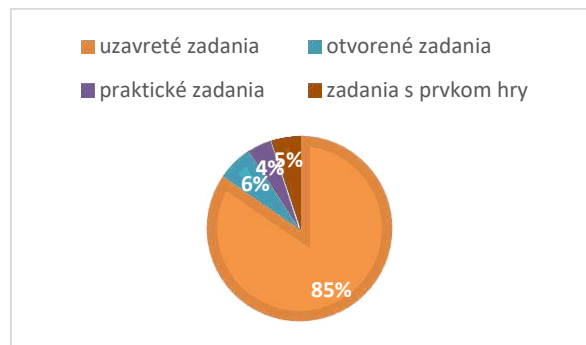
Graf 3 Zadaní v pracovnom zošite Hravá geografia 8 z pohľadu zjednodušenej taxonómie učebných úloh. Zvislá os reprezentuje počet úloh.

Podľa iŠVP sú prierezové témy multikultúrna výchova, mediálna výchova, osobnostný a sociálny rozvoj, environmentálna výchova, dopravná výchova – výchova k bezpečnosti, ochrana života a zdravia, tvorba projektu a prezentačné zručnosti. Je na rozhodnutí každej školy, akým spôsobom realizuje vyučovanie v tejto podstatnej oblasti vyučovacieho procesu [11]. Ak sa učitelia snažia integrovať do aprobačného predmetu prierezové témy, pracovný zošit Hravá geografia 8 im pomôže len minimálne. V analyzovanej učebnej pomôcke sa nachádza iba 6 % úloh (graf 4), ktoré súvisia s prierezovými tematikami. Najmä environmentálna výchova a multikultúrna výchova, avšak tieto úlohy sú spojené primárne s kognitívnou zložkou osobnosti. Učitelia však vhodným využívaním pracovného zošita dokážu prepojiť zadania s výchovnými či postojoyými cieľmi vyučovania.



Graf 4 Frekvencia prierezových tém v úlohách v pracovnom zošite Hravá geografia 8. Zvislá os reprezentuje počet úloh.

Skúmané boli aj úlohy z pohľadu typológie zadania. Kategorizácia prebehla do štyroch kategórií. Zadania s vyžadovaním uzatvorených odpovedí (napr. výber z možností, jednoslovná odpoveď, priradovanie) sú v analyzovanom pracovnom zošite najpočetnejšie. Otvorené zadania s potrebou uviesť rozvinutú odpoveď výrazne zaostávajú. Didakticky kvalitnejšie praktické zadania – zadania „pre život“ sa vyskytujú v minimálnej miere, aj napriek tomu sa našli ocenenia hodné úlohy akou je napr. č. 7 na strane 21. Zadania, ktoré niesli prvky hry sa v užšom zmysle slova nevyskytovali častokrát, do tejto kategórie sme zaradili aj tajničky či osemsmierky. Výsledky sú prezentované grafom 5.



Graf 5 Pomer typov úloh v pracovnom zošite Hravá geografia 8.

V závere je potrebné spomenúť možné limity výsledkov príspevku, najmä z dôvodu individuálneho posúdenia učebných úloh v pracovnom zošite. Pre prezentovanie pohľadu na pracovný zošit sme vytvorili komplexnú SWOT analýzu pracovného zošita Hravá geografia 8. SWOT analýza odráža subjektívne vnímanie učebnej pomôcky z pohľadu autora príspevku. Medzi silné stránky zaraďujeme najmä tradičné vydavateľstvo a cenu produktu, rovnako aj súlad s iŠVP a možnú atraktivitu pre tradičných encyklopedických učiteľov. Naopak medzi slabé stránky sme zaradili veľmi nízke až nulové hodnoty početnosti úloh na rozvoj tvorivosti, divergentného myslenia či zadaní zameraných na afektívnu zložku osobnosti. Medzi príležitosti môžeme zaradiť odstránenie slabých stránok. Najväčším ohrozením je nepoužiteľnosť pracovného zošita po aplikácii novej verzie ŠVP do edukačnej praxe, najmä z dôvodu zmien vo forme vzdelávania. SWOT analýza slúži na účel možnej diskusie a je prezentovaná v obrázku 2.



Obr. 2 SWOT analýza pracovného zošita Hravá geografia 8

Záver

V príspevku sme predstavili analýzu úloh v pracovnom zošite Hravá geografia 8 z didaktického hľadiska. Zistili sme, že učebná pomôcka obsahuje úlohy, ktoré sú zamerané najmä na nižšie kognitívne procesy. Vďaka analýze sme zistili, že priestor pre rozvoj či využívanie divergentného myslenia sa objavuje v analyzovanom pracovnom zošite len minimálne.

Pracovný zošit Hravá geografia 8 obsahuje úlohy, ktoré súvisia s prierezovými témami, avšak nie sú prítomné zadania, ktoré by vyžadovali od žiakov vyjadrenie postoja k témam pracovného zošita. Analýza ukázala, že vo vybranom produkte od vydavateľstva Taktik sa nenachádzajú úlohy zamerané na afektívnu zložku osobnosti. V kontexte zmien obsahu a najmä foriem vzdelávania na Slovensku nie je plne vhodný na využívanie v pedagogickej praxi po aplikácii zmien vo vzdelávaní do praxe. Na základe zistení prezentovaných v príspevku odporúčame autorom učebníc, pracovných zošitov a učebných kníh zamerať sa v budúcej publikačnej činnosti nielen na kognitívnu zložku vyučovania. Považujeme za dôležité zvýšiť počet úloh, ktoré sa týkajú osobnosti žiaka – zadania, ktoré vyžadujú vyjadrenie postojov či hľadanie kreatívnych a tvorivých riešení sú v súlade s didaktickou zásadou prepojenia teórie s praxou, a to nielen v rámci hraníc vyučovacieho predmetu.

Rovnako odporúčame autorom pracovať s témou prierezových gramotností po zmene v obsahu a forme vzdelávania. V médiách, ale i na oficiálnych stránkach inštitúcií sa táto zmena nazýva „kurikulárna reforma“ [18, 19], nepovažujeme to za správne pomenovanie, pretože „kurikulárna reforma“ môže zväzdať iba k vnímaniu zmien v obsahu a tým zanedbávať skryté kurikulum. Dôležitá je i forma vzdelávania, ktorá má byť praktická, aktivizujúca a zameraná na charakter, metakogníciu a celkový osobnostný rozvoj žiakov [4]. Preto odporúčame autorom učebných textov a pracovných zošitov, aby vnímali a prijali zmeny v pedagogickom myslení a aplikovali ich do praxe v podobe zamerania sa na spomenuté oblasti vo svojich učebných pomôckach v súlade s úlohami školy pre 21. storočie [1, 20]. Príklad návrhu dvojstránky pracovného zošita z geografie Slovenska ponúkame v prílohe 1 a 2. Inšpiráciou pre autorov učebných kníh a pracovných zošitov by mohli byť práce R. Čapeka, ktorý v českom vydavateľstve Taktik vydal sériu Občanka pre ročníky 6, 7, 8, 9. Český popularizátor nových trendov v oblasti pedagogiky a obzvlášť didaktiky pripravuje

v rovnakom duchu aj učebné knihy pre predmet geografia [21].

Náš príspevok by mohol byť inšpiráciou, prípadne základom, pre komplexnú komparáciu pracovných zošitov z predmetu geografia v rámci Slovenska, prípadne v medzinárodnom kontexte.

Poďakovanie

Ďakujem školiteľke RNDr. Martine Škodovej, PhD. za cenné tipy a rady pri písaní príspevku.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] TUREK, I., (2008). Didaktika. 3. vydanie. Bratislava: Wolters Kluwer, 2014. 620 s. ISBN 978-80-7168-004-5
- [2] PETLÁK, E., (2025). Didaktika : Teória a prax vo vzdelávaní. Bratislava : Wolters Kluwer, 2015, 512 s. ISBN 978-80-571-0792-7.
- [3] ČAPEK, R., (2020). Uč jako umělec [mp3]. Brno: Jan Melvil Publishing, 2020.
- [4] Ministerstvo školstva, vedy, výskumu a športu, (2023). Štátny vzdelávací program pre základné vzdelávanie. 2023. 725 s. Dostupné na internete: https://www.minedu.sk/data/files/11808_statny-vzdelavaci-program-pre-zakladne-vzdelavanie-cely.pdf [cit. 2026-02-12]
- [5] ŠKODOVÁ, M., MADLEŇÁK, T., MIHOKOVÁ, M (2025). Critical spots and misconceptions in students' understanding of problems and challenges in Europe. European Journal of Geography. In: European Journal of Geography, roč. 16, č. 2, s. 406–418. ISSN 1792-1341. DOI:10.48088/ejg.m.sko.16.2.406.418.
- [6] ŠKODOVÁ, M., HOLLÝ, M. (2026). Potential of mobile virtual reality as a tool for supporting students' motivation in school geography. In: International Research in Geographical and Environmental Education. Abingdon : Taylor & Francis Group, roč. 35, č. 1, s. 123–137. ISSN 1038-2046. DOI: <https://doi.org/10.1080/10382046.2024.2416303>
- [7] Národný inštitút vzdelávania a mládeže. *Vízia zmien v základnom vzdelávaní – Štefan Porubský*. In: YouTube, 20. 01. 2026. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=2T0jwAajdXE>. [cit. 2026-02-12].

- [8] ZELINA, M., (1996). – Stratégie a metódy rozvoja osobnosti dieťaťa. 3. vydanie, 2011. Bratislava : IRIS, 241 s. ISBN 978-80-892-5660-0
- [9] ČAPEK, R., (2015). Moderní didaktika : Lexikon výukových a hodnotících metod. Praha: Grada, 2015. 604 s. ISBN 978-80-247-3450-7
- [10] FARÁRIK, P. a kol., (2020). Hravá geografia 8. Košice : Taktik, 2020, 60 s. ISBN 978-80-8180-078-8
- [11] Štátny pedagogický ústav. (2015). Štátny vzdelávací program pre 2. stupeň základnej školy v Slovenskej republike : ISCED 2 – nižšie sekundárne vzdelávanie. 37 s. Dostupné z: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/statny-vzdelavaci-program/isced2_spu_uprava.pdf [cit. 2026-02-12]
- [12] ANDERSON, L., KRATHWOHL, D. a kol. (2001). A Taxonomy for Learning, Teaching, and Assessing : A Revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives. New York : Longman. 302 s. ISBN 0-8013-1903-X.
- [13] Geography National Curriculum (2016). Geographical skills in the National Curriculum and GCSE and A level examination specifications (in 2016). 4 s. Dostupné z: https://geography.org.uk/wp-content/uploads/2023/05/ITE_Geographical_skills_in_the_NC_GCSE_A_level.pdf [cit. 2026-02-18]
- [14] ALEX, K., (2009). Soft skills. 3. vydanie. New Delhi : Vikas Publishing House, 2019. 224 s. ISBN 978-81-219-3192-2
- [15] TOLLINGEROVÁ, D. a kol. (1986) K teorii učebních činností. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 235 s.
- [16] ČAPEK, R., (2019). Líný učitel : Jak učit dobře a efektivně. Praha: Raabe, 2019. 140 s. ISBN 978-80-7496-344-5
- [17] Štátny pedagogický ústav. (2015) Geografia – nižšie stredné vzdelávanie. 23 s. Dostupné z: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/geografia_nsv_2014.pdf [cit. 2026-02-18]
- [18] TASR. (2025). *Drucker: Kľúčovou zmenou bude kurikulárna reforma*. 29.12.2025. Dostupné z: <https://www.teraz.sk/slovensko/drucker-klucovou-zmenou-bude-kurikul/930075-clanok.html> [cit. 2026-02-18]
- [19] MINEDU. *Kurikulárna reforma*. Dostupné z: <https://www.minedu.sk/41529-sk/kurikularna-reforma/> [cit. 2026-02-18]
- [20] ĽUPTÁK, P. (2025). *Nové trendy v lokalizácii významných športových podujatí*. Bakalárska práca. Banská Bystrica : FPV v Banskej Bystrici, 66 s.
- [21] ČAPEK, R. (2025) Líný učitel v roce 2026. Blogový príspevok. 26.12.2025 Dostupné z: <https://robertcapek.cz/liny-ucitel-v-roce-2026/> [cit. 2026-02-19]

Manažér futbalového klubu

Predstav si, že si manažerom FK Slovan Bratislava. Slovan má najbližšie sponzorské zmluvy s nasledujúcimi tímami: Dukla Banská Bystrica, FC Košice, Dajem Mníchov, AS Rím. Tvojou úlohou je vybrať si spôsob dopravy, ale aj napísať odôvodnenie s plusmi a mínusmi vybraného dopravného prostriedku. Zohľadňuj ekonomický, ekologický, marketingový a aj športový kontext zvolenej dopravy.



SÚPER	DOPRAVNÝ PROSTRIEDOK	ODŮVODNENIE	PLUSY	MÍNUSY



Sem si môžete zapísať poznámky, ktoré si považujete za najdôležitejšie.

Príloha 1 Návrh dvojstránky pre pracovný zošit z geografie Slovenska

Michalov projekt



Michal sa rozhodol, že spraví projekt o pohľade obyvateľov na svoj štát. Ozval sa mu Oliver z Austrálie a Mohamed zo Sýrie.

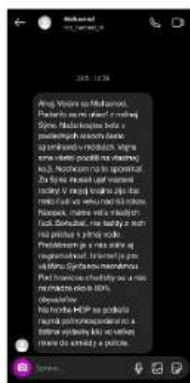
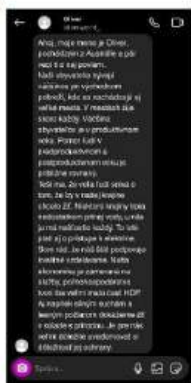
- 1.) Prečítaj si, aké správy prišli Michalovi.
- 2.) Aké sú hlavné rozdiely v správach? (zohľadňuj aj štýlistiku)
- 3.) Vyber si z textov jednu myšlienku a odpovedaj na otázky.
- 4.) Skús napísať podobnú správu o Slovensku.

Vyber jednu myšlienku, ktorá ťa zaujala

Prečo si si vybral túto myšlienku?

Čo ťa táto myšlienka najviac zaujala?

Aké otázky vyvolala táto myšlienka?



Príloha 2 Návrh dvojstránky pre pracovný zošit z geografie Slovenska

Inteligentný skleník s BBC micro:bit

Intelligent Greenhouse with BBC micro:bit

Janka Motešická¹ – Martin Cápaj²

^{1,2}Katedra informatiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹janka.motesicka@student.ukf.sk, ²mcapaj@ukf.sk

Abstrakt

Príspevok opisuje návrh, realizáciu a overenie kompaktného prototypu inteligentného skleníka na platforme BBC micro:bit ako didaktickej pomôcky pre STEM vzdelávanie. Systém zabezpečuje monitoring a automatizované riadenie mikroklimy prostredníctvom lokálneho rádiového prenosu a cloudového Wi-Fi riešenia cez ThingSpeak. Experimentálne dáta potvrdili vysokú stabilitu vnútorného prostredia, pričom relatívna vlhkosť bola v priemere o viac než 40 percentuálnych bodov vyššia ako vonku ($p < 0,001$) a systém tlmiť teplotné výkyvy z 1 °C na približne 0,1 °C. Výsledky potvrdzujú technickú spoľahlivosť riešenia aj jeho didaktický potenciál pre prepojenie biológie, informatiky a dátovej analýzy. Súčasťou práce je aj interaktívna aplikácia a metodická videodokumentácia podporujúce implementáciu modelu v pedagogickej praxi.

Kľúčové slová: BBC micro:bit, IoT, STEM vzdelávanie.

Abstract

This paper describes the design, implementation, and validation of a compact smart greenhouse prototype built on the BBC micro:bit platform as a didactic tool for STEM education. The system provides environmental monitoring and automated microclimate control via two communication approaches: local radio transmission and a cloud-based Wi-Fi solution using ThingSpeak. Experimental data confirmed high stability of the internal environment, with relative humidity averaging more than 40 percentage points above outdoor levels ($p < 0.001$), while the system attenuated external temperature fluctuations from 1 °C to approximately 0.1 °C. The results validate both the technical reliability of the proposed IoT solution and its didactic potential for interdisciplinary integration of biology, computer science, and data analysis. The work also includes an interactive application and instructional video documentation to support the implementation of the model in educational practice.

Key Words: BBC micro:bit, IoT, STEM education.

Úvod

Digitalizácia poľnohospodárstva a rozvoj internetu vecí (IoT) zásadne transformujú spôsoby monitorovania a riadenia pestovateľských podmienok. Inteligentné skleníky umožňujú presnú kontrolu

mikroklimy prostredníctvom integrácie senzorických a automatizačných systémov. V kontexte tejto práce je takýto systém chápaný ako deterministicky riadený automatizovaný mechanizmus, ktorý na základe preddefinovaných logických pravidiel autonómne udržiava požadované podmienky bez využitia metód strojového učenia alebo manuálneho zásahu. Väčšina existujúcich riešení je však orientovaná na komerčné aplikácie s dôrazom na maximalizáciu výnosov a energetickú efektivitu [1].

V pedagogickom prostredí je situácia odlišná. Existujúce projekty, ako napríklad strešné skleníky [2] alebo virtuálne záhrady [3], narážajú na viaceré obmedzenia, medzi ktoré patrí vysoká finančná náročnosť komerčných systémov, zvýšená manuálna náročnosť jednoduchších riešení či nevhodné rozmery pre praktické využitie pri pestovaní rastlín v školskom prostredí. V dôsledku toho vzniká výrazná medzera medzi technologickým pokrokom a jeho efektívnou implementáciou do STEM vzdelávania.

Analýza odbornej literatúry naznačuje, že hoci komerčné IoT riešenia pre inteligentné skleníky predstavujú etablovaný štandard, v edukačnom kontexte stále absentujú otvorené a nízkonákladové systémy umožňujúce plnohodnotné riadenie prostredníctvom mikrokontrolérov [4]. Empirické štúdie zároveň poukazujú na to, že integrácia platformy BBC micro:bit do výučby prispieva k znižovaniu technických bariér, rozvoju algoritmického myslenia a zvýšeniu angažovanosti žiakov v prakticky orientovanom environmentálnom učení [5]–[8].

Proces návrhu a implementácie senzorických systémov zároveň podporuje rozvoj technologických kompetencií [9] a v kontexte projektovo orientovaného vyučovania umožňuje efektívne prepájanie technických disciplín s kreatívnymi činnosťami [10]. Softvérová flexibilita platformy navyše umožňuje plynulý prechod od blokového programovania k pokročilejším programovacím jazykom, ako je Python [11]. Tento potenciál potvrdzujú aj aktuálne edukačné prístupy zamerané na mestské pestovanie [12] a koncepty inteligentnej starostlivosti o rastliny [13].

Predkladaný príspevok reaguje na identifikovanú medzeru návrhom a experimentálnym overením modelu inteligentného skleníka na platforme BBC micro:bit, ktorý je zároveň súčasťou uceleného edukačného ekosystému. Tento ekosystém zahŕňa interaktívnu aplikáciu vytvorenú v prostredí Figma a

metodickú video-dokumentáciu v slovenskom jazyku, čím rozširuje možnosti implementácie riešenia v pedagogickej praxi.

Cieľom práce je navrhnúť a overiť modulárny, finančne dostupný didaktický nástroj schopný spoľahlivo monitorovať mikroklimatické parametre, zabezpečiť stabilný prenos dát a podporiť realizáciu výskumne orientovaných vzdelávacích aktivít.

Výskumná otázka je formulovaná nasledovne: Je možné vytvoriť cenovo dostupný model inteligentného skleníka, ktorý zabezpečí stabilné monitorovanie mikroklimatických parametrov a spoľahlivý prenos dát v podmienkach bežného školského prostredia?

1 Návrh systému a metodika vývoja

Návrh inteligentného skleníka vychádza z biologického predpokladu adaptácie rastlín na prostredie [14], pričom cieľom je udržiavanie optimálnych mikroklimatických podmienok pre ich rast. Systém zohľadňuje kľúčové faktory, ako sú teplota, ventilácia, svetlo a vodný režim [15], ktorých stabilita je rozhodujúca pre funkčnosť modelu [16].

Architektúra systému predstavuje autorské riešenie zahŕňajúce konštrukčný návrh 3D komponentov, vývoj riadiaceho softvéru, implementáciu bezdrôtovej komunikácie a cloudového logovania dát. Návrh bol realizovaný s dôrazom na modularitu, jednoduchú údržbu a možnosť zásahu do zdrojového kódu v edukačnom procese.

1.1 Konštrukcia a hardvérová architektúra

Konštrukčné riešenie: Fixná plastová konštrukcia obsahuje 3D tlačene komponenty navrhnuté v prostredí TinkerCad (Príloha A1 a A2) a primárne využíva hydroponický systém cenový pre svoju efektivitu [17] a nízku hmotnosť pri prenose. Všetky 3D komponenty boli vytlačené z materiálu PLA s výplňou 15%, čo je z hľadiska mechanickej odolnosti plne postačujúce pre interiérové didaktické podmienky a bežnú manipuláciu v triede. [18]

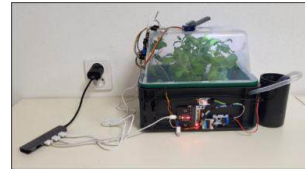
Hardvérová špecifikácia a distribúcia senzorov: Technologické jadro pozostáva z viacerých mikrokontrolérov, senzorickej siete a súčiastok. Senzorická sieť je rozdelená do troch funkčných zón (externá, nadzemná, koreňová), pričom ich presná špecifikácia a ceny sú uvedené v Tabuľke 4.

Výber biologického materiálu: Výber zohľadňoval stabilitu a bezpečnosť v pedagogickom procese.

2 Technická realizácia a systémová architektúra

Realizácia zahŕňala konfiguráciu senzorickej siete, návrh komunikačnej topológie a testovanie spoľahlivosti prenosu, zdokumentované vo

videodokumentácii (Príloha A14 a A16). Implementované boli dva scenáre zberu dát: rádiový protokol a Wi-Fi sieť. Batériové napájanie bolo nahradené sieťovým adaptérom, čím sa eliminovali výpadky systému (Obr. 1).



Obr. 1 Plné zapojenie modelu

Softvér bol vyvinutý v MakeCode s ohľadom na limity micro:bitu. Systém je rozdelený na viacero uzlov s OLED displejmi a logovaním dát, čo umožňuje flexibilnú rekonfiguráciu a demonštruje škálovateľnosť IoT riešení.

Technologické riešenie je prepojené s digitálnou edukačnou nadstavbou v podobe prototypu aplikácie (Príloha A15), štruktúrovanej do štyroch modulov. Analytický modul slúži ako interaktívny digitálny žurnál pre interpretáciu dát a vyhodnocovanie stavu rastliny. Inštruktážny modul poskytuje technickú dokumentáciu pre konštrukciu a programovanie. Metodický modul definuje výskumné postupy využiteľné na hodinách prírodovedných a technických predmetov. Adaptívny edukačný modul integruje gamifikované kvízy a simulátor environmentálnych zmien. Aktuálna verzia rozhrania je v angličtine, pričom architektúra počíta s integráciou slovenskej lokalizácie.

3 Riadenie systému cez rádiovú komunikáciu

Riadenie skleníka je postavené na rádiovom protokole micro:bitu, ktorý umožňuje bezdrôtovú výmenu dát v reálnom čase bez externých modulov. Celý systém operuje v rámci jednej rádiovkej skupiny, pričom všetky zariadenia zachytávajú vysielaný signál, no reagujú len tie s naprogramovanou podmienkou. Obmedzením protokolu je, že micro:bit nemôže byť súčasne členom viacerých skupín ani prijímať viacero signálov naraz. Dáta uložené v zariadení navyše vyžadujú fyzické pripojenie k počítaču, čo znižuje mieru automatizácie systému. V hierarchii systému pôsobia dva riadiace moduly: Master 1# agreguje dáta z externých senzorov cez rozširujúcu dosku IoT:bits a Master 2# monitoruje mikroklimatické podmienky v okolí vegetatívnych častí rastlín.

3.1 Logika komunikačného cyklu a spracovanie dát cez rádiovú komunikáciu

Pri inicializácii systému sa všetky premenné nastavujú na kontrolnú hodnotu -100, čo slúži na identifikáciu

prípadných chýb pri prenose. Proces zberu dát prebieha v sekvenčných krokoch:

1. **Fáza Alfa:** Master 1# vyšle signál s hodnotou 1, čím vyžiada dáta od jednotky Alfa. Po prijatí sa údaje zapíšu do Data Loggera a vizualizujú cez funkciu *Show data – Device*.
2. **Synchronizácia:** Po úspešnom zápise vyšle Master 1# signál 101, ktorým informuje Master 2# o dokončení prvej fázy.
3. **Fáza Beta:** Master 2# následne vyšle signál s hodnotou 2 pre jednotku Beta. Po prijatí dát skontroluje ich úplnosť (overenie voči hodnote - 100) a spracuje ich.
4. **Ukončenie cyklu:** Master 2# vyšle signál 102 späť k Master 1#. Ten aktivuje časovač, ktorý pozastaví cyklus na 20 minút (1 200 000 ms), po ktorých sa proces automaticky reštartuje.

3.2 Funkcie a automatizácia lokálnych jednotiek

Jednotlivé koncové moduly vykonávajú špecifické riadiace úlohy na základe nameraných hodnôt:

- **Micro:bit Alfa (Vonkajšie prostredie):** Sníma teplotu, vlhkosť a tlak cez senzor BME280. Zároveň ovláda servomotor (180°), ktorý slúži ako pohon na otváranie horného okna. Pohyb okna je automatizovaný podľa vonkajšej teploty ako ochrana pred tepelným šokom, s možnosťou manuálneho ovládania cez tlačidlá A a B. Kompletný kód Alfa je dostupný v prílohe A5.
- **Micro:bit Beta (Vnútorne prostredie - stonka):** Monitoruje teplotu a vlhkosť cez senzor DHT11. Obsahuje logickú podmienku pre osvetlenie: ak intenzita svetla klesne pod 50 %, aktivuje sa biele RGB LED svetlo. Systém umožňuje manuálnu deaktiváciu svetla tlačidlom B pre použitie v obytných priestoroch. Kompletný kód Beta je dostupný v prílohe A6.
- **Micro:bit Gama (Vnútorne prostredie - koreň):** Spravuje vodný manažment v úschovnej nádrži. Ak hladina klesne pod 50 %, relé zapne ponorné čerpadlo. Jednotka taktiež monitoruje teplotu vody pomocou senzora DS18B20. Systém umožňuje aj manuálne ovládanie relé a pumpy prostredníctvom tlačidiel A a B. Kód Gama je dostupný v prílohe A7.

4 Implementácia Wi-Fi prenosu a cloudová analytika

Alternatívne riešenie využíva Wi-Fi komunikáciu cez modul ESP-12F, pričom každý uzol komunikuje priamo s cloudom (ThingSpeak). Výhodou je vzdialený prístup k dátam v reálnom čase a vyššia granularita meraní.

Hoci senzorické zapojenie zostáva rovnaké ako pri rádiovom modeli, softvérová časť využíva rozšírenie ESP8266_IoT. Hlavnou prednosťou tohto prístupu je možnosť nepretržitého sledovania dát na diaľku, vďaka čomu systém nevyžaduje fyzickú prítomnosť používateľa priam pri skleníku. Celé kódy možno nájsť v prílohe A8, A10, A12.

4.1 Sieťová konfigurácia a konektivita

Pre úspešnú komunikáciu bolo nevyhnutné splniť špecifické sieťové parametre:

- **Pásmo:** Systém vyžaduje prevádzku v 2,4 GHz Wi-Fi pásme.
- **Autentifikácia:** Vyžaduje sa pripojenie k sieti s jednoduchým zabezpečením (názov a heslo). Sieť s dvojfaktorovým overovaním alebo používateľským prihlasovaním sú nevhodné.
- **Stabilita:** Optimálne výsledky boli dosiahnuté pripojením k domácim sieťam alebo cez zdieľaný Wi-Fi hotspot z mobilného telefónu.

4.2 Zálohovanie v cloude a analytický potenciál

Dáta sú v pravidelných intervaloch smerované na platformu **ThingSpeak**, kde sú segregované do troch nezávislých kanálov: Greenhouse Alfa (Príloha A9), Beta (Príloha A11) a Gama (Príloha A13). Vizualizácia v podobe dynamických grafov transformuje surové dáta na názorný edukačný materiál, ktorý žiakom umožňuje identifikovať kauzálne vzťahy medzi environmentálnymi faktormi (napr. vzťah medzi intenzitou svetla a vnútornou teplotou). Údaje je potom možné využiť na analýzu počas vyučovania. Cloudová architektúra zároveň minimalizuje riziko straty dát v dôsledku lokálnych výpadkov napájania.

5 Výsledky a implementácia

V tejto časti sú prezentované a analyzované namerané údaje, ktoré slúžia na posúdenie funkčnosti navrhnutého inteligentného skleníka. Testovanie prebiehalo v rôznych časových intervaloch a prostrediach, pričom sa sledovala dynamika zmien.

5.1 Implementácia a optimalizácia rádiového prenosu

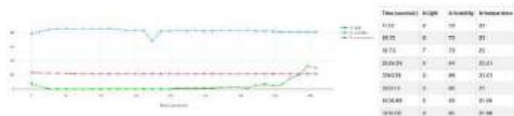
Implementácia bezdrôtovej komunikácie na platforme BBC micro:bit odhalila viaceré technické limity. Vstavaný rádiový protokol obmedzuje veľkosť dátového paketu na približne 8 znakov, čo spôsobovalo skreslenie alebo stratu dát presahujúcich kapacitu jedného bajtu. Riešením bolo zavedenie štruktúrovaného formátu správ so skrátenými identifikátormi senzorov a implementácia kontrolného

súčtu pre validáciu integrity paketov.

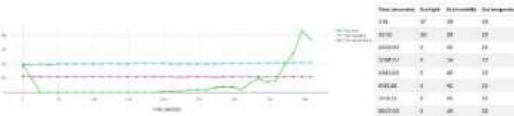
Ďalším problémom bola nemožnosť zaradenia zariadenia do viacerých rádiových skupín súčasne. Pri paralelnom vysielaní uzlov Alfa, Beta a Gama dochádzalo k prekryvaniu signálov, pričom systém zachytil spravidla len prvý prijatý signál a ostatné nahradil chybovou hodnotou -100. Riešením bolo zavedenie potvrdzovania prijatia a kontroly úplnosti dát pred ich zápisom. Stabilita komunikácie bola overená počas kontinuálneho testovania v dĺžke viac než 12 hodín, ktoré pokrylo celý jeden merací cyklus.

5.2 Analýza výsledkov v domácom prostredí (rádiový prenos)

Testovanie prebiehalo v obytných priestoroch (spáľňa) dňa 23. 03. 2025 v čase približne od 00:00 do 12:00 s meracím intervalom 20 minút, čo predstavovalo súbor 35 meraní pre každý parameter.



Graf 1 Záznam dát z vnútorných senzorov (spáľňa)



Graf 2 Záznam dát z vonkajších senzorov (spáľňa)

Zaznamenávané boli hodnoty vnútorného aj vonkajšieho prostredia, pričom dynamika zmien bola vizualizovaná v grafoch (Graf 1 a Graf 2) a následne štatisticky vyhodnotená (Tabuľka 1). V dátach boli identifikované výrazné zmeny osvetlenia, napríklad zhasnutie LED osvetlenia o polnoci a následné postupné zvyšovanie intenzity svetla po približne 5,5 hodinách, keď senzory zaznamenali svitanie.

Záznam dát dňa 23/03/2025 z vnútorných senzorov (spáľňa) - Rádiový prenos							
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Dobrá CI	Horná CI
Teplota	21,31	0,59	0,35	35	0,00007	1,72	7,30
Vlhkosť	82,23	3,13	9,77	35	0,89	81,95	83,38
Teplota	21,31	0,59	0,35	35	0,00007	1,72	7,30

Záznam dát dňa 23/03/2025 z vonkajších senzorov (spáľňa) - Rádiový prenos							
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Dobrá CI	Horná CI
Teplota	22,03	0,38	0,15	35	0,00007	1,72	7,30
Vlhkosť	40,46	0,85	0,73	35	0,89	40,16	40,75
Teplota	22,03	0,38	0,15	35	0,00007	1,72	7,30

Tabuľka 1 Výpočet dát z 23/03/2025 (spáľňa)

Vlhkosť vzduchu a retenčný efekt: Najvýznamnejším preukázaným faktorom bola schopnosť modelu zadržiavať vlhkosť. Priemerná vnútorná vlhkosť dosiahla 82,23 % (so smerodajnou odchýlkou SD=3,13), zatiaľ čo vonkajšia vlhkosť v miestnosti sa pohybovala na úrovni len 40,46 % (SD=0,85). Tento rozdiel takmer 42 percentuálnych bodov je štatisticky významný ($p < 0,001$) a potvrdzuje silný retenčný efekt uzavretého systému. Mierne vyšší rozptyl vnútornej vlhkosti (9,77 oproti 0,73 vonku) je

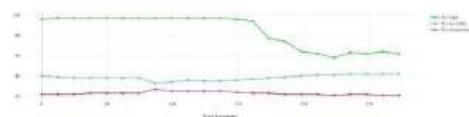
spôsobený prirodzenými kondenzačnými procesmi, ktoré prebiehajú v skleníku počas nočného poklesu teplôt.

Teplotná stabilita a izolačné vlastnosti: Priemerná vnútorná teplota bola zaznamenaná na úrovni 21,31 °C (SD=0,59), zatiaľ čo vonkajšia teplota dosiahla 22,03 °C (SD=0,38). Rozdiel 0,72 °C indikuje mierne chladnejšiu, no výrazne stabilnú vnútornú mikroklimu. Tento jav je vysvetliteľný absenciou priameho slnečného žiarenia počas noci a tepelnou zotrvačnosťou vlhkého substrátu a vodnej nádrže v modeli, ktoré zabraňujú prudkým výkyvom teploty.

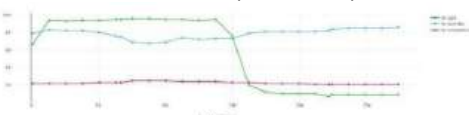
Dynamika osvetlenia: Svetelné senzory zaznamenali výrazné zmeny korešpondujúce s fázami dňa. V dátach bolo identifikované zhasnutie umelého osvetlenia okolo polnoci a následné postupné zvyšovanie intenzity svetla po svitaní. Výsledky preukázali výrazný tlmiaci efekt konštrukcie: zatiaľ čo vonkajší senzor zaznamenal priemernú intenzitu 13,51 jednotiek (s vysokým rozptylom 484,02 pre prudký ranný nárast), vnútorný senzor prepustil v priemere len 4,51 jednotiek (SD=8,12). Tento trojnásobný útlm potvrdzuje potrebu automatizovaného suplementárneho osvetlenia pre udržanie fotosyntézy.

5.3 Analýza výsledkov v kancelárskom prostredí (rádiový prenos)

Meranie v kancelárskych priestoroch prebiehalo dňa 24. 03. 2025 približne od 13:00 do 21:00 pri rovnakom 20-minútovom cykle ($n=23$). Skleník bol umiestnený pri okennej ploche, čo umožnilo zachytiť prirodzený priebeh popoludňajšieho slnka a jeho západu. Porovnávané boli údaje z externých senzorov (Master 1#) a interných senzorov (Master 2#), zobrazené na grafoch (Graf 3 a 4) a tabuľke (Tabuľka 2).



Graf 3 Záznam z Master 1# (kancelária)



Graf 4 Záznam z Master 2# (kancelária)

Master 1# - 24/03/2025 (kancelária) - Rádiový prenos							
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Dobrá CI	Horná CI
Teplota	22,95	1,55	2,41	23	0,04170	22,29	23,63
Vlhkosť	38,35	2,67	7,15	23	0	37,99	39,50
Teplota	22,95	1,55	2,41	23	0,04170	22,29	23,63

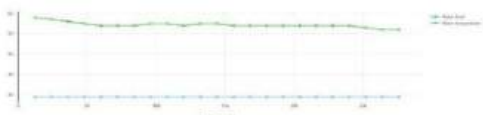
Master 2# - 24/03/2025 (kancelária) - Rádiový prenos							
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Dobrá CI	Horná CI
Teplota	22,52	1,17	1,37	23	0,04410	22,53	23,21
Vlhkosť	36,38	0,91	0,83	23	0	36,13	36,77
Teplota	22,52	1,17	1,37	23	0,04410	22,53	23,21

Tabuľka 2 Výpočet dát z 24/03/2025 (kancelária)

Tlmenie tepelných šokov: Porovnanie jednotiek Master 1# a Master 2# preukázalo schopnosť konštrukcie odolávať vonkajšej tepelnej záťaži. Kým vonkajšia teplota pri okennej ploche dosahovala v priemere 22,96°C (SD=1,55), vnútorná teplota skleníka bola stabilizovaná na hodnote 22,62°C s nižšou smerodajnou odchýlkou (SD=1,37). Tento rozdiel (potvrdený p-hodnotou 0,044) naznačuje, že hoci systém reaguje na vonkajšie podnety (napríklad oteplenie od slnka), plastový skelet v kombinácii so zvýšenou vlhkosťou slúži ako tepelný nárazník, ktorý chráni biologický materiál pred náhlym prehriatím alebo ochladením.

Udržateľnosť vlhkosti v exponovanom prostredí: Údaje potvrdili, že aj pri výrazných vonkajších teplotných výkyvoch zostávala vlhkosť vo vnútri skleníka veľmi vysoká. Priemerná vnútorná vlhkosť (Master 2#) sa držala na hodnote 78,39% (SD=5,51), zatiaľ čo okolité prostredie kancelárie vykazovalo len 38,35% (SD=2,67). Rozdiel presahujúci 40 percentuálnych bodov potvrdzuje, že model si stabilne udržiava izolačné vlastnosti v odlišných podmienkach.

Svetelný útlm a korelácia veličín: Pri poobednom slnku bola vonkajšia intenzita svetla značná (priemer 84,30 jednotiek, SD=16,18), pričom vnútorný priestor skleníka prepustil v priemere 56,04 jednotiek. Smerodajná odchýlka vnútorného svetla (SD=41,43) bola vysoká, čo odráža dynamickú zmenu tieňov počas západu slnka. Zároveň bola pozorovaná negatívna korelácia medzi intenzitou svetla a vnútornou mikroklimou: pri poklese osvetlenia vo večerných hodinách došlo k miernemu poklesu teploty a úmernému zvýšeniu relatívnej vlhkosti vzduchu.



Graf 5 Záznam z Gama (kancelária)

Vodný modul reprezentovaný jednotkou Gama (Graf 5) zaznamenal kontinuálny pokles hladiny vody bez náhlych výkyvov. Automatická aktivácia čerpadla nebola spustená, pretože hladina neklesla pod prahovú hodnotu 50 jednotiek. Teplota vody zostala stabilná (22,05°C), čo naznačuje efektívnu tepelnú izoláciu zásobníka.

5.4 Testovanie Wi-Fi prenosu a vizualizácia v platforme ThingSpeak

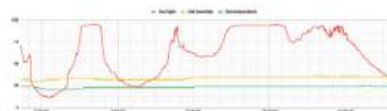
Pre vzdialené monitorovanie bol implementovaný Wi-Fi prenos dát do cloudu platformy ThingSpeak, čo umožňuje nepretržité ukladanie údajov bez potreby manuálneho zásahu. Implementácia v praxi poukázala

na administratívne obmedzenia spojené s nutnosťou registrácie cez inštitucionálne e-mailové adresy a na technické riziká v podobe sieťovej interferencie v hustých školských sieťach. Na zabezpečenie stability systému a elimináciu chýb v meraní sa preto odporúča využitie domácej siete alebo mobilného hotspotu. Kľúčovým zistením testovania bola nekompatibilita súbežného rádiového a Wi-Fi prenosu na jednom mikrokontroléri, čo viedlo k zlyhaniu systému. Tento problém vyriešila reštrukturalizácia architektúry rozdelením úloh medzi samostatné jednotky a elimináciou modulov Master.

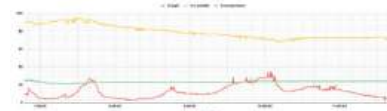
Z hľadiska didaktiky je hlavným prínosom Wi-Fi riešenia možnosť analýzy dát v reálnom čase a vzdialený prístup z akéhokoľvek zariadenia bez nutnosti fyzického prepojenia. Táto technológia minimalizuje potrebu priamych náhľadov do skleníka počas vyučovacieho procesu, čím sa predchádza narušeniu vnútornej mikroklimy. Zhromaždené dáta sú efektívne využiteľné na vysvetlenie dejov priamo počas vyučovania. Dynamická vizualizácia nameraných parametrov v cloudovom prostredí zároveň výrazne zvyšuje vizuálnu príťažlivosť didaktickej pomôcky, čím efektívnejšie udržiava pozornosť žiakov a motivuje ich k analytickému mysleniu.

5.5 Analýza dát v domácom prostredí cez Wi-Fi

Počas testovania prostredníctvom mobilného hotspotu bolo generovaných presne 987 záznamov na každý kanál (Greenhouse Alfa a Beta). Interval zápisu sa pohyboval v rozmedzí 15 až 25 sekúnd, čo v porovnaní s rádiovým prenosom umožnilo dosiahnuť preukázateľne vysokú časovú granularitu dát a detailné sledovanie dynamiky prostredia. Vizualizácia údajov v platforme ThingSpeak umožňuje okamžité grafické zobrazenie v reálnom čase, avšak základné užívateľské rozhranie poskytuje len obmedzený pohľad na posledných 20 minút údajov. Pre komplexnú analýzu celého 5-hodinového cyklu boli preto využité exportované surové dáta, z ktorých boli vytvorené súhrnné grafy (Graf 6 a 7) a následne vypočítané dáta (Tabuľka 3).



Graf 6 Dáta z kanálu Greenhouse Alfa (exteriér)



Graf 7 Dáta z kanálu Greenhouse Beta (interiér)

Rozdiel vo veľkosti meraných vzoriek (N=35) pri rádiovom prenose verzus (N=987) pri Wi-Fi prenose je metodickým zámerom. Rádiový prenos s 20-minútovým intervalom bol navrhnutý pre energetickú úspornosť a sledovanie dlhodobých trendov stabilnej mikroklimy v školskom prostredí. Naopak, 15-sekundový interval pri Wi-Fi prenose mal za cieľ demonštrovať maximálnu analytickú kapacitu, rýchlosť odozvy a vysokú dátovú granularitu cloudového riešenia.

Výpočet z dát z kanála Greenhouse Alfa (exteriór)						
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Hodna CI
Svetlo	63,56	36,88	732,62	987	0	61,39
Vlhkosť	33,71	1,57	3,46	987	0	33,62
Teplota	23,38	0,92	0,89	987	0,1820	23,35

Výpočet z dát z kanála Greenhouse Beta (interiér)						
Parameter	Priemer	SD	Rozptyl	n	p-hodnota	Hodna CI
Svetlo	12,39	6,31	47,70	987	0	12,82
Vlhkosť	78,95	6,91	56,50	987	0	79,42
Teplota	23,35	0,79	0,62	987	0,0000	23,40

Tabuľka 3 Výpočet dát z oboch kanálov

Vlhkosť vzduchu ako dôkaz tesnosti systému: Analýza Wi-Fi dát s vysokým rozlíšením výrazne potvrdila tesnosť a funkčnosť navrhnutej konštrukcie. Kým vonkajšia vlhkosť vzduchu v miestnosti (Alfa) dosahovala priemerne len 33,71 % (SD = 1,57), vnútorný priestor modelu (Beta) si udržiaval vysokú vlhkosť na úrovni 78,95 % (SD = 6,91). Vlhkostný rozdiel predstavujúci viac než 45 percentuálnych bodov je štatisticky významný a potvrdzuje, že náš ekosystém dokáže generovať a dlhodobo udržiavať vlastnú mikroklimu aj napriek suchej okolitej klíme.

Optické vlastnosti a plynulosť prechodov svetla: Porovnanie kanálov Greenhouse Alfa a Beta preukázalo výrazný stabilizačný efekt konštrukcie aj z hľadiska svetelných podmienok. Vonkajšie osvetlenie vykazovalo vysokú intenzitu a výrazné skokové zmeny (priemer 63,06 jednotiek s obrovským rozptylom 722,62), zatiaľ čo vo vnútri modelu boli prechody neporovnateľne plynulejšie. Priemerná vnútorná intenzita klesla na 12,39 jednotiek s výrazne nižším rozptylom (47,70). Tento útlm žiarenia dokazuje schopnosť plastového materiálu rozptyľovať priame svetlo, čo chráni rastliny pred spálením listov.

Termoregulácia a tlmenie teplotných šokov: Zaujímavým zistením bola komparatívna analýza teplôt. Aplikácia dvojvýberového t-testu na namerané dáta preukázala, že priemerné teploty sa štatisticky významne nelíšia ($p=0,1820$; 23,38°C vonku vs. 23,35°C vnútri). Tento výsledok je však z hľadiska funkčnosti modelu pozitívny, keďže potvrdzuje, že skleník sa na slnku kriticky neprehrieva a rešpektuje okolitú izbovú teplotu. Kľúčový rozdiel však nastáva v dynamike zmien: zatiaľ čo vonkajšia teplota mala vyššiu variabilitu (SD=0,92), vnútorná teplota bola stabilnejšia (SD=0,79). Z exportovaných dát bolo možné pozorovať, že ak vonkajší senzor zaznamenal náhly teplotný skok o 1°C, vnútorná teplota v modeli sa vďaka tepelnej

zotrvačnosti konštrukcie v rovnakom čase zmenila len o 0,1°C. Tieto výsledky potvrdzujú stabilizačný efekt skleníkového prostredia.

Analýza vodného modulu z kanála Gama sa zamerala na časový úsek medzi 15:13 a 15:40, kedy došlo k automatickej aktivácii zavlažovacieho systému. Pokles hladiny pod hodnotu 50 jednotiek vyvolal aktiváciu relé a čerpadla, čo sa v grafoch prejavilo ako dynamická zmena nameraných hodnôt spôsobená pohybom kvapaliny.

5.6 Integrita dát a chybovosť

Porovnanie lokálneho úložiska micro:bitu a cloudovej platformy ThingSpeak odhalilo zaujímavý rozdiel v integrite dát. V 17. minúte sa v lokálnom zázname objavila anomália v podobe neočakávaného nárastu hodnoty, ktorá v cloude absentovala, čo naznačuje, že k sporadickým chybám dochádza primárne pri lokálnom zápise (Obr. 2). Toto zistenie má priamy didaktický potenciál: učitelia môžu podobné situácie využiť na simuláciu reálnych technických problémov, počas ktorých žiaci identifikujú príčiny anomálií a diskutujú o spoľahlivosti IoT zariadení a kritickom vyhodnocovaní dát.



Obr. 2 Dáta z micro:bitu Gama

6 Ekonomická náročnosť a dostupnosť pre školy

Náklady na vybudovanie trojuzlovej Wi-Fi siete predstavujú celkovú investíciu 181,60 €, teda približne 60 € na jeden plne vybavený uzol zahŕňajúci dosku BBC micro:bit V2, IoT modul, senzory, akčné členy aj konštrukčný materiál. V porovnaní s komerčnými alternatívami je toto riešenie výrazne dostupnejšie. Ekvivalentná sieť zložená z hotových smart agrikultúrnych setov (napr. ElecFreaks) by presiahla 250 €, pričom jednotlivé uzly za 85 – 95 € často ani neobsahujú pokročilé senzory či akčné členy. Robotické stavebnice typu Lego sa pohybujú od 70 do 100 € za set bez riadiacej jednotky, čo ďalej obmedzuje ich využiteľnosť pre IoT aplikácie. Navrhnutý model teda školám poskytuje plnohodnotnú IoT infraštruktúru pri nižších nákladoch a zároveň zvyšuje didaktickú hodnotu prostredníctvom práce s reálnymi elektronickými komponentmi.

Odhadovaná kalkulácia nákladov na zostavenie modelu (v eurách)			
Název	Číslo	Množstvo	Cena
Doska Zvláštna doska BBC mikro:bit V2 (2 kusy)	66 33	2	6,60
Vlhkosť/Teplota doska ElecFreaks IoTKit (2 kusy)	48 09	2	4,80
Senzor teploty a vlhkosti DHT11	4 30	1	4,30
Senzor intenzity svetla DHT11 Light Sensor (2 kusy)	4 00	2	4,00
Senzor osvetlenia DHT11 Blue LED	3 00	1	3,00
Environmentálny senzor DHT11	15 00	1	15,00

Tabuľka 4 Odhadované náklady

7 Diskusia a záver testovania

Navrhnutý model inteligentného skleníka potvrdzuje realizovateľnosť implementácie IoT technológií do školského prostredia bez potreby nákladných priemyselných riešení. Experimentálne testovanie na platforme BBC micro:bit preukázalo stabilitu monitorovania a schopnosť systému adaptívne reagovať na zmeny mikroklimatických podmienok.

Získané výsledky korelujú so zisteniami súčasného výskumu v oblasti STEM vzdelávania. Podľa Papadaki [6] integrácia platformy micro:bit znižuje technické bariéry a podporuje rozvoj algoritmického myslenia. Systematické prehľady [7], [8] zároveň poukazujú na zvýšenú angažovanosť žiakov pri využívaní takýchto nástrojov. Predkladaný model tieto zistenia rozširuje tým, že demonštruje schopnosť platformy riadiť komplexné procesy s vysokou mierou presnosti.

Analýza experimentálnych dát potvrdila výrazný stabilizačný efekt konštrukcie: vnútorné teplotné výkyvy boli redukované z 1 °C na približne 0,1 °C a retenčný efekt vlhkosti dosiahol významný rozdiel 40 – 45 percentuálnych bodov ($p < 0,001$). Identifikovaný pokles intenzity osvetlenia (3- až 5-násobný) zároveň otvára priestor pre ďalší výskum optických vlastností materiálov a ich vplyvu na fotosyntetické procesy.

Pri dlhodobom nasadení je však potrebné zohľadniť technologické limity použitých komponentov. Senzor DHT11 pri relatívnej vlhkosti nad 80 % vykazuje degradáciu presnosti v dôsledku korózie kontaktov. Podobne odporové senzory vlhkosti pôdy podliehajú degradácii vplyvom elektrolyzy. [19] Z didaktického hľadiska však tieto obmedzenia nepredstavujú nedostatok, ale naopak poskytujú autentický kontext pre pochopenie životného cyklu a spoľahlivosti IoT zariadení. Ako zistili Esmaeilian a Ahmed [13] a potvrdzuje aj štúdia Precharattanu a kol. [12], práve riešenie takýchto reálnych konštrukčných a technických výziev buduje technologické znalosti žiakov efektívnejšie než práca s bezchybnými a drahými komerčnými setmi.

Významným prínosom práce je aj experimentálne porovnanie dvoch prístupov k prenosu dát. Lokálny rádiový prenos poskytuje nezávislosť od internetového pripojenia, čo je výhodné v školách s obmedzenou sieťovou infraštruktúrou, avšak vyžaduje komplexnejšiu architektúru agregáčnych uzlov. Naopak, Wi-Fi riešenie prostredníctvom platformy ThingSpeak zjednodušuje hardvérovú architektúru, umožňuje vyššiu časovú granularitu dát a podporuje vzdialený monitoring v reálnom čase. Navrhnutý model možno preto považovať za presný a flexibilný merací systém vhodný pre využitie na základných aj stredných školách. Limitom zostáva absencia dlhodobého

overenia priamo vo vyučovacom procese. Tento aspekt však predstavuje prirodzený smer ďalšieho výskumu.

Didaktický potenciál riešenia je ďalej rozšírený o digitálnu edukačnú nadstavbu. Interaktívna aplikácia vytvorená v prostredí Figma spolu s metodickou video-dokumentáciou umožňujú jednoduchú implementáciu systému do výučby. Anglické používateľské rozhranie zároveň vytvára priestor pre aplikáciu metódy CLIL (Content and Language Integrated Learning), čím podporuje integráciu odborného obsahu s jazykovým vzdelávaním.

Záver

Cieľom príspevku bolo navrhnúť, realizovať a experimentálne overiť model inteligentného skleníka využiteľného v STEM vzdelávaní. Navrhnuté modulárne riešenie, postavené na platforme BBC micro:bit, preukázalo vysokú technickú spoľahlivosť pri monitorovaní a riadení mikroklimatických parametrov prostredníctvom dvoch nezávislých komunikačných prístupov.

Experimentálne overenie potvrdilo realizovateľnosť cenovo dostupného systému vhodného pre školské prostredie. Identifikované technologické limity boli analyzované a čiastočne eliminované úpravou systémovej architektúry. Kvantitatívna štatistická analýza zároveň potvrdila výrazné izolačné vlastnosti modelu a jeho schopnosť efektívne tlmiť teplotné výkyvy.

Výsledky práce naznačujú, že je možné vytvoriť technicky transparentný a pedagogicky hodnotný nástroj, ktorý efektívne prepája teoretické poznatky s praktickou aplikáciou v oblasti IoT. Navrhnutý systém, doplnený o edukačnú aplikáciu a metodickú podporu, predstavuje otvorenú platformu pre interdisciplinárne STEM/STEAM vzdelávanie.

Budúci výskum bude zameraný na dlhodobé overenie implementácie riešenia vo vyučovacom procese a na kvantitatívne hodnotenie jeho vplyvu na rozvoj digitálnych, analytických a technických kompetencií žiakov.

Poďakovanie

Moje poďakovanie patrí školiteľovi a konzultantovi Mgr. Martin Cápay, PhD. za odbornú pomoc a rady.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SUBAHI, A.F. a BOUAZZA, K.E., (2020). An intelligent IoT-based system design for controlling and monitoring greenhouse temperature. IEEE Access, vol. 8.
- [2] NADAL, A. et al., (2018). Rooftop greenhouses in educational centers: A sustainability assessment of

- urban agriculture in compact cities. *Science of the total environment*, vol. 626.
- [3] WILSON, S.B. a DANIELSON, H.E., (2005). A new instrument for interactive virtual plant identification and use. *HortTechnology*, vol. 15, no. 3.
- [4] Setiawan, D. Y., Warsito, W., Marjunus, R., Nurfiana, N., & Syahputri, R. (2022). A Systematic literature review: internet of things on smart greenhouse. *International Journal of Advanced Computer Science and Applications*.
- [5] Kvašayová, N., Cápaj, M., Petřík, Š., Bellayová, M., & Klimeková, E. (2022). Experience with using bbc micro: Bit and perceived professional efficacy of informatics teachers. *Electronics*, 11(23), 3963.
- [6] Papadaki, E. (2025). The BBC micro: bit in Primary Schools: A Systematic Review on Computational Thinking, Creativity, and Pedagogical Strategies. *Advances in Mobile Learning Educational Research*, 5(2), 1611-1620.
- [7] Quyen, K. T., Van Bien, N., & Thuan, N. A. (2023). Micro: bit in Science Education: A systematic review. *Jurnal Penelitian dan Pembelajaran IPA*, 9(1), 1-14.
- [8] Mardian, V., & Azzahra, W. (2024). A Review: The Impact of Micro: Bit-Assisted STEM Education. *International Journal of Science Education and Teaching*, 3(1), 30-37.
- [9] Cederqvist, A. M. (2022). An exploratory study of technological knowledge when pupils are designing a programmed technological solution using BBC Micro: bit. *International Journal of Technology and Design Education*, 32(1), 355-381.
- [10] Lu, S. Y., Lo, C. C., & Syu, J. Y. (2022). Project-based learning oriented STEAM: the case of micro-bit paper-cutting lamp. *International Journal of Technology and Design Education*, 32(5), 2553-2575.
- [11] Weill-Tessier, P., Kyfonidis, C., Brown, N., & Kölling, M. (2022, July). Strype: Bridging from blocks to Python, with Micro: Bit support. In *Proceedings of the 27th ACM Conference on on Innovation and Technology in Computer Science Education Vol. 2* (pp. 585-586).
- [12] Precharattana, M., Pitiporntapin, S., Sanium, S., Kitrungrloadjanaporn, P., & Phengpom, T. (2024). Enhancing teachers' integrating micro: bit in their teaching through professional development program within the urban vegetable garden context. *Kasetsart Journal of Social Sciences*, 45(4), 1141-1150.
- [13] Esmailian, A., & Ahmed, K. (2025, November). From Soil to Software: Experience from a STEM Workshop on Smart Plant Care and Teachable Machines. In *Proceedings of the SC'25 Workshops of the International Conference for High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis* (pp. 424-432).
- [14] CALVO, P. et al., (2020). Plants are intelligent, here's how. *Annals of botany*, vol. 125, no. 1.
- [15] SINGH, M.C.; YOUSUF, A. a SINGH, J.P., (2016). Greenhouse microclimate modeling under cropped conditions-A review. *Res. Environ. Life Sci.*, vol. 9, no. 12.
- [16] CHOAB, N. et al., (2019). Review on greenhouse microclimate and application: Design parameters, thermal modeling and simulation, climate controlling technologies. *Solar Energy*, vol. 191.
- [17] SHARMA, N. et al., (2018). Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. *Journal of Soil and Water Conservation*, vol. 17, no. 4. DOI: 10.5958/2455-7145.2018.00056.5.
- [18] Travieso-Rodriguez, J. A., Jerez-Mesa, R., Llumà, J., Traver-Ramos, O., Gomez-Gras, G., & Roa Rovira, J. J. (2019). Mechanical properties of 3D-printing polylactic acid parts subjected to bending stress and fatigue testing. *Materials*, 12(23), 3859.
- [19] Haller, M. (2024). DHT11 Sensor: A Comprehensive Study on Temperature and Humidity Sensor. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH IN ENGINEERING AND MANAGEMENT*, 8(03), 1-11.

Príloha

Zdrojový kód, odkaz na databázy, aplikáciu a videa:

- A1 3D model prstenca: <https://www.tinkercad.com/things/fUKT6b5oLU1-prstencesklenik>
- A2 3D model rúrky: <https://www.tinkercad.com/things/3ij492rJ2Go-rurkasklenik>
- A3 Prenos dát cez rádio: Master 1# <https://makecode.microbit.org/S06740-51503-44556-01594>
- A4 Prenos dát cez rádio: Master 2# <https://makecode.microbit.org/S04279-70305-02190-60192>
- A5 Prenos dát cez rádio: Alfa <https://makecode.microbit.org/S44186-20829-03654-87624>
- A6 Prenos dát cez rádio: Beta <https://makecode.microbit.org/S52232-81250-17560-46221>
- A7 Prenos dát cez rádio: Gama <https://makecode.microbit.org/S47619-20624-83894-84651>
- A8 Testovanie: Wi-Fi prenos : Alfa <https://makecode.microbit.org/S76601-95128-20130-67032>
- A9 Link na kanál Greenhouse Alfa <https://thingspeak.mathworks.com/channels/2896355>
- A10 Testovanie: Wi-Fi prenos : Beta <https://makecode.microbit.org/S05042-06732-63272-67599>
- A11 Link na kanál Greenhouse Beta <https://thingspeak.mathworks.com/channels/2896345>
- A12 Testovanie: Wi-Fi prenos : Gama <https://makecode.microbit.org/S75476-50335-76170-42717>
- A13 Link na kanál Greenhouse Gama <https://thingspeak.mathworks.com/channels/2890585>
- A14 Video nášho projektu: <https://sdu.sk/video>
- A15 Aplikácia (Figma): <https://smart-greenhouse-bbcmicrobit.figma.site>
- A16 Metodické inštruktážne video (Slovenčina): <https://drive.google.com/file/d/1Jewbwf3yD2-v3xiID-MuQt2937JAMM6w/view?usp=sharing>

Výroba učebnej pomôcky hydraulického zdviháku

Production of a Teaching Aid – Hydraulic Jack

Matúš Pavlús – Petra Kvasnová

Katedra techniky a technológií, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica

matus.pavlus@student.umb.sk, petra.kvasnova@umb.sk

Abstrakt

Táto práca sa zaoberá vytvorením učebnej pomôcky hydraulického zdviháka pre predmet technika v 6. ročníku základných škôl, kde sa preberá tematický celok jednoduché stroje a mechanizmy. Učebná pomôcka slúži na názorné vysvetlenie princípu hydrauliky a fungovania jednoduchých technických zariadení. Vďaka praktickej ukážke môžu žiaci lepšie pochopiť preberané učivo a aktívnejšie sa zapájať do vyučovania. Využívanie názorných učebných pomôcok podporuje záujem o technické predmety a prispieva k efektívnejšiemu osvojeniu základných technických poznatkov. Návod na výrobu môže inšpirovať učiteľov techniky a fyziky k vytvoreniu vlastného modelu hydraulického zdviháku.

Kľúčové slová: hydraulický zdvihák, jednoduché stroje, technika, učebná pomôcka

Abstract

This paper deals with the creation of a teaching aid in the form of a hydraulic jack for the subject Technology in the 6th grade of primary schools, where the topic of simple machines and mechanisms is taught. The teaching aid serves to visually explain the principles of hydraulics and the functioning of simple technical devices. Through practical demonstration, students can better understand the presented subject matter and become more actively involved in the learning process. The use of visual teaching aids supports students' interest in technical subjects and contributes to the more effective acquisition of basic technical knowledge. The instructions for its construction may also inspire teachers of technology and physics to create their own model of a hydraulic jack.

Keywords: hydraulic jack, simple machines, technology education, teaching aid

Úvod

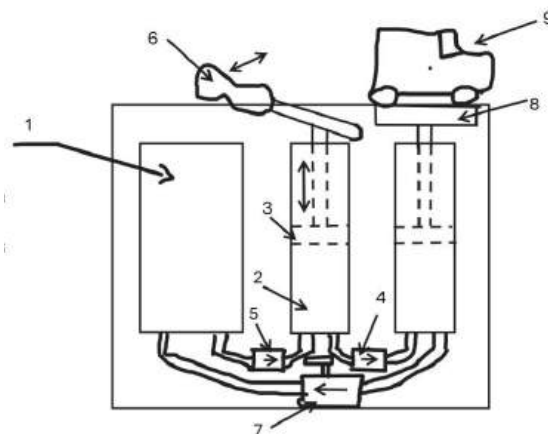
K rozhodnutiu, prečo vyrobiť práve hydraulický zdvihák ako učebnú pomôcku, ma viedol nedostatok funkčných možností, ako žiakom lepšie priblížiť danú problematiku.

Hydraulický zdvihák patrí medzi jednoduché mechanizmy využívajúce princíp hydrauliky, teda prenos tlaku prostredníctvom kvapaliny. Jeho fungovanie je založené na Pascalovom zákone, podľa ktorého sa tlak vyvolaný v uzavretej kvapaline prenáša rovnomerne do všetkých smerov. Vďaka tomuto princípu je možné pomocou relatívne malej sily zdvihnúť ťažké predmety, čo nachádza široké využitie napríklad v automobilovom priemysle, stavebníctve alebo servisných činnostiach.

Hydraulické zdviháky sa používajú najmä na zdvíhanie vozidiel, strojov alebo stavebných konštrukcií. Ich konštrukcia je založená na systéme piestov a pracovnej kvapaliny, ktorá zabezpečuje prenos sily medzi jednotlivými časťami zariadenia. Využívanie názorných modelov hydraulických zariadení vo vyučovaní umožňuje žiakom lepšie pochopiť princíp ich fungovania a praktické využitie v technickej praxi.

1 Postup výroby učebnej pomôcky

V prvej časti príprav sme spravili náčrt toho ako by mohol hydraulický zdvihák vyzerat.



Obr.1 Náčrt výrobku

1 – nádoba na olej, 2 – nádoba s olejom vytvárajúca tlak, 3 – piest, 4,5 – jednosmerný prepúšťač oleja, 6 – rúčka na ovládanie piestu, 7 – jednosmerný prepúšťač

oleja s možnosťou zavretia, 8 – zdvíhacia plošina, 9 – zdvíhaný objekt

Keď bol náčrt hotový tak sme rúrky ktoré fungujú ako nádrže odrezali na požadované veľkosti, následne odrezali nylónový valec ktorý sme natlačili do nádob a vyvrtali sme do nich diery na vstup pre hadičky.



Obr.2 Plastová rúra so vstupmi pre hadičky



Obr.3 Diery na vstupy

V ďalšej časti sme vytvorili z nylónového valca, tesnenia a kovovej skrutky dva piesty ktoré sme namazali vazelínou a vložili ich do plastových nádob. Na jeden z piestov sme privarili kovový hranol spoločne s rúčkou ktorý bude fungovať ako tzv „pumpa“ ktorá bude čerpať a vytláčať olej. Na druhý piest privaríme „plošinu“ ktorá bude predstavovať zdvíhák na model auta.



Obr.4 Piest

Základom celého modelu bude drevená opracovaná a povrchovo ošetrovaná doska. Na nej budú pripevnené všetky nádoby pomocou hliníkových obručí ktoré sme si odstrihli na požadovanú veľkosť a prichytili sme ich skrutkami na drevenú dosku.



Obr.5 Predbežné uloženie

V poslednej časti všetko prepojíme hadičkami a regulátormi toku.

2 Výsledky a diskusia

Na začiatku tejto práce sme si stanovili hlavný cieľ, ktorým bola funkčnosť vytvorenej učebnej pomôcky, čo sa nám podarilo splniť. Hydraulický zdvíhák je funkčný a umožňuje názorne demonštrovať princíp prenosu tlaku v kvapaline, čím môže byť využiteľný vo vyučovacom procese. Jeho použitie vo vyučovaní môže prispieť k lepšiemu pochopeniu preberanej problematiky a zvýšiť záujem žiakov o technické predmety.

Medzi ďalšie ciele patrí postupné vylepšovanie tejto učebnej pomôcky. Jednou z možností je pripevnenie elektrického motorčeka namiesto ručnej rukoväte, čím by sa zvýšila komfortnosť ovládania a zároveň by sa rozšírili možnosti jej prezentácie vo vyučovaní. Ďalším plánovaným krokom je vypracovanie presného náčrtu v programe AutoCAD vrátane požadovaných rozmerov, aby sa mohli iní učitelia inšpirovať a prípadne si vytvoriť vlastný model hydraulického zdvíháka pre potreby výučby.

Záver

V príspevku bola predstavená učebná pomôcka hydraulického zdvíháka, ktorá je funkčná a vhodná na názorné vysvetlenie princípu hydrauliky v predmete technika. Vytvorený model umožňuje žiakom lepšie pochopiť fungovanie jednoduchých mechanizmov a podporuje ich záujem o technické vzdelávanie. Zistenia poukazujú na význam využívania názorných učebných pomôcok vo vyučovaní, ktoré prispievajú k efektívnejšiemu osvojeniu učiva.

Výsledky práce majú praktické využitie najmä vo vyučovaní techniky a fyziky, kde môže byť model hydraulického zdvíháka použitý ako názorná pomôcka

pri vysvetľovaní princípu prenosu tlaku v kvapalinách. Návod na jeho výrobu môže zároveň slúžiť ako inšpirácia pre učiteľov pri tvorbe vlastných učebných pomôcok.

Poďakovanie

Týmto by som sa chcel poďakovať Ing. Petre Kvasnovej, PhD. za spoluprácu ako aj za možnosť zúčastniť sa na tejto vedeckej konferencii.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] PAVLOK, Bohumil a kol. *Hydraulická zařízení strojů* [online]. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2007 [cit. 20.2.2026]. Dostupné z: <https://projekty.fs.vsb.cz/414/hydraulicka-zarizeni-stroju.pdf>.
- [2] ŠIMONÍK, Pavel. *Zvedací zařízení automobilu* [online]. Zlín: Univerzita Tomáše Baťu vo Zlíne, 2021 [cit. 20.2.2026]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/49958/%C5%A1imon%C3%ADk_2021_dp.pdf?sequence=1.
- [3] Kde, ako a kedy využijete hydraulický zdvihák? [online]. Dostupné z: <http://www.ako-na.sk/navod/5666/kde-ako-a-kedy-vyuzijete-hydraulicky-zdvihak/> [cit. 20.2.2026].
- [4] URBAN, Jakub. *Hydraulický zdvihák – pokus* [online]. Dostupné z: https://www.gjar-po.sk/~jakub.urban1a/urban/jakub_urbanpokus.pdf [cit. 20.2.2026].

Tvorba výučbových aktivít z chémie s využitím medzipredmetových vzťahov

Designing chemistry activities with inter-disciplinary connections

Marek Skupeň¹ – Marek Skoršepa²

^{1,2}Katedra chémie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ mskupen@student.umb.sk, ² marek.skorsepa@umb.sk

Abstrakt

Predmetom príspevku je návrh výučbových aktivít z chémie pre gymnáziá (ISCED 3A) koncipovaných so zreteľom na medzipredmetové prepojenia s predmetmi vzdelávacích oblastí Človek a príroda, Jazyk a komunikácia, Matematika a práca s informáciami, Človek a spoločnosť, Umenie a kultúra, či Zdravie a pohyb. Navrhli sme 14 vyučovacích hodín s výučbovými aktivitami zameranými na problematiku fotosyntézy s cieľom aplikovať v nich medzipredmetové vzťahy s chémiou a implementovať aktivizujúce didaktické metódy, koncepcie, či organizačné formy. Niektoré aktivity boli verifikované realizáciou v reálnom vzdelávacom prostredí gymnázia. Na overenie boli použité anonymizované výskumné nástroje – pretest a posttest s identickými výroky relevantnými z hľadiska obsahu výučbových aktivít a miskonceptí identifikovanými inými autormi. Na základe nich sme zhodnotili zmeny celkového percentuálneho skóre, mediánu, minima, maxima, validného percenta správnych odpovedí pri výrokoch a zmeny odpovedí. Na štatistické spracovanie sme použili neparametrické testy – Wilcoxonov test a McNemarov test. Výsledky boli v niektorých prípadoch doplnené žiackymi a učiteľskými spätnými väzbami.

Kľúčové slová: medzipredmetové vzťahy, vyučovanie chémie, výučbové aktivity, gymnáziá

Abstract

The subject of this paper is the design of chemistry teaching activities for grammar schools (ISCED 3A) drawn up with regard to the interdisciplinary connections with subjects in the educational fields Human and nature, Language and communication, Mathematics and work with information, Human and society, Art and culture, or Health and movement. We proposed 14 lessons with teaching activities focused on the topic of photosynthesis with the aim of applying in them inter-

disciplinary connections with chemistry and implementing active didactics methods, concepts of education, or types of organization. Some of the teaching activities were verified by implementation in a real educational environment of grammar school. For verify were used anonymized research tool – pretest and posttest with identical statements relevant to the content of teaching activities and misconceptions identified by other authors. Based on these, we evaluated changes in total percentage score, median, minimum, maximum, valid percent of correct answers to statements and changes in responses. For statistical processing were used nonparametric tests – the Wilcoxon test and the McNemar test. In some cases, the results were supplemented with student and teacher feedback.

Key Words: inter-disciplinary connections, chemistry teaching, teaching activities, grammar schools

Úvod

Medzipredmetové vzťahy a ich aplikácia vo vzdelávaní sú potenciálnym prostriedkom pre prehĺbenie učiva na konkrétnych predmetoch a vytvorenie holistického pohľadu na svet. Prostredníctvom kooperácie medzi predmetmi a učiteľmi rozdielnych predmetov môže učiteľ poskytnúť žiakom dostatočný priestor na aplikovanie medzipredmetového prístupu a vytvorenie komplexného systému poznatkov rôznych disciplín, motivovať pre vzdelávanie a zvýšiť úroveň gramotností a kľúčových kompetencií [1-3]. Akcent na medzipredmetový prístup je stanovený Inovovaným Štátnym vzdelávacím programom (ďalej ŠVP) pre 2. stupeň základných škôl [4], Inovovaným ŠVP pre gymnáziá [5], no i ŠVP pre základné vzdelávanie [6] v súlade s cieľmi a obsahom vzdelávania 21. storočia.

Medzipredmetový prístup je možné aplikovať nielen prostredníctvom učiva, ale aj didaktickými metódami a koncepciami vzdelávania, ako je metóda hrania rolí, projektová metóda, výskumne ladená

konceptia vzdelávania (IBSE), počítačom podporované experimentovanie, či out-of-school learning.

Aktivitami z chémie s medzipredmetovými vzťahmi možno stimulovať vytvorenie komplexnejších vedomostí o rôznych prírodovedných témach, spomedzi ktorých je výraznou napríklad téma *fotosyntéza*, ktorá má potenciál pre aplikovanie poznatkov nielen zo vzdelávacej oblasti Človek a príroda, ale aj z iných vzdelávacích oblastí. Navyše, podľa zistení z dostupných štúdií, problematika (alebo téma) fotosyntézy spôsobuje problémy žiakom nielen na základných a stredných školách, ale aj študentom vysokých škôl [7-16]. Tieto zistenia sú pozoruhodné, pretože žiaci, či študenti sa stretli s týmto fyziologickým procesom v rámci vzdelávania niekoľkokrát, na rôznych predmetoch, v rôznych ročníkoch a často aj s rôznymi vyučujúcimi. Na základe poznania a identifikovania miskonceptí možno predchádzať nielen formovaniu, ale aj nevyhnutnej potrebe korekcie pôvodných miskonceptí prostredníctvom medzipredmetových prepojení a efektívnych didaktických metód, koncepcií vzdelávania, či organizačných foriem.

1 Medzipredmetové vzťahy

Pod pojmom medzipredmetové vzťahy môžeme rozumieť vzťahy medzi rôznymi predmetmi (*vertikálne vzťahy*) a medzi témami v rámci jedného predmetu (*horizontálne vzťahy*) [17].

Inovovaný ŠVP pre 2. stupeň základných škôl (*nižšie stredné vzdelávanie*) [4], ani Inovovaný ŠVP pre gymnáziá (*úplné stredné všeobecné vzdelávanie*) [5] síce nedefinujú medzipredmetové vzťahy, no hovoria o preferencii aplikácií medzipredmetového prístupu vo vyučovaní cez vzdelávacie oblasti a prierezové témy. Medzipredmetovými vzťahmi sa prelína nielen obsah, ale aj vyučovacie metódy [18]. Prostredníctvom nich možno vo výchovno-vzdelávacom prostredí systematizovať, zlučovať, zovšeobecňovať okolo vedeckých myšlienok a integrovať poznatky a zručnosti (*zásada systematickosti*) a aplikovať ich nielen medzi témami, predmetmi, či stupňami vzdelávania, ale aj medzi školou a osobným životom [1, 19-20].

V súvislosti s medzipredmetovými vzťahmi boli realizované rôzne experimenty zamerané na horizontálne prepojenia medzi matematikou a informatikou a pedagogické a digitálne technológie [3], na metódu CLIL (*Content and Language Integrated Learning*) [21], na interdisciplinárne prepojenia biológie, chémie a fyziky pre prekonanie vzdelávacích strát počas pandémie COVID-19 a výnimočného stavu na Ukrajine [22]. Ďalšími metódami na aplikovanie

medzipredmetových prepojení je didaktická hra, napr. hra *Drawing Science*, ktorá prepája poznatky z fyziky, biológie, chémie a astronómie [23]. Skúmaním projektového vyučovania v kontexte integrovaného prírodovedného vzdelávania sa zistili nielen výhody, ale aj výzvy pri jej implementácii [24]. Zaujímavá je aj metóda hrania rolí, prostredníctvom ktorej je možné zistiť jej vplyv na povahu vedy (konkrétne dočasnosť, empirickosť, viaceré metódy výskumu, subjektívnosť a teoretické rámce, sociokultúrne zakotvenie, kreativita a predstavivosť a obraz vedca), ale aj zvýšiť záujem žiakov [25-26]. Implementovaním bádateľských aktivít v prírodovednom vzdelávaní sa zaoberali viacerí autori [17, 27]. Pri aplikovaní medzipredmetových prepojení je možné využiť aj počítačom podporované experimentovanie [28-31].

2 Potenciálne témy vhodné na uplatnenie medzipredmetových prepojení na gymnáziách

Pri hľadaní vhodnej témy pre návrh výučbových aktivít s potenciálom podporovať rozvoj medzipredmetových vzťahov sa ako optimálna javí téma *fotosyntéza*, o ktorej majú žiaci často rôzne miskonceptie nielen na základných školách a stredných školách, ale aj na vysokých školách, a preto sme sa rozhodli vo vyučovaní rozvíjať medzipredmetové prepojenia pre vytvorenie holistického pohľadu a implementovať aktivizujúce didaktické metódy [7-16].

Na základe analýz vzdelávacích štandardov chémie, biológie, fyziky, slovenského jazyka a literatúry, anglického jazyka, matematiky, informatiky, dejepisu, geografie, občianskej náuky, etickej výchovy, náboženskej výchovy, telesnej a športovej výchovy, umenia a kultúry pre gymnáziá so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom [7-16] sme zaznamenali najväčší obsahový prienik chémie s predmetmi vzdelávacej oblasti *Človek a príroda* (biológia, fyzika) a s predmetom geografia, ktorý je súčasťou vzdelávacej oblasti *Človek a spoločnosť* [33-46].

Fotosyntéza sa javí ako téma, kde možno aplikovať poznatky získané na viacerých predmetoch vzdelávacej oblasti *Človek a príroda*. LearningCorner.co v materiáli (Exploring Photosynthesis: Interdisciplinary Insights for Holistic Learning / Subject Explorer / LearningCorner.co) navrhli implementovať poznatky o fotosyntéze na viacerých predmetoch (anglický jazyk, matematika, telesná a športová výchova, veda, spoločenské vedy) [47].

3 Metodika práce

Navrhnuté výučbové aktivity (okrem *(Ne)dramatizuj, veď je to fotosyntéza!*; *Návšteva záhradníctva*) sme prakticky overili so žiakmi 1. až 4. ročníka (konk. *charakteristika – probandi* pri konkrétnych vyučovacích hodinách s výučbovými aktivitami) na rôznych predmetoch. Výberový súbor sme stanovili na základe dostupného výberu.

Na overenie navrhnutých výučbových aktivít sme použili výskumný nástroj – anonymizovaný pretest a posttest. Súčasťou pretestu i posttestu bolo niekoľko položiek (konk. *výskumný nástroj* pri konkrétnych vyučovacích hodinách s výučbovými aktivitami) – identické výroky súvisiace s miskoncepciami o fotosyntéze a dýchaní rastlín identifikovanými inými autormi a vlastné výroky (testové úlohy typu správne – nesprávne).

V ďalšej časti konkretizujeme výskumný súbor a výskumný súbor navrhnutej aktivity s názvom *Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia*, ktorú sme vybrali z nami navrhnutých vyučovacích hodín.

Pretest k aktivite *Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia* sme realizovali s 21 žiakmi 3. ročníka gymnázia. Test bol anonymný, pričom si žiaci zvolili jedinečný číselný kód, ku ktorému sme pri spracovaní dát pridali Drago (z ang. *Dragon*, čiže Drak). Navrhnuté výučbové aktivity pre dvojhodinový vyučovací blok (resp. pre 2 samostatné vyučovacie hodiny) *Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia* a posttest sme realizovali s 22 žiakmi v rámci povinného predmetu *slovenský jazyk a literatúra*. Pretest a posttest k aktivite *Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia* bol tvorený 10 výroky, o ktorých pravdivosti / nepravdivosti rozhodovali žiaci: Výrok č. 1: *Dielo Drak sa vracia obsahuje prvky naturizmu.*; Výrok č. 2: *Fotosyntéza je procesom dýchania rastlín.*; Výrok č. 3: *Fotosyntéza je exergonický proces.*; Výrok č. 4: *Fotosyntéza je katabolický dej.*; Výrok č. 5: *Fotosyntézou je produkovaný kyslík.*; Výrok č. 6: *Kyslík uvoľnený rastlinami je využívaný len živočíchmi, a nie samotnými rastlinami na ich dýchanie.*; Výrok č. 7: *Rastliny produkujú kyslík v procese dýchania.*; Výrok č. 8: *Rastliny neprodukujú CO₂.*; Výrok č. 9: *Zelené rastliny dýchajú len, keď nie je k dispozícii svetelná energia.*; Výrok č. 10: *Fototropizmus a fotonastie patria medzi pohyby rastlín.* [7-9; 13; 15].

Nominálne premenné – dáta získané na základe žiackych odpovedí sme operacionalizovali, pričom sme aplikovali dichotomické skórovanie, ak žiak neodpovedal alebo odpovedal nesprávne, nezískal bod. Na základe ich súčtu sme vypočítali ordinálnu

premennú – celkové bodové skóre, ktoré sme vyjadrili v percentách ako celkové percentuálne skóre.

Stanovili sme si 2 kauzálne výskumné otázky: *Ako sa zmení validne percento správnych odpovedí pri konkrétnych výrokoch? Ako sa zmení celkové percentuálne skóre žiaka po implementácii výučbových aktivít s využitím medzipredmetových vzťahov?*

Predpokladali sme štatisticky významný rozdiel v odpovediach pri niektorých výrokoch a pri celkovom percentuálnom skóre v preteste a postteste.

Pri štatistickom spracovaní dát sme aplikovali deskriptívnu štatistiku a komparatívnu analýzu. Pri deskriptívnej štatistike porovnávame hodnoty mediánu, minima a maxima v preteste a v postteste, graficky znázorňujeme celkové percentuálne skóre v preteste a v postteste, validne percento správnych odpovedí pri konkrétnych výrokoch v preteste a v postteste a graficky znázorňujeme žiacke odpovede pri konkrétnych výrokoch v preteste a postteste.

Na základe hodnôt celkového percentuálneho skóre v preteste a v postteste sme v prostredí programu IBM SPSS ver. 22 [48] vytvorili histogramy. Na základe ich tvaru sme zistili, že dáta nemajú normálne rozdelenie ani v jednom prípade, preto sme na zistenie štatistickej významnosti aplikovali neparametrické testy (pre celkové percentuálne skóre: Wilcoxonov test súčtu znamienkových hodnôt (orig. *Wilcoxon Signed-Rank Test*) a pre rozdiel v odpovediach pri konkrétnych výrokoch: McNemarov test). Podľa Webb [49] je možné porovnať kritické hodnoty pre Wilcoxonov test súčtu znamienkových hodnôt pre zamietnutie H_0 na hladine významnosti $\alpha = 0,05$, ak je veľkosť výskumného súboru aspoň $n = 6$ (two-tailed).

Ak by sme chceli výskum zdokonaľiť a zistiť kauzálne príčiny, namiesto akčného výskumu by sme použili kvázi-experiment s experimentálnymi a kontrolnými skupinami. Pri konkrétnych výberových súboroch sme formulovali okolnosti, ktoré mohli ovplyvniť výsledky v preteste a postteste (napr. intervenujúce premenné, hawthornský efekt, realizácia viacerých výučbových aktivít s konkrétnymi výberovými súbormi, realizácia posttestu cez prestávku).

4 Výsledky a diskusia

Navrhli sme 14 vyučovacích hodín s výučbovými aktivitami z chémie súvisiacich s fotosyntézou, ktorých názvy a medzipredmetové prepojenia zobrazuje tab. 1. Keďže si niektorí žiaci mýlia procesy fotosyntézy a dýchania rastlín, rozhodli sme sa do vybraných

výučbových aktivít zahrnúť aj poznatky o dýchaní rastlín [7-15].

Tab. 1 Navrhnuté vyučovacie aktivity

Fotosyntéza a dýchanie rastlín na stanovištiach a Fyziologické procesy sú hračka!	BIO, CHE
Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia	SJL, UKL, OBN, BIO, CHE
Fotosyntéza a výroková logika	MAT, BIO, CHE, TSV
Boj o fotón	TSV, BIO, CHE
Are photosynthesis and respiration of plants the same process?	ANJ, BIO, CHE
Od flogistónovej teórie k fotosyntéze – Priestley, Lavoisier, IngenHousz (Ne)dramatizuj, veď je to fotosyntéza!	DEJ, BIO, CHE, OBN, ANJ
Návšteva záhradníctva	BIO, CHE, FYZ, SJL, DEJ, GEO, UKL
Fotosyntéza s programom ChemSketch	INF, BIO, CHE
Následníci myšlienky Descarta „Cogito, ergo sum“	SJL, OBN, GEO, BIO, CHE
Svetlo a fotosyntéza	FYZ, BIO, CHE
Dôkaz niektorých zlúčenín vystupujúcich pri dýchaní rastlín, fotosyntéza a dýchanie rastlín	BIO, CHE, FYZ
Fotosyntetické farbivá a stanovenie koncentrácie chlorofylu a a chlorofylu b	BIO, CHE, FYZ
Faktory ovplyvňujúce rast a vývin rastlín a Fotosyntetické farbivá a ich rozdelenie	BIO, CHE, FYZ

Spomedzi navrhnutých vyučovacích hodín v tomto príspevku prezentujeme jednu, aktivitu *Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia*.

Dvojhodinová vyučovacia hodina (*Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia*) s výučbovými aktivitami prepájajúcimi poznatky vzdelávacích oblastí Človek a príroda (*biológia, chémia*), Jazyk a komunikácia (*slovenský jazyk a literatúra*), Umenie a kultúra (*umenie a kultúra*), Človek a spoločnosť (*občianska náuka*) sa môže realizovať na povinnom predmete *slovenský jazyk a literatúra, umenie a kultúra*, ale aj na voliteľnom predmete *seminár zo slovenského jazyka a literatúry*.

Počas výučbových aktivít žiaci v skupinách kooperujú pri riešení úloh v pracovnom liste súvisiacich s dielom *Drak sa vracia*, ktoré sú vytvorené pre zopakovanie a lepšie porozumenie literárneho smeru

naturizmus, zopakovanie a prehĺbenie informácií o fyziologických procesoch (*pohyb rastlín, fotosyntéza, dýchanie rastlín*) a biochemických procesoch (*katabolizmus, anabolizmus*), aplikovanie vedomostí o ekosystémoch, umeleckých prostriedkoch, vetných skladoch a vetných členoch. Do pracovného listu sme zakomponovali úlohy rôznych kategórií (napr. *doplňovacie úlohy, dichotomické úlohy, polytomické úlohy, úlohy neštrukturalizované so širokou odpoveďou, úlohy s úzkou alebo krátkou odpoveďou*) zamerané na *zapamätanie, porozumenie, či aplikáciu*. Žiaci môžu počas výučbových aktivít pracovať aj s AI, čo môže podporiť ich kritické myslenie a rozvoj digitálnej gramotnosti. Kooperatívne vyučovanie sa môže uplatniť aj pri tvorbe scénok podľa úryvku z diela a pri tvorbe rozprávok o fotosyntetických farbivách. Pri výbere úryvkov sme sa zamerali aj na rozvoj afektívnej zložky osobnosti žiaka a motiváciu k hromadnej diskusii (napr. o pocitoch Draka a Šimona, postoji k Drakovi, intrapersonálnych a interpersonálnych konfliktoch). Skupinové písanie krátkej rozprávky s prvkami hovorového jazykového štýlu a rozprávacieho slohového postupu na tému *Ako pomocné fotosyntetické farbivá vyhnali chlorofyl a z chloroplastu* slúži na rozvoj soft skills, rozvoj lexiky, štylistiky, syntaxe a morfológie a aplikovanie vedomostí o jazykových štýloch a slohových postupoch, či o fotosyntetických farbivách. Žiaci tak prostredníctvom takýchto výučbových aktivít rozvíjajú aj soft skills, hard skills, viaceré gramotnosti (napr. čitateľskú, prírodovednú, umeleckú, sociálnu a emocionálnu), ale aj charakter žiaka.

Tab. 2: Didaktické metódy, organizačná forma, didaktické prostriedky

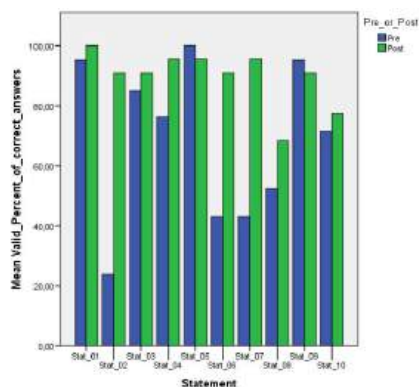
<p>Didaktické metódy: metóda KWL, kladenie cielených otázok, brainwriting, hromadný rozhovor, diskusia, práca s videoukážkou, práca s pracovným listom, práca s literárnym úryvkom, práca s IKT, práca s AI, inscenačná metóda, tvorba textu, slohová práca, rovesnícke vyučovanie</p> <p>Organizačná forma: dvojhodinová vyučovacia hodina (resp. 2 samostatné vyučovacie hodiny), skupinové vyučovanie, kooperatívne vyučovanie, frontálne vyučovanie</p> <p>Didaktické prostriedky: pracovný list (<i>Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia</i>), texty pre inscenačnú metódu (úryvky z diela <i>Drak sa vracia</i>), pracovný list (<i>Ako pomocné fotosyntetické farbivá vyhnali chlorofyl a z chloroplastu</i>), prezentácia k vyučovacej</p>

hodine (Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia) (príloha I), notebook / počítač, mobilné zariadenia pre Slido, dataprojektor

Navrhli sme aj nasledovné didaktické poznámky a odporúčania do praxe: (i) Pri opisovaní literárneho smeru *naturizmus* pripomenúť aj dielo Tri gaštanové kone (*Margita Figuli*). (ii) Učiteľ môže navrhnuté výučbové aktivity realizovať aj pri prvom stretnutí s dielom *Drak sa vracia*, nielen v rámci fixácie a aplikácie. (iii) Pri aktivitách si môžu žiaci pomôcť nástrojmi AI, no je potrebné rozvíjať ich kritické myslenie a učiť ich pracovať s týmito nástrojmi. (iv) Žiaci, ktorí vypracovali všetky úlohy skôr sa stávajú učiteľmi ostatných a pomáhajú ostatným skupinám s problémovými úlohami (*rovesnícke vyučovanie*). (v) Pri prezentovaní scénok zabezpečiť, aby bola v triede priateľská atmosféra a nenútiť hrať všetkých z akýchkoľvek príčin.

Štatistické zhodnotenie vplyvu výučbových aktivít:

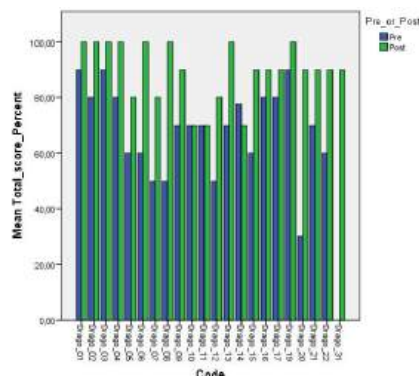
Zvýšenie percenta správnych odpovedí (Graf 1) sme sledovali pri 8 výrokoch a zníženie pri 2 výrokoch (výrok č. 5 a výrok č. 9). V preteste sme 100 % správnych odpovedí zaznamenali len pri výroku č. 5 a v postteste pri výroku č. 1. Zvýšenie počtu správnych odpovedí aspoň o 20 % sme zaznamenali pri výroku č. 2, č. 6 a č. 7.



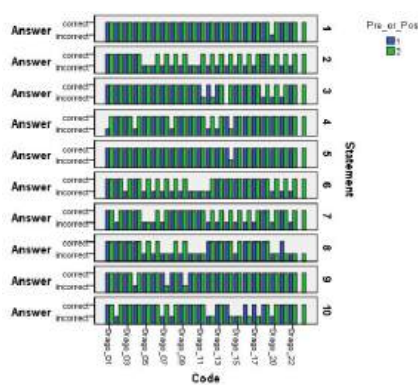
Graf 1: Validne percentá správnych odpovedí pri výrokoch v preteste a v postteste v aktivite Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia

Celkové percentuálne skóre (Graf 2) sa zmenilo pri 19 žiakoch, z ktorých sme pri 18 zaznamenali zvýšenie a pri 1 zníženie (77,78 % vs. 70 %). Dvaja mali celkové percentuálne skóre v preteste a postteste rovnaké – 70 % (Graf 2). V preteste získali najvyššie

celkové percentuálne skóre (90 %) 3 žiaci, ktorí v postteste získali maximálne skóre (100 %). Zmeny žiackych odpovedí je možné sledovať v grafe 3. Najnižšie celkové skóre (30 %) v preteste mal žiak, ktorý v postteste získal 90 %. Konzistentne nesprávne odpovedal len pri výroku č. 8. V postteste získali maximálne celkové skóre (100 %) 8 žiaci, ktorí mali v preteste rôzne skóre (50 – 90 %). Najnižšie celkové skóre (70 %) v postteste dosiahli žiaci, ktorí v preteste získali skóre (70 – 77,78 %). Najväčší pokles celkového percentuálneho skóre (o 7,78 %) mal žiak (Drago_14) a najväčší nárast (o 60 %) žiak (Drago_20).



Graf 2: Celkové percentuálne skóre v preteste a v postteste a aktivite Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia.



Graf 3: Žiacke odpovede pri konkrétnych výrokoch v preteste a v postteste v aktivite Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia

Pri výpočte mediánu, minima a maxima sme vylúčili prípady, kedy žiakovi chýbal posttest, a tak $N = 21$. Realizáciou navrhnutých výučbových aktivít s medzipredmetovými vzťahmi (*biológia, chémia, slovenský jazyk a literatúra, umenie a kultúra*) sa zvýšil

medián celkového % skóre ($MED_{PRE} = 70,00\%$ vs. $MED_{POST} = 90,00\%$), minimum ($MIN_{PRE} = 30,00\%$ vs. $MIN_{POST} = 70,00\%$) i maximum ($MAX_{PRE} = 90,00\%$ vs. $MAX_{POST} = 100,00\%$). Wilcoxonovým testom sme však zistili, že sa hodnoty celkového percentuálneho skóre v preteste ($MED_{PRE} = 70,00\%$) a v postteste ($MED_{POST} = 90,00\%$) štatisticky líšili ($W_s = 1$, $z = -3,806$, $p = 0,000$, $r = 0,83$), a tak môžeme zamietnuť hypotézu H_0 a prijať H_A : Rozdiel v celkovom percentuálnom skóre v preteste a postteste, po implementovaní výučbových aktivít s využitím medzipredmetových vzťahov, je štatisticky významný. McNemarovým testom sme skúmali, či je rozdiel v žiackych odpovediach pri výroch štatisticky významný. Štatisticky významný rozdiel v zmenách odpovedí sme zaznamenali pri výroch: č. 2 ($p = 0,000$), č. 6 ($p = 0,002$), č. 7 ($p = 0,001$). Pri výroku č. 2 (**Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.**) došlo k žiadúcej zmene odpovedí ($N \rightarrow S$) pri 14 žiakoch. Ostatní odpovedali konzistentne správne (5 žiaci), či nesprávne (2 žiaci). Pri výroku č. 6 sme zaznamenali zmeny odpovedí ($N \rightarrow S$) pri 10 žiakoch. Konzistentnými zostali 2 žiaci s nesprávnymi a 9 žiaci so správnymi odpoveďami. Pri výroku č. 7, 11 žiaci zmenili nesprávne odpovede na správne. Ostatní odpovedali konzistentne správne (9 žiaci), či nesprávne (1 žiak). Pri ostatných výroch sme nezaznamenali štatisticky významný rozdiel odpovedí.

Záver

Navrhli sme 14 vyučovacích hodín z chémie pre gymnázia (ISCED3A) s využitím medzipredmetových prepojení a rôznych aktivizujúcich didaktických metód a koncepcií vzdelávania. Niektoré z nich sme prakticky overili so žiakmi gymnázia na rôznych predmetoch. Pri niektorých aktivitách sme zistili štatisticky významný rozdiel v celkovom percentuálnom skóre v preteste a v postteste: aktivita Dobroslav Chrobák – Drak sa vracia ($W_s = 1$, $z = -3,806$, $p = 0,000$, $r = 0,83$); aktivita Fotosyntéza a výroková logika ($W_s = 16$, $z = -2,540$, $p = 0,011$, $r = 0,62$) a aktivita Dôkaz niektorých zlúčenín vystupujúcich pri dýchaní rastlín, fotosyntéza a dýchanie rastlín v skupine *biológia* ($W_s = 3$, $z = -3,826$, $p = 0,000$, $r = 0,78$), no nie v skupine *chémia* ($W_s = 18,5$, $z = -1,664$, $p = 0,096$, $r = 0,40$).

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] JANČAŘÍKOVÁ, Kateřina, BRŮNOVÁ, Linda, HEJNOVÁ, Eva, HLAVÁČOVÁ, Lucie, JANČAŘÍK, Antonín, KRÁLÍK, Jiří, KRÁTKÁ, Magdalena, KREJČÍ, Jan, KROUFEK, Roman, MATĚJČEK, Tomáš, MEDOVÁ, Janka, PELIKÁNOVÁ, Monika, SVOBODOVÁ, Silvie, ŠMÍDL, Milan, TRAHORSCH, Petr, VOJÍŘ, Karel. (2022). *Didaktické zásady v přírodovědném vzdělávání: metodická příručka pro učitele biologie, chemie, fyziky, geografie, informatiky, matematiky a lektory environmentální výchovy*. Praha: Univerzita Karlova – Pedagogická fakulta, 2022. 158 s. 2022. ISBN 978-80-7603-289-7.
- [2] KOLDOVÁ, Helena a ROKOS (2023). *Učit STEM integrovaně, nebo v mezipředmětových vztazích?* Dostupné na: <https://www.ped.muni.cz/komensky/clanky/ucit-stem-integrované-nebo-v-mezipředmětových-vztazích>
- [3] TOLKACHEVA, Elena, SERGEY Ivanov, a PODZNIÁKOV, Sergei (2022). Implementation of Horizontal Connections in the Course of Mathematics by Combining Pedagogical and Digital Technologies. *Mathematics*, 10(13), 2352.
- [4] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Nižšie stredné vzdelávanie – 2. stupeň základnej školy*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/svp_nsv_6_2_2015.pdf
- [5] Inovovaný štátny vzdelávací program pre gymnázia (úplné stredné všeobecné vzdelávanie). (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/statny_vzdel_program_pre_gymnazia.pdf
- [6] Štátny vzdelávací program pre základné vzdelávanie. (2023). Bratislava: Ministerstvo školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky. Dostupné na: https://www.minedu.sk/data/files/11808_statny-vzdelavaci-program-pre-zakladne-vzdelavanie-cely.pdf
- [7] HASLAM, Filocha a David F., TREAGUST. (1987). Diagnosing secondary students' misconceptions of photosynthesis and respiration in plants using a two-tier multiple choice instrument. *Journal of biological education*, 21(3), 203-211.
- [8] ANJARSARI, Putri (2018). The common science misconceptions in Indonesia junior high school students. *Journal of Science Education Research*, 2(1), 21-24.
- [9] SVANDOVA, Katerina. (2014). Secondary school students' misconceptions about photosynthesis

- and plant respiration: Preliminary results. *Eurasia Journal of Mathematics, Science and Technology Education*, 10(1), 59-67.
- [10] KELEŞ, Esra a KEFELI, Pinar (2010). Determination of student misconceptions in “photosynthesis and respiration” unit and correcting them with the help of cai material. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 2(2), 3111-3118.
- [11] MANURUNG, G. A., SIMANJUNTAK, L. A., & SIHOMBING, R. A. (2021). Misconceptions on the concept of photosynthesis and plant respiration for class viii at smp negeri 27 medan in science learning. *Indonesian Science Education Research (ISER)*, 3(2), 12-19.
- [12] LIAN, Lim Hooi, a PENG, Poo Yen (2021). A diagnosis of students’ misconceptions of photosynthesis and plant respiration. *Asia Pacific Journal of Educators and Education*, 36(1), 155-176.
- [13] JAYANTI, Puji (2019). Comparative study: Misconceptions on photosynthesis and respiration concepts from past to the present. *JPPS (Jurnal Penelitian Pendidikan Sains)*, 9(1), 1750-1755.
- [14] APRIANTI, Evi, SUNANDAR, Ari, a SETIADI, Anandita Eka (2025). Misconceptions about the Concept of Photosynthesis among Grade 12 Students Using the Image Analysis Method. *Journal of Biological Education Indonesia (Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia)*, 11(1), 343-350.
- [15] SÖDERVIK, Ilona, VIRTANEN, Viivi, a MIKKILÄ-ERDMANN, Mirjamaija (2015). Challenges in understanding photosynthesis in a university introductory biosciences class. *International Journal of Science and Mathematics Education*, 13(4), 733-750.
- [16] MELTA, Defrian, QALBINA, Putri, & FESTIYED, Festiyed (2023). Identification of student misconceptions on photosynthesis material using three tier test instrument. *Bioeducation Journal*, 7(2), 116-123.
- [17] ČÁBALOVÁ ŠAFRÁNKOVÁ, Dagmar, PODROUŽEK, Ladislav, KLEČKA, Milan (2016). *Mezipředmětové vztahy a badatelské metody v popularizaci vědy – chemie*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2016. Dostupné na: <https://naos-be.zcu.cz/server/api/core/bitstreams/39ecaead-e05e-42be-9e0f-f61701252207/content>
- [18] PLACHÁ, Ivana, a BÁNESZ, Gabriel (2015). Využitie medzipredmetových vzťahov v predmete Technika na základných školách. *Edukacja-Technika-Informatyka*, 6(1), 71-76.
- [19] MALACH Josef (2003). *Základy didaktiky*. Ostrava: Pedagogická fakulta, Ostravská Univerzita v Ostrave, 2003. ISBN 80-7042-266-1.
- [20] RAJABOVA, Almaz Ogtay (2021). Interdisciplinary connections in education as a pedagogical problem. *Revista on line de Política e Gestão Educacional*, 3043-3058.
- [21] KARPOVA, T. A., VOSKOVSKAYA, A. S., ANYUSHENKOVA, O. N., Digtyar, O. Y., a BOTTIGLIERO, F. (2020). Establishing interdisciplinary logical connections at the non-linguistic higher school in the process of the foreign language teaching. *Espacios*, 41(11), 5.
- [22] NEKRASOVA, M., CHAUS, H., & PROKUDA, V. (2025). Міжпредметні зв’язки як шлях подолання освітніх втрат у природничій освітній галузі. *ScienceRise: Pedagogical Education*, (1 (62)), 22-25.
- [23] SOUZA, M. A. M., DUTRA, V., MENEZES, T. B., a SILVA, J. W. (2021). Drawing Science: an interdisciplinary, playful, and inclusive proposal. *arXiv preprint arXiv:2109.10748*.
- [24] HAATAINEN, Outi, a AKSELA, Maija (2021). Project-based learning in integrated science education: Active teachers’ perceptions and practices. *LUMAT: International Journal on Math, Science and Technology Education*, 9(1), 149-173.
- [25] CAKICI, Yilmaz, a BAYIR, Eylem (2012). Developing children’s views of the Nature of Science through role play. *International Journal of Science Education*, 34, 1075-1091.
- [26] AMEYAW, Yaw, a MANTE, Alex Gyan (2025). Effect of Role-Play Teaching Method on Science Students’ Interest in Teaching and Learning of Photosynthesis. *Open Access Library Journal*, 12(3), 1-18.
- [27] KIREŠ, Marián, JEŠKOVÁ, Zuzana, GANAJOVÁ, Mária, a KIMÁKOVÁ, Katarína (2016). *Bádatelské aktivity v prírodovednom vzdelávaní. Časť B*. Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/nove_dokumenty/ucebnice-metodiky-publikacie/badatelske-aktivity/04cast_b_chemia_web.pdf
- [28] KOSTELNÍKOVÁ, Michaela, a TKÁČ, Lukáš. Počítačom podporované experimenty s podporou systému ISES v prírodovednom vzdelávaní. *Tvorivý učiteľ fyziky V, Národný festival fyziky 2012: zborník*, 158-165.
- [29] SKORŠEPA, Marek (2015). *Počítačom podporované experimenty v prírodovednom vzdelávaní*. Banská Bystrica: Belianum

- (Vydavateľstvo UMB), 2015, 187 s. ISBN 978-80-557-0898-0.
- [30] SKORŠEPA, Marek; STRATILOVÁ URVÁLKOVÁ, Eva, ŠMEJKAL, Petr, TEPLÝ, Pavel (2015). Zo života kvasiniek – príklad školského experimentu s podporou digitálnych meracích zariadení. In: *Biológia, ekológia, chémia*. roč. 19, 2015, č. 1, s 11-15. ISSN 1338-1024.
- [31] SKORŠEPA, Marek, KMEŤOVÁ, Jarmila a HORVÁTHOVÁ, Erika (2020). Tablet alebo notebook? Komparatívna štúdia žiakovho vnímania rozdielnych technologických prístupov v počítačom podporovanom chemickom laboratóriu. *Scientia in educatione*, 11(1), 82-96.
- [32] SKORŠEPA, Marek a MELICHERČÍK, Milan (2001). Zaujímavé kontinuálne merania z chémie uskutočňované SM Systémom. In Proceedings of II. Conference for Ph.D. students (pp. 254–258). Nitra, FPV UKF.
- [33] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Chémia – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/chemia_g_4_5_r.pdf
- [34] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Biológia – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/biologia_g_4_5_r.pdf
- [35] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Fyzika – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/fyzika_g_4_5_r.pdf
- [36] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Slovenský jazyk a literatúra – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/sk/svp/inovovany-statny-vzdelavaci-program/inovovany-svp-gymnazia-so-stvorrocny-m-patrocnym-vzdelavacim-programom/jazyk-komunikacia/slovensky_jazyk_a_literatura_g_4_5_r_novy.pdf
- [37] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Anglický jazyk, úroveň B2 – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/anglicky_jazyk-uroven_b2_g_4_5_r.pdf
- [38] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Matematika – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/matematika_g_4_5_r.pdf
- [39] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Informatika – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/informatika_g_4_5_r.pdf
- [40] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Dejepis – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/dejepis_g_4_5_r.pdf
- [41] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Geografia – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/geografia_g_4_5_r.pdf
- [42] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Občianska náuka – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/obcianska_nauka_g_4_5_r.pdf
- [43] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Etická výchova – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom*. (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/eticka_vychova_g_4_5_r.pdf

- [44] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Náboženská výchova / náboženstvo katolícka cirkev – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom.* (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/nabozenska_vychova_nabozenstvo_katolicka_cirkev_g_4_5_r.pdf
- [45] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Telesná a športová výchova – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom.* (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/telesna_a_sportova_vychova_g_4_5_r.pdf
- [46] Inovovaný štátny vzdelávací program. *Umenie a kultúra – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom.* (2015). Bratislava: Štátny pedagogický ústav. Dostupné na: https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/umenie_a_kultura_g_4_5_r.pdf
- [47] LearningCorner.co. (n.d.). *Exploring Photosynthesis: Interdisciplinary Insights for Holistic Learning / Subject Explorer.* LearningCorner.co. Dostupné na: <https://learningcorner.co/get-pdf/activity/228628>
- [48] IBM Corp., (2013). *IBM SPSS Statistics.* Softvér. Verzia 22.0. IBM Corp.
- [49] WEBB, Rachel (2021). *Wilcoxon Signed-Rank Test.* Mostly harmless statistics. Akt. 2024-06-06. Dostupné na: [https://stats.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Statistics/Mostly_Harmless_Statistics_\(Webb\)/13%3A_Nonparametric_Tests/13.04%3A_Wilcoxon_Signed-Rank_Test](https://stats.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Statistics/Mostly_Harmless_Statistics_(Webb)/13%3A_Nonparametric_Tests/13.04%3A_Wilcoxon_Signed-Rank_Test)

Postoje učiteľov odborných ekonomických predmetov ku kontinuálnemu vzdelávaniu a ich vplyv na profesijný rozvoj

Attitudes of teachers of vocational economic subjects towards continuing professional education and its impact on professional development

Patrik Staňo¹ – Jarmila Hudáková²

^{1,2}Ústav ekonomiky a manažmentu, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹patrik.stano@student.ukf.sk, ²jhudakova@ukf.sk

Abstrakt

Kontinuálne vzdelávanie pedagogických a odborných zamestnancov predstavuje významný predpoklad zvyšovania kvality vzdelávania v oblasti odborných ekonomických predmetov. Príspevok sa zameriava na identifikáciu faktorov, ktoré ovplyvňujú kvalitu a efektivitu kontinuálneho vzdelávania učiteľov, a na zistenie ich názorov, skúseností a postojov k ďalšiemu vzdelávaniu. Teoretické východiská vychádzajú z analýzy legislatívnych rámcov profesijného rozvoja, druhov kontinuálneho vzdelávania a ich prínosov pre výchovno-vzdelávací proces. Empirická časť je založená na analýze výsledkov dotazníkového prieskumu realizovaného medzi učiteľmi odborných ekonomických predmetov pôsobiacimi na stredných odborných školách. Údaje boli spracované pomocou deskriptívnej štatistiky, chí-kvadrát testu a výpočtu koeficientu Cramérovo V. Príspevok prináša súhrn názorov, postojov a skúseností učiteľov odborných ekonomických predmetov na kvalitu, formy a možnosti vzdelávacích programov a na základe zistení formuluje odporúčania pre prax.

Kľúčové slová: kontinuálne vzdelávanie, profesijný rozvoj učiteľov, odborné ekonomické predmety, stredné odborné školy

Abstract

Continuous professional education of teachers and other educational professionals represents a key prerequisite for improving the quality of education in the field of vocational economic subjects. The paper focuses on identifying factors that influence the quality and effectiveness of teachers' continuing professional education, as well as on exploring their opinions, experiences, and attitudes toward further education. The theoretical frameworks are based on the analysis of statutory framework of professional development,

types of continuing education, and their benefits for the educational process. The empirical section is based on the analysis of data obtained from a questionnaire survey, conducted among teachers of vocational economic subjects working at secondary vocational schools. The data were processed using descriptive statistics, the chi-square test, and Cramér's V coefficient. The paper provides a summary of the opinions, attitudes, and experiences of vocational economic subject teachers regarding the quality, forms, and possibilities of educational programmes, and on the basis of the findings formulates recommendations implementable in praxis.

Key Words: continuing professional education, teacher professional education, vocational economic subjects, secondary vocational schools

Úvod

Oblasť ekonomického vzdelávania svojou podstatou zaraďujeme medzi kľúčové prvky, ktoré sa vyznačujú vysokou mierou variability v súčinnosti s aktuálnym vývojom na národnej aj medzinárodnej úrovni. Prostredníctvom odborných ekonomických predmetov na stredných odborných školách sa rámec povedomia o ekonomických problematikách rozširuje a prepája s praktickou rovinou vzdelávania. Nevyhnutnou podmienkou zabezpečenia kvalitného a efektívneho výchovno-vzdelávacieho procesu je disponovanie kvalifikovanými pedagogickými a odbornými zamestnancami v oblasti ekonomiky. S dynamikou ekonomickej problematiky sa spája aj potreba neustálej aktualizácie odborných znalostí, ktorú pedagogickí a odborní zamestnanci zabezpečujú prostredníctvom kontinuálneho vzdelávania. Kvalita a efektivita poskytovaných programov zameraných na kontinuálne vzdelávanie sú považované za kľúčový prvok udržania rovnocenného vzdelávacieho štandardu v porovnaní s medzinárodnými úrovňami vzdelávania.

Identifikovanie faktorov, ktoré ovplyvňujú výber, realizáciu a praktickú využiteľnosť zručností získaných z jednotlivých programov, nepredstavuje pridanú hodnotu iba pre zúčastneného zamestnanca, ale vytvára rámec činností podporujúcich zvýšenie kvality realizovaného vyučovania v širokej škále odborných ekonomických predmetov. Dôležitým prvkom udržania kvality poskytovaného vzdelávania na stredných odborných školách je preto zameranie sa na skúsenosti a názory pedagogických a odborných zamestnancov v oblasti ďalšieho vzdelávania. Získanie informácií o rozsahu absolvovaných programov, dostupných možnostiach, motivačných prvkoch, bariérach a podmienkach ich realizácie umožňuje identifikovať oblasti, ktoré si vyžadujú zapracovanie zmien smerujúcich k zvýšeniu kvality vzdelávania prostredníctvom odporúčaní pre poskytovanie ďalších vzdelávacích programov.

1 Metodika

Teoretické východiská uvedené v práci boli spracované na základe analýzy legislatívnych rámcov zachytávajúcich aktuálne podmienky, formy a druhy vzdelávania. Informácie z monografií, elektronických zdrojov a odborných článkov získaných z recenzovaných databáz Scopus, ScienceDirect a Web of Science boli spracované prostredníctvom metódy vysvetľujúceho opisu formou interpretácie získaných poznatkov.

Získanie skúseností, postojov a názorov na oblasť kontinuálneho vzdelávania bolo realizované prostredníctvom dotazníkového prieskumu vytvoreného v prostredí Google Formuláre a distribuovaného na e-mailové adresy 84 stredných odborných škôl s ekonomickým zameraním na území Slovenskej republiky. Anonymný dotazník obsahoval 19 otázok, z toho 14 uzatvorených, 4 polouzatvorené a 1 otvorenú. Časť uzatvorených otázok bola zameraná na získanie údajov prostredníctvom 5-stupňovej Likertovej škály. Na vyhodnotenie dát bola použitá deskriptívna štatistika, pričom výsledky boli spracované pomocou tabuliek, grafov a základných štatistických charakteristík. V rámci prieskumu boli stanovené dve výskumné otázky:

VO1: Existuje rozdiel v záujme o kontinuálne vzdelávanie medzi učiteľmi s pedagogickou praxou do 10 rokov a učiteľmi s praxou nad 10 rokov?

VO2: Súvisí dĺžka pedagogickej praxe učiteľov s počtom absolvovaných programov kontinuálneho vzdelávania?

K výskumným otázkam boli sformulované hypotézy, ktoré boli následne štatisticky testované pomocou chí kvadrát testu, výpočtu koeficientu Cramérovo V a neparametrického Mann-Whitneyho U testu. Analýza údajov bola realizovaná pomocou softvéru Real Statistics Resource Pack (Release 8.8.2).

2 Teoretické východiská profesijného rozvoja učiteľov

Profesijný rozvoj pedagogických a odborných zamestnancov predstavuje významný prvok zvyšovania kvality vzdelávania. V širšom kontexte je chápaný ako kontinuálny proces získavania a zdokonaľovania vedomostí, schopností, zručností a individuálnych predispozícií, ktoré umožňujú pedagogickým a odborným zamestnancom efektívne vykonávať svoju činnosť s dôrazom na aplikáciu inovácií do výchovno-vzdelávacieho procesu [1].

Kontinuálne vzdelávanie je neoddeliteľnou súčasťou celoživotného vzdelávania počas profesionálneho života zamestnanca. Hlavným cieľom ďalšieho vzdelávania je vytváranie a zabezpečenie rovnakých príležitostí v pracovnej aj osobnej oblasti [2]. Pri ďalšom vzdelávaní hovoríme o kontinuálnom procese založenom na systematickosti, ktorý plynulo nadväzuje na pregraduálne vzdelávanie počas celoživotného výkonu učiteľského povolania s dôrazom na rozvíjanie profesijných kompetencií. Uvedený proces je nevyhnutný pre reformu vzdelávacieho systému a zároveň predstavuje spôsob, akým je možné modifikovať aktuálne vyučovacie metódy s cieľom ich inovácie prostredníctvom nových prístupov v globálnom kontexte [3]. Cieľom ďalšieho vzdelávania je naplniť tri základné roviny, ktoré spoločne tvoria systém odborného rozvoja pedagogických a odborných zamestnancov. Prvou je individuálna rovina, ktorá súvisí s nevyhnutnou aktualizáciou poznatkov potrebných na uplatňovanie nových trendov vo výchovno-vzdelávacom procese. Druhou je variabilná rovina zameraná na prispôsobenie sa rýchlo sa meniacim podmienkam, vrátane nepredvídateľných udalostí. Treťou je kreatívna rovina, ktorá predstavuje neoddeliteľnú súčasť rozvoja pri tvorbe vlastných poznatkov a inovatívnych nápadov [4].

Profesijný rozvoj pedagogických a odborných zamestnancov je upravený zákonom č. 138/2019 Z. z. o pedagogických zamestnancoch a odborných zamestnancoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov, ktorý definuje kvalifikačné predpoklady, kariérové stupne a formy ďalšieho vzdelávania. Kontinuálne vzdelávanie je možné realizovať

prostredníctvom jednotlivých druhov ďalšieho vzdelávania, medzi ktoré zaraďujeme kvalifikačné, inovačné, aktualizčné, predatestačné, adaptačné, špecializačné a funkčné vzdelávanie. Kvalifikačné vzdelávanie je zamerané na získanie vzdelania, ktoré pedagogickému alebo odbornému zamestnancovi umožní výkon pracovnej činnosti v príslušnej kategórii alebo podkategórii, prípadne v inej ako pôvodnej kategórii. Zároveň umožňuje rozšírenie aprobácie na vyučovanie ďalších predmetov vyplývajúcich zo štátneho vzdelávacieho programu, ako aj pôsobenie v triedach a vzdelávacích inštitúciách určených pre deti a žiakov so špeciálnymi výchovno-vzdelávacími potrebami. Inovačné vzdelávanie je zamerané na rozšírenie alebo nadobudnutie nových inovatívnych kompetencií, ktoré je možné využiť pri praktickej realizácii vyučovania. Aktualizačné vzdelávanie sa zameriava na udržiavanie profesijných kompetencií a nadobúdanie nových vedomostí týkajúcich sa platnej legislatívy, pedagogických dokumentov a nových predpisov. Predatestačné vzdelávanie je orientované na získanie profesijných kompetencií potrebných na zaradenie pedagogického alebo odborného zamestnanca do vyššieho kariérového stupňa. Adaptačné vzdelávanie je zamerané na získanie profesijných kompetencií nevyhnutných na zaradenie pedagogického alebo odborného zamestnanca do kariérového stupňa samostatný. Špecializačné vzdelávanie je koncipované na získanie profesijných kompetencií využiteľných pri výkone špecializačných činností. Posledným typom je funkčné vzdelávanie, prostredníctvom ktorého sa získavajú profesijné kompetencie potrebné na výkon činnosti vedúceho pedagogického alebo odborného zamestnanca [5].

Význam profesijného rozvoja pedagogických a odborných zamestnancov nespočíva len v jeho legislatívnom vymedzení, ale predovšetkým v prínosoch pre zvyšovanie kvality a efektivity výchovno-vzdelávacieho procesu, na ktoré poukazuje viacero výskumov. Profesijný rozvoj prispieva k zvyšovaniu efektívnosti pedagogických a odborných zamestnancov prostredníctvom využívania účinnejších vyučovacích metód a techník, zlepšuje kvalitu výchovno-vzdelávacieho procesu implementáciou inovatívnych prístupov, podporuje rozvoj inštitúcie a kolegiálnych vzťahov a zároveň napomáha udržiavaniu odbornosti a aktuálnosti poznatkov v ekonomických oblastiach [6].

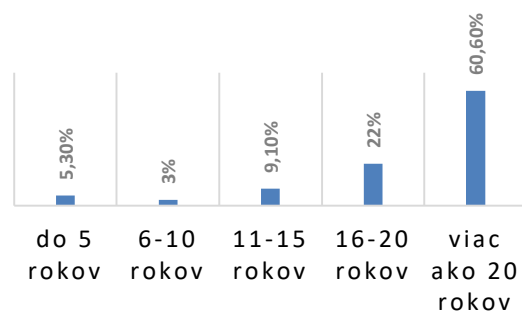
Napriek legislatívnemu vymedzeniu a komplexnému významu kontinuálneho vzdelávania pre profesijný rozvoj pedagogických a odborných zamestnancov je nevyhnutné venovať osobitnú

pozornosť skúsenostiam, postojom a názorom samotných učiteľov z pedagogickej praxe na jednotlivé vzdelávacie programy. Individuálne poznatky o absolvovaných programoch predstavujú významný zdroj informácií pre hodnotenie ich kvality a efektivity v reálnych podmienkach stredných odborných škôl.

3 Výsledky a diskusia

Výskum bol realizovaný formou dotazníkovej metódy, pričom výskumnú vzorku tvorili učitelia odborných ekonomických predmetov z 84 stredných odborných škôl. Prvá časť dotazníka obsahovala otázky demografického charakteru, prostredníctvom ktorých sme zisťovali pohlavie, vek, kraj výkonu pedagogickej činnosti, dosiahnuté vzdelanie, dĺžku pedagogickej praxe a dosiahnutý kariérny stupeň. Druhá časť dotazníka bola zameraná na kontinuálne vzdelávanie, kde sme zisťovali, či zamestnávateľ poskytuje možnosť účasti na vzdelávacích programoch, vzdialenosť miesta ich realizácie, počet úspešne absolvovaných programov, druh a formu vzdelávania, dôvody účasti a aktuálnu participáciu na vzdelávaní v školskom roku 2024/2025.

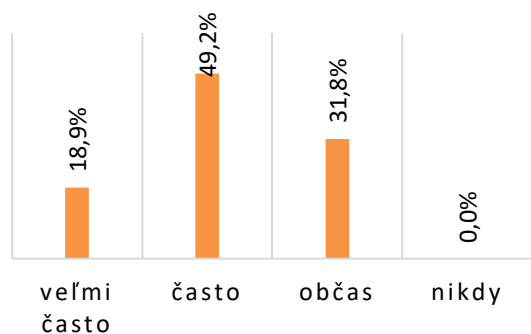
Z celkového počtu 132 respondentov, ktorí poskytli platné odpovede, tvorilo ženské pohlavie 96,2 % a mužské 3,8 %. Dĺžku pedagogickej praxe respondenti označovali v piatich kategóriách, ktorých výsledky uvádzame v grafickom vyhotovení.



Graf 1 Dĺžka pedagogickej praxe

Najmenší podiel z celkového počtu platných odpovedí predstavovala kategória 6 – 10 rokov s hodnotou 3 %. O niečo vyšší podiel zaznamenala kategória do 5 rokov s hodnotou 5,3 %. Percentuálny podiel kategórie od 11 do 15 rokov dosiahol 9,1 %. Na druhej priečke z hľadiska zastúpenia respondentov sa umiestnila kategória 16 – 20 rokov s podielom 22 %. Najväčší percentuálny podiel, zároveň nadpolovičnú väčšinu, predstavovala kategória viac ako 20 rokov s hodnotou 60,6 %. Z uvedených údajov môžeme

konštatovať, že v prieskume výrazne prevládali pedagogickí a odborní zamestnanci s dlhoročnou praxou. Do dotazníka bola zaradená aj otázka zameraná na zistenie miery poskytovania možnosti zúčastňovať sa kontinuálnych vzdelávacích programov, prostredníctvom ktorej sme zisťovali mieru podpory profesijného rastu zo strany vedenia školy.



Graf 2 Miera podpory profesijného rastu od zamestnávateľa

Výsledky tejto položky dotazníka hodnotíme prevažne pozitívne, keďže ani jeden respondent neoznačil možnosť, ktorá by poukazovala na neochotu zamestnávateľa podporovať profesijný rozvoj. Kategóriu „veľmi často“ označilo 18,9 % respondentov. Druhou najčastejšie zvolenou odpoveďou bola možnosť „občas“ s percentuálnym podielom 31,8 %. Najväčší podiel dosiahla kategória „často“ s hodnotou 49,2 %. Uvedené výsledky naznačujú podporu profesijného rozvoja pedagogických a odborných zamestnancov zo strany zamestnávateľa. Respondentov sme sa pýtali aj na vzdialenosť miesta realizácie vzdelávacích programov. Najväčšia časť respondentov (51,5 %) uviedla, že majú možnosť zúčastniť sa vzdelávania priamo v mieste pracoviska. Ďalších 22 % respondentov uviedlo, že za vzdelávaním dochádzajú do vzdialenosti maximálne 30 km. V prieskume sa nachádzali aj respondenti (18,9 %), ktorí musia za vzdelávacími programami dochádzať viac ako 30 km. Uvedené výsledky poukazujú na relatívne dobrú dostupnosť vzdelávacích programov pre väčšinu pedagogických a odborných zamestnancov, hoci časť z nich musí cestovať na väčšie vzdialenosti, čo môže ovplyvniť ich záujem o účasť na vzdelávacích aktivitách. Z celkového počtu platných odpovedí 14,7 % respondentov uviedlo, že sa zúčastnili vzdelávacích aktivít v zahraničí. V nasledujúcej položke dotazníkového prieskumu sme zisťovali počet absolvovaných vzdelávacích programov.

	Počet absolvovaných programov				
	0	1	2-3	4-5	viac ako 5
Prax do 10 rokov	2	3	3	3	0
Prax nad 10 rokov	0	1	42	23	55

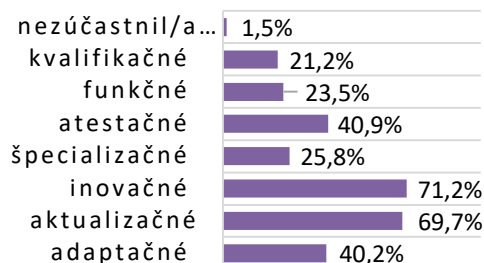
Tab. 1 Počet absolvovaných vzdelávacích programov

Najväčší podiel (41,7 %) predstavovala kategória viac ako 5 absolvovaných programov. Nasledovala kategória 2 – 3 absolvované programy s podielom 34,1 % a kategória 4 – 5 absolvovaných programov s hodnotou 19,7 %. Jedného vzdelávacieho programu sa zúčastnilo 3 % respondentov, pričom iba 1,5 % uviedlo, že neabsolvovali žiadny program kontinuálneho vzdelávania. Pri analýze výsledkov sme využili testovanie kvalitatívnych znakov pomocou Pearsonovho chí-kvadrát testu v kombinácii s výpočtom koeficientu Cramérovo V. Výpočty boli realizované prostredníctvom softvéru Real Statistics. Stanovili sme si dve hypotézy:

H₀: Dĺžka pedagogickej praxe nesúvisí s počtom absolvovaných programov.

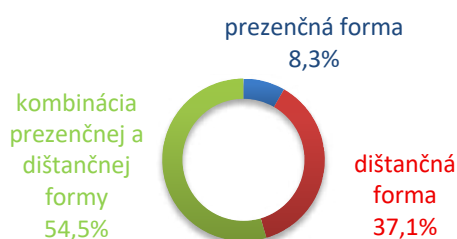
H₁: Dĺžka pedagogickej praxe súvisí s počtom absolvovaných programov.

Po vykonaní testovania sme získali nasledujúce výsledky: $\chi^2 = 50,79$; p-hodnota = 0,00000000247; Cramérovo V = 0,620; $\alpha = 0,05$; $p < \alpha$. Pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$ zamietame nulovú hypotézu. Výsledky chí-kvadrát testu potvrdili štatisticky významný vzťah medzi dĺžkou pedagogickej praxe a počtom absolvovaných programov. Hodnota koeficientu Cramérovo V = 0,620 poukazuje na silnú mieru asociácie medzi sledovanými premennými. Ďalšia položka dotazníka bola zameraná na preferovaný výber druhov kontinuálneho vzdelávania. Respondenti mali možnosť vybrať si z adaptačného, aktualizáčného, inovačného, špecializačného, atestačného, funkčného a kvalifikačného vzdelávania.



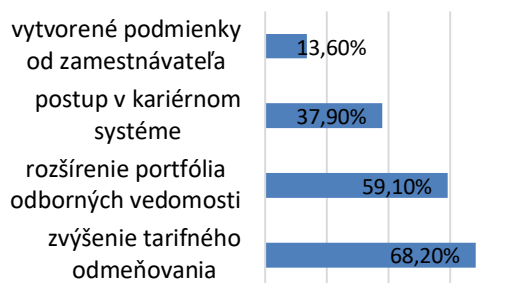
Graf 3 Druh absolvovaného vzdelávania

Najväčší percentuálny podiel (71,2 %) získala kategória inovačného vzdelávania. Tesne za ňou sa umiestnila kategória aktualizáčného vzdelávania s hodnotou 69,7 %. Tretie miesto obsadilo atestačné vzdelávanie (40,9 %). S veľmi podobným podielom (40,2 %) nasledovalo adaptačné vzdelávanie. Špecializačné vzdelávanie zaznamenalo účasť 25,8 %, funkčné vzdelávanie 23,5 % a kvalifikačné vzdelávanie 21,2 %. Z celkového počtu 132 platných odpovedí iba 1,5 % respondentov uviedlo, že sa nezúčastnili žiadneho programu kontinuálneho vzdelávania. Pri otázke zameranej na preferenciu formy realizácie kontinuálneho vzdelávania mali respondenti možnosť vybrať si z prezenčnej, dištančnej a kombinovanej formy.



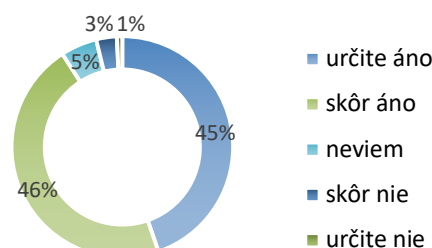
Graf č 4 Preferovaná forma kontinuálneho vzdelávania

Najväčší záujem prejavili respondenti o kombinovanú formu vzdelávania, ktorá zahŕňa prezenčné aj dištančné vzdelávanie (54,5 %). Druhou najpreferovanejšou formou bolo výhradne dištančné vzdelávanie (37,1 %). Najnižší podiel odpovedí získala prezenčná forma vzdelávania s hodnotou 8,3 %. V nasledujúcej položke sme sa zamerali na hlavné dôvody, ktoré respondentov viedli k účasti na kontinuálnom vzdelávaní.



Graf č 5 Dôvod účasti na kontinuálnom vzdelávaní

Z celkového počtu 132 získaných odpovedí žiadny respondent nevyužil možnosť doplniť vlastnú odpoveď. Najmenej zastúpenou kategóriou bol výber na základe vytvorených podmienok zo strany zamestnávateľa (13,6 %). Druhou najčastejšie zvolenou kategóriou bol postup v kariérom systéme (37,1 %). Nadpolovičnú väčšinu tvorila motivácia zameraná na rozšírenie odborných vedomostí, ktorú si zvolilo 59,1 % respondentov. Najvyšší podiel respondentov, až 68,2 %, uviedol ako dôvod absolvovania vzdelávania zvýšenie tarifného odmeňovania. Zaujímavým zistením je, že podnet na účasť na kontinuálnom vzdelávaní vychádzal najmä z vlastnej iniciatívy pedagogických a odborných zamestnancov (56,8 %). Podnet zo strany vedenia školy uviedlo 21,2 % respondentov, motiváciu vyplývajúcu zo zmien v školskej legislatíve 15,9 % respondentov a najmenej podnetov prichádzalo od kolegov (6,1 %). Väčšina respondentov (64,4 %) zároveň uviedla, že účasť na týchto vzdelávaníach bola pre nich zaujímavá. V ďalšej otázke sme zisťovali, či majú respondenti záujem zúčastniť sa v budúcnosti akreditovaných vzdelávacích programov.



Graf č 6 Záujem o vzdelávanie v budúcnosti

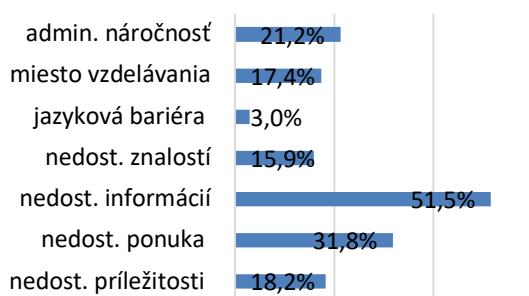
Učítelia odborných ekonomických predmetov najčastejšie označili odpoveď „skôr áno“ (46,2 %). Druhou najčastejšou odpoveďou bola možnosť „určite áno“, ktorú zvolilo 44,7 % respondentov. Neutrálnu odpoveď „neviem“ označilo 5,3 % opýtaných a odpoveď „skôr nie“ uviedlo 3 % respondentov. V tejto dotazníkovej položke sme porovnávali dve nezávislé skupiny učiteľov – s pedagogickou praxou do 10 rokov a s praxou nad 10 rokov. Na vyhodnotenie rozdielov medzi týmito skupinami sme použili neparametrický Mann-Whitneyho U test, prostredníctvom ktorého sme zisťovali, či je rozdiel v rozdelení odpovedí medzi skupinami štatisticky významný. Dáta boli testované na normalitu a zistili sme, že nepochádzajú zo súboru s

normálnym rozdelením, preto predpoklad normality nebol splnený. Stanovili sme si dve hypotézy:

H_0 : V prejavenom záujme o kontinuálne vzdelávanie medzi učiteľmi s praxou do 10 rokov a učiteľmi s praxou nad 10 rokov nie je rozdiel.

H_1 : V prejavenom záujme o kontinuálne vzdelávanie medzi učiteľmi s praxou do 10 rokov a učiteľmi s praxou nad 10 rokov je rozdiel.

Výsledky testovania boli nasledovné: p -hodnota = 0,789; $\alpha = 0,05$; $p > \alpha$. Výsledky Mann-Whitneyho U testu ukázali, že medzi učiteľmi s praxou do 10 rokov a učiteľmi s praxou nad 10 rokov nie je štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Na základe dostupných údajov nemožno zamietnuť nulovú hypotézu, a teda nebolo preukázané, že by sa záujem o účasť na akreditovaných vzdelávacích programoch medzi týmito skupinami učiteľov štatisticky odlišoval. Respondentov sme sa pýtali aj na najväčšie prekážky pri absolvovaní kontinuálneho vzdelávania.



Graf 7 Prekážky v absolvovaní vzdelávacích programov

Učelia odborných ekonomických predmetov uvádzali rôzne prekážky pri absolvovaní programov kontinuálneho vzdelávania. Za najčastejšiu prekážku označili nedostatok informácií o ponúkaných akreditovaných vzdelávacích programoch (51,5 %). Druhou najčastejšou prekážkou bola nedostatočná ponuka akreditovaných programov (31,8 %). Administratívna náročnosť sa umiestnila na treťom mieste s podielom 21,2 %. Skúsenosť s nedostatočnou podporou zo strany zamestnávateľa uviedlo 18,2 % respondentov. Miesto realizácie vzdelávacieho programu považovalo za prekážku 17,4 % opýtaných. Nedostatočnú odbornú znalosť lektorov, ktorá podľa respondentov znižovala kvalitu vzdelávania, označilo 15,9 % zúčastnených. Respondenti mali možnosť uviesť aj vlastné prekážky, z ktorých sme parafrázovali najčastejšie odpovede. Niektorí uvádzali, že sú často nútení absolvovať aktualizácie vzdelávania zo zákona

pod tlakom zamestnávateľa, pričom v praxi často nie je možné nové získané poznatky uplatniť. Ďalšou významnou prekážkou bolo nastavenie pracovného úväzku, ktorý často presahuje 25 hodín týždenne, čo je spôsobené najmä suplovaním za kolegov.

Posledná položka dotazníkového prieskumu bola zameraná na odporúčania učiteľov odborných ekonomických predmetov v oblasti zlepšenia kontinuálneho vzdelávania. Najčastejšie návrhy sa týkali rozšírenia tematického zamerania vzdelávania s dôrazom na aktuálne potreby praxe, napríklad v oblasti psychológie, efektívnej komunikácie so žiakmi, overených postupov pri riešení problémových situácií či reakcií v život ohrozujúcich situáciách. Ako prioritná oblasť sa ukázala aj potreba zapojenia nových lektorov do vedenia kurzov, najmä pedagógov s dlhoročnou praxou. Odporúčania sa týkali aj legislatívneho rámca kreditového hodnotenia, pričom respondenti kritizovali súčasný systém kreditov a navrhovali jeho prepracovanie, najmä s dôrazom na predĺženie platnosti už získaných kreditov. Respondenti poukázali aj na potrebu rozšírenia ponuky vzdelávacích programov zameraných na odborné ekonomické predmety, ktoré by pomohli riešiť konkrétne situácie a výzvy v tejto oblasti namiesto všeobecných vzdelávacích tém. Častou požiadavkou bola aj úprava rozsahu dní vyhradených na vzdelávanie s možnosťou náhrady mzdy počas neprítomnosti na vyučovaní. Rovnako sa objavovali odporúčania týkajúce sa zvýšenia podielu dištančných foriem vzdelávania, najmä z dôvodu dostupnosti pre pedagógov z odľahlejších regiónov. Významnou oblasťou odporúčaní bola aj potreba podpory individuálnej voľby účasti a výberu tém vzdelávania, keďže viacerí respondenti poukázali na negatívny tlak zo strany zamestnávateľov, ktorí často striktno určujú témy vzdelávania bez ohľadu na individuálne potreby pedagógov. Z uvedených odporúčaní vyplýva, že respondenti poskytli rôznorodé a podnetné návrhy na zlepšenie systému kontinuálneho vzdelávania, ktoré môžu prispieť k vytvoreniu efektívnejšieho a systematickejšie nastaveného modelu vzdelávania na území Slovenskej republiky.

3.1 Faktory ovplyvňujúce kvalitu a efektívnosť kontinuálneho vzdelávania učiteľov

Na základe analýzy aktuálnych prístupov, legislatívnych rámcov a skúseností pedagogických a odborných zamestnancov s kontinuálnym vzdelávaním sme identifikovali základné faktory, ktoré ovplyvňujú kvalitu a efektívnosť poskytovaného kontinuálneho vzdelávania

učiteľov. Programy zamerané na kontinuálne vzdelávanie sú ovplyvňované viacerými faktormi, ktoré vyplývajú z potreby neustálej aktualizácie odborných vedomostí v súlade so zmenami dynamicky sa rozvíjajúceho ekonomického prostredia. V nadväznosti na tieto zmeny je zo strany poskytovateľov vzdelávacích programov nevyhnutné zapracovanie aktuálnych legislatívnych rámcov, finančných stratégií, zvyšujúcej sa miery digitalizácie a ďalších čiastkových zmien súvisiacich so samotnou realizáciou vzdelávacích aktivít.

Prvá skupina faktorov sa zameriava na systémové a inštitucionálne oblasti, medzi ktoré zaraďujeme legislatívne rámce upravujúce formy organizácie a odmeňovanie za absolvovanie vzdelávacích programov, geografickú dostupnosť akreditovaných programov a finančné možnosti vyčlenené na realizáciu vzdelávania zamestnancov školstva. Druhá skupina faktorov je orientovaná na osobnosť a profesijný rast pedagógov. Zahŕňa motiváciu vychádzajúcu z vlastnej iniciatívy, podporu zo strany vedenia školy a kolegov, mieru iniciatívy vedenia školy pri zvyšovaní kvalifikácie zamestnancov, časovú dostupnosť vzdelávania počas pracovnej doby a individuálne skúsenosti s predchádzajúcimi programami. Tretia skupina faktorov súvisí s organizačnou stránkou vzdelávania. Kľúčovým prvkom je flexibilita formy vzdelávania, teda kombinácia prezenčnej a dištančnej formy, ako aj administratívne zaťaženie a prehľadnosť ponuky aktuálnych programov v elektronickej podobe. Posledná skupina faktorov sa zameriava na prepojenie obsahu vzdelávania s technológiami. Ide najmä o aktuálnosť programov priamo využiteľných v praxi, prepájanie teoretickej a praktickej časti prostredníctvom modelových situácií z ekonomického prostredia, kvalitu lektorov – odborníkov z praxe – a digitálne možnosti a gramotnosť pedagogických a odborných zamestnancov.

Z uvedených faktorov vyplýva ich vzájomná prepojenosť a poukázanie na kľúčové prvky súvisiace s financovaním, motiváciou zamestnancov, flexibilitou rozsahu a času vzdelávania, aktuálnosťou programov, kvalitou lektorov a podporou prepojenia teoretických poznatkov s praxou.

Záver

Výsledky realizovaného dotazníkového prieskumu poukazujú na to, že učitelia odborných ekonomických predmetov vnímajú kontinuálne vzdelávanie ako významnú súčasť svojho profesijného rozvoja a aktívne sa doň zapájajú. Zistenia potvrdili existenciu podpory

zo strany zamestnávateľov, výraznú vnútornú motiváciu pedagógov a preferenciu flexibilných foriem vzdelávania, najmä kombinovanej a dištančnej formy. Súčasne však výskum odhalil aj viaceré bariéry, ktoré účasť na vzdelávacích programoch sťažujú, predovšetkým nedostatok informácií o ponuke programov, ich nedostatočné tematické zameranie na odborné ekonomické predmety, administratívnu náročnosť a vzdialenosť miesta realizácie. Na základe analýzy odpovedí respondentov boli identifikované faktory ovplyvňujúce kvalitu a efektívnosť kontinuálneho vzdelávania, ktoré poukazujú na prepojenie systémových podmienok, organizačných aspektov a individuálnej motivácie pedagogických zamestnancov. Ako kľúčové sa ukázali dostupnosť vzdelávania, flexibilita jeho formy, aktuálnosť obsahu, kvalita lektorov a podpora zo strany vedenia školy.

Zistenia výskumu vytvárajú priestor pre formulovanie odporúčaní pre prax, ktoré smerujú k posilneniu motivačných podmienok výkonu pedagogického povolania, k väčšej slobode výberu vzdelávacích programov podľa individuálnych potrieb pedagógov a k rozšíreniu ponuky vzdelávania v oblasti odborných ekonomických predmetov. Zároveň poukazujú na potrebu decentralizácie miest realizácie vzdelávania a zvýšenia podielu dištančných foriem, čím sa odstránia bariéry spojené s dostupnosťou. Uvedené odporúčania môžu prispieť k efektívnejšiemu a systematickejšiemu nastaveniu kontinuálneho vzdelávania tak, aby lepšie reflektovalo potreby pedagogickej praxe.

Podakovanie

Touto cestou sa chcem poďakovať mojej školiteľke Mgr. Jarmile Hudákovej, PhD., MBA za vysoko profesionálny prístup, odborné vedenie a podporu pri tvorbe, realizácii a spracovaní výskumu, ako aj za cenné odporúčania a usmernenie vo výskumnej oblasti ekonomickej problematiky.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] FERENCOVÁ, Janka a ŠUŤÁKOVÁ, Valentína, (2023). *Akčný výskum a profesijný rozvoj učiteľa*. In: Sborník z mezinárodní konference ICOLLE 2022: "Omnes, omnia, omnio" pro 21. století?. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 24-31. ISBN 978-80-7509-922-8.
- [2] VETEŠKA, Jaroslav, (2016). *Přehled andragogiky: úvod do studia vzdělávání a učení se dospělých*. Praha: Portál, 320 s. ISBN 978-80-262-1026-9.

- [3] KOHNOVÁ, Jana, (2004). *Další vzdělávání učitelů a jejich profesní rozvoj*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 181 s. ISBN 80-7290-148-6.
- [4] PAVLOV, Ivan, (2020). *Andragogické poradenstvo*. Bratislava: Rokos, 104 s. ISBN 978-80-89510-83-2.
- [5] Zákon č. 138/2019 Z. z. zo dňa 10. mája 2019 o pedagogických zamestnancoch a odborných zamestnancoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov.
- [6] ASMARE, Mekuriaw Ayenew, (2025). *Teachers' experiences of continuous professional development: Implications for policy and practice*. Online. Social Sciences & Humanities Open, vol. 11, no. 1, pp. 101514. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ssaho.2025.101514> [viewed 2026-02-01].
- [7] ZAIONTZ, Charles, (2025). Real Statistics Resource Pack. Software. Release 8.8.2. Available from: <https://www.real-statistics.com/> [viewed 2026-02-01].

Možnosti didaktickej implementácie histórie prírodných vied do vyučovania chémie

Didactic Implementation Possibilities of the History of Science in Chemistry Teaching

Ester Švienta¹ – Marek Skoršepa²

^{1,2}Katedra chémie FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ esvienta@student.umb.sk, ² marek.skorsepa@umb.sk

Abstrakt

Cieľom práce je rozšíriť pilotné overovanie dotazníka zisťujúceho, do akej miery učitelia základných a stredných škôl do výučby chémie zaraďujú historické súvislosti na hlavný výskum a získať tak objektívnejšie a ucelenejšie informácie o danej problematike. Na základe získaných výsledkov je ďalším dôležitým cieľom práce predstaviť návrh didaktických materiálov, ktoré by mohli slúžiť ako pomôcka pri začleňovaní historických súvislostí do výučby, čím by sa učivo mohlo značne zatriktívniť pre žiakov aj pre samotných učiteľov. Taktiež uvádzame teoretické východiská našej práce, ktoré tvoria dôležitý pilier pre pochopenie významu začlenenia historických súvislostí do výučby a čitateľovi pomôžu lepšie sa orientovať v skúmanej problematike.

Kľúčové slová: dotazník, didaktické materiály, pilotné overenie, hlavný výskum, história chémie

Abstract

The aim of this thesis is to expand the pilot validation of a questionnaire investigating the extent to which primary and secondary school teachers incorporate historical contexts into chemistry teaching into the main research phase, thereby obtaining more objective and comprehensive information on the issue. Based on the results obtained, another important objective of the thesis is to present a proposal for didactic materials that could serve as a tool for integrating historical contexts into teaching, thus making the subject matter significantly more engaging for both students and teachers. We also present the theoretical foundations of our work, which form an important pillar for understanding the significance of incorporating historical contexts into teaching and help the reader better navigate the subject under study.

Key Words: questionnaire, didactic materials, instructional materials, pilot testing, main research, history of chemistry

Úvod

Výučba prírodovedných predmetov sa často zameriava na fakty a experimentálne postupy. V posledných desaťročiach sa však pri ich výučbe kladie dôraz čím ďalej tým viac aj na historický a filozofický kontext, prostredníctvom ktorého žiaci dokážu lepšie pochopiť vývoj poznatkov, ktorými dnes disponujeme, a uvedomiť si, že cesta, ktorá k nim viedla, bola neraz náročná a popretkávaná prekážkami rôzneho druhu [1,2].

Prevažná väčšina žiakov na druhom stupni ZŠ dnes vie, že obsah kyslíka v atmosfére je 21 %, avšak už málokto z nich je oboznámený s okolnosťami, ktoré viedli k objaveniu kyslíka, ba si dokonca uvedomuje, že ľudstvo nie vždy disponovalo touto vedomosťou, ktorú dnes bežne ovládajú siedmci. Aby sme podporili záujem žiakov o „zákulisné“ informácie z historických objavov, potrebujeme vytvoriť stratégiu, v ktorej žiaci nebudú nové vedomosti vnímať ako ďalšiu záťaž, ale zatriktívni to v ich očiach výučbu prírodných vied a vnesie novú perspektívu do vyučovania. Je taktiež nutné vytvoriť priestor a vymyslieť riešenia pre učiteľa, ktorý často bojuje s nedostatkom času, materiálov a nezájmom žiakov napriek svojej túžbe odovzdať im všetko, čo je v jeho silách.

Na základe učiteľmi poskytnutých informácií chceme navrhnúť nástroje, ktoré by im mohli pomôcť naplniť tieto túžby a uľahčiť im prácu.

1 Význam historického a filozofického kontextu vo výučbe prírodovedných predmetov

Na prepojenie prírodovedných predmetov, v našom prípade predovšetkým chémie, s históriou nám veľmi dobre slúži história prírodných vied a taktiež povaha prírodovedných disciplín, ktorá zahŕňa kritické myslenie, overovanie hypotéz a porozumenie vedeckému poznaniu [3,4].

Ako vo svojej práci spomína Milanović [5], pri témach, ktoré priamo súvisia s historickými objavmi či ex-

perimentálnymi postupmi, sú historické vsuvky pre žiakov obzvlášť zaujímavé a prínosné. Majú prostredníctvom nich prístup ku kontextu, v ktorom obsahový rámec učiva vznikol, a okolnostiam, v ktorých sa vyvíjal. To následne zvyšuje ich motiváciu a angažovanosť vo výučbe, nehovoriac okrem lepšieho pochopenia procesov vedeckého bádania aj o lepšom pochopení samotného preberaného učiva [6].

Historický kontext sa dá do výučby priniesť viacerými spôsobmi, ako sú rôzne historické dokumenty, texty, experimentálne reprodukcie či prípadové štúdie. Tieto materiály dávajú študentom priestor, aby znovuobjavovali objavené, čím sa rapídne zvyšuje pravdepodobnosť, že si zapamätajú čo najviac z preberaného učiva [3]. Takýto spôsob výučby umožňuje viesť diskusiu o vedeckom procese bádania, kriticky hodnotiť vedecké dôkazy a integrovať už nadobudnuté fakty do odhaľovania nových. Takéto učenie sa, v ktorom je centrom diania žiak a nie učivo, má potenciál mať odlišné výsledky od toho, keď žiak fakty len pasívne prijíma [2].

Dôležitým faktorom, ktorý je tiež nutné zohľadniť, je postoj učiteľa k spôsobu výučby. Môže byť kontra-produktívne vyžadovať od učiteľa, ktorý nemá k historickému a filozofickému vnímaniu vedy pozitívny vzťah, aby tieto prístupy pri výučbe uplatňoval. Len ten učiteľ, ktorý má k historickému naratívu pozitívny vzťah, vie s ním súvisiace aktivity či spôsoby výučby efektívne implementovať do svojej pedagogickej praxe [7,8]. Je preto dôležité zistiť preferencie učiteľov vo výbere historických tém a zároveň ich postoj k zaradeniu histórie prírodných vied do vyučovania a tieto získané informácie následne aplikovať pri tvorbe didaktických materiálov.

2 Metódy integrácie povahy prírodných vied a historických tém do vyučovania chémie

Zahrnúť povahu prírodných vied do vyučovania sa podľa Allchina [3] dá viacerými spôsobmi, a to prostredníctvom konkrétnych didaktických postupov:

- diskusia o experimentoch
- rekonštrukcia historických experimentov
- kritická analýza historických dokumentov
- rozbor prípadových štúdií významných objavov

Mnohí iní autori taktiež podporujú podobné prístupy vo výučbe prírodných vied prepojenej s históriou a filozofiou.

Tak, ako tieto prístupy výrazne podporujú hlbšie porozumenie učiva žiakmi, tak je tomu aj pri vysokoškolských študentoch učiteľstva, u ktorých sa tak významne zvyšuje schopnosť využívať historický a filozofický kontext ďalej u svojich žiakov [6]. Výsledkom tejto činnosti

je trvalejšie a kvalitnejšie učenie sa ako u študentov vysokých škôl, tak aj u žiakov základných a stredných škôl.

Pre učiteľov chémie podľa Milanović [5] boli najzaujímavejšími historickými témami tieto:

- vývoj atómovej teórie
- história periodickej tabuľky prvkov
- objavy kyselín a zásad a ich syntéza
- významné laboratórne techniky a experimentálne postupy, ktoré viedli k zásadným chemickým objavom.

Výskumom Milanović [5] sme sa inšpirovali aj v našej práci a rovnako sme zisťovali preferované historické témy pre slovenských učiteľov, čo viac rozoberáme v praktickej časti príspevku.

3 Metodika práce

3.1 Zber údajov

Koncom roka 2024 sme prostredníctvom dotazníka administrovaného učiteľom chémie základných a stredných škôl začali zisťovať, ako vnímajú zaradenie historických súvislostí do výučby chémie. Do apríla 2025 sme získali postoje 63 učiteľov, ktorí sa vyjadrili k skúmanej problematike v otvorených aj uzavretých otázkach [9,10,11]. Dotazník nám poskytol cenné údaje a pomohol overiť funkčnosť použitej metodiky. Vďaka pilotnému výskumu sme začali lepšie rozumieť tomu, ako učitelia nazerajú na medzipredmetový vzťah chémie – história (resp. dejepis). Keďže výskumnú vzorku tvorilo už spomínaných 63 učiteľov, považujeme výsledky za pomerne objektívne, avšak vyhodnotili sme, že ďalšie rozšírenie vzorky nám poskytne ucelenejšie informácie o skúmanej problematike. Týmto krokom sme získali ďalšie dôležité dáta, vďaka ktorým skutočné požiadavky učiteľov povedú našu prácu správnym smerom. Hlavný rozšírený výskum posilnil spoľahlivosť a všeobecnosť záverov nami skúmanej problematiky.

Dotazník tvorilo 14 otázok, z ktorých prvých 6 bolo sociodemografických a pýtali sme sa v nich učiteľov na pohlavie, vek, dĺžku pedagogickej praxe, to, či počas štúdia absolvovali predmet týkajúci sa výučby chémie, či pôsobia na základnej alebo strednej škole a ktoré predmety okrem chémie v súčasnosti vyučujú.

Ďalších 6 otázok sa zameriavalo na skúmanú problematiku a zaujímali sme sa v nich o to, čoho sa najčastejšie týkajú historické súvislosti, ktoré do svojich hodín učitelia zahŕňajú, mená ktorých vedcov najčastejšie spomínajú a ktoré konkrétne vedecké objavy žiakom na hodinách približujú. Pokračovali sme otázkou týkajúcou sa učebníc chémie, ktoré používajú – či je v nich podľa názoru učiteľov historický obsah postačujúci, či si myslia, že žiaci považujú zaradenie historických súvislostí

do výučby chémie za užitočné a zaujímavé a či vnímajú lepšie pochopenie učiva chémie žiakmi po zaradení historických súvislostí doň.

Posledné dve otázky sa zameriavali na pokračovanie našej práce, a teda tvorbu didaktických materiálov. Pýtali sme sa učiteľov, či by takýto materiál privítali, a ak áno, ako by si ho predstavovali.

Zber údajov pilotného výskumu prebiehal od polovice decembra 2024 do apríla 2025 a zúčastnilo sa ho 63 respondentov. Hlavný rozšírený výskum prebiehal od začiatku decembra 2025 do konca februára 2026 a zúčastnilo sa ho 112 učiteľov chémie, čo dohromady predstavuje 175 respondentov.

Keďže v pilotnom výskume sme úspešne overili použitú metodiku, pred ďalšou fázou rozposielania dotazníka v ňom neboli vykonané žiadne zmeny.

3.2 Tvorba didaktických materiálov

Vzhľadom na výsledky dotazníka pilotného výskumu, v ktorom viac ako 75 % učiteľov prejavilo záujem o didaktické materiály na podporu výučby chémie v historickom kontexte, sme začali pracovať na ich tvorbe. Učitelia kládli vo svojich vyjadreniach k didaktickým materiálom dôraz na to, aby boli stručné, ale výstižné a zároveň zábavné, no nie až príliš zjednodušené.

Na základe týchto kritérií sme vytvorili súbor didaktických listov veľkosti A4, pričom na každom je zhrnutý historický kontext určitej problematiky z oblasti chémie, napríklad objavenie vodíka, kyslíka či modely atómu. Každý didaktický list zobrazuje historickú chronológiu udalostí, fakty uvádza vedecky, ale zrozumiteľne pre úroveň žiaka ZŠ (pričom je vhodný aj pre žiaka strednej školy) a je doplnený o ilustrácie súvisiace s riešenou problematikou, aby ich žiak považoval nielen za obsahovo hodnotné, ale aj vizuálne príťažlivé.

4 Výsledky a diskusia

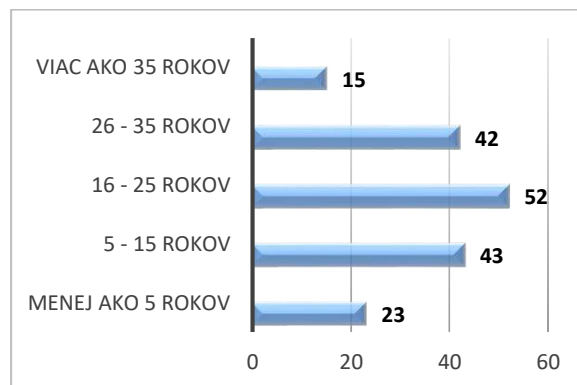
4.1 Výsledky výskumu

Skupina respondentov pozostávala zo 175 učiteľov, pričom mužov bolo 15 a žien 160.

V otázke na vek učiteľov bola najzastúpenejšou kategóriou viac ako 50 rokov, pričom ju označilo 63 učiteľov a najmenej učiteľov spadá do kategórie menej ako 30 rokov – 15 učiteľov. V kategórii 30 – 40 rokov sa nachádza 41 učiteľov a 41 – 50 rokov je to 56 učiteľov.

V Grafe 1 zobrazujeme rozloženie respondentov do kategórií podľa dĺžky pedagogickej praxe. Najpočetnejšou skupinou boli učitelia so 16 – 25 rokmi praxe a najmenej početnou skupinou bola kategória viac ako 35 rokov. Kategóriu 26 – 35 rokov označilo 42 účastníkov,

v kategórii 5 – 15 rokov to bolo 43 respondentov a menej ako 5 rokov pedagogickej praxe v našom výskume zastupuje 23 učiteľov.



Graf 1 Dĺžka pedagogickej praxe učiteľov

V ďalšej otázke sme zistili, že 53 zo 175 učiteľov (30,5 %) sa počas štúdia na vysokej škole zúčastnilo predmetu týkajúceho sa histórie chémie.

Keďže rozšírenie výskumu bolo zamerané na základné školy, väčšina nových respondentov v porovnaní s pilotným výskumom pôsobí, podľa očakávania, na základnej škole. Celkovo vyučuje na ZŠ 146 učiteľov a 35 učiteľov na gymnáziu, žiaden učiteľ nevyučuje na strednej odbornej škole. V otázke bola možnosť označiť viac odpovedí, teda učitelia, ktorí pôsobia na ZŠ aj na gymnáziu, mohli označiť obidve zložky.

Tab. 1 Prehľad počtu predmetov vyučovaných s CHE (z toho v zátvorke počet získaný počas pilotáže)

Predmet	Počet spomenutí
Biológia	91 (33)
Matematika	34 (10)
Fyzika	32 (12)
Technika	13 (1)
Geografia	12 (4)
Anglický jazyk	10 (2)
Informatika	10 (2)
Dejepis	3 (1)
Telesná výchova	3 (2)
Etická výchova	2 (1)
Hudobná výchova	2 (0)
Náboženstvo	2 (0)
Slovenský jazyk	2 (0)
Výtvarná výchova	2 (1)

V šiestej otázke sme zisťovali predmety, ktoré respondenti okrem chémie vyučujú. V Tabuľke 1 je uvedený prehľad týchto predmetov. Najfrekvencovanejším spoluvyučovaným predmetom s chémiou je biológia, nasleduje matematika s fyzikou. Medzi ďalšie spomínané predmety sa zaradili aj technika, geografia, anglický jazyk či informatika. Pre široký záber spomínaných predmetov spomínáme len tie, ktoré sa v hlavnom výskume vyskytli aspoň dvakrát.

Dostávame sa do druhej časti dotazníka, v ktorej sme skúmali už konkrétne výučbu chémie a zaradovanie historických súvislostí do nej.

Najprv sme sa učiteľov pýtali, čoho sa týkajú najčastejšie historické súvislosti na hodinách chémie, ktoré do výučby zaraďujú. Nami poskytnuté možnosti boli životopisy vedcov, ktoré využíva 104 (59,4 %) učiteľov, nasledovali roky, v ktorých boli uskutočnené vedecké objavy, čo si vybralo 88 (50,3 %) učiteľov. Najčastejšie zvolenou odpoveďou boli spôsoby, akými boli realizované vedecké objavy, a to až u 125 (71,4 %) učiteľov.

Na výber bola aj možnosť, podľa ktorej učiteľ do výučby historické súvislosti nezaraďuje, pričom ju označilo 9 (5,1 %) respondentov.

Učitelia mohli dopísať aj vlastné témy, ktoré sme v možnostiach síce neponúkli, ale ktoré do výučby zaraďujú. Medzi najzaujímavejšie z nášho pohľadu patrilo využitie látok na bojové účely, „pikošky“ zo života vedcov či konkrétne audiovizuálna tvorba.

V ďalšej otázke sme zisťovali mená vedcov, ktoré na svojich hodinách učitelia najčastejšie spomínajú. Tabuľka 2 sumarizuje najčastejšie poskytnuté odpovede.

Najčastejšie spomínaným vedcom bol Dmitrij Ivanovič Mendelejev a hneď za ním nasledovala Marie Curie Skłodovska. Rovnako boli často spomínaní aj Antoine Laurent Lavoisier, Michail Vasilievič Lomonosov či John Dalton. Učitelia spomenuli v dotazníku veľmi široké spektrum vedcov, pre obmedzený priestor však uvádzame len tých najfrekvencovanejších, ktorí sa v hlavnom výskume vyskytli minimálne desaťkrát.

V nasledujúcej otázke sme sa pýtali učiteľov, ktoré chemické objavy žiakom približujú v historickom kontexte a v Tabuľke 3 ponúkame prehľad odpovedí.

Najčastejšie spomínaným objavom bola periodická sústava prvkov spolu s periodickým zákonom, nasledovala atómová štruktúra a rádioaktivita. Podobne sa učitelia často zmieňovali aj o zákone zachovania hmotnosti, objavení rôznych chemických prvkov či o objave štruktúry DNA.

Cieľom ďalšej otázky bolo zistiť, do akej miery sú učitelia spokojní s historickým obsahom v učebniciach chémie. 31 (17,7 %) učiteľov považuje učebnice

v tomto smere za postačujúce, 135 (77,1 %) učiteľov učebnice dopĺňa vlastným historickým materiálom a 9 (5,1 %) sa k danej problematike nevedelo vyjadriť.

Tab. 2 Frekvencia konkrétnych spomínaných mien vedcov (z toho v zátvorke počet získaný počas pilotáže)

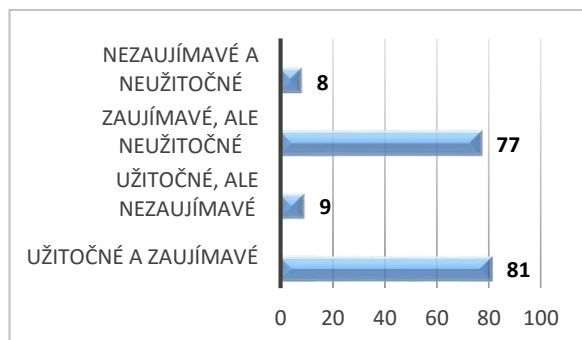
Meno vedca	Počet spomenutí
Dmitrij Ivanovič Mendelejev	148 (52)
Marie Curie Skłodovska	100 (43)
Antoine Laurent Lavoisier	71 (26)
Michail Vasilievič Lomonosov	67 (23)
John Dalton	53 (26)
Niels Bohr	49 (19)
Ernest Rutherford	39 (24)
Friedrich A. Kekulé von Stradonitz	28 (9)
Fridrich Wöhler	25 (10)
Francis Crick	20 (13)
James Watson	20 (13)
Joseph John Thomson	19 (12)
Jöns Jakob Berzelius	16 (2)
Démokritos	16 (5)
Linus Carl Pauling	12 (4)
Pierre Curie	11 (9)
Alexander Fleming	11 (3)
Alfred Nobel	11 (4)
Erwin Schrödinger	10 (6)

Tab. 3 Frekvencia konkrétnych spomínaných objavov (z toho v zátvorke počet získaný počas pilotáže)

Vedecký objav	Počet spomenutí
PSP + periodický zákon	106 (44)
Atómová štruktúra	78 (40)
Rádioaktivita	44 (19)
Zákon zachovania hmotnosti	42 (15)
Objavenie chemických prvkov	32 (18)
Objav štruktúry DNA	21 (15)
Objavenie penicilínu	13 (5)
Organická chémia	13 (5)
Syntéza močoviny	11 (5)
Štruktúra benzénu	11 (3)

V nasledujúcej otázke sme sa učiteľov opýtali, ako podľa nich vnímajú žiaci zaradenie historických súvislostí do výučby chémie, a teda či sú z ich pohľadu zaují-

navé a užitočné v rôznych kombináciách. V Grafe 2 sú zobrazené odpovede učiteľov na túto otázku.



Graf 2 Vnímanie zaradenia historických súvislostí do vyučovania chémie

Za nezaujímavé a neužitočné označilo zaradenie historických súvislostí do výučby 8 (4,57 %) učiteľov, za zaujímavé, ale neužitočné je zaradovanie historických súvislostí do výučby chémie podľa 77 (44 %) učiteľov. Možnosť užitočné, ale nezaujímavé označilo 9 učiteľov (5,1 %) a možnosť zaujímavé a užitočné si vybralo 81 učiteľov (46,3 %).

Koniec pomyselnej druhej časti dotazníka predstavovala otázka, v ktorej sme sa zaujímali o to, či podľa učiteľov prispieva začlenenie historických súvislostí do učiva k jeho lepšiemu pochopeniu. Podľa najväčšieho počtu respondentov (108; 61,7 %), je tento prínos mierny, nasledoval výrazný vplyv na pochopenie učiva (39; 22,3 %) a nakoniec niektorí učitelia nepozorujú žiadny vplyv (28; 16 %).

Posledná časť dotazníka sa zameriavala na tvorbu didaktických materiálov, ktoré by podporovali výučbu chémie prostredníctvom historického naratívu. Najprv sme sa učiteľov opýtali, či by vôbec o takýto materiál mali záujem. Odpovede boli nasledovné: 120 učiteľov (68,6 %) by niečo podobné uvítalo, 32 učiteľov (18,3 %) dôvod na vznik nového didaktického materiálu nevidí a 23 učiteľov (13,1 %) sa nevedelo vyjadriť.

Posledná otázka dotazníka nadväzovala na predošlú a zisťovala, ako by didaktický materiál, ktorý by učiteľom vyhovoval na zaradenie historických súvislostí do výučby chémie, mal vyzerieť, príp. čo by mal obsahovať.

Veľmi často učitelia ako námet na didaktický materiál spomenuli životopisy významných vedcov, zaujímavosti z ich života, objavy prvkov a informácie o ich objaviteľoch, vznik a vývoj periodickej tabuľky prvkov, vývoj predstáv o atóme či alchýmiu. Kládli tiež dôraz na prepojenie minulosti so súčasnosťou a využitie objavov v reálnom živote. Čo sa formy týka, učitelia by ocenili prezentácie, krátke videá, pracovné listy či PDF/Word

dokumenty. Kritériá na kvalitný didaktický materiál boli predovšetkým stručnosť, ale výstižnosť a vedeckosť, prehľadnosť a logické usporiadanie, pútavé, príbehové spracovanie a motivačný charakter. Na základe týchto cenných dát priamo od učiteľov sme v našej práci postúpili na ďalšiu úroveň, a teda tvorbu samotného didaktického materiálu.

4.2 Tvorba didaktických materiálov

Ako uvádzame vyššie, cieľom práce bolo nielen rozšíriť výskumnú vzorku respondentov a zhromaždiť nové informácie, ale aj vytvoriť súbor konkrétnych didaktických materiálov, ktoré by mohli učitelia využiť vo výučbe chémie.

Vzhľadom na požiadavky učiteľov sme začali s použitím odbornej literatúry vypracúvať súbor didaktických listov v podobe kariet vo formáte A4, pričom každá je venovaná jednej samostatnej téme, ktorej historické pozadie a proces objavovania vysvetľuje. Tematicky aj formálne sme sa nechali viesť predstavami učiteľov, kde sme niekoľkokrát našli spomenutú online formu materiálov (ktoré sa ale bez problémov dajú previesť do fyzickej podoby), zameranie na konkrétne témy (PTP, objavenie prvkov, modely atómu), farebnosť a pútavosť materiálov, odbornosť, ale zároveň stručnosť tém. Pre učiteľov je dôležité, aby neučili vedu skreslene, ale zároveň si uvedomujú, že množstvo informácií navyše podaných príliš detailne môže pôsobiť kontraproduktívne a žiakov namiesto toho, aby motivovali, odradia.

Naše materiály sa do určitej miery dajú vnímať aj ako časové osi, keďže vývoj danej témy uvádzame v kontexte doby, v ktorej sa odohrávali, rokov a objaviteľov, ktorí na problematike spolupracovali, respektíve tvorili jej dejiny. Na obrázkoch 1, 2 a 3 ponúkame ukážky didaktických listov jednotlivých tém.



Obr. 1 Ukážka didaktického listu k téme „Objavenie kyslíka“



Obr. 2 Ukážka didaktického listu k téme „Objavenie vodíka“



Obr. 3 Ukážka didaktického listu k téme „Modely atómu“

Záver

V práci analyzujeme výsledky rozšíreného výskumu týkajúceho sa zisťovania miery zaraďovania historických súvislostí do vyučovania chémie, ktorého sa zúčastnilo 175 respondentov – učiteľov chémie na základných a stredných školách.

Na základe odpovedí z dotazníka sme začali zostavovať súbor didaktických materiálov, ktoré môžu učiteľom napomôcť zapojiť do výučby chémie aj históriu chémie. Didaktický materiál bude k dispozícii v online podobe listov vo formáte A4. Čitateľa prehľadne prevádza jednotlivými témami v súlade s časovou chronológiou. Tieto materiály môžu žiakom aj učiteľom pomôcť zorientovať sa v konkrétnej problematike objavov na poli chémie, rozšíriť ich vedomosti a podnietiť v nich záujem o štúdium prírodných vied.

Každý chemický objav má svoj príbeh a je len na nás, či ho budeme hľadať, alebo nám bude stačiť poznať záver a o príbeh sa necháme ukrátiť.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] LEDERMAN, N. G. (2007). Nature of Science: Past, present, and future. In: ABELL, S. K.; LEDERMAN, N. G., eds. *Handbook of Research on Science Education*. New York : Routledge, pp. 831–879.
- [2] MATTHEWS, M. R., ed. (2018). *History, Philosophy and Science Teaching: New Perspectives*. Cham : Springer, pp. 340. ISBN 978-3-319-62614-7.
- [3] ALLCHIN, D. (2013) *Teaching the Nature of Science: Perspectives & Resources*. Saint Paul (MN) : SHiPS Education Press, pp. 310. ISBN 978-0-9892524-0-9.
- [4] CLOUGH, M. P. (2006). Learning the Nature of Science: Student Understandings of Scientific Inquiry and the Nature of Science. In: LEDERMAN, N. G.; ABD-EL-KHALICK, F., eds. *Handbook of Research in Science Education*. Mahwah : Lawrence Erlbaum Associates, pp. 123–145.
- [5] MILANOVIC, V. D.; TRIVIC, D. D.; TOMASEVIC, B. I. (2021). What contents from the history of chemistry are estimated as useful for chemistry lessons – attitudes of chemistry teachers. In: *Research in Science & Technological Education*. Abingdon : Routledge (Taylor & Francis Group), vol. 41, no. 3, pp. 1101-1116. ISSN 1470-1138.
- [6] SENDUR, G.; POLAT, M.; KAZANCI, C. (2017). Does a course on the history and philosophy of chemistry have any effect on prospective chemistry teachers' perceptions? In: *Chemistry Education Research and Practice*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, vol. 18, no. 4, pp. 601–629.
- [7] BELL, R. L., BLAIR, L. M., CRAWFORD, B. A., & LEDERMAN, N. G. (2003). Just do it? The impact of a science methods course on preservice teachers' conceptions of inquiry. In: *Journal of Research in Science Teaching*, Cambridge : Royal Society of Chemistry, vol. 40, no. 5, pp. 487–509.
- [8] AIKENHEAD, G. S. (2006). *Science Education for Everyday Life: Evidence-Based Practice*. Dordrecht : Springer, pp. 194. ISBN 978-1-4020-3868-0.
- [9] ŠVIENTA, E., SKORŠEPA, M. (2025). *Motivačný potenciál vybraných tém z histórie prírodných vied pre vyučovanie chémie*. Bakalárska práca. Banská Bystrica : Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici, 41 s.
- [10] ŠVIENTA, E., SKORŠEPA, M. (2025). Motivačný potenciál vybraných tém z histórie prírodných vied pre vyučovanie chémie. In: *Študentská vedecká konferencia 2025 – zborník recenzovaných príspevkov*. Trnava : UCM v Trnave, s. 208–214 ISBN 978-80-572-0523-4

- [11] ŠVIENTA, E., SKORŠEPA, M. (2025). Motivačný potenciál histórie prírodných vied vo výučbe chémie. In: *DIDSCI+ 2025: Zborník príspevkov z medzinárodnej vedeckej konferencie*. Banská Bystrica : Bellianum. Vydavateľstvo UMB v Banskej Bystrici, s. 57–59 ISBN: 978-80-557-2279-5.

Odlievanie kovov do sépiovej kosti ako učebná pomôcka v technickom vzdelávaní

Metal casting into cuttlefish bone as a teaching aid in technical education

Vojčeková Terézia – školiteľ Kvasnová Petra

Katedra techniky a technológií, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

tvojcekova@student.umb.sk

Abstrakt

Príspevok sa zaoberá využitím odlievania kovov do sépiovej kosti ako kombinovanej učebnej pomôcky v technickom vzdelávaní. Cieľom je analyzovať možnosti zavedenia tejto tradičnej techniky do škôl prostredníctvom demonštrácií a praktických cvičení. Na rozdiel od iných cenovo dostupných školských metód, ako je liatie do plastelíny alebo piesku, sépiová kosť ponúka prírodný, ľahko opracovateľný materiál a umožňuje detailné modelovanie. Táto technika efektívne prepája teóriu s praxou. Teoretická časť sa zameriava na historický vývoj a princípy liatia do prírodných foriem. Praktická časť opisuje návrh, realizáciu a technologický postup odlievania cínu a hliníka, vrátane vtokovej sústavy a bezpečnostných opatrení. Výsledky potvrdzujú motivačný potenciál tejto metódy a jej prínos k rozvoju technického myslenia, manuálnych zručností a porozumenia procesov tuhnutia kovov.

Príučové slová: odlievanie kovov, sépiová kosť, učebná pomôcka, technické vzdelávanie, experiment

Abstract

This paper investigates the use of metal casting in cuttlefish bone as a combined teaching aid in technical education. The aim is to analyse the feasibility of introducing this traditional foundry technique into educational environments through demonstrations and practical exercises. The theoretical section addresses the historical development of metal casting and the principles of casting into natural molds. The practical section describes the design and technological procedures for casting tin and aluminum, including the gating system configuration and safety measures. The results highlight the motivational potential of this method and its contribution to the development of technical thinking, manual skills, and understanding of solidification processes.

Key Words: metal casting, cuttlefish bone, teaching aid, technical education, experiment

1. Úvod

Odlievanie kovov patrí medzi najvýznamnejšie technologické inovácie v dejinách civilizácie. Už v dobe bronzovej umožnilo odlievanie výrobu nástrojov, zbraní a umeleckých predmetov s lepšími vlastnosťami než kamenné výrobky [1]. Zlievarenské technológie sa vyvíjali od jednoduchých kamenných a hlinených foriem po moderné pieskové a tlakové liatie používané v súčasnom priemysle [2].

V technickom vzdelávaní má spracovanie kovov významné postavenie. Žiaci spoznávajú vlastnosti materiálov, fyzikálne javy pri tavení a tuhnutí a základné technologické operácie. Realizáciu klasických zlievarenských procesov však limituje technické vybavenie, bezpečnostné požiadavky a finančné náklady.

Hlavným cieľom tejto aktivity je rozvíjať komplexné kompetencie žiakov: porozumenie technologickým a fyzikálnym princípom, osvojenie si pracovných a bezpečnostných postupov a zároveň podpora záujmu o techniku [6,8]. Využitie sépiovej kosti ako prírodnej formy umožňuje bezpečne a názorne priblížiť proces odlievania. Táto technika, známa najmä v šperkárstve a umeleckom odlievaní, je v školách využívaná len zriedkavo. Jej prednosťami sú jednoduchá opracovateľnosť, nízke náklady a názornosť.

Cieľom príspevku je navrhnúť a zdokumentovať využitie odlievania kovov do sépiovej kosti ako učebnej pomôcky, ktorá spája demonštračný experiment s praktickou činnosťou žiakov. Úspech tejto pomôcky sa hodnotí podľa schopnosti žiakov opísať kroky procesu a bezpečnostné pravidlá, samostatne navrhnúť formu so vtokovou sústavou a vykonať odlievanie s minimálnou pomocou učiteľa. Dôležitým ukazovateľom úspešnosti je aj aktívna účasť žiakov na diskusii a ich porozumenie fyzikálnym javom pri zmene skupenstva kovu.

2. Teoretické východiská

Najstaršie doklady o odlievaní kovov pochádzajú z obdobia približne 3000 rokov p.n.l. Spočiatku sa používali jednoduché otvorené kamenné formy. Významným krokom bol rozvoj metódy strateného vosku, ktorá umožnila vytvárať tvarovo náročnejšie predmety [1]. Rovnako ako v minulosti znamenalo zavádzanie nových materiálov a techník posun v možnostiach liatia, dnes sa k tomuto odkazu vraciame využívaním udržateľných prírodných materiálov, ako je sépiová kosť, ktoré predstavujú moderný a ekologický prístup k tradičným metódam.

V období stredoveku sa rozvíjalo najmä odlievanie bronzu na výrobu zvonov a umeleckých diel. Priemyselná revolúcia priniesla technologický pokrok v oblasti výroby liatiny a ocele. V 19. storočí bol vyvinutý Bessemerov proces výroby ocele, ktorý zásadne ovplyvnil rozvoj strojárstva [3].

V súčasnosti sa využívajú moderné technológie ako tlakové liatie, presné liatie či liatie do trvalých foriem. Napriek technologickému pokroku však princíp ostáva rovnaký – roztavený kov vyplní dutinu formy a po ochladení nadobudne jej tvar [2].

2.1 Charakteristika sépiovej kosti

Sépiová kosť je vnútorný vápenatý skelet hlavonožca rodu *Sepia*. Je tvorená prevažne uhličitanom vápenatým a aragonitom, má pórovitú štruktúru. Táto štruktúra zabezpečuje:

- nízku hmotnosť,
- dobrú tepelnú odolnosť,
- jednoduchú mechanickú opracovateľnosť,
- schopnosť odvádzať plyny pri liatí.

Tieto vlastnosti umožňujú jej využitie ako jednorazovej prírodnej formy pri

odlievaní kovov s nižšou teplotou tavenia [2].

3. Metodika a technologický postup

Pri experimente bol použitý cín a hliník. Cín má teplotu tavenia 232 °C, čo umožňuje jeho bezpečnejšie použitie v školskom prostredí. Hliník sa taví pri 660 °C, poskytuje pevnejší a mechanicky odolnejší odlitek [4]. V rámci experimentu sú bezpečnostné aspekty nielen súčasťou postupu, ale aj základným cieľom učenia. Namiesto jednoduchého vymenovania opatrení je bezpečnosť rámcovaná ako predmet bádateľského skúmania: žiaci dostávajú napríklad otázku „Čo by sa mohlo stať, ak by sme do studenej formy náhle naliali roztavený kov?“ Týmto spôsobom analyzujú riziko tepelného šoku a diskutujú o dôvodoch predhrievania formy v praxi. Úlohou žiakov je nielen identifikovať bezpečnostné opatrenia, ale aj posúdiť ich efektívnosť a kompromis medzi pohodlnosťou, rýchlosťou a bezpečnosťou.

3.1 Postup a vyhotovenie

Príprava formy zo sépiovej kosti:

Sépiová kosť sa rozreže pozdĺžne na dve polovice. Plochy sa zarovnajú a vyhladia.

Do jednej polovice sa pomocou noža alebo rydla vyreže negatívny tvar požadovaného odlitku (napr. prívesok, znak, ozdoba).

Do formy sa tiež vyreže vtoková sústava – t. j. kanálik, ktorým sa bude kov vlievať do dutiny. Ak je tvar väčší, môžeme doplniť aj výfuky, ktoré uľahčia únik vzduchu pri plnení formy.



Obrázok 1 Pracovné pomôcky

Zostavenie formy:

Obe polovice sépiovej kosti sa spoja tak, aby do seba presne zapadli.

Formu treba upevniť drôtom alebo svorkou, aby sa počas liatia neotvorila.

Odporúča sa formu pred liatím mierne predhriať (napr. nad plameňom), aby sa znížil teplotný šok a zlepšilo sa plnenie.



Obrázok 2 Príprava sépiovej kosti



Obrázok 3 Príprava sépiovej kosti na odlievanie

Tavenie kovu:

Vybraný kov (cín alebo hliník) sa vloží do kelímka a roztopí pomocou horáka alebo pece.

Cín sa taví rýchlo, pri nízkej teplote ($T_t = 232 \text{ }^\circ\text{C}$), hliník potrebuje vyššiu teplotu ($T_t = 660 \text{ }^\circ\text{C}$).



Obrázok 4 Granulát / odpad kovu na tavenie



Obrázok 5 Tavenie kovu

Kov sa taví do homogénneho stavu, bez viditeľných pevných častí

Odlievanie:

Pomocou klieští sa kelímok uchopí a rozravený kov sa naleje plynulo do vtokového kanáliku formy.

Dbáme na plynulý tok bez prskania a dostatočné naplnenie formy.



Obrázok 6 Roztavený kov prichystaný na odlievanie

Kov sa nechá úplne vychladnúť (niekoľko minút v závislosti od materiálu a objemu)

Otvorenie formy a vybratie odliatku:

Po ochladení sa forma rozoberie. Sépiová kosť je jednorazová a často sa čiastočne spáli.

Odliatok sa opatrne vyberie, odstráni sa vtokový zvyšok a povrch sa očistí.



Obrázok 7 Finálne odliatky po otvorení sépiovej kosti

Úprava a finálna povrchová úprava:

Hrubé časti sa obrúsia alebo odpíli.

Odliatok je možné leštiť, patinovať alebo ďalej upravovať podľa účelu

4. Výsledky a diskusia

Odlievanie do sépiovej kosti prinieslo prekvapivo presné a kvalitné výsledky, a to aj napriek jednoduchej technike a prírodnému materiálu formy. Oba testované kovy – cín aj hliník – vykazovali dobrú zlievateľnosť, no medzi nimi boli pozorované významné rozdiely:

- Cín sa vďaka nízkemu bodu tavenia ($T_t = 232 \text{ } ^\circ\text{C}$) spracovával jednoduchšie, rýchlejšie a bezpečnejšie. Je vhodný na prvé pokusy alebo výučbu v bežnej triede. Odliatky z cínu boli hladké, s jemnými detailmi, no mechanicky

mäkké – vhodné skôr ako dekorácia alebo výtvarný prvok.

- Hliník vyžaduje vyššiu teplotu ($T_t = 660 \text{ } ^\circ\text{C}$), čím sa zvyšujú nároky na vybavenie aj bezpečnostné opatrenia. Práca s hliníkom bola technicky náročnejšia, no výsledné odliatky boli pevnejšie, ľahšie a vhodnejšie na funkčné alebo technické aplikácie.

Z pedagogického hľadiska bola táto technika veľmi prínosná. Študenti si mohli prakticky vyskúšať celý proces od návrhu po finálny výrobok. Učili sa základom tavenia, bezpečnej manipulácii s horúcimi materiálmi, ako aj práci s prírodnou formou. Navyše mali priestor na vlastnú tvorivosť – návrh tvaru, umelecké poňatie či estetickú úpravu.

Z hľadiska opakovania sa sépiová kosť osvedčila ako spoľahlivý formovací materiál pre malé série – po viacerých pokusoch však dochádza k jej opotrebovaniu alebo prepáleniu, najmä pri hliníku.

Celkovo možno túto techniku označiť ako dostupnú, bezpečnú a inšpiratívnu formu výučby, ktorá kombinuje tradičné remeslo s modernými vzdelávacími cieľmi.

5. Záver

Odlievanie kovov do sépiovej kosti predstavuje efektívnu kombinovanú učebnú pomôcku vhodnú pre výučbu základov techniky a materiálových technológií. Metóda je finančne nenáročná, názorná a podporuje aktívne učenie.

Navrhnutá metodika má potenciál širšieho využitia v projektovom vyučovaní a pri technických odboroch. Praktické aktivity spojené s odlievaním kovov môžu u žiakov vzbudiť záujem nielen o technické remeslá, vrátane strojárstva, materiálového

inžinierstva či dizajnu. Zručnosti nadobudnuté pri týchto úlohách, ako sú konštruktárske myslenie, technická tvorba a tímová spolupráca, patria medzi základné kompetencie vyžadované v modernom priemysle a technických profesiách. Uvedené skúsenosti tak môžu slúžiť ako inšpiračný základ pre ďalšie štúdium a rozvoj vo vedeckých a technologických oblastiach, čo zároveň posilňuje relevanciu tejto metódy pre vzdelávacie inštitúcie a podporuje pripravenosť žiakov na požiadavky trhu práce.

Pod'akovanie

Pod'akovanie patrí školiteľovi práce za odborné konzultácie a metodické usmernenie pri realizácii.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] CAMPBELL, John. Complete Casting Handbook: Metal Casting Processes, Metallurgy, Techniques and Design. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2015. ISBN 978-0081001202
- [2] ASM INTERNATIONAL. ASM Handbook. Volume 15: Casting. Materials Park: ASM International, 2008. ISBN 978-0871707109.
- [3] KALPAKJIAN, S.; SCHMID, S. Manufacturing Engineering and Technology. 7th ed. Pearson, 2014. ISBN 978-0133128741.
- [4] GRÍGEROVÁ, Tatiana; LUKÁČ, Ivan; KOŘENÝ, Rudolf. Zlievarenstvo neželezných kovov. Bratislava: ALFA, 1988.
- [5] KOVOVÉ MATERIÁLY – Metallic Materials. Bratislava: Ústav materiálov a mechaniky strojov SAV. ISSN 0023-432X.
- [6] STOFFA, Ján. Didaktika technickej výchovy. Nitra: UKF, 2002. ISBN 80-8050-543-3.

[7] KROPÁČ, Jiří; PECINA, Pavel. Didaktika techniky. Brno: Masarykova univerzita, 2010. ISBN 978-80-210-5267-3.

[8] TUREK, Ivan. Didaktika. Bratislava: Iura Edition, 2010. ISBN 978-80-8078-322-8

Finančná gramotnosť žiakov slovenských stredných škôl

The financial literacy of Slovak secondary school students

Katarína Zrebená¹ – Marta Urbaníková²

^{1,2} Ústav ekonomiky a manažmentu, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹ katarina.zrebena@student.ukf.sk, ² murbanikova@ukf.sk

Abstrakt

Finančnú gramotnosť definuje PISA ako znalosť a pochopenie finančných pojmov a rizík. Schopnosť, motiváciu a sebadôveru jedinca využívať získané vedomosti s cieľom vykonávania efektívnych rozhodnutí v rôznych situáciách týkajúcich sa financií, so zámerom zlepšiť finančnú situáciu jednotlivca i spoločnosti. Vyučovanie finančnej gramotnosti je na Slovensku do istej miery regulované, no o jeho forme rozhoduje príslušná stredná škola. Práca sa zaoberá aktuálnym stavom finančnej gramotnosti žiakov slovenských stredných škôl. Skúma faktory, ktoré majú vplyv na úroveň finančnej gramotnosti žiakov.

Výskum je založený na dotazníkovom šetrení. Výskumu sa zúčastnilo 318 žiakov z rôznych stredných škôl na území Slovenska. Získané dáta boli vyhodnotené metódami popisnej a inferenčnej štatistiky. Na základe výsledkov výskumu môžeme konštatovať, že úroveň finančnej gramotnosti žiakov je spojená s pohlavím a typom školy, ktorú žiaci navštevujú. Poloha školy v rámci Slovenska finančnú gramotnosť žiakov významne neovplyvňuje.

Kľúčové slová: finančná gramotnosť, finančné vzdelávanie, stredné školy, prierezové vyučovanie.

Abstract

Pisa defines financial literacy as the knowledge and understanding of financial concepts and risks, combined with the skills, motivation, and confidence to apply such knowledge to make effective decisions across various financial contexts. Its goal is to improve individual and societal financial well-being and enable participation in economic life. This paper investigates the current state of financial literacy among Slovak secondary school students. Financial education is regulated to some extent but how it is implemented into the curriculum is a decision of each individual school. We explore factors, which influence level of financial literacy. The research was based on a questionnaire survey. 318 students from various secondary schools in Slovakia participated in the research. The data were evaluated using the methods of descriptive and inferential statistics. Based on the results of the research, we can state that the level of financial literacy of students relates to the gender and the type of school that the students attend. The location of the school within Slovakia does not significantly affect the students' financial literacy.

Key Words: financial literacy, financial education, secondary schools, cross-section education

Úvod

Finančná gramotnosť je nevyhnutnou súčasťou života každého človeka. Finančné prostredie sa neustále mení, počet rôznych finančných produktov rastie, a preto je dôležité vedieť sa správne a efektívne rozhodovať. Edukácia v oblasti finančnej gramotnosti pomáha predísť zadlženiu, finančnej nestabilite a iným problémom pri hospodárení s osobnými financiami. Ľudia sa stretávajú s finančnými rozhodnutiami v čoraz nižšom veku a dostatočná pripravenosť je kľúčová pre zodpovedné ekonomické správanie.

Práca kombinuje teoretický základ s praktickým výskumom, pričom sa opiera o dotazníkové šetrenie realizované medzi študentmi vybraných stredných škôl. Získané výsledky poskytujú komplexnejší obraz o súčasnom stave finančnej gramotnosti mladých ľudí na Slovensku a umožňujú formulovať návrhy na jej rozvoj.

1 Teoretický základ

Vzhľadom na aktuálnu slovenskú aj svetovú ekonomickú situáciu je finančná gramotnosť jednou z kľúčových schopností každého človeka. Finančné rozhodnutia robíme, počnúc pubertálnym vekom, na dennej báze. V priemere 60 % pätnásťročných žiakov už má vlastný bankový účet a viac ako 85 % z nich si v poslednom roku objedali niečo z internetu [1].

„Finančná gramotnosť je vedomosť a pochopenie finančných konceptov a rizík, ako aj zručnosti a postoje potrebné na ich aplikáciu, aby sme mohli robiť efektívne rozhodnutia naprieč širokou škálou finančných kontextov s cieľom zlepšiť finančný blahobyt seba aj spoločnosti a pre umožnenie zapojenia sa do ekonomického života“ [2]. Byť finančne gramotným jednotlivcom nám umožňuje vyhnúť sa dlhodobým problémom, ako sú finančný deficit, dlhová pasca či bankrot, a zároveň nám pomáha robiť rozhodnutia, ktoré nám zabezpečia pocit finančnej spokojnosti, ktorá je úzko spätá so životnou spokojnosťou.

1.1 Vyučovanie finančnej gramotnosti na Slovensku

Finančná gramotnosť ako samostatný predmet nepatrí medzi povinné predmety na základných a stredných školách. Aplikuje sa prierezovo do viacerých predmetov

- do matematiky, občianskej náuky, informatiky a i. Na niektorých stredných školách sa vyskytuje aj ako voliteľný predmet, avšak takýchto škôl je relatívne málo. Cieľovú úroveň vedomostí v oblasti financií určuje Národný štandard finančnej gramotnosti [3]. Národný štandard finančnej gramotnosti je dokument, ktorý vydalo Ministerstvo školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky v spolupráci s Ministerstvom financií Slovenskej republiky. Tento dokument, ktorý vznikol až v roku 2008, definuje návrh stratégie vzdelávania vo finančnej oblasti a v oblasti manažmentu osobných financií. Po poslednej úprave v roku 2018 ho rozšírili o výučbu spotrebiteľskej výchovy, výchovy k podnikaniu, protikorupčnej výchovy a výchovy proti podvodom [3]. Podľa tohto návrhu by mal byť žiak po ukončení vyššieho sekundárneho vzdelávania schopný napríklad: „nájsť, vyhodnotiť a použiť finančné informácie; Efektívne používať finančné služby; Porozumieť a orientovať sa v zabezpečovaní základných ľudských a ekonomických potrieb jednotlivca a rodiny, podniku; ale aj Zostaviť a prezentovať vlastný podnikateľský zámer, myslieť strategicky, analyzovať a riešiť problémy“ a iné [3].

Vyššie opísané schopnosti sú rozdelené do šiestich tém podľa tematických oblastí a každá téma je ďalej diferencovaná na tri úrovne. Prvá úroveň opisuje schopnosti a znalosti k danej téme pre žiakov prvého stupňa základnej školy, druhá úroveň pre žiakov druhého stupňa základnej školy a tretia pre žiakov stredných škôl (úplné stredné všeobecné vzdelanie aj úplné stredné odborné vzdelanie). Ministerstvo školstva nenariaďuje presný priebeh vyučovania finančnej gramotnosti na základných a stredných školách. Spôsob jej začlenenia do vyučovacieho procesu je rozhodnutím vedenia každej školy jednotlivito. Odporúča sa však prevažne posledný spôsob výučby – prierezovou formou. Ten totiž umožňuje predstaviť žiakom komplexnosť danej témy. Dochádza k prepájaniu poznatkov, vnímaniu súvislostí. Cieľom je, aby žiaci získali potrebné kompetencie a zručnosti pre zodpovedné narábanie s financiami [4].

1.2 Faktory ovplyvňujúce finančnú gramotnosť

Sigurdur Gudjonsson vo svojej štúdii [5], vykonanej na Islande, skúmal rozdiely vo finančnej gramotnosti žien a mužov, pomocou krátkeho dotazníka finančnej gramotnosti zloženého z piatich praktických úloh. Tejto štúdii sa zúčastnilo približne 800 účastníkov naprieč rôznymi demografickými skupinami. Napriek tomu, že Island je krajinou s najvyššou úrovňou rodovej rovnosti, aj v tejto krajine boli rozdiely vo finančnej gramotnosti žien a mužov významné. Priemerná úspešnosť mužov bola 76 % a priemerná úspešnosť žien 56,2 %. V štúdii zdôraznili aj fakt, že ženy v dotazníku oveľa častejšie volili možnosť „neviem“, čo poukázalo na neistotu žien vo finančných rozhodnutiach.

Rozdiely vo finančnej gramotnosti sa výrazne

prejavujú aj v závislosti od typu stredoškolského vzdelania, najmä pri porovnaní študentov stredných odborných škôl a gymnázií. Žiaci gymnázií majú širší všeobecný rozhľad a kladú väčší dôraz na teoretické vedomosti, vrátane základov ekonómie, logického myslenia či kritického vyhodnocovania informácií. Vďaka tomu sa často ľahšie orientujú vo finančných témach ako sú rozpočet, úroky, pôžičky alebo investície. Na druhej strane sa žiaci stredných odborných škôl vo väčšine prípadov sústreďujú na praktické zručnosti v konkrétnom odbore. Štúdia [6] brala ohľad aj na skutočnosť, že niektoré stredné odborné školy ponúkajú študijné odbory priamo zamerané na financie – bankovníctvo, zahraničný trh, účtovníctvo atď. Žiaci z týchto odborov mali vyššiu úroveň finančnej gramotnosti. Dôležitým faktorom je aj samotná motivácia pri výbere typu školy. Žiaci, ktorí si vyberajú gymnázium, väčšinou smerujú k vysokoškolskému štúdiu a dávajú prednosť teoretickému vzdelaniu s dôrazom na dlhodobé ciele. Ich záujem o širšie spoločenské a ekonomické súvislosti môže prispieť k lepšiemu pochopeniu finančných tém. Naopak, študenti odborných škôl sa často rozhodujú pre konkrétny odbor s cieľom čo najskôr vstúpiť na trh práce. Ich výber je zameraný na praktickosť a rýchle uplatnenie, pričom finančné témy môžu zostať v úzadí, ak nie sú výslovnou súčasťou výučby [6].

„Z vlastných omylov a skúseností sa o fungovaní financií učí 49 % ľudí. Informácie od rodiny čerpá 38 %, internet zase využíva 33 % respondentov. Školské vyučovanie ako zdroj informácií využíva len 16 % opýtaných a predovšetkým ide o obyvateľov Bratislavského kraja. Podľa prieskumu sa na správy z médií spolieha 16 % občanov“ [7]. Vzhľadom na toto zistenie usudzujeme, že úroveň finančnej gramotnosti ľudí môže ovplyvniť aj socioekonomické prostredie, v ktorom sa daný jedinec pohybuje. Slovensko je krajinou s výraznými regionálnymi rozdielmi v ekonomickej výkonnosti. Najrozvinutejším regiónom je západné Slovensko, predovšetkým Bratislavský kraj, ktorý je ekonomickým centrom Slovenska. V roku 2023 dosiahol tento kraj hrubý domáci produkt (HDP) vo výške 33,5 miliardy eur, čo predstavovalo až 27,2 % celonárodného HDP [8]. Miera nezamestnanosti sa v Bratislavskom kraji pohybovala na úrovni iba 2 %, čo je najnižšia hodnota spomedzi všetkých regiónov [9]. Vysoká zamestnanosť, lepšie pracovné príležitosti a vyššie mzdy môžu prispievať k vyššej úrovni finančnej gramotnosti obyvateľov. Ľudia tu majú lepší prístup k finančným produktom, odbornému poradenstvu a zároveň majú väčšiu motiváciu venovať sa plánovaniu osobných financií. Stredné Slovensko, reprezentované napríklad Banskobystrickým krajom, dosahuje výrazne nižšiu ekonomickú výkonnosť. V roku 2023 tu HDP predstavoval približne 10,8 miliardy eur, čo je len 8,8 % podiel na celoslovenskom HDP [8]. Miera nezamestnanosti v tomto regióne sa pohybovala medzi

7 % - 9 % [9]. Východné Slovensko dlhodobo zaostáva za ostatnými regiónmi. Hoci Košický kraj vygeneroval v roku 2022 približne 12,1 % HDP Slovenska, jeho HDP na obyvateľa zostáva nízky a ekonomická aktivita je koncentrovaná najmä v Košiciach [8]. Miera nezamestnanosti vo východných regiónoch je najvyššia – napríklad v Prešovskom kraji dosiahla v roku 2024 úroveň 10,6 % [9]. Okrem vysokej nezamestnanosti región čelí aj odlivu obyvateľstva a slabšej infraštruktúre. V oblastiach so slabšou ekonomikou sa finančná gramotnosť často znižuje kvôli nižšej kúpyschopnosti obyvateľstva, ale aj kvôli obmedzenému prístupu k informáciám a menšej ponuke vzdelávacích aktivít v oblasti financií. Obyvatelia tu častejšie riešia akútne finančné problémy, než aby sa venovali dlhodobému plánovaniu, investovaniu či šetreniu. Tieto čísla ukazujú, že regionálne rozdiely sú na Slovensku stále výrazné. Zatiaľ čo západ Slovenska, a najmä jeho hlavné mesto Bratislava, ponúka množstvo pracovných príležitostí a vysoké mzdy, stred a východ Slovenska čelia výzvam spojeným s hospodárskym rozvojom, vyššou nezamestnanosťou a nižšou životnou úrovňou, čo môže ovplyvniť finančnú gramotnosť obyvateľov.

1.3 Metodológia

Cieľom práce je analyzovať úroveň finančnej gramotnosti žiakov slovenských stredných škôl. Skúmať budeme rozdiely v úrovni finančnej gramotnosti vzhľadom na pohlavie žiakov, typ strednej školy a región, v ktorom sa škola nachádza. Výskum bol koncipovaný ako kvantitatívna štúdia s využitím metódy dotazníkového šetrenia. Výskumnú vzorku tvorilo 318 žiakov z rôznych stredných škôl na Slovensku. Prebiehal v školskom roku 2024/2025.

Dotazník bol rozdelený do troch blokov – zber demografických údajov, test finančnej gramotnosti a otázok ohľadom sebareflexie. V prvom bloku žiaci odpovedali výberom jednej z možností, ktoré sme určili vzhľadom na cieľovú skupinu. Časť dotazníka, kde zisťujeme samotný level finančnej gramotnosti je formulovaná ako test, kde je vždy jedna odpoveď správna. Za správne odpovede žiaci dostávajú body, ktorých súčet definuje celkovú úspešnosť, teda ich úroveň finančnej gramotnosti. Keďže sú respondentmi žiaci stredných škôl, mysleli sme pri tvorbe dotazníka aj na ich rozsah pozornosti a udržanie ich záujmu, čo malo zvýšiť pravdepodobnosť získania autentických výsledkov. Každá otázka sa venuje aspoň jednej kompetencii, z Národného štandardu finančnej gramotnosti a zároveň musí byť podaná zrozumiteľne. Otázky sme sa snažili formulovať tak, aby nežiadali vpísanie pasívnych vedomostí a faktov, ale práve použitie vedomostí v reálnych situáciách.

Otázok na finančnú gramotnosť je v dotazníku sedem, niektoré z nich sú rozčlenené na viacero pod otázok. Na niektoré otázky žiaci odpovedajú výberom z

troch možností, pričom vždy je správna práve jedna možnosť. Za takéto otázky, ako aj za časť otázky číslo štyri žiaci dostali jeden bod. Jedna otázka obsahovala dve tvrdenia o vyššie opísanej situácii. Žiak rozhodoval, či je tvrdenie pravdivé, alebo nepravdivé. Za túto otázku bol tak isto udelený jeden bod. Vo zvyšných otázkach žiaci odpovedali číslom, ktoré vypočítali alebo vyhľadali v dokumente. Za každú takúto otázku dostali žiaci dva body. Ak by žiak odpovedal správne na všetky otázky, mohol získať 15 bodov.

Pred začatím zberu dát sme si stanovili nasledujúce výskumné otázky:

WO1: *Má pohlavie vplyv na úroveň finančnej gramotnosti?*

WO2: *Má región, v ktorom sa škola nachádza vplyv na úroveň finančnej gramotnosti?*

WO3: *Má typ školy, ktorú žiaci navštevujú vplyv na úroveň finančnej gramotnosti?*

Na základe týchto otázok sme stanovili a výskumné hypotézy. Na vyhodnotenie dotazníka boli použité metódy popisnej štatistiky a T-testy štatistických hypotéz. Dáta boli spracované pomocou štatistického softvéru Microsoft Excel.

Výskum bol realizovaný anonymne v súlade s nariadením GDPR. Respondenti boli o účele spracovania údajov informovaní v úvodnej časti dotazníka.

2 Výsledky a diskusia

V tejto časti prezentujeme kľúčové zistenia z dotazníkového šetrenia. Do výskumu sa zapojilo 318 respondentov z 11 rôznych škôl. Počty respondentov z hľadiska regiónu a typu školy neboli rozložené rovnomerne, avšak počet respondentov v každej skupine bol dostatočný pre vyvodenie signifikantných výsledkov. Z hľadiska pohlavia vzorku tvorilo 60,38 % žien a 39,62% mužov. Podľa typu školy bolo rozdelenie: obchodné akadémie 40,57 %, gymnáziá 33,96 % a iné stredné odborné školy 25,47 %. Z hľadiska regiónu, malo najväčšie zastúpenie respondentov východné Slovensko 41,19 %, žiaci zo stredného Slovenska tvorili 24,53 % a žiaci zo západného Slovenska 34,28 %.

Celkovo mohli žiaci v dotazníku získať 15 bodov. Priemerný získaný počet bodov na žiaka bol 9,56. Priemerná percentuálna úspešnosť žiakov v testovej časti dotazníka bola 63,72 %. V tabuľke 1 vidíme, ako žiaci odpovedali na jednotlivé otázky. V prvom stĺpci tabuľky sú označenia úloh z dotazníka, ktorý žiaci vyplňali, v druhom stĺpci sa nachádza percento správnych odpovedí k danej otázke.

Číslo otázky:	Percento správnych odpovedí:
1	89,62%
2A	80,50%
2B	77,36%

3A	70,75%
3B	37,74%
4A	74,84%
4B	80,50%
4C	31,76%
5	50%
6	58,81%
7	88,05%

Tabuľka 1 Percento správnych odpovedí na jednotlivé otázky

Zdroj: Vlastné spracovanie

Najlepšie výsledky dosiahli žiaci v otázke 1. Táto otázka sa zameriava na fakt, že ak nakupujeme produkty na splátky, pravdepodobne za ne zaplatíme viac, pretože musíme brať do úvahy aj úroky a prípadné poplatky. Na otázku odpovedalo správne 89,62 % testovaných žiakov. Podobnú úspešnosť dosiahli respondenti aj v otázke číslo 7 - úver a dlh, kde mali žiaci vysvetliť význam skratky „p.a.“ vo financiách. Medzi ďalšie otázky, v ktorých žiaci dosiahli vysokú úspešnosť – 80,5 % patria otázky 2A a 4B. Otázka 2A sa týkala témy úver a dlh a otázka 4B bola zameraná na hľadanie informácií vo faktúre. Pomerne dobré výsledky žiaci dosiahli aj v otázkach 2B, 4A a 3A. Tieto otázky sa zameriavali na vyhľadávanie informácií v dokumentoch. V otázkach 5 a 6 správne odpovedala približne polovica respondentov, pričom v otázke 5 mali žiaci identifikovať rozdiel medzi kreditnou a debetnou kartou a v otázke 6 vysvetľovali, ako funguje povinné zmluvné poistenie. Vo zvyšných otázkach bola úspešnosť respondentov pomerne nízka. Išlo práve o otázky, na ktoré neodpovedali výberom z možností, ale k odpovedi sa museli dopracovať krátkym výpočtom. Z týchto výsledkov vyplýva, že medzi silné stránky finančnej gramotnosti stredoškôľakov patrí tematika úver a dlh. Pomerne dobre žiaci rozumejú aj rôznym finančným produktom ako je poistenie či kreditné karty. Slabou stránkou finančnej gramotnosti žiakov je kritické myslenie pri plánovaní výdavkov, ktoré sa vyskytovalo v otázkach 3B a 4C. V otázke 3B mali žiaci vypočítať konečný stav účtu po rôznych transakciách, museli si uvedomiť, že za niektoré transakcie sú účtované poplatky, čo bolo jasne zobrazené v priloženom výpise z účtu. V otázke 4C mali upraviť sumu na faktúre, po zmene množstva tovaru, tu si mali žiaci uvedomiť, že DPH je premenlivá zložka celkovej zaplatenej ceny a po upravení celkovej ceny produktov museli prepočítať aj sumu zaplatenej DPH.

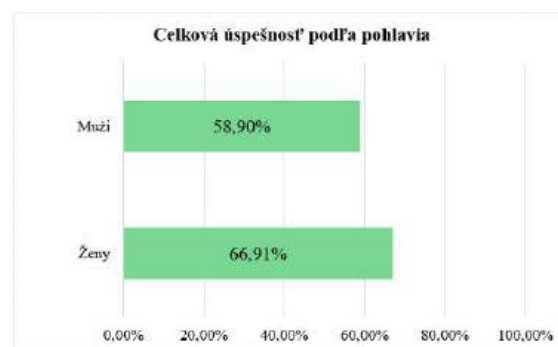
Na zodpovedanie výskumnej otázky WO1 sme testovali hypotézu

- *H0: Rozdiel medzi priemernou úspešnosťou žien a mužov nie je významný* oproti hypotéze
- *H1: Rozdiel medzi priemernou úspešnosťou žien a*

mužov je významný.

V grafe 1 je zobrazená úspešnosť respondentov rozdelená podľa pohlavia. Vidíme, že ženám sa v otázkach z finančnej gramotnosti darilo lepšie. Ich priemerná úspešnosť bola o 8,01 % vyššia ako úspešnosť mužov. Výsledky sme testovali na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Z T-testu, ktorý sme vykonali pomocou programu Microsoft Excel sme získali p-hodnotu - 0,00235355, preto prijímame alternatívnu hypotézu H1 a s 95 % pravdepodobnosťou môžeme tvrdiť, že rozdiel medzi výsledkami žien a mužov je významný, teda že ženy, ktoré navštevujú stredné školy, majú vyššiu úroveň finančnej gramotnosti ako muži - stredoškôľáci.

Náš výsledok sa síce nezhoduje s výsledkami ostatných výskumov [5] ,[10], no musíme brať do úvahy, že predošlé štúdie, ktoré sme analyzovali boli zovšeobecnené na celú populáciu, nie len na vekovú kategóriu stredoškôľakov. Zároveň vieme, že medzera medzi finančnou gramotnosťou žien a mužov sa čoraz viac znižuje.



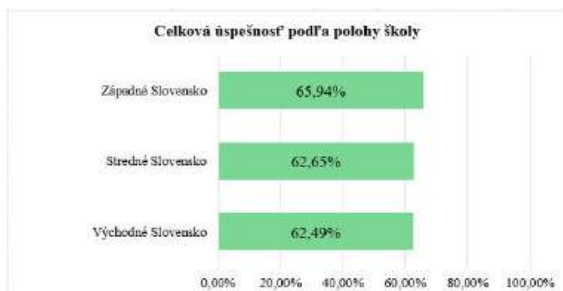
Graf 1 Celková úspešnosť podľa pohlavia

Zdroj: Vlastné spracovanie

Na zodpovedanie výskumnej otázky WO2 sme testovali hypotézu :

- *H0: Rozdiel medzi priemernou úrovnou fg v jednotlivých regiónoch nie je významný.*
- *H1: Rozdiel medzi priemernou úspešnosťou v jednotlivých regiónoch je významný.*

V grafe 2 sú zobrazené celkové úspešnosti žiakov rozdelené podľa toho, v ktorom regióne sa nachádza škola, ktorú navštevujú. Na prvý pohľad vidíme, že rozdiel medzi stredným a východným Slovenskom je veľmi malý. Západné Slovensko sa líši, avšak len o približne 3,3%. Z T-testu (na hladine významnosti $\alpha = 0,05$) sme získali p-hodnotu: 0,417484, preto nemôžeme zamietnuť nulovú hypotézu. Môžeme teda vyvodiť výsledok, že s 95 % pravdepodobnosťou, rozdiel vo finančnej gramotnosti v rôznych častiach Slovenska, nie je významný. Aj napriek veľkým regionálnym rozdielom v ekonomickej výkonnosti, respondenti dosiahli približne rovnaké výsledky a je možné, že ich socioekonomické prostredie neovplyvňuje do takej miery, ako sme predpokladali.



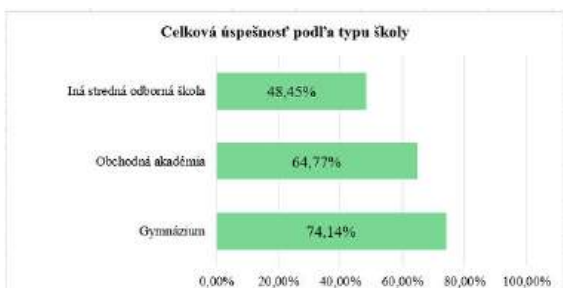
Graf 2 Celková úspešnosť podľa polohy školy

Zdroj: Vlastné spracovanie

Na zodpovedanie výskumnej otázky WO3 sme testovali hypotézu:

- *H0: Rozdiel medzi priemernou úspešnosťou v jednotlivých typoch škôl nie je významný*
- *H1: Rozdiel medzi priemernou úspešnosťou fg v jednotlivých typoch škôl je významný*

V grafe 3 je zobrazená celková úspešnosť respondentov, rozdelená podľa typu školy, ktorú navštevujú. Najhoršie výsledky dosahovali žiaci stredných odborných škôl, kde sa zapojili primárne školy s technickým a IT zameraním. Prekvapivé však bolo, že žiaci obchodných akadémií dosahovali výsledky o 9,37% horšie, ako žiaci gymnázií. Vzhľadom na to, že obchodné akadémie sú priamo zamerané na financie a ekonomiku, predpokladali sme, že budú v teste dosahovať najlepšie výsledky. Výsledky sme testovali T-testom na hladine významnosti $\alpha = 0,05$, p-hodnota = $5,2981E-15$, preto prijímame alternatívnu hypotézu H1 a s 95% pravdepodobnosťou môžeme tvrdiť, že rozdiel medzi výsledkami žiakov z rôznych typov škôl je významný. Žiaci z gymnázií majú najvyššiu úroveň finančnej gramotnosti, obchodné akadémie sú o niečo horšie a žiaci stredných odborných škôl majú najnižšiu úroveň finančnej gramotnosti. Konštatujeme, že typ strednej školy, ktorú žiaci navštevujú má vplyv na ich úroveň finančnej gramotnosti.



Graf 3 Celková úspešnosť podľa typu školy

Zdroj: Vlastné spracovanie

Záver

Cieľom výskumu bolo analyzovať úroveň finančnej gramotnosti žiakov slovenských stredných škôl. Dôležitým odrazovým dokumentom bol národný štandard finančnej gramotnosti. Tento dokument síce

neurčuje presný spôsob vyučovania finančnej gramotnosti, no určuje vedomosti a kompetencie, ktoré žiak má ovládať po ukončení jednotlivých študijných míľnikov. Priemerná úspešnosť respondentov v dotazníku bola 63,72 %, a 47,17 % žiakov si myslí, že dotazník bol skôr jednoduchý. Z prieskumov [5] [10] vyplýva, že muži majú vyššiu finančnú gramotnosť ako ženy naprieč všetkými vekovými kategóriami. Výsledky nášho výskumu boli však opačné. Ženy, študujúce na stredných školách, majú vyššiu úroveň finančnej gramotnosti než muži stredoškolační.

Podľa typu strednej školy, najlepšie výsledky dosahovali žiaci gymnázií, zatiaľ čo najnižšia úspešnosť sa ukázala pri žiakoch stredných odborných škôl. Tento rozdiel bol očakávaný a pravdepodobne bol spôsobený rozličnou intenzitou a formou výučby, ako aj celkovým charakterom týchto typov škôl. Prekvapujúce však bolo, že obchodné akadémie sa zaradili až za gymnáziá, napriek tomu, že sa špecializujú na ekonomické a finančné témy. Toto by mohlo naznačovať, že ani zvýšená expozícia voči finančným témam nezaručuje efektívnejšie osvojenie si kľúčových poznatkov a kompetencií, preto by sme odporučili prehodnotiť spôsob, akým sú tieto informácie žiakom podávané.

Aby sme zvýšili finančnú gramotnosť populácie, musíme venovať viac pozornosti jej vyučovaniu. Odporučili by sme prehodnotiť spôsob implementácie tém do vzdelávacieho systému. Odporučame sústrediť sa na moderné, interaktívne a zážitkové metódy vo vyučovaní a na používanie simulačných hier, obsahujúcich autentické situácie zo sveta financií. Z dlhodobého hľadiska by bolo vhodné zväziť zavedenie finančnej gramotnosti, ako samostatného predmetu alebo jej výraznejšiu integráciu do výučby s jasne definovanou osnovou. Pomôcť by mohla aj podpora organizovania workshopov s odborníkmi, či zvýšenie povedomia o dostupných projektoch na podporu rozvoja finančnej gramotnosti. V neposlednom rade je veľmi dôležité, aby sa finančné vzdelávanie pravidelne aktualizovalo a prispôbovalo sa rýchlemu vývoju finančného prostredia.

PodĎakovanie

Ďakujem mojej školiteľke doc. RNDr. Marte Urbaníkovej, CSc. za odbornú spoluprácu pri písaní tejto práce.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] OECD, (2024). PISA 2022 Results (Volume IV): How Financially Smart Are Students?. Paris: OECD Publishing, 244 s. PDF ISBN 978-92-64-61351-5
- [2] OECD, (2023). PISA 2022 Assessment and Analytical Framework. Paris: OECD Publishing, 289 s. PDF ISBN 978-92-64-90611-2
- [3] MINEDU, (2017). Národný štandard finančnej

gramotnosti verzia 1.2, č. 2017-1053/10961:12-10E0

- [4] MINEDU, (2014). Metodika pre zapracovanie a aplikáciu tém finančnej gramotnosti do školských vzdelávacích programov základných škôl a stredných škôl, č. 2014-11498/40322:5-10E0
- [5] GUDJONSSON, Sigurdur; MINELGAITE, Inga; KRISTINSSON, Kari a PÁLSDÓTTIR, Sigrún, (2022). Financial Literacy and Gender Differences: Women Choose People While Men Choose Things? *Administrative Sciences*, 12(4), 179. <https://doi.org/10.3390/admsci12040179>
- [6] KHUSAINI, et al, (2021). Vocational and senior high school differences in financial literacy, IOP Publishing Ltd. DOI 10.1088/1755-1315/747/1/012018
- [7] TASR, (2024). Rozumiete peniazom? Finančnú gramotnosť ľudia čerpajú najmä od rodiny a z internetu. Dostupné na: Rozumiete peniazom? Finančnú gramotnosť ľudia čerpajú najmä od rodiny a z internetu - Forbes, 20.2.2026.
- [8] Directorate-General for Economic and Financial Affairs, (2023). 2023 Country Report – Slovakia, Brusel: Európska komisia, ISBN 978-92-68-03216-9 (online)
- [9] ŠÚSR, (2025). Nezamestnanosť vo 4. štvrtroku a za rok 2024, Bratislava : Štatistický úrad SR
- [10] HASLER, Andrea a LUSARDI, Annamaria, (2017). The Gender Gap in Financial Literacy: A Global Perspective, Washington: Global Financial Literacy Excellence Center, The George Washington University School of Business.

SEKCIA

PHD. I



Jazero Vinderel ako archív vegetačných zmien v pohorí Maramureš (Východné Karpaty, Rumunsko)

Lake Vinderel as an archive of vegetation changes in the Maramureş Mountains (Eastern Carpathians, Romania)

Silvia Bartóková¹ – Ladislav Hamerlík¹

¹Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ silvia.bartokova@umb.sk, ²ladislav.hamerlik@umb.sk

Abstrakt

Paleolimnologický a palynologický výskum jazera Vinderel vo Východných Karpatoch poskytuje nový pohľad na vývoj vegetácie a environmentálnych podmienok v horskej oblasti Maramureš za posledných cca 7500 rokov. Analýza približne 300 cm dlhého sedimentárneho jadra, z ktorého bolo spracovaných 66 vzoriek a determinovaných 53 peľových taxónov, umožnila rekonštruovať hlavné zmeny vegetácie od stredného holocénu po súčasnosť. Chronológia profilu bola založená na rádiokarbónovom datovaní makrozvyškov a následne tvorená pomocou vekovo-hĺbkového modelu. Výsledky dokumentujú prechod od zmiešaných lesov s brezou, lieskou a jedľou k bukovo-jedľovým porastom počas holocénskeho klimatického optima (cca 8000 – 5000 rokov BP). Neskoro-holocénny záznam poukazuje na postupný nárast otvorených biotopov a výraznejší antropogénny vplyv, najmä v posledných približne 800 rokoch BP. Jazero Vinderel predstavuje významný archív dlhodobých environmentálnych zmien v citlivom vysokohorskom prostredí Karpát.

Kľúčové slová: holocén, peľová analýza, dynamika vegetácie, vysokohorské ekosystémy, ľudský vplyv

Abstract

Paleolimnological and palynological research of Lake Vinderel in the Eastern Carpathians provides new insights into the development of vegetation and environmental conditions in the Maramureş Mountains over the last approximately 7500 years. The analysis of an approximately 300 cm long sediment core, based on 66 processed samples and the identification of 53 pollen taxa, made it possible to reconstruct the main vegetation changes from the Middle Holocene to the present. The chronology of the profile was established using radiocarbon dating of macroremains and subsequently constructed by an age-depth model. The results document a transition

from mixed forests dominated by birch, hazel, and fir to beech-fir stands during the Holocene climatic optimum (ca. 8000 – 5000 years BP). The Late Holocene record indicates a gradual increase in open habitats and a stronger anthropogenic influence, particularly over the last approximately 800 years BP. Lake Vinderel represents an important archive of long-term environmental changes in the sensitive high-mountain ecosystems of the Carpathians.

Key Words: Holocene, pollen analysis, vegetation dynamics, high-mountain ecosystems, human impact

Úvod

Paleolimnológia využíva jazerné sedimenty ako prírodné archívy dlhodobých environmentálnych zmien. Vrstvy sedimentov sa kontinuálne akumulujú a zachovávajú biologické aj geochemické indikátory minulých podmienok (napr. peľové zrná, zvyšky hmyzu, diatómy či mikroskopické zvyšky uhlíka) a sú často datovateľné pomocou rádioizotopických metód [1, 2]. Práve tieto sedimentárne dáta poskytujú chronológiu pre rekonštrukciu vývoja krajiny, klímy a vegetácie, čo je kľúčové pre pochopenie súčasných ekologických procesov a predikciu ich budúceho vývoja.

Palynológia – štúdium peľových zŕn a spór – je jedným z najpoužívanejších nástrojov paleoekologického výskumu, pretože peľové zrná majú typicky odolný vonkajší obal, exinu tvorenú sporopolenínom, ktorý zabraňuje degradácii v sedimentárnych sekvenciách [3]. Analýzou zmien peľových spektier v sedimentárnom zázname je možné rekonštruovať dynamiku vegetácie a súvisiacich environmentálnych zmien cez sto- až tisícročia, vrátane identifikácie antropogénnych vplyvov, ako je odlesňovanie a rozširovanie otvorených biotopov [4].

Vysokohorské jazerá predstavujú osobitný typ paleolimnologických záznamov: ich sedimenty akumulujú informácie o klimatických podmienkach a biotických spoločenstvách vo veľmi citlivých ekosystémoch, ktoré reagujú na zmeny teploty, zrážok

a ľudských aktivít oveľa intenzívnejšie než nížinné oblasti [1]. Tieto jazera sú všeobecne oligotrofné, chladné a často relatívne izolované, čo zvyšuje hodnotu ich sedimentov ako chronologických záznamov environmentálnych zmien v prehistorickom aj historickom období [5, 6].

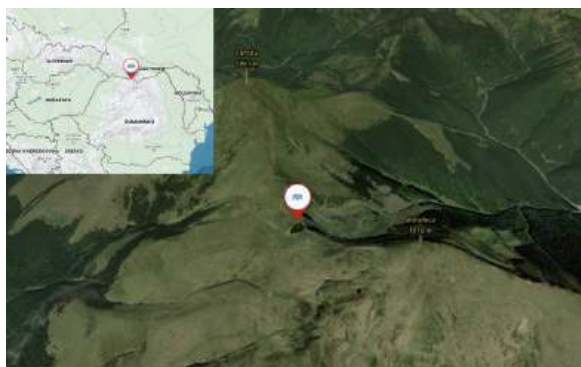
Jazero Vinderel vo Východných Karpatoch predstavuje významný paleoekologický objekt, pričom predpokladáme, že jeho sedimentárny záznam zachytáva kontinuálny a lokálne citlivý priebeh zmien vegetácie a environmentálnych podmienok počas holocénu. Tento predpoklad vychádza z jeho malej rozlohy, vysokej nadmorskej výšky a relatívnej izolovanosti, ktoré podporujú dominanciu lokálneho peľového signálu a dobré zachovanie sedimentov. Očakávame, že záznam bude odrážať nielen klimaticky podmienené zmeny vegetácie, ale aj postupne narastajúci antropogénny vplyv v neskorom holocéne. Cieľom nášho výskumu bolo rekonštruovať environmentálne a vegetačné zmeny v okolí tohto jazera v priebehu Holocénu a identifikovať zmeny, ktoré sú dôsledkom ľudskej činnosti.

1 Materiál a metódy

Na účely rekonštrukcie vegetačných a environmentálnych zmien v okolí jazera Vinderel boli využité paleolimnologické a palynologické metódy.

1.1 Opis lokality

Jazero Vinderel (*Lacul Vinderel*) sa nachádza vo Východných Karpatoch, v pohorí Maramureš (Munții Maramureșului) na severe Rumunska. Jazero leží vo vrcholovej horskej polohe medzi dvoma vrcholmi – Farcau a Mihăilecu, v nadmorskej výške 1 676 m n. m. (Obr. 1). Táto oblasť patrí k jedným z mála relatívne nedotknutých horských prostredí v Európe a je súčasťou Maramureș Mountains Natural Park, chráneného územia s vysokou biodiverzitou a bohatou horskou faunou a flórou [7].



Obr. 1 Poloha jazera Vinderel vo Východných Karpatoch
Zdroj: Mapy.com, 2026

Jazero je hydrologicky uzavretým systémom, napájaným prevažne z topiaceho sa snehu a dažďovej vody. V dôsledku extrémnych horských podmienok – nízkych teplôt, vysokého množstva zrážok a krátkeho vegetačného obdobia – je región charakteristický horskými lúkami, kosodrevinou a rastlinami typickými pre subalpínsku vegetáciu (vrátane trávnatých spoločenstiev), ktoré tvoria dôležité biotopy pre vysokohorské druhy rastlín a živočíchov [8].

Okolie jazera je charakteristické vysokou zonálnosťou vegetácie typickou pre Východné Karpaty. Nižšie polohy sú tvorené montánnymi smrekovo-bukovými lesmi (*Picea abies*, *Fagus sylvatica*, *Abies alba*), ktoré prechádzajú do pásma kosodreviny (*Pinus mugo*) a subalpínskych trávnatých spoločenstiev s dominanciou druhov čeľade Poacea a Cyperaceae. Táto krajina je charakterizovaná strmými svahmi, v najvyšších polohách sa uplatňujú alpínske lúky a skalné biotopy, ktoré sú dôkazom pleistocénnych glaciálnych procesov, ktoré formovali reliéf regiónu [9, 21, 37, 38,].



Obr. 2 Pohľad na jazero Vinderel, v pozadí vrchol Farcau
Zdroj: Ladislav Hamerlík, 2022

Vzhľadom na svoju izolovanú polohu a skutočnosť, že ide o najväčšie a najhlbšie jazero v pohorí (s plochou cca 0,6 ha a maximálnou hĺbkou 5 m), predstavuje jazero Vinderel cenný objekt, pre paleolimnologický výskum.

1.2 Prieskum dna a odber sedimentu

Pred realizáciou odberu sedimentárneho jadra bolo dno jazera detailne preskúmané pomocou sub-bottom sonarového systému SB-216S typu *chirp*. Sonarové merania umožnili určiť celkovú hrúbku sedimentárnej výplne, identifikovať typ usadenín a lokalizovať objekty nesusedimentárneho pôvodu. Na základe týchto údajov bolo vybrané miesto vhodné na samotný odber jadra.

Dve sedimentárne jadrá boli odobraté z dvoch miest v najhlbšej časti jazera pomocou piestového jadrovacieho zariadenia Uwitec Piston Corer, ktoré je štandardne používané v paleolimnologických výskumoch pre získavanie neporušených sedimentárnych sekvencií (Obr. 3) [10].



Obr. 3 Odber sedimentačného jadra na jazere Vinderel
Zdroj: Peter Uhlík, 2022

Jadro VIN 4-2 s dĺžkou 330cm bolo prepravené do laboratórnych podmienok (Obr. 4). Po transporte bolo jadro pozdĺžne rozrezané na dve polovice, z ktorých jedna bola určená na litologický opis a druhá na analýzu paleoindikátorov. Litologická charakteristika zahŕňa opis zrnitosti, farby, štruktúry a typu sedimentu. Pracovná polovica jadra bola následne rozdelená na centimetrové intervaly pomocou geologických dlát. Jednotlivé vzorky boli uložené do vopred označených uzatvárateľných plastových vrecúšok a skladované pri teplote 4 °C až do ďalšieho spracovania pre datovanie a proxy analýzy, vrátane peľu, pakomárov a biomarkerov.



Obr. 4 Preprava sedimentačných jadier z terénneho odberu
Zdroj: Peter Uhlík, 2022

Chronológia sedimentárneho profilu bola zostavená na základe rádiokarbónového datovania piatich vybraných organických zvyškov. Získané ^{14}C dáta boli použité na konštrukciu vekovo-hĺbkového modelu, ktorý poskytol spoľahlivý časový rámec pre interpretáciu paleoenvironmentálnych zmien zaznamenaných v sedimentoch [11, 12].

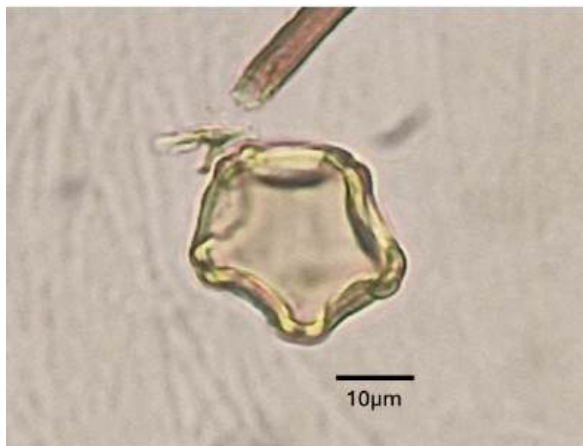
1.3 Laboratórne spracovanie

Pre palynologickú analýzu bolo zo sedimentárneho profilu odobratých 66 vzoriek s objemom 0,5 cm³ pomocou upravenej injekčnej striekačky. Vzorky boli spracované v laboratóriu klasickou acetolyzačnou metódou, ktorá predstavuje štandardný postup v palynológii [13, 14]. Táto metóda umožňuje postupné uvoľnenie a homogenizáciu sedimentu, odstránenie humínových látok, karbonátov, ílových minerálov a väčšiny organických zvyškov, pričom zachováva chemicky odolné peľové zrná. Vysoká rezistencia exiny (vonkajšieho obalu) peľových zŕn, tvorenej sporopolenínom, umožňuje selektívne odstránenie nežiaducich zložiek bez poškodenia analyzovaného materiálu [15]. Peľový materiál bol extrahovaný postupným premývaním v chemikáliách a varením vo vodnom kúpeli, následne bol prevedený do mikroskopovacieho média (zmes glycerínu a vody v pomere 2 : 1).

Laboratórne spracovanie vzoriek prebiehalo v súlade s platnými pravidlami bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci. Pomôcky boli dôsledne označené a pre každú vzorku bol používaný samostatný súbor nástrojov, čím sa minimalizovalo riziko kontaminácie.

1.4 Determinácia peľových zŕn

Zo spracovaných vzoriek boli pripravené mikroskopické preparáty nanosením premiešanej vzorky na podložné sklíčko a jej prekrytím krycím sklíčkom. Determinácia peľových zŕn prebiehala pomocou svetelného mikroskopu pri 400-násobnom zväčšení (Obr. 5). Mikroskopické pozorovanie prebiehalo systematickým prehľadávaním preparátu zhora nadol a späť, s postupným posunom zorného poľa zľava doprava, aby sa predišlo viacnásobnému započítaniu jednotlivých peľových zŕn.



Obr 5 Peľové zrnko *Alnus* sp. pod mikroskopom pri 400-násobnom zväčšení

Zdroj: Silvia Bartóková, 2025

Počítanie a spracovanie peľových zŕn bolo realizované pomocou softvéru PolPal [16]. V každej vzorke bolo spočítaných minimálne 500 peľových zŕn, pričom základná suma bola definovaná ako AP + NAP = 100 % (kde AP - arborálne taxóny predstavujú peľ drevín a krovín; a NAP - non-arborálne taxóny zahŕňajú peľ bylín a tráv). Na stanovenie absolútnych peľových koncentrácií bola použitá metóda exotického markera s pridaním tabliet spór rodu *Lycopodium* so známym počtom zŕn ešte pred chemickým spracovaním vzoriek [17].

Determinácia peľových zŕn bola vykonávaná na základe štandardných palynologických atlasov a determinačných kľúčov [14, 18, 19], pričom použitá nomenklatura vychádzala z týchto zdrojov. Na podporu a spresnenie determinácie boli využité aj online databázy ako Pollenatlas a PalDat – Palynological Database. Výsledné palynologické dáta boli vizualizované vo forme stratigrafických peľových diagramov v programe C2 [20] po ich predchádzajúcej úprave a prepočte na percentuálne hodnoty v programe Microsoft Excel.

2 Výsledky a diskusia

Sedimentárne jadro z jazera Vinderel má dĺžku približne 300 cm a predstavuje kontinuálny záznam posledných približne 7500 rokov BP. Chronológia profilu bola určená pomocou rádiokarbónového datovania makrozvyškov a následne modelovaná vekovo-hĺbkovým modelom.

V rámci palynologickej analýzy bolo spracovaných 66 sedimentárnych vzoriek, z ktorých bolo determinovaných 53 peľových taxónov. Na základe

rádiokarbónovej chronológie a zmien v zložení peľových spektier bolo možné rozdeliť celý profil do niekoľkých peľových zón, ktoré odrážajú hlavné fázy vývoja vegetácie a environmentálnych podmienok v horskej oblasti Maramureš počas holocénu (Príloha č.1).

Najstaršia časť profilu (7500 – 5400 rokov BP) dokumentuje vývoj lesnej vegetácie dominovanej drevinami ako jelša (*Alnus*), breza (*Betula*), lieska (*Corylus avellana*), jedľa (*Abies alba*), pričom v menších podieloch sa vyskytovali aj borovica (*Pinus*), brest (*Ulmus*) a dub (*Quercus*). Takéto zloženie je typické ešte pre ranoholocénne lesy Karpát, ktoré kombinovali pionierske dreviny (*Betula*, *Alnus*) s ihličnanmi a listnatými stromami viazanými na vlhšie stanovištia [21]. Zvýšený podiel *Alnus* pravdepodobne odráža rozvoj vlhkých brehových a pramenných biotopov v okolí jazera.

Relatívne skorý výskyt jedle v oblasti jazera Vinderel je pozoruhodný. V stredoeurópskych záznamoch sa prvé peľové zrná jedle objavujú už medzi ~10 200 a ~6 800 rokov BP, pričom jej výraznejšia expanzia nastáva v strednom holocéne (~4 800 – 3 800 rokov BP) [22]. V niektorých vysokohorských polohách a v rumunskej časti Východných Karpát sú však kontinuálne záznamy *Abies* doložené až neskôr (napr. 3200 – 2500 rokov PB) [23]. Tento rozdiel poukazuje na variabilitu nástupu a šírenia *Abies* v závislosti od mikroklimatických a ekologických podmienok.

V období približne 4800 – 2400 rokov BP dochádza k výraznej zmene vegetačného krytu. Peľové spektrá poukazujú na expanziu buku (*Fagus sylvatica*) a jedle, ktoré postupne nahrádzajú *Pinus* a *Betula*. Výsledkom je vznik bukovo-jedľových lesov, typických pre vlhké a klimaticky stabilné podmienky tohto obdobia. Tento trend bol zaznamenaný aj v iných oblastiach rumunských Východných Karpát, v okolí pohoria Rodna [21], a zodpovedá fáze holocénneho klimatického optima.

V tomto období sa objavuje aj smrek obyčajný (*Picea abies*), ktorého rozšírenie v Karpatoch je často spájané s miernym ochladením a zvýšenou vlhkosťou v neskoršej časti stredného holocénu [24]. Neskorší nárast hrabu obyčajného (*Carpinus betulus*) odráža postupnú zmenu lesných spoločenstiev, kde dochádza k sukcesii zmiešaných lesov, ktoré poskytujú vhodné polotienisté podmienky pre rast ostatných druhov rastlín [25].

Od približne 3 000 rokov BP sa v peľovom zázname prejavuje zvýšený podiel nearboreálnych taxónov, najmä tráv (Poaceae), ostríc (Cyperaceae) a bylín. Hoci

Fagus, *Abies* a *Carpinus* zostávajú dominantnými lesnými zložkami, nárast otvorených vegetačných prvkov naznačuje vznik mozaikovitej krajiny. Tento vývoj je často interpretovaný ako kombinovaný dôsledok miernych klimatických zmien a narastajúcej ľudskej činnosti, najmä pastvy a lokálnych kľčovanií [26, 27].

Podobné signály antropogénneho ovplyvnenia krajiny boli zaznamenané aj na iných lokalitách Východných Karpát, kde sa v tomto období objavujú prvé výraznejšie stopy po hospodárskom využívaní horských oblastí, zatiaľ čo jadrové lesné porasty pretrvávali najmä vo vyšších a menej dostupných polohách [28].

Najmladšia časť profilu (posledných približne 800 rokov BP) je charakterizovaná výrazným poklesom podielu lesných drevín, najmä *Fagus*, *Abies* a *Picea*, sprevádzaný výrazným nárastom tráv a bylín tolerantných voči disturbanciám. Zvýšené zastúpenie druhov z čeľade Asteraceae, ako je *Artemisia* či *Aster*-type signalizuje otvorené stanovišťa s narušenými brehovými biotopmi. *Artemisia*, ako typický ruderal, kolonizuje narušené a eutrofizované plochy, ktoré vznikajú po porušení pôvodnej vegetácie, čo odráža intenzitu antropogénnych vplyvov a transformáciu krajiny v priebehu posledných storočí [29].

V regióne Východných Karpát a najmä vo vyšších polohách sa v tomto období historicky uplatňovala tzv. valašská kolonizácia — forma osídľovania a pastevného hospodárstva, ktorá sa šírila pozdĺž horských hrebeňov od 14. do 17. storočia [30]. Valasi (pôvodom z rumunsko-ruthénskeho prostredia) sa usádzali v horských oblastiach a intenzívne odlesňovali tieto oblasti, aby získali nové pasienky, čo viedlo k premene pôvodných lesov na pasienky a celkovému otvoreniu krajiny. Podobné paleoenvironmentálne štúdie z iných častí Karpát poukazujú na výraznú deforestáciu a následnú eróziu pôdy počas valašskej kolonizácie aj v 16. a 17. storočí [31, 32].

Vegetačný vývoj zaznamenaný v jazere Vinderel je v súlade s ostatnými palynologickými štúdiami z Východných Karpát, ktoré dokumentujú výrazný antropogénny tlak na horské ekosystémy v posledných storočiach, pričom vysokohorské polohy si dlhšie zachovávali prirodzený charakter v porovnaní s nižšie položenými oblasťami [33, 34]. Takéto dlhodobé prepojenie prírodných a kultúrnych faktorov je zaznamenané aj v iných lokalitách Karpát, kde vzostupy a poklesy ľudskej populácie, vojenské

konflikty a historické udalosti sú dobre reflektované v peľových záznamoch [34, 35, 36].

Záver

Palynologický záznam zo sedimentov jazera Vinderel poskytuje detailnú rekonštrukciu vývoja vegetácie a environmentálnych podmienok v citlivom vysokohorskom prostredí pohoria Maramureš. Výsledky ukazujú, že zmiešané lesy, tvorené drevinami ako *Betula*, *Corylus* a *Pinus*, boli primárne formované klimatickými podmienkami, pričom lokálne mikroklimatické faktory umožnili skorý výskyt jedle *Abies alba* v tejto oblasti v porovnaní s inými časťami Východných Karpát. Stredoholocénne obdobie charakterizuje expanzia *Fagus sylvatica* a *Abies alba* a vznik bukovo-jedľových lesov, čo korešponduje s holocénnym klimatickým optimom.

Od približne 3 000 rokov pred súčasnosťou sa záznam vyznačuje postupným otváraním krajiny a nárastom bylinnej vegetácie, čo je dôsledok kombinácie miernych klimatických zmien a ľudskej činnosti, predovšetkým pastvy a drobného lesného hospodárstva. Najmladšia časť profilu poukazuje na intenzívnu antropogénnu aktivitu v stredoveku a novoveku, prejavujúcu sa poklesom hlavných lesných drevín a expanziou bylinných taxónov.

Tieto zistenia zdôrazňujú význam vysokohorských jazier ako paleoekologických archívov, ktoré poskytujú cenné informácie o dynamike vegetácie, interakcii klímy a ľudskej činnosti a o reakcii citlivých horských ekosystémov na environmentálne zmeny. Z hľadiska ochrany prírody a predikcie budúcich zmien sú takéto dlhodobé rekonštrukcie vzácne, pretože ukazujú, ako kombinácia klimatických faktorov a antropogénnych zásahov formovala súčasnú krajinu a biodiverzitu horských oblastí Karpát.

Podakovanie

Rada by som sa poďakovala konzultantke Ing. Kataríne Trnkovej, PhD. za metodické usmernenie a podnetné pripomienky. Zároveň ďakujem prof. RNDr. Petrovi Bitušíkovi, CSc., za jeho cenné a odborné pripomienky a zabezpečenie výskumu. Výskum bol realizovaný s podporou grantu APVV-20-0358 (2021-2025).

Zoznam bibliografických odkazov

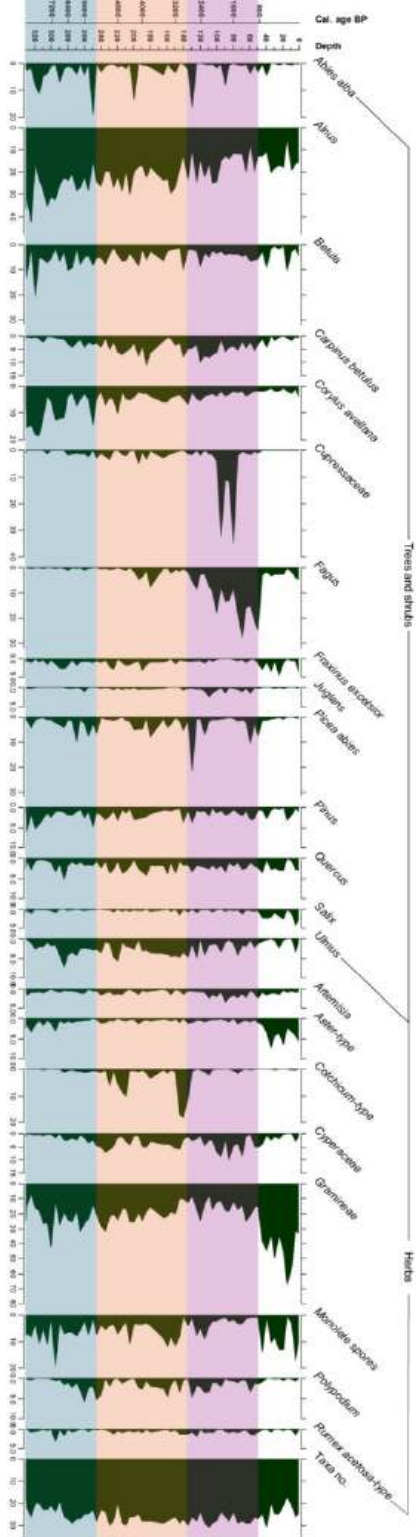
- [1] MA, Q.; ZHU, L.; JU, J.; WANG, J.; WANG, Y.; HUANG, L.; & HABERZETTL, T. (2023). A modern pollen dataset from lake surface sediments on the central-western Tibetan

- Plateau. *Earth System Science Data Discussions*, 2023, 1-15.
- [2] CAO, X.; TIAN, F.; LI, K.; NI, J.; YU, X.; LIU, L.; & WANG, N. (2021). Lake surface sediment pollen dataset for the alpine meadow vegetation type from the eastern Tibetan Plateau and its potential in past climate reconstructions. *Earth System Science Data*, 13(7), 3525-3537.
- [3] BILTEKIN, D.; ERIS, K. K.; SCHACHNER, A.; YAKUPOGLU, N., & YAKUPOGLU, C. (2025). Late Holocene vegetation dynamics and climate variations through pollen analysis of sediments from Lake Sülük (Corum, Türkiye). *Review of Paleobotany and Palynology*, 334, 105280.
- [4] ZARGAR, M. A.; RIYAZ, M.; HUSSAIN, S. M.; NAZIR, A.; HAMID, S.; GOJREE, I. A., & PARRAY, K. A. (2025). Pollen and spores as proxies for paleoenvironment reconstruction: A review of sediment-based research. *Journal of the Paleontological Society of India*, 05529360251318072.
- [5] CATALAN, J. et al. (2013). Global change revealed by paleolimnological records from remote lakes: a review. *Journal of Paleolimnology*, 49(3), 513-535.
- [6] MOSER, K. A. et al. (2019). Mountain lakes: Eyes on global environmental change. *Global and Planetary Change*, 178, 77-95.
- [7] KLAPYTA, P.; MINDRESCU, M.; ZASADNI, J., & DUBIS, L. (2024). Glacial geomorphology and glacier reconstruction in the Maramures Mountains (Romania and Ukraine). *Geoconcept Journal*, 1, 80-102.
- [8] FLORESCU, G. et al. (2024). The legacy of millennial-scale land-use practices on landscape composition, diversity and slope erosion in the subalpine areas of Eastern Carpathians, Romania. *The Holocene*, 34(4), 467-486.
- [9] COLDEA, G.; STOICA, I. A.; PUSCAS, M.; URSU, T.; OPREA, A., & IntraBioDiv Consortium. (2009). Alpine-subalpine species richness of the Romania Carpathians and the current conservation status of rare species. *Biodiversity and Conservation*, 18(6), 1441-1458.
- [10] GLEW, J. R.; SMOL, J. P., & LAST, W. M. (2001). Sediment core collection and extrusion. In *Tracking environmental change using lake sediments: basin analysis, coring, and chronological techniques* (pp. 73-105). Dordrecht: Springer Netherlands.
- [11] RAMSEY, C. B. (2008). Deposition models for chronological records. *Quaternary Science Reviews*, 27(1-2), 42-60.
- [12] BLAAUW, M., & CHRISTEN, J. A. (2011). Flexible paleoclimate age-depth models using an autoregressive gamma process. *Bayesian Analysis*, 6(3) 457-474.
- [13] ERDTMAN, G. (1960). The acetolysis method. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54, 561-564. [13]
- [14] MOORE, P. D.; WEBB, J. A., & COLLINSON, M. E. (1991). *Pollen Analysis*. 2nd Edition, Blackwell, Oxford, 1-216.
- [15] TRAVERSE, A. (2007). *Paleopalynology*. 2nd Edition, Springer Science & Business Media, 814. ISBN 978-1-4020-6684-9.
- [16] WALANUS, A., & NALEPKA, D. (2003). PolPal: counting pollen made easy: *Acta Paleobotanica*, 43, 211-216.
- [17] BENNINGHOFF, W. S. (1962). Calculation of pollen and spores density in sediments by addition of exotic pollen. *Pollen et Spores*, 4, 332-333.
- [18] BEUG, H. J. (2004). *Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete* (Guide to the Pollen Analysis for Central Europe and the Adjacent Areas). München: Pfeil, 542. ISBN 978-3-89937-043-0.
- [19] DEMSKE, D.; MULLER, S.; TARASOV, P. E., & HOELZMANN, P. (2013). *Pollen atlas of Arctic plants*. Springer.
- [20] JUGGINS, S. (2007). *C2 software for ecological and paleoecological data analysis*. University of Newcastle.
- [21] TANTAU, I.; FEURDEAN, A.; de BEAULIEU, J. L.; REILLE, M., & FARCAS, S. (2011). Holocene vegetation history in the upper forest belt of the Eastern Romanian Carpathians. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 309(3-4), 281-290.
- [22] PIDEK, I. A.; SVITAVSKÁ-SVOBODOVÁ, H.; VAN DER KNAAP, W. O., & MAGYARI, E. (2013). Pollen percentage thresholds of *Abies alba* based on 13-year annual records of pollen deposition in modified Tauber traps: perspectives of application to fossil situations. *Review of Paleobotany and Palynology*, 195, 26-36.

- [23] FARCAS, S.; TANTAU, I.; MINDRESCU M., & HURDU, B. (2013). Holocene vegetation history in the Maramures mountains (Northern Romanian Carpathians). *Quaternary International*, 293, 92-104.
- [24] BJORKMAN, L.; FEURDEAN, A., & WOHLFARTH, B. (2003). Late-glacial and holocene forest dynamics at Steregoiu in the Gutaiului Mountains, Northwest Romania. *Review of Paleobotany and Palynology*, 124(1-2), 79-111.
- [25] PETROKAS, R.; BALIUCKAS, V., & MANTON, M. (2020). Successional categorization of European hemi-boreal forest tree species. *Plants*, 9(10), 1381.
- [26] TARASOV, P. E. et al. (2022). Lateglacial and Holocene changes in vegetation and human subsistence around Lake Zhizhitskoye, East European midlatitudes, derived from radiocarbon-dated pollen and archeological records. *Quaternary International*, 623, 184-197.
- [27] TRONDMAN, A. K., et al. (2015). Pollen-based quantitative reconstructions of Holocene regional vegetation cover (plant-functional types and land cover types) in Europe suitable for climate modelling. *Global change biology*, 21(2), 676-697.
- [28] ROMHÁNYI, B. F.; PINKE, Z., & LASZLOVSZKY, J. (2020). Environmental impacts of medieval uses of natural resources in the Carpathian Basin. *The Hungarian historical review*, 9(2), 241-283.
- [29] HRABOVSKÝ, M.; ŠČEVKOVÁ, J.; RENDEKOVÁ, A.; ZÁHRADNÍKOVÁ, E., & JAROLÍMEK, I. (2025). Long-term changes in the allergenic potential of ruderal vegetation in a Central European urban area. *Regional Environmental Change*, 25(1), 35.
- [30] PORTA RUSICA (n.d.). Valašská kolonizácia. Retrieved February 18, 2026 from https://portarusica.sk/zastavky/2-valasska-kolonizacia/?utm_source=chatgpt.com
- [31] KLAPYTA, P. (2024). The evolution of settlement under the Wallachian Law in the Polish Carpathians. *Balkanica Posnaniensia. Acta Et Studia*, 31, 363-384.
- [32] KAPUSTOVÁ, V., et al. (2018). Peat bog and alluvial deposits reveal land degradation during 16th and 17th century colonisation of the Western Carpathians (Czech Republic). *Land Degradation & Development*, 29(4), 894-906.
- [33] FEURDEAN, A., et al. (2013). Biodiversity variability across elevations in the Carpathians: parallel change with landscape openness and land use. *The Holocene*, 23(6), 869-881.
- [34] SLOBODNÍKOVÁ, V., et al. (2025). Reconstructing limnological and vegetation changes in the Eastern Carpathians (Ukraine) over the past 200 years inferred from sediments of three contrasting alpine lakes. *Regional Environmental Change*, 25(4), 119.
- [35] CHAPMAN, J. (2018). Climatic and human impact on the environment?: A question of scale. *Quaternary International*, 496, 3-13.
- [36] DEZAA-ARAUJO, M., et al. (2020). A critical assessment of human-impact indices based on anthropogenic pollen indicators. *Quaternary Science Reviews*, 236, 106291.
- [37] FEURDEAN, A.; LIAKKA, J.; VANNIÉRE, B.; MARINOVA, E.; HUTCHINSON, S. M.; MOSBURGGER, V., & HICKLER, T. (2014). Climate variability and associated vegetation response throughout Central and Eastern Europe. *Quaternary Science Reviews*, 106, 206-224.
- [38] MAGYARI, E. K.; JAKAB, G.; RUDNER, E. & SÜMEGI, P. (2014). Holocene vegetation dynamics in the East Carpathians. *Quaternary Science Reviews*, 90, 144-159.

Prílohy

Príloha č. 1 Vývoj vegetácie (peľový diagram) jazera Vinderel



2D simulácia 100 ročného prietoku na rieke Žitava

2D simulation of the 100-year discharge on the Žitava River

Adam Čaplák¹ – Henrich Grežo²

^{1,2}Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

¹adam.caplak@ukf.sk, ²hgrezo@ukf.sk

Abstrakt

Povodne predstavujú jedno z najzávažnejších prírodných rizík, ktoré ohrozujú ľudské životy, zdravie, infraštruktúru, kultúrne dedičstvo a životné prostredie. Z dôvodu zvyšujúcej sa frekvencie a intenzity extrémnych zrážkových udalostí, ako dôsledky klimatických zmien a rastúceho antropického tlaku, je identifikácia a hodnotenie povodňovej náchylnosti území čoraz dôležitejšia. V predloženej štúdii sme sa zamerali na neregulovaný úsek horného toku rieky Žitava, konkrétne na katastrálne územia Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou, ktoré patria medzi oblasti výrazne ohrozené klimatickými extrémami. Cieľom výskumu bolo modelovanie rozsahu 100-ročnej povodne s využitím softvéru MIKE+ a následný výpočet počtu zasiahnutých budov prostredníctvom GIS nástrojov. Hydraulické modelovanie bolo založené na detailnom digitálnom modeli reliéfu (DMR 5.0) a údajoch z vodomernej stanice Vieska nad Žitavou. Výsledky ukázali maximálnu hĺbku zaplavenia 3,26 m a identifikovali 92 potenciálne zasiahnutých budov, čo predstavuje 5,68 % zo všetkých budov v skúmanom území. Zistenia prispievajú k efektívnejšiemu hodnoteniu povodňových rizík a môžu byť využité pri plánovaní preventívnych opatrení a územného rozvoja.

Kľúčové slová: 2D simulácia, povodeň, 100-ročný prietok

Abstract

Floods represent one of the most severe natural hazards threatening human lives, health, infrastructure, cultural heritage, and the environment. Due to the increasing frequency and intensity of extreme precipitation events as a result of climate change and growing anthropogenic pressure, the identification and assessment of flood susceptibility in territories is becoming increasingly important.

In the presented study, we focused on the unregulated section of the upper course of the Žitava River, specifically the cadastral areas of Nová Ves nad Žitavou, Slepčany, and Vieska nad Žitavou, which are among the areas significantly threatened by climate

extremes. The aim of the research was to model the extent of a 100-year flood using the MIKE+ software and subsequently calculate the number of affected buildings through GIS tools.

The hydraulic modelling was based on a detailed digital terrain model (DTM 5.0) and data from the Vieska nad Žitavou gauging station. The results showed a maximum flood depth of 3.26 meters and identified 92 potentially affected buildings, representing 5.68% of all buildings in the studied area. The findings contribute to more effective flood risk assessment and can be used in planning preventive measures and spatial development.

Key Words: 2D simulation, flood, 100-year flow

Úvod

Povodne ohrozujú životy a zdravie obyvateľov, kultúrne dedičstvo, životné prostredie, spôsobujú škody na majetku a obmedzujú hospodárske aktivity [1]. Povodne sú najbežnejším prírodným procesom, ktorý spôsobuje škody na majetku a stratách na životoch v našej geografickej oblasti [2]. Identifikácia oblastí náchylných na povodne je dôležitá otázka, ktorá si vyžaduje zvýšenú pozornosť vzhľadom na meniacu sa frekvenciu a rozsah povodní, čo je najmä dôsledkom prebiehajúcej zmeny klímy a rastúceho antropického tlaku na krajinu [3]. Ohrozenie slovenských obcí je spôsobené troma rôznymi dopadmi klimatických zmien: extrémnymi horúčavami, suchom a extrémnymi zrážkami [4].

Fluviálne záplavy sú charakteristické prietokmi vody, ktoré spôsobujú vyliatie z brehov riek a ohrozujú priľahlé záplavové oblasti [5]. Individuálne morfológické charakteristiky povodí riek významne ovplyvňujú ich aktivitu; ovplyvňujú prietok vody, akumuláciu vody v povodí, čas odtoku vody a ďalšie atribúty, ktoré ovplyvňujú ich intenzitu počas príválových povodní [6].

Mapovanie a hodnotenie náchylnosti na povodne je dôležitým prvkom stratégií prevencie a zmierňovania povodní, pretože identifikuje najzraniteľnejšie oblasti na základe fyzikálnych charakteristík, ktoré určujú náchylnosť na záplavy [7]. Povodňové ohrozenie

vodného toku je chápané komplexnejšie, pričom sa zohľadňuje súbor ovplyvňujúcich premenných a ich atribútov, ktoré majú vplyv na povodňové riziko [8]. Cieľom výskumu bolo modelovanie rozsahu záplavy, následný výpočet zasiahnutých budov na neregulovanej časti rieky Žitava v katastrálnych územiach Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou. Modelovanie sme vykonali v programe MIKE +, výpočet v programe QGIS s hodnotou 100 ročného prietoku z vodomernej stanice vo Vieske nad Žitavou.

1 Metodika

V rámci jednotlivých podkapitol kapitoly 1 sú uvedené a zhrnuté vstupné údaje pre hydrologické modelovanie v programe MIKE+.

1.1 Vstupné údaje

V rámci modelovania MIKE+ vstupujú do výpočtov topografické údaje, okrajové podmienky, riečna sieť, koeficient drsnosti, časový krok výpočtu, výpočtová sieť a batymetria.

Modely povodní založených na digitálnych modeloch reliéfu s vysokým rozlíšením sú dôležité na identifikáciu zaplavenia mestských pozemkov [12]. Vyhodenie riečnej siete pre naše záujmové územie sme vykonali v programe QGIS na základe digitálneho modelu reliéfu (vo formáte „Hillshade“), pričom sme dostali presné údaje o koryte rieky. Dĺžka vodného toku na ktorom sme vykonali simuláciu bola v celkovej dĺžke 14,28 km (nad záujmovým územím v dostatočnej rezerve, v našom prípade 0,6 km) dlhšia ako dĺžka vodného toku v rámci nášho záujmového územia. Preto, aby sme v rámci nášho záujmového územia už mali ustálené prúdenie hladiny. Získane vrstvy sme pomocou vektorových línií pridali do Mesh Generátora. V tejto štúdií sme použili digitálny model reliéfu DMR 5.0 (1-cyklus projektového leteckého laserového skenovania 2017-2023) vo formáte TIFF + TFW, súradnicový referenčný systém S-JTSK[JTSK03] – kód EPSG:8353 [13]. Pri zadávaní hornej okrajovej podmienky sme vychádzali z údajov vypočítaných na vodomernej stanici Vieska nad Žitavou (Q100 - sto ročná povodeň = 80,0 m³/s [14]); dolná okrajová podmienka je hranica po prúde nastavená ako „vzťah Q/h (vzťah hladiny vypúšťanej vody)“.

Koeficient drsnosti bol zvolený v hodnotách od 0,02 až po hodnotu 1 v závislosti od typu územia z tabuľky podľa autora Chow, 1959 [9]. 2D modelovanie využíva na svoj výpočet nepravidelnú trojuholníkovú sieť [10]. Čím je sieť podrobnejšia, tým je výpočet presnejší. V našom prípade sme pracovali s 2 017 595 elementami. MIKE funguje efektívne, keď je hranica nastavená tak, aby zodpovedala potrebnému rozsahu povodia [11].

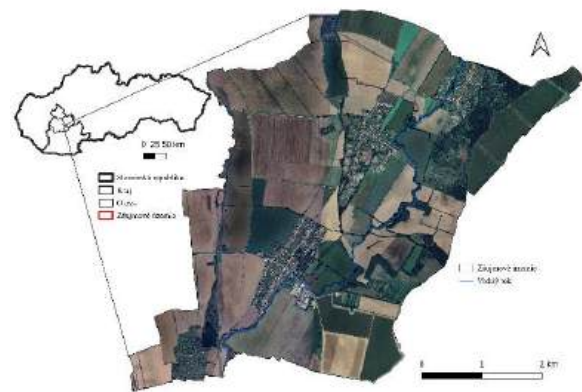
Použitie výrazne hrubšieho rozlíšenia trojuholníkovej siete by viedlo k nepresnému zobrazeniu nadmorskej výšky a batymetrie v oblasti záujmu.

Na získanie potrebných údajov ohľadom počtu budov sme využili plugin OpenStreetMap [19]. Tento údaj nám slúžil na záverečný výpočet počtu zasiahnutých budov.

1.2 Záujmové územie

V rámci nášho výskumu sme sa zamerali na horný tok rieky Žitavy, tok ktorý nie je regulovaný a nemá vybudované ochranné hrádze. Konkrétne sme sa venovali katastrálnym územiám Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou (Obr. 1). Územia, ktoré sa nachádzajú na rozhraní dvoch okresov Nitra a Zlaté Moravce v Nitrianskom kraji na južnom Slovensku.

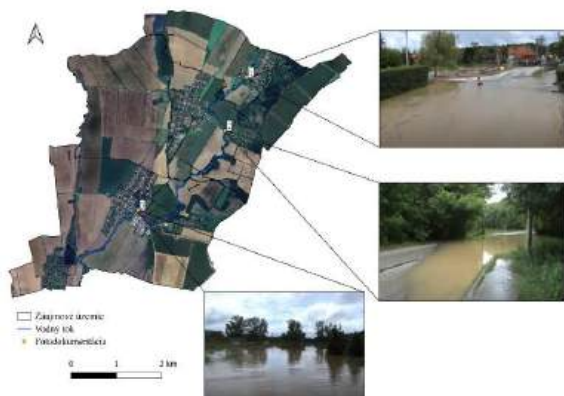
Na základe ohrozenia slovenských obcí troma dopadmi klimatických zmien: extrémnymi horúčavami, suchom a extrémnymi zrážkami radíme záujmové územie do oblastí Vieska nad Žitavou: sucho 9/10, horúčavy 9/10, zrážky 5/10; Nova Ves nad Žitavou: sucho 10/10, horúčavy 9/10, zrážky 5/10; Slepčany: sucho 9/10, horúčavy 9/10 a zrážky 6/10. Na základe posúdenia údajov o všetkých obciach na Slovensku sú priradené stupne ohrozenia: kým obce s hodnotou 10 patria medzi najohrozenejšie, obce s hodnotou 1 sú najmenej ohrozené obce na Slovensku [4].



Obr. 1 Záujmové územie

Zdroj: [13]; [15]; vlastné spracovanie

Počas júna 2010 sa v Slovenskej republike vyskytlo niekoľko povodní. Hlavnými príčinami týchto povodní boli dlhodobé dažde v kombinácii so silnými zrážkami [18]. V rámci nášho výskumu sme vybrali lokality, ktoré tieto povodne zasiahli (Obr. 2).

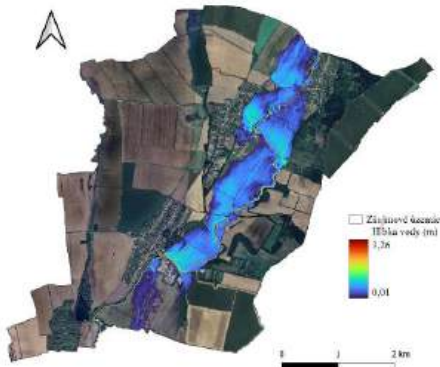


Obr. 2 Zaujmové územie počas povodne v roku 2010
Zdroj: [13]; [15]; fotografie: Tomáš Turček, 2010; vlastné spracovanie

2 Výsledky a diskusia

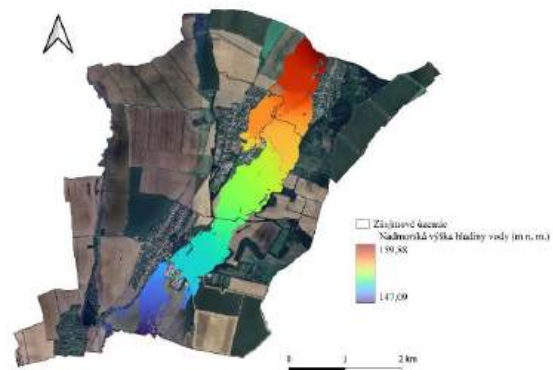
V rámci simulácií sme sa venovali dĺžke vodného toku 9,43 km z celkovej rozlohy 14,28 km. Dĺžke toku vo vybraných katastrálnych územiach obcí Nová Ves na Žitavu, Slepčany a Vieska nad Žitavou.

V prvej časti sa zameriame na hĺbku povodne v záujmovom území (Obr. 3). Hĺbky povodní sú v rozsahu 0,01 po 3,26 metra. Najväčšie hĺbky povodne sledujeme v severnej časti záujmového územia, konkrétne v katastrálnom území v obci Slepčany pri mostoch.



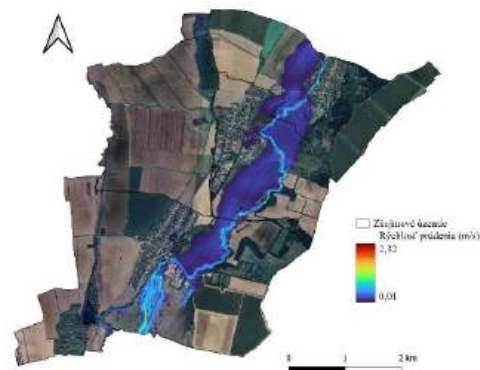
Obr. 3 Hĺbka nožnej povodne v záujmovom území
Zdroj: [9]; [13]; [15]; vlastné spracovanie

V kombinácii výšky hladiny povodne s nadmorskou výškou sledujeme na mape nadmorskú výšku hladiny vody (m n. m) v záujmovom území (Obr. 4). Rozsah nadmorskej výšky spolu s výškou povodne je v rozsahu od 147,09 po 159,88 m n. m.. Pričom v severnej časti záujmového územia sledujeme nadmorskú výšku spolu s hladinou vodného toku vyššiu, smerom na juh nadmorská výška spolu s hladinou vodného toku klesá.



Obr. 4 Nadmorská výška v kombinácii s hladinou nožnej povodne v záujmovom území
Zdroj: [9]; [13]; [15]; vlastné spracovanie

V rámci modelu sledujeme aj jednotlivé rýchlosti prúdenia vodného toku a povodne. Rýchlosti prúdenia dosahovali najvyššiu rýchlosť v koryte vodného toku, taktiež v blízkosti mostov (Obr. 5). V rámci modelu sme zaznamenali najvyššiu rýchlosť 2,32 m/s v severnej časti záujmového územia v blízkosti mostu.

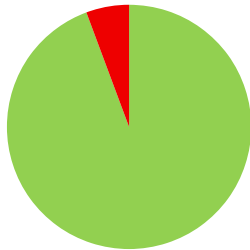


Obr. 5 Rýchlosť prúdenia nožnej povodne v záujmovom území
Zdroj: [9]; [13]; [15]; vlastné spracovanie

Dikici at al., 2022 [16] využili pre dvojrozmerné hydraulické simulovanie záplav MIKE 21, pričom poukázala na výhodu generovania máp rizika záplav MIKE 21 oproti MIKE 11 pri modelovaní povodňových udalostí. Autori poukázali na rast osídlenia v oblasti povodí a pokles leŤných oblastí, čím sa znížila miera zadržiavania vody a množstvo infiltrácie, z toho dôvodu autori očakávajú veľký počet krátkodobých maximálnych záplav. V našom výskume sme vykonali simuláciu povodne s hodnotou 100 ročnej vody (pre vodomernú stanicu Vieska nad Žitavou) pomocou modelu MIKE+.

Lamichhane et al., 2024 [17] hodnotia historické povodne na základne odhadov prietokov, terénnych prieskumov, hydrologických štúdií, kde predpovedali 100-ročne povodne. Hodnotenie ukázalo že 75% budov v blízkosti rieky čelí extrémnemu riziku takýchto udalostí.

V našom výskume sme sa zamerali na budovy v katastrálnych územiach Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou s celkovým počtom 1619. Počet možných budov zasiahnutých povodňou sme zistili 92, čo tvorí 5,68% (Graf 1, Obr. 6) z celkového počtu budov. Konkrétne v katastrálnom území Vieska nad Žitavou je to 23 budov (z celkového počtu 319), Slepčany 63 budov (z celkového počtu 458) a Nová Ves nad Žitavou 6 (z celkového počtu 842).

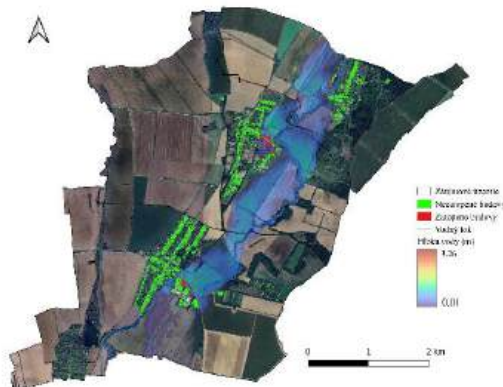


■ Nezatopené budovy (1527) ■ Zatopené budovy (92)

Graf 1 Počet zasiahnutých budov počas simulácie 100 ročnej povodne

Zdroj: [9]; [13]; [15]; [19] vlastné spracovanie

V rámci Viesky nad Žitavou sú to dve poľnohospodárske budovy a zvyšné budovy sídla, v obci Slepčany je to jedna budova v športovom areály a zvyšné budovy sídla a v obci Nová Ves nad Žitavou sú to štyri priemyselné budovy a zvyšné budovy sídla.



Obr. 6 Výsledná mapa rozsahu nožnej 100 ročnej povodne v záujmovom území

Zdroj: [9]; [13]; [15]; [19] vlastné spracovanie

Záver

Cieľom výskumu bolo modelovanie rozsahu záplavy, následného výpočtu zasiahnutých budov na neregulovanej časti rieky Žitavy v katastrálnych územiach Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou. Na simuláciu sme využili aktuálny digitálny model reliéfu, údaje o prietoku pre Q100 z vodomernej stanice Vieska nad Žitavou.

Pri povodňovej udalosti s prietokom Q100 (80,0 m³/s) by povodeň podľa nášho výpočtu zasiahla 92 budov v katastrálnych územiach Nová Ves nad Žitavou, Slepčany a Vieska nad Žitavou z celkového počtu 1 619. Pričom podľa súčasného územného plánu obce Vieska nad Žitavou (stred severnej časti záujmového územia) sú navrhované plochy výstavby rodinných domov v záplavovej oblasti Q100.

Výsledky našich zistení môžu byť využité pri plánovaní výstavby infraštruktúr, obytných budov alebo zlepšenie opatrení v rizikových oblastiach, čím môžu slúžiť na zníženie rizika škôd na majetkoch a ohrozenosti ľudských životov.

Podakovanie

Príspevok bol spracovaný v rámci projektu 09I01-03-V04-00092 Indikátory zmien krajiny v regióne Nitra v kontexte územného plánovania (INKLIPLAN) z Plánu obnovy a odolnosti SR.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ZELENÁKOVÁ, Martina, BLISTAN, Peter, PURCZ, Pavol. 2024. Flood vulnerability in Bodva River basin in Slovakia. Air & Water Components of the Environment/Aerul si Apa Componente ale Mediului. ISSN 2067-743X, 2015, pp. 1-8
- [2] RUMAN, Stanislav. 2019. Comparison of two flood risk assessment methods in the case of the Turiec River, Slovakia. *Acta Universitatis Carolinae.*, ISSN 0300-5402, 2019, vol. 49, no. 2, pp. 127-134. : <http://dx.doi.org/10.14712/23361980.2014.22>
- [3] VOJTEK, Matej et al. 2021 Comparison of multi-criteria-analytical hierarchy process and machine learning-boosted tree models for regional flood susceptibility mapping: a case study from Slovakia. *Geomatics, Natural Hazards and Risk.* (2021) 1153-1180. <https://doi.org/10.1080/19475705.2021.1912835>
- [4] RPI.GOV [online]. Zobrazovacia služba WMS-Ortofotomapa [17.09.2025]. Dostupné z : <https://rpi.gov.sk/metadata/6db4d064-cd47-4284-b4b2-4b3f8558d00e>
- [5] VOJTEK, Matej et al. 2025. Comparing hydraulic and

- GIS-based Height Above the Nearest Drainage model for fluvial flood hazard mapping: a case study of the Gidra River, Slovakia. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. (2025), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s00477-025-02988-0>
- [6] ZELENKOVA, Martina 2024. Morphometric parameterization of flash flood risk assessment. *Acta Montanistica Slovaca*. (2024) 712-723, <https://doi.org/10.46544/AMS.v29i3.17>
- [7] VOJTEK, Matej, VOJTEKOVA, Jana. 2019. Mapping on a National Scale in Slovakia using the Analytical Hierarchy Process. *Water*. (2024) 1-17. <https://doi.org/10.3390/w11020364>
- [8] SOLÍN, Ľubomír, MADAJOVÁ SLÁDEKOVÁ, Michala, MICHÁLEJE, Lukáš. 2024. Mapping the flood hazard potential of small watercourses in a mountain river basin. *Natural Hazards*. (2024) 3827-3845, <https://doi.org/10.1007/s11069-023-06348-5>
- [9] VEN TE, Chow. *Open-channel hydraulics*. New York: McGraw-Hill College Book Co; 1959. p. 680
- [10] CHEN, Jie. 2023. Dynamic and loss analysis of flood inundation in the floodplain area of the lower Yellow River considering ecological impact. *Journal Engineering and Applied Science*. (2023) 1-18, <https://doi.org/10.1186/s44147-023-00197-6>
- [11] ANSARIFARD, Sara et al. 2024. Simulation of floods under the influence of effective factors in hydraulic and hydrological models using HEC-RAS and MIKE 21. *Discover Water*. (2024) 1-31, <https://doi.org/10.1007/s43832-024-00155-0>
- [12] YOUNSHUAI, Liang, WEIHONG, Liao, HAO, Wang. 2025. A High-Resolution DEM-Based Method for Tracking Urban Pluvial-Fluvial Floods. *Remote Sensing*. (2025) 1-24, <https://doi.org/10.3390/rs17071225>
- [13] Geoportál LLS. [online]. Geoportál – ZBGIS - LLS [17.10.2025]. Dostupné z : <https://www.geoportál.sk/sk/zbgis/lis/>
- [14] SHMU. [online]. Slovenský hydrometeorologický ústav. [20.1.2025]. Dostupné z : <https://www.shmu.sk/sk/?page=1>
- [15] RPI.GOV1 [online]. Zrážka - ohrozenie zmenou klímy [17.09.2025]. Dostupné z : <https://rpi.gov.sk/metadata/1b133c15-b7b4-434b-a061-14c4ad71e9e4>
- [16] DIKICI, Mehmet, ALHAN-KAZEZYILMAZ MELEK, Cevza, GÜLBAZ, Sezer. 2022. Flood hazard assessment for alibeyköy watershed in Istanbul with mike nam and MIKE21. *Environmental Engineering and Management Journal*. (2022) 399-411, DOI: 10.30638/eemj.2022.038
- [17] LAMICHHANE, Suraj et al. 2024. Flood Hazard Mapping and Flood Vulnerability Analysis of Building Structures at Settlement-Scale. *Journal of Science and Engineering*. (2024) 25-34, <https://doi.org/10.3126/jsce.v11i01.73526>
- [18] GREŽO, Henrich et al. 2020 Flood Risk Assessment for the Long-Term Strategic Planning Considering the Placement of Industrial Parks in Slovakia. *Sustainability*, 2020, 12.10
- [19] OSM [online]. OpenStreetMap [cit. 22.10.2025]. Dostupné z internetu: <https://welcome.openstreetmap.org/what-is-openstreetmap/>

VÍRUS OBYČAJNEJ MOZAIKY FAZULE (BCMV) AKO VÝZNAMNÝ PATOGÉN STRUKOVÍN

Bean Common Mosaic Virus (BCMV) as a Significant Pathogen of Legumes

Tatiana Dobiašová¹ – Adam Achs² – Miroslav Glasa^{1,2}

¹Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

²Virologický ústav, BMC SAV v.v.i. Bratislava, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

¹dobiasova2@ucm.sk, ²adam.achs@savba.sk, ¹miroslav.glasa@ucm.sk, ²miroslav.glasa@savba.sk

Abstrakt

Vírus obyčajnej mozaiky fazule (*Bean Common Mosaic Virus* – BCMV) je jedným z najvýznamnejších vírusových patogénov strukovín, prenášaný voškami neperzistentným spôsobom a infikovanými semenami. Cieľom tejto práce bola molekulárna charakterizácia izolátu BCMV zo Slovenska a vývoj diagnostických nástrojov na jeho detekciu. Zo vzorky fazule obyčajnej (SK-LB2) bola zostavená celogenómová sekvencia BCMV (9 932 nt), ktorá vykazovala vysokú podobnosť s referenčnými izolátmi BCMV a obsahovala všetky funkčné domény typické pre rod *Potyvirus*. Na detekciu BCMV boli vyvinuté a optimalizované metódy RT-PCR, SYBR Green RT-qPCR a TaqMan RT-qPCR. Skrining vzoriek rôznych druhov strukovín pestovaných na experimentálnych poliach VÚRV NPPC v Piešťanoch odhalil vysokú prevalenciu BCMV, pričom pozitívny výsledok bol okrem fazule obyčajnej zaznamenaný aj vo viacerých odrodách podzemnice olejnej. Prebiehajúce biologické experimenty s mechanickou inokuláciou sú zamerané na hodnotenie patogenity a citlivosti rôznych genotypov hostiteľských rastlín voči infekcii BCMV.

Kľúčové slová: BCMV, celogenómové sekvenovanie, molekulárna diagnostika, Potyvirus

Abstract

Bean Common Mosaic Virus (BCMV) is one of the most economically important viral pathogens of legumes, transmitted by aphids in a non-persistent manner and through infected seeds. The aim of this study was the molecular characterization of a Slovak BCMV isolate and the development of reliable diagnostic tools for its detection. A complete BCMV genomic sequence (9,932 nt) was assembled from a common bean sample (SK-LB2), showing high similarity to reference BCMV isolates and containing all functional domains characteristic of the genus *Potyvirus*. RT-PCR, SYBR Green RT-qPCR, and TaqMan RT-qPCR methods were

developed and optimized for BCMV detection. Screening of different legume samples grown on experimental fields of RIPP NAFC in Piešťany revealed a high prevalence of BCMV, and positive results were also recorded in peanut cultivars. Ongoing biological experiments using mechanical inoculation aim to evaluate the pathogenicity and susceptibility of various host plant genotypes against BCMV infection.

Key Words: BCMV, molecular diagnostics, Potyvirus, whole-genome sequencing

Úvod

Strukoviny predstavujú významný zdroj potravy v ľudskej výžive na celom svete a sú hostiteľmi viac ako 168 rastlinných vírusov patriacich do 16 rôznych čeľadí. Medzi najvýznamnejšie patogény fazule obyčajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) patria bezprostredne vírus obyčajnej mozaiky fazule (*Bean Common Mosaic Virus* – BCMV) a vírus nekrózy obyčajnej mozaiky fazule (*Bean Common Mosaic Necrosis Virus* – BCMNV), oba zaradené do rodu *Potyvirus* z čeľade *Potyviridae* [1]. BCMV aj BCMNV sú prenášané predovšetkým voškami neperzistentným spôsobom, ale významnú úlohu zohráva aj vertikálny prenos infikovanými semenami. Účinnosť prenosu závisí od odrody fazule a konkrétneho vírusového kmeňa [2]. Práve vysoká miera prenosu semenami je kľúčovým faktorom vzniku globálnych epidémií BCMV, keďže predstavuje ťažko kontrolovateľný primárny zdroj infekcie na poľných porastoch [3].

Rod *Potyvirus* je v súčasnosti najväčším rodom rastlinných RNA vírusov a zahŕňa viac ako 190 druhov [4]. Rovnako ako ostatné potyvírusy, aj BCMV a BCMNV sú monopartitné jednovláknové RNA vírusy s pozitívnou polaritou, ktoré vytvárajú vláknité virióny [1]. Virióny dosahujú dĺžku približne 750 nm a priemer 11 – 13 nm, pričom ich genóm má veľkosť okolo 10 kb a na 3'-konci nesie poly(A) chvost [5]. Genóm

potyvírusov obsahuje jediný otvorený čítací rámec kódujúci prekurzorový polyproteín, ktorý sa následne štiepi na jednotlivé vírusové proteíny: proteín P1 (proteáza); pomocnú zložku/proteázu (HC-Pro); proteín P3; 6-kDa peptid; cylindrový inklúzný proteín (CI) s aktivitou RNA helikázy; druhý 6 kDa peptid; vírusový proteín viazaný na genóm (VPg); jadrový inklúzný proteín „a“ (NIa, proteáza); jadrový inklúzný proteín „b“ (NIb, predpokladaná RNA polymeráza) a obalový proteín (CP) [6].

Infekcia BCMV vyvoláva u citlivých odrôd fazule široké spektrum symptómov, vrátane mozaiky, zakrpatenia, chlorózy či zvlhnenia listov. Škvritosť a deformácia prvých pravých listov často naznačujú, že počiatočná infekcia vznikla prostredníctvom infikovaného semena. Závažnosť symptómov je podmienená viacerými faktormi, najmä vírusovým kmeňom, odrodou fazule a vekom rastliny v čase infekcie [3]. Infikované rastliny zvyčajne vykazujú spomalený rast a oneskorené kvitnutie, pričom závažnosť prejavov sa líši v závislosti od genetických vlastností odrody, podmienok prostredia a vývojového štádia, v ktorom k infekcii dochádza [7].

1 Materiál a metódy

1.1 Rastlinný materiál

Semená fazule obvyčajnej vzorky SK-LB2 boli experimentálne vysiate do vopred vysterilizovaného záhradníckeho substrátu a pestované v kultivačnej miestnosti chránenej proti hmyzu v kontrolovaných podmienkach (14 hod. svetelná/10 hod. tmavá fotoperiód; denná/nočná teplota: 22/18 °C). Ďalšie vzorky z listov pochádzali z VÚRV NPPC v Piešťanoch, kde boli pestované v poľných podmienkach a vystavené prirodzeným environmentálnym vplyvom.

1.2 Izolácia celkovej RNA a RT-PCR

Celková RNA bola izolovaná z listov fazule pomocou komerčnej súpravy Spectrum™ Plant RNA Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Spojené štáty) v súlade s odporúčaniami výrobcu. Vzorky celkovej RNA boli použité na syntézu jednovláknovej cDNA s použitím náhodných hexamérnych primerov a reverznej transkriptázy z vírusu vtáčej myeloblastózy (AMV) (obe od spoločnosti Promega Corp., Madison, WI, USA). Pre následné PCR amplifikácie bol použitý komerčný mastermix GoTaq G2 Hot Start Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA) a primery zamerané na gén kódujúci obalový proteín: BCMV_NIb_For (5'- GAT GCG GAG AAT CTG TGC -3') a BCMV_9679R (5'- GTG CCT TTC AGT ATT CTC GC-3'). PCR amplifikácia sa uskutočnila za nasledujúcich cyklických podmienok: počiatočná

denaturácia pri 94 °C počas 3 minút; 30 cyklov pri 95 °C počas 30 sekúnd, 58 °C počas 30 sekúnd a 72 °C počas 60 sekúnd; finálny krok elongácie pri 72 °C počas 5 minút. Výsledný amplikón mal veľkosť 829 bp. RT-PCR amplikóny boli purifikované z reakčnej zmesi pomocou komerčnej súpravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI, USA) a podrobené obojsmernému Sangerovmu sekvenovaniu pomocou rovnakých oligonukleotidov, aké boli použité na PCR amplifikáciu.

1.3 qPCR

Pre qPCR boli použité primery BCMV_9577F (5'- AGC AGT AGC ACA GAT GAA GG -3') a BCMV_9679R (5'- GTG CCT TTC AGT ATT CTC GC -3') navrhnuté na základe viacnásobného zarovnania všetkých celogenómových sekvencií BCMV dostupných v databáze GenBank. Pri návrhu sme dodržali štandardné kritériá: dĺžka 18 – 20 nt, obsah GC 50 – 55 %, T_m ≈ 58 °C s rozdielom medzi *forward* a *reverse* primerom ≤ 2 °C. Amplikón mal veľkosť 102 bp. Špecificita bola overená testovaním bezteplátových kontrol, negatívnych kontrol a panelu príbuzných vírusov (napr. vírusu žltej mozaiky fazule). qPCR na báze farbiva SYBR Green bola realizovaná pomocou komerčného mastermixu Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a prebiehala za nasledovných podmienok: počiatočná denaturácia 95 °C 10 min, následne 40 cyklov pri 95 °C 15 sek a 60 °C 60 sek. Pre účely qPCR na báze hydrolyzačných prób TaqMan bola navrhnutá próba nesúca fluorescenčné farbivo HEX: BCMV_Probe (5'-GTT ARC AGC AAG TTG TTT GGA CTT GAT GG). Podmienky qPCR boli nasledovné: počiatočná denaturácia 95 °C 20 sek, následne 40 cyklov pri 95 °C 3 sek a 60 °C 20 sek. Reakčné koncentrácie použité pri optimalizácii boli 300 nM pre primery a 250 nM pre próbu.

1.4 Mechanická inokulácia rastlín

Z infikovanej vzorky fazule sme odobrali čerstvú zelenú hmotu (listový materiál), ktorá bola okamžite zmrazená a uchovávaná pri – 80 °C až do použitia. Pre mechanickú inokuláciu sme materiál homogenizovali vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS) (0,01 M fosfátový pufor; pH 7,0), obsahujúcom 0,1% β-merkaptóetanol a 0,1 % karborundum, ktoré slúži ako abrazívum. Suspenziu sme nanášali prostredníctvom molitanovej hubky na listy rastlín *Nicotiana benthamiana* a rôznych odrôd fazule obvyčajnej, ktoré sme vopred pripravili posypaním sterilným práškovým karborundom na zabezpečenie vhodných abrazívnych podmienok. Po inokulácii boli rastliny jemne orosené vodou a

umiestnené späť do rastovej komory za kontrolovaných podmienok (14 h svetlo/10 h tma; 22/18 °C).

2 Výsledky

2.1 Identifikácia genómu izolátu BCMV

Celogenómová sekvencia analyzovaného izolátu BCMV mala dĺžku 9 932 nukleotidov, čo zodpovedá typickému rozsahu genómov potyvírusov (≈9,5 – 10 kb). Genóm predstavuje jednovláknovú RNA s pozitívnou polaritou, ktorá kóduje jeden veľký polyproteín následne štiepený vírusovými a hostiteľskými proteázami na funkčné proteíny. Porovnanie s referenčnou sekvenciou BCMV MN399727.1 ukázalo vysokú mieru podobnosti, čo je v súlade s nízkou genetickou variabilitou BCMV v rámci jednotlivých fylogenetických skupín.

Získali sme rovnomerné pokrytie naprieč celým genómom s priemernou hĺbkou pokrytia ~ 879x, pričom minimálne pokrytie nekleslo pod 2x. Najvyššie hodnoty pokrytia (až 3102x) sa nachádzali v centrálnej časti genómu.

Na základe porovnania s referenčnými izolátmi a konzervovaných štiepných miest možno predpokladať, že polyproteín BCMV izolátu je štiepený na funkčné proteíny (Tab. 1).

Tab. 1 Prehľad konzervovaných domén z izolátu BCMV „SK-LB2“.

Proteín	Popis	Funkcia
ps-ssRNAv <i>Potyviridae</i> RdRp	Katalytické jadro N1b proteínu	Zabezpečuje replikáciu genómu
Peptidáza C6	Peptidáza pomocnej zložky	Pomocná proteázová aktivita
Obalový proteín	Interakcia s vektormi (voškami) cez DAG motív	Tvorba kapsidu
Časť polyproteínu	Prechodová oblasť N1a/C1	Identifikácia štiepneho miesta
Peptidáza C4	Hlavná cysteinová proteáza	Štiepi polyproteín na všetky funkčné proteíny
DEXDc	Doména RNA helikázy	Súčasť replikačného komplexu
HELICc	C-terminálna časť helikázy C1	C1 tvorí replikačné vezikuly v cytoplazme

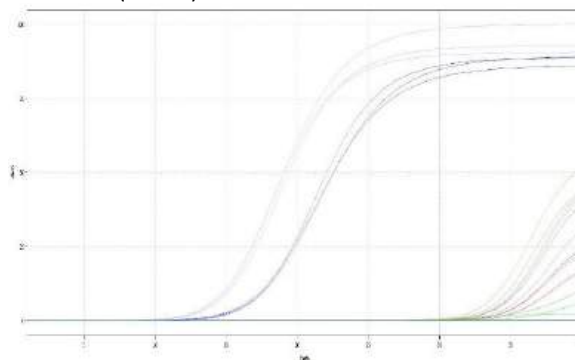
Identifikované domény polyproteínu zahŕňajú všetky kľúčové funkčné jednotky charakteristické pre rod *Potyvirus*, vrátane proteázových domén (Peptidase C6 a C4), helikázových domén (DEXDc a HELICc), RNA-závislej RNA polymerázy (RdRp) a obalového proteínu.

Ich prítomnosť a rozsah sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami o BCMV a potvrdzujú, že izolát „SK-LB2“ predstavuje typický genotyp bez známkov rekombinácie alebo rozsiahlych delécií. Vysoká priemerná hĺbka pokrytia a rovnomerné rozloženie čítaní naprieč celým genómom potvrdzujú spoľahlivosť zostavy a absenciu chýbajúcich úsekov. Tieto výsledky podporujú záver, že získaná sekvencia presne reprezentuje genóm BCMV prítomný vo vzorke fazule „SK-LB2“.

2.2 Výsledky molekulárnych analýz (RT-PCR a RT-qPCR)

2.2.1 qPCR analýza

Po počiatočnej identifikácii BCMV vo vzorke „SK-LB2“ sme vysiali viacero semien z tejto rastliny s cieľom overiť, či je vírus prítomný aj v ďalších jedincoch a či pôvodná infekcia bola stabilná. Na prvotný skrining bola použitá SYBR Green RT-qPCR, ktorá poskytla rýchlu informáciu o prítomnosti BCMV v jednotlivých rastlinách (Obr. 1).

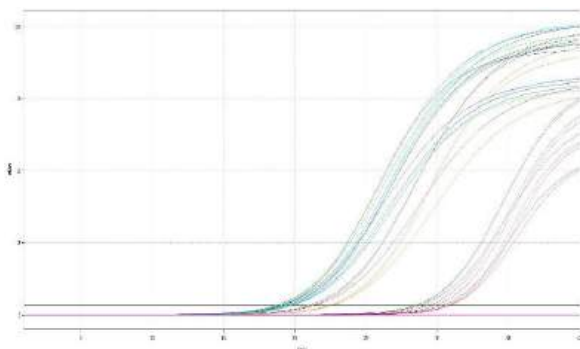


Obr. 1 Amplifikačné krivky SYBR Green RT-qPCR pre rastliny pochádzajúce z pôvodnej vzorky „SK-LB2“.

Z celého súboru analyzovaných rastlín vykázali jednoznačne pozitívnu amplifikáciu iba dve vzorky, označené ako 10A a 10B. Obe dosiahli veľmi nízke Ct hodnoty (Ct ≈ 13-16), čo poukazuje na vysokú koncentráciu vírusovej RNA a aktívnu infekciu BCMV. Ostatné rastliny zo súboru SK-LB2 vykázali buď veľmi vysoké Ct hodnoty (> 34), alebo žiadnu amplifikáciu, čo naznačuje absenciu infekcie, alebo len stopové množstvá vírusovej RNA pod hranicou detekcie.

Na základe týchto výsledkov boli vzorky 10A a 10B vybrané ako spoľahlivé pozitívne kontroly pre následné PCR a TaqMan RT-qPCR analýzy.

TaqMan RT-qPCR bola následne použitá na testovanie vzoriek pochádzajúcich z VÚRV NPPC v Piešťanoch (Obr. 2).



Obr. 2 Amplifikačné krivky TaqMan RT-qPCR pre environmentálne vzorky strukovín z VÚRV NPPC v Piešťanoch.

Všetky vzorky z VÚRV vykázali Ct hodnoty v rozmedzí 18–22, čo poukazuje na veľmi vysokú vírusovú akumuláciu. Kontrolná vzorka „SK-LB2“ mala Ct \approx 29–30, čo potvrdzuje konzistentnosť medzi SYBR Green a TaqMan metódou. Negatívne kontroly (NTC) nevykázali žiadnu amplifikáciu, čo potvrdzuje absenciu kontaminácie a spoľahlivosť celého experimentu.

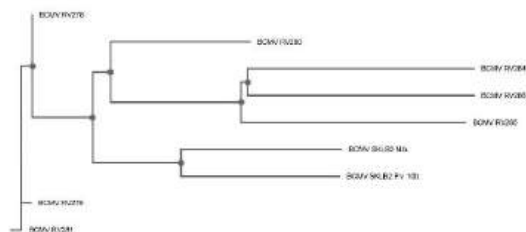
2.2.2 RT-PCR analýza

Identifikácia BCMV aj v podzemnici olejnej iniciovala podrobnejšiu analýzu molekulárnej diverzity zachytených izolátov. Na tento účel bol navrhnutý nový primer BCMV_Nib_For nasadajúci do 3' oblasti cistrónu Nib. Sekvencia primeru bola navrhnutá na základe viacnásobného zarovnania všetkých dostupných sekvencií BCMV z databázy Genbank, aby jeho sekvencia zodpovedala konzervovaným oblastiam genómu BCMV naprieč rozličnými izolátmi. RT-PCR analýza bola vykonaná kombináciou primeru BCMV_Nib_For a BCMV_9679R, aby výsledný amplikón zahŕňal celú oblasť kódujúcu N-koniec obalového proteínu BCMV. Práve táto oblasť sa u potyvírusov vyznačuje najvyššou molekulárnou variabilitou.

RT-PCR amplifikácia viedla k získaniu produktov očakávanej veľkosti 829 bp vo viacerých analyzovaných vzorkách. Sekvenovanie amplikónov potvrdilo ich identitu s BCMV, čím bola overená špecificita navrhnutého testu. Z celkového počtu 11 testovaných vzoriek bolo pozitívnych 8, pričom tento výsledok koreloval s predchádzajúcou RT-qPCR analýzou. Prítomnosť amplikónu bola zaznamenaná u všetkých vzoriek, ktoré pri RT-qPCR vykazovali nízke hodnoty Ct. Naopak, u vzoriek vykazujúcich vysoké hodnoty Ct pri RT-qPCR neboli po elektroforéze pozorované detekovateľné hladiny amplikónu. Tento výsledok potvrdzuje signifikantne vyššiu citlivosť RT-qPCR v porovnaní s konvenčnou RT-PCR.

Pozitívny výsledok bol zaznamenaný u 4 z 5 vzoriek fazule obyčajnej a všetkých troch vzoriek podzemnice olejnej. Analyzované bola aj rastliny *N. benthamiana* po mechanickom prenose BCMV z pozitívne testovaných rastlín fazule SKLB2. Výsledok bol pozitívny aj v tomto prípade, čo potvrdzuje úspešnosť prenosu vírusu na laboratórneho hostiteľa v experimentálnych podmienkach, napriek tomu, že infekcia tabakov bola bez symptómov.

Sekvenovanie amplikónov jednoznačne potvrdilo prítomnosť BCMV vo všetkých 9 pozitívnych vzorkách. Izoláty fazule obyčajnej (BCMV RV278, RV279, RV280, RV281) sa na strome zoskupili oddelene, čo potvrdzuje diferenciáciu medzi izolátmi BCMV. Sekvencia BCMV získaná z rastlín *N. benthamiana* po mechanickej inokulácii (BCMV SKLB2 N.b.) bola identická so sekvenciou izolátu BCMV z fazule SKLB2, čím bola potvrdená špecificita experimentálneho prenosu (Obr. 3). Genómové sekvencie BCMV z ďalších pozitívnych vzoriek naopak vykazovali individuálnu variabilitu. Zarovnanie sekvencií amplikónov preukázalo vysokú príbuznosť izolátov z podzemnice olejnej (BCMV RV284, RV285, RV286), ktorých sekvencia bola zároveň odlišná od izolátov pochádzajúcich z fazule obyčajnej (Obr. 3).



Obr. 3 Fylogenetický strom izolátov BCMV na základe analýzy sekvencie oblasti Nib/CP.

3 Diskusia

Výsledky RT-PCR aj qPCR analýz potvrdili prítomnosť BCMV vo viacerých analyzovaných vzorkách fazule a ďalších strukovín (podzemnica olejná), pričom rozsah infekcie a úroveň vírusovej akumulácie sa medzi jednotlivými vzorkami výrazne líšili. Tieto rozdiely sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré poukazujú na vysokú variabilitu citlivosti hostiteľov a rozdielnu dynamiku vírusovej replikácie v závislosti od odrody, veku rastliny a podmienok prostredia [2].

Skríning rastlín pochádzajúcich z pôvodnej vzorky SK-LB2 a získaných výsevom SK-LB2 semien pomocou SYBR Green qPCR ukázal, že aktívna infekcia BCMV bola prítomná v dvoch rastlinách (10A a 10B), ktoré vykázali nízke Ct hodnoty. Tento výsledok dokazuje vertikálny

prenos BCMV na potomstvo. Pôvodná rastlina SK-LB2 bola pravdepodobne heterogénna alebo vírusová infekcia bola v čase odberu už regresívna. Alternatívne nemožno vylúčiť ani technický faktor, napríklad rozdiely v kvalite izolovanej RNA alebo v riedení jednotlivých vzoriek, ktoré mohli ovplyvniť detekovateľnosť vírusu. Vysoká vírusová nálož v rastlinách 10A a 10B potvrdzuje, že tieto rastliny predstavovali spoľahlivé zdroje vírusovej RNA, čo umožnilo ich využitie ako pozitívnych kontrol v následných PCR experimentoch. RT-qPCR analýza s použitím hydrolyzačnej próby TaqMan odhalila, že všetky testované vzorky strukovín z VÚRV NPPC v Piešťanoch boli v rôznej miere pozitívne na prítomnosť BCMV. Zaujímavým zistením bolo potvrdenie BCMV aj v troch odrodách podzemnice olejnej, čo podporuje tvrdenia, že BCMV môže infikovať širšie spektrum strukovín. Výsledky následnej analýzy konvenčnou RT-PCR korelovali s RT-qPCR, ktorá však bola mnohonásobne citlivejšia a umožnila zaznamenať prítomnosť BCMV aj vo vzorkách, ktoré pri konvenčnej RT-PCR vykazovali negatívny výsledok.

Celkovo výsledky naznačujú, že BCMV je v analyzovaných odrodách fazule a podzemnice olejnej prítomný v rôznej intenzite, pričom niektoré odrody vykazujú vysokú citlivosť a akumuláciu vírusu, zatiaľ čo iné môžu vykazovať čiastočnú rezistenciu alebo nízku úroveň infekcie. Tieto poznatky sú dôležité pre ďalšie epidemiologické sledovanie BCMV a pre výber vhodných odrôd v šľachtiteľských programoch zameraných na rezistenciu voči vírusovým patogénom. Sekvenovanie RT-PCR amplikónov zahŕňajúcich variabilnú oblasť kódujúcu N-koniec obalového proteínu BCMV preukázala 100-percentnú sekvenčnú identitu vírusu v rastlinách *N. benthamiana* po mechanickej inokulácii z pôvodnej vzorky fazule SKLB2, čo potvrdzuje úspešnosť experimentálneho prenosu. Izoláty BCMV pochádzajúce zo vzoriek podzemnice olejnej predstavujú samostatný fylogenetický klastér líšiaci sa od izolátov BCMV infikujúcich fazuľu, čo potvrdzuje adaptabilitu vírusu na rôznych hostiteľov v rámci čeľade *Fabaceae*.

Záver

Výsledky tejto práce potvrdzujú prítomnosť vírusu mozaiky fazule obyčajnej (BCMV) v analyzovaných vzorkách fazule a ďalších strukovín, pričom kombinácia RT-PCR, SYBR Green qPCR a TaqMan qPCR poskytla robustný a konzistentný dôkaz o jeho výskyte. Identifikácia BCMV vo viacerých genotypoch fazule z VÚRV Piešťany, ako aj v odrodách podzemnice olejnej, poukazuje na širší hostiteľský rozsah vírusu a zdôrazňuje potrebu jeho dôsledného monitorovania v rámci poľnohospodárskej produkcie.

V súčasnosti prebiehajú biologické experimenty zamerané na získanie jednoagensového inokula BCMV, ktoré je nevyhnutné pre presné hodnotenie patogenity a virulencie vírusu. Mechanickou inokuláciou testujeme rôzne odrody fazule obyčajnej a modelový hostiteľ *N. benthamiana*, aby sme sledovali priebeh infekcie, dynamiku symptómov a rozdiely v citlivosti jednotlivých genotypov. Tieto experimenty umožnia lepšie pochopiť interakciu BCMV s hostiteľskými rastlinami a prispejú k identifikácii potenciálne rezistentných odrôd.

Komplexné spojenie molekulárnych a biologických prístupov poskytuje pevný základ pre ďalšie štúdium BCMV v našich podmienkach a predstavuje dôležitý krok smerom k efektívnejšiemu monitoringu, diagnostike a manažmentu tohto významného patogénu strukovín.

Podakovanie

Táto práca bola podporená projektom FPPV-39-2026 a APVV 24-0226.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ÇELİK, A., EMIRALIOĞLU, O., YEKEN, M.Z., ÇİFTÇİ, V., ÖZER, G., KIM, Y., BALOCH, F.S., CHUNG, Y.S. 2023. A novel study on bean common mosaic virus accumulation shows disease resistance at the initial stage of infection in *Phaseolus vulgaris*. In: *Frontiers in Genetics*, 2023, roč. 14. Doi: 10.3389/fgene.2023.1136794.
- [2] TANG, M., FENG, X. 2023. Bean Common Mosaic Disease: Etiology, Resistance Resource, and Future Prospects. In: *Agronomy*, 2023, roč. 13, č. 1. Doi: 10.3390/agronomy13010058.
- [3] EXPÓSITO-GOÁS, S., PINACHO-LIETI, L.G., LAGO-PENA, F., CABALEIRO, C. 2024. Epidemiology and Management of Bean Common Mosaic Virus (BCMV) in Traditional *Phaseolus vulgaris* L. Landraces within Protected Geographical Indications. In: *Horticulturae*, 2024, roč. 10, č. 7, s. 699. Doi: 10.3390/horticulturae10070699.
- [4] INOUE-NAGATA, A., WYLIE, S., JORDAN, R.L., KREUZE, J., LI, F., LOPEZ-MAYO, J., MAKINEN, K., OHSHIMA, K. 2022. Create five new species in the genus *Potyvirus* (*Potatavirales: Potyviridae*). Elektronická publikácia.
- [5] WORRALL, E.A., WAMONJE, F.O., MUKESHIMANA, G., HARVEY, J.J.W., CARR, J.P., MITTER, N. 2015. Chapter One - *Bean Common Mosaic Virus* and *Bean Common Mosaic Necrosis Virus*: Relationships, Biology, and Prospects for Control. In: *Advances in Virus Research*, 2015, roč. 93, s. 1-46. Doi: 10.1016/bs.aivir.2015.04.002.
- [6] SHARMA, A., SHARMA, V., SHARMA, P., SHARMA, S.K., SHARMA, P.N. 2016. Molecular

characterization and genome organization of temperature insensitive necrosis inducing strain of BCMV infecting common bean in India. In: *Australian Plant Pathology*, 2016, roč. 45, s. 219-227. Doi: 10.1007/s13313-016-0407-6.

- [7] TUNGADI, T.D., WAMONJE, F.O., MHLANGA, N.M., MURPHY, A.M., ARINAITWE, W., CARR, J.P. 2025. The Complex Interactions of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with Viruses, Vectors and Beneficial Organisms in the Context of Sub-Saharan Africa. In: *Agriculture*, 2025, roč. 15, č. 17, s. 1808. Doi: 10.3390/agriculture15171808.
- [8] JO, Y., CHOI, H., HONG, J-S, CHUNG, H., CHOI, S.Y., LEE, B.C., CHO, B.K. 2022. Complete genome sequences of three bean common mosaic virus isolates identified from peanut (*Arachis hypogaea* L.) In: *Korean Journal of Microbiology*, 2022, roč. 3, č. 58, s. 197-200. Doi: 10.7845/kjm.2022.2043.
- [9] TAJADINI, M., PANJEHPOUR, M., JAVANMARD, S.H. 2014. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. In: *Advanced Biomedical Research*, 2014, roč. 3, č. 85. Doi: 10.4103/2277-9175.127998.

Vplyv eugenolu na redoxnú rovnováhu a mieru dozrievania prasacích oocytov kultivovaných *in vitro*

Influence of eugenol on redox balance and maturation rate of porcine oocytes cultured *in vitro*

Patrik Fecko¹

Školiteľ: Alexandra Rosenbaum Bartková^{1,2}

¹Katedra Zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra,

²Ústav živočišné fyziológie a genetiky Akadémie vied ČR, Rumburská 89, 277 21 Liběchov

¹patrik.fecko@ukf.sk, ^{1,2}arbartkova@ukf.sk

Abstrakt

In vitro maturácia (IVM) oocytov predstavuje dôležitú techniku v oblasti asistovanej reprodukcie, ktorá umožňuje dozrievanie oocytov mimo organizmu bez potreby intenzívnej hormonálnej stimulácie samice. Jedným z limitujúcich faktorov tejto techniky je zvýšený oxidačný stres vznikajúci v kultivačných podmienkach. Nerovnováha medzi reaktívnymi formami kyslíka (ROS) a antioxidantnou ochranou môže negatívne ovplyvniť maturáciu oocytov, ich kvalitu aj následný embryonálny vývin. Z tohto dôvodu sa pozornosť sústreďuje na využitie antioxidantov ako doplnkov kultivačných médií.

Cieľom práce bolo posúdiť účinok eugenolu na vývinovú kompetenciu oocytov maturovaných v médiách TCM 199 a FLI. Hodnotená bola miera maturácie do štádia MII, hladina ROS a ukazovatele antioxidantnej kapacity. Výsledky poukazujú na to, že účinok eugenolu závisí nie len od koncentrácie, ale aj typu média.

Kľúčové slová: oocyt, eugenol, ROS, antioxidanty

Abstract

In vitro maturation (IVM) of oocytes represents an important technique in the field of assisted reproduction, enabling oocyte maturation outside the organism without the need for intensive hormonal stimulation of the female. One of the limiting factors of this technique is increased oxidative stress arising under *in vitro* culture conditions. An imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense may negatively affect oocyte maturation, their quality, as well as subsequent embryonic development. For this reason, attention has been focused on the use of antioxidants as supplements to culture media.

The aim of this study was to evaluate the effect of eugenol on the developmental competence of oocytes matured in TCM 199 and FLI media. The rate of maturation to the MII stage, ROS levels, and indicators of antioxidant capacity were assessed. The results

indicate that the effect of eugenol depends not only on its concentration, but also on the type of culture medium used.

Key Words: oocyte, eugenol, ROS, antioxidants

Úvod

In vitro maturácia (IVM) oocytov predstavuje prvý a zásadný krok *in vitro* produkcie embryí (IVEP). V priebehu tohto procesu sa oocyt stáva schopným úspešného oplodnenia a ďalšieho embryonálneho vývinu. Úspešnosť IVM je však výrazne ovplyvnená podmienkami kultivačného prostredia. Napriek neustálemu zdokonaľovaniu kultivačných systémov sa podmienky *in vitro* stále významne odlišujú od fyziologického prostredia folikulu. Na rozdiel od prirodzeného prostredia vaječníka sú *in vitro* podmienky charakteristické vyššou koncentráciou kyslíka, expozíciou svetlu, kolísaním teploty a absenciou komplexnej bunkovej podpory. Tieto faktory prispievajú k zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a vzniku oxidačného stresu. Ten môže negatívne ovplyvniť mitochondriálnu aktivitu, integritu DNA, cytoplazmatické dozrievanie oocytov aj následný embryonálny vývin. Z tohto dôvodu sa výskum intenzívne zameriava na optimalizáciu maturačných podmienok, najmä prostredníctvom suplementácie médií antioxidantmi [1,2].

1 Maturačné médiá

Po izolácii z folikulov sú nezrelé oocyty kultivované v maturačných médiách navrhnutých tak, aby čo najviac napodobňovali prirodzené prostredie. Tieto médiá zvyčajne obsahujú základný kultivačný roztok doplnený o hormóny a rastové faktory stimulujúce obnovenie meiózy, proteíny, pufre na udržanie stabilného pH, energetické substráty a minerálne ióny. Správna kombinácia a koncentrácia jednotlivých zložiek je rozhodujúca pre kvalitu oocytov a celkovú úspešnosť IVEP [3].

1.1 Antioxidanty v maturačných médiách

Nadmerná produkcia ROS počas IVM negatívne ovplyvňuje kvalitu oocytov. Zvýšená koncentrácia kyslíka, svetlo, prítomnosť prechodných kovov či zmeny pH podporujú oxidačné reakcie vedúce k peroxidácii lipidov, oxidácii proteínov a poškodeniu nukleových kyselín [1].

Jednou z možností, ako tieto negatívne účinky zmierniť, je suplementácia maturačných médií antioxidantmi. Tie môžu pôsobiť priamo neutralizáciou voľných radikálov alebo nepriamo, napríklad cheláciou kovových iónov a podporou endogénnych obranných mechanizmov. Medzi najčastejšie skúmané látky patria vitamíny C a E [4] resveratrol [5,6], quercetín [7,8], L-karnitín [9,10], koenzým Q10 [11,12] a melatonín [13,14]. Ich účinok sa spája so znížením hladín ROS, zvýšením intracelulárneho glutatiónu a vyšším podielom oocytov dosahujúcich štádium metafázy II (4).

1.2 Eugenol

Jednou z perspektívnych bioaktívnych látok je eugenol (4-allyl-2-metoxifenol), prírodný fenyylpropanoid nachádzajúci sa najmä v esenciálnom oleji klinčekovca. Eugenol je známy svojimi antioxidantnými, protizápalovými, antimikrobiálnymi a analgetickými účinkami. Jeho antioxidantný potenciál spočíva v schopnosti neutralizovať voľné radikály, inhibovať peroxidáciu lipidov, či podporovať opravu poškodených molekúl [15,16].

Štúdie u hospodárskych zvierat naznačujú, že suplementácia eugenolom počas IVM môže znížiť hladiny ROS, zvýšiť množstvo exprimovaných mRNA enzýmov superoxidodismutázy, katalázy, peroxiredoxin 6 a glutatión peroxidázy [17], podporiť dozrievanie oocytov do štádia MII a zlepšiť vývin embryí až do štádia blastocysty [16]. Tieto poznatky poukazujú na potenciál eugenolu ako vhodného doplnku maturačných médií s cieľom optimalizovať podmienky IVM.

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). Roztoky a médiá boli prefiltrované cez filter s veľkosťou pórov 0,22 μm a vyhriaté na teplotu 38,5°C.

2.1 Izolácia oocytov

Ovária prasničiek boli získané z bitúnku Příbram, ČR a transportované v termoboxe pri teplote 38°C. Vaječníky boli premyté fyziologickým roztokom a pomocou aspirácie bola izolovaná folikulárna tekutina z antrálnych folikulov (3–6 mm), ktorá bola následne sedimentovaná počas 10 minút. Využitie boli len COCs s homogénnou ooplazmou a minimálne tromi vrstvami kumulárných buniek okolo oocytu.

2.2 Príprava eugenolu

Po zriedení eugenolu etanolom v pomere 1:20 bol pripravený roztok následne ďalej riedený deionizovanou vodou na alikvóty s koncentraciami 1000 μM , 2000 μM a 5000 μM . Pridaním 5 μl príslušného alikvótu do 500 μl maturačného média sa dosiahla konečná koncentrácia eugenolu 10 μM , 20 μM a 50 μM .

2.3 In vitro maturácia oocytov

Izolované oocyty boli premyté v médiu TCM 199 a následne rozdelené do štyroch experimentálnych skupín podľa koncentrácie eugenolu, konkrétne:

- Kontrola (K): 0 μM
- 10 μM
- 20 μM
- 50 μM

COCs boli maturované v skupinách po 50 a kultivované 44 hodín v 0,5 ml TCM 199 (Tab. 1) alebo FLI (Tab. 2) média pri 38,5 °C s 5 % CO₂.

Tab. 1. Zloženie TCM 199 maturačného média

TCM 199 stock	2 ml
Pyruvát sodný	0,2 mM
L-glutamín	6,85 mM
Cysteín	0,57 mM
Gentamycín	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
BSA	1 mg/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-glutamín	6,85 mM
Cysteín	0,57 mM
Gentamycín	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
BSA	1 mg/mL
PMSG	10 IU/mL
hCG	10 IU/mL
EGF	10 IU/mL
ľudský LIF	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ľudský IGF1	20 ng/mL
ľudský FGF2	40 ng/mL

2.4 Hodnotenie maturácie oocytov

Po 44 h maturácii využitím 100 μl pipety boli odstránené kumulárne bunky z oocytu. Po 24-hodinovej fixácii v roztoku kyseliny octovej a etanolu (1:3) boli preparáty farbené 1 % roztokom orceínu po dobu 20 minút. Následne sa prebytočné farbivo odstránilo odfarbením v roztoku kyseliny octovej a destilovanej vody v pomere 1:3. Štádiá maturácie

oocytov boli následne stanovené na základe zmien chromatinu pozorovaných svetelnou mikroskopiou.

2.5 Hodnotenie oxidačného stresu a antioxidačnej kapacity

Oxidačný stres a antioxidačná kapacita boli hodnotené pomocou fluorescenčných sond CellROX™ Deep Red Reagent (CRDR) a ThiolTracker™ Violet (TTV). Pri stanovení hladiny tiolov boli oocyty fixované v 4 % paraformaldehyde počas 40 minút a následne inkubované s farbivom TTV (1 nM) v inkubátore po dobu 30 minút pri teplote 38,5 °C s 5 % CO₂. Na vyhodnotenie oxidačného stresu boli fixované oocyty permeabilizované využitím 0,5 % Triton X-100 a následne inkubované s CRDR (500 nM) počas 30 minút. Intenzita fluorescencie bola následne meraná v ooplazme pomocou konfokálnej mikroskopie a vyhodnotená programom ImageJ.

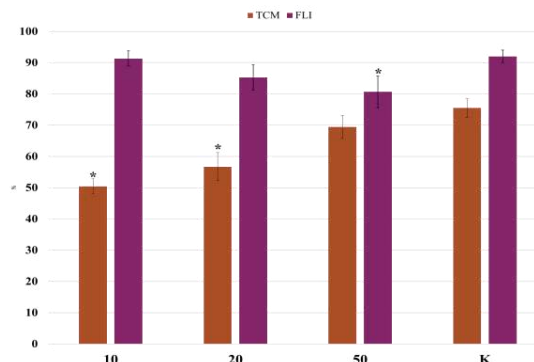
3 Výsledky a diskusia

Rozdiely medzi skupinami boli analyzované jednofaktorovou ANOVA s Tukeyho post hoc testom. Intenzita fluorescencie bola vyjadrená relatívne ku kontrole (nastavenej na 1) v arbitrárnych jednotkách (AU) ako priemer ± SD. Štatistická významnosť bola stanovená pri $p < 0,05$.

3.1 Miera maturácie *in vitro*

V médiu TCM 199 bola najnižšia miera maturácie do štádia MII zaznamenaná pri koncentrácii 10 μM eugenolu, kde MII dosiahlo 50,36 % oocytov, čo bolo signifikantne menej než v kontrolnej skupine ($p < 0,05$). Pri 20 μM sa podiel MII mierne zvýšil na 56,69 %, avšak stále nedosiahol úroveň kontroly (75,51 %). Najvyššiu mieru maturácie v rámci experimentálnych skupín sme pozorovali pri 50 μM, kde MII dosiahlo 69,39 % oocytov, bez signifikantného rozdielu oproti kontrolnej skupine ($p > 0,05$) (Graf 1). Tento trend naznačuje pozitívny efekt vyššej koncentrácie eugenolu v TCM 199 médiu.

Vo FLI médiu bola najvyššia miera maturácie zaznamenaná v kontrolnej skupine (92 %). Pri 10 μM eugenolu dosiahlo štádium MII 91,33 % oocytov, bez signifikantnej zmeny oproti kontrole ($p > 0,05$). Pri 20 μM došlo k poklesu maturácie na 85,23 % a pri 50 μM na 80,67 %, pričom najvyššia koncentrácia predstavovala signifikantné zníženie oproti kontrolnej skupine ($p < 0,05$) (Graf 1). Na rozdiel od TCM média sa vo FLI médiu so zvyšujúcou koncentráciou eugenolu pozoroval postupný pokles miery maturácie.



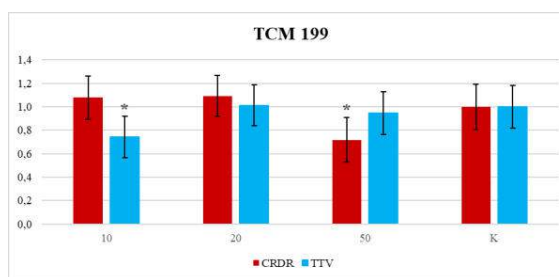
Graf 1: Miera maturácie v TCM 199 a FLI médiu

Zdroj: autor

* označuje signifikantné rozdiely skupiny oproti príslušnej kontrole

3.2 Oxidačný stres a antioxidačná kapacita

Hodnotenie redoxnej rovnováhy v TCM 199 (Graf 2) médiu ukázalo, že pri 10 μM došlo k poklesu antioxidačnej kapacity (TTV: 0,7438 AU) a zvýšeniu oxidačného stresu (CRDR: 1,079 AU), čo korelovalo s nízkou mierou maturácie. Pri 20 μM sa antioxidačná kapacita mierne zvýšila (TTV: 1,0128 AU), avšak hladina ROS zostala relatívne vysoká (CRDR: 1,092 AU). Významný pozitívny efekt bol zaznamenaný pri 50 μM, kde TTV (0,9467 AU) prevyšovala CRDR (0,718 AU), čo poukazuje na efektívne zníženie oxidačného stresu ($p < 0,05$) (Obr. 1). Tento výsledok koreluje s vyššou mierou maturácie pozorovanou v tejto skupine.

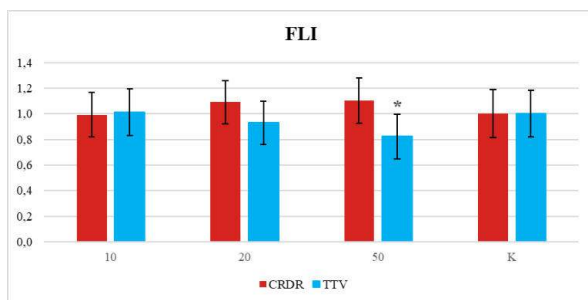


Graf 2: Relatívne intenzity fluorescencie CRDR a TTV v TCM 199

Zdroj: autor

* označuje signifikantné rozdiely skupiny oproti kontrole

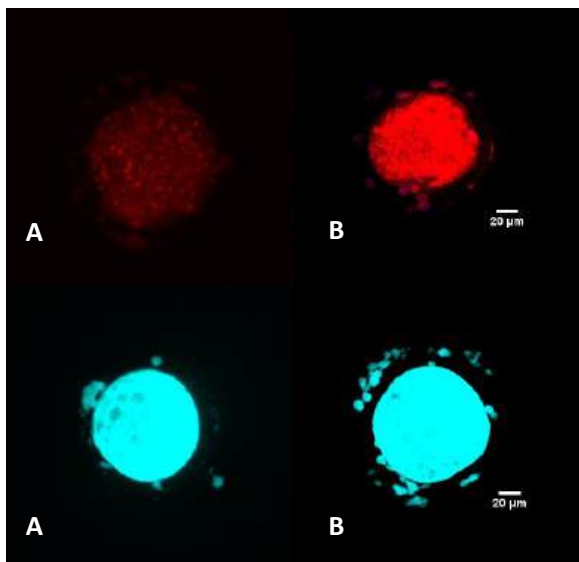
Vo FLI médiu (Graf 3) boli pri 10 μM hodnoty CRDR (0,992 AU) a TTV (1,0106 AU) porovnateľné s kontrolou, čo zodpovedalo zachovanej miere maturácie. Pri 20 μM však došlo k zvýšeniu CRDR (1,090 AU) a poklesu TTV (0,9289 AU), čo signalizuje prevahu ROS nad antioxidačnou kapacitou. Tento nepriaznivý trend pokračoval pri 50 μM (CRDR: 1,103 AU; TTV: 0,8217 AU) (Obr. 2), čo predstavuje výrazné narušenie redoxnej rovnováhy a koreluje so zníženou mierou maturácie v tejto skupine.



Graf 3: Relatívne intenzity fluorescencie CRDR a TTV v TCM 199

Zdroj: autor

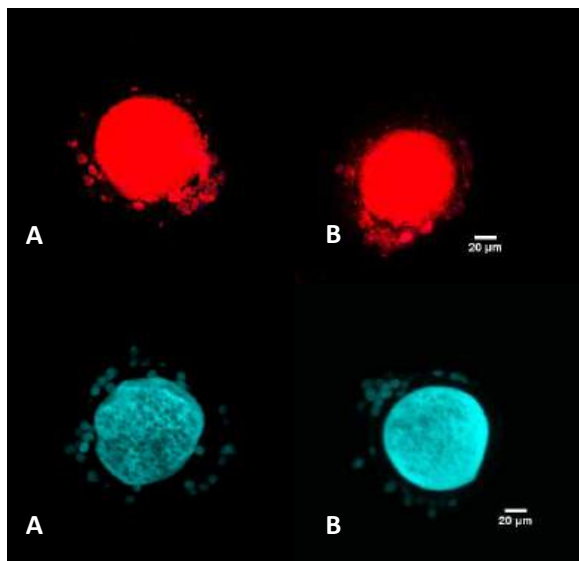
* označuje signifikantné rozdiely skupiny oproti kontrole



Obr. 1: TCM 199: CRDR a TTV

A. 50 μM, B. K

Zdroj: autor



Obr. 2: FLI: CRDR a TTV

A. 50 μM, B. K

Zdroj: autor

IVM oocytov je limitovaná podmienkami *in vitro* prostredia, ktoré môžu narušiť redoxnú rovnováhu buniek. Preto sme v tejto štúdií sledovali vplyv eugenolu na mieru maturácie a parametre oxidačného stresu (CRDR) a antioxidačnej kapacity (TTV) v dvoch médiách – TCM 199 a FLI.

V médiu TCM 199 bola najvyššia miera maturácie zaznamenaná pri koncentrácii 50 μM (69,39 %), zatiaľ čo pri 10 μM (50,36 %) a 20 μM (56,69 %) bola výrazne nižšia. Tento trend koreloval s hodnotami CRDR a TTV. Pri 10 μM prevládali vyššie hodnoty CRDR nad TTV, čo poukazuje na zvýšený oxidačný stres a súvisí s nízkou mierou MII. Pri 50 μM naopak TTV prevyšovala CRDR ($p < 0,05$), čo naznačuje efektívnejšie udržanie redoxnej rovnováhy a zodpovedá vyššej miere maturácie [18–20].

Vo FLI médiu bola kontrolná skupina charakteristická vyššou antioxidačnou kapacitou a najvyššou mierou MII (92 %). Hodnoty TTV boli vyššie a CRDR nižšie v porovnaní s TCM 199. Po pridaní eugenolu však so zvyšujúcou sa koncentráciou dochádzalo k nárastu CRDR a poklesu TTV, čo signalizuje narušenie redoxnej rovnováhy. Tento nepriaznivý trend koreloval s postupným znížením miery maturácie, ktorá pri 50 μM klesla na 80,67 %.

Výsledky zároveň nepotvrdili zvýšenie antioxidačnej kapacity oocytov ani jednoznačné zlepšenie miery maturácie oproti kontrolným skupinám, čo sa líši od niektorých štúdií [18,19]. Účinok eugenolu teda nie je univerzálne pozitívny a môže byť podmienený interakciou s konkrétnym zložením média, či v závislosti od druhu, z ktorého oocyty pochádzajú.

Záver

Získané výsledky preukázali, že účinok eugenolu je výrazne závislý od typu použitého média. V TCM 199 médiu sa pri vyššej koncentrácii (50 μM) preukázalo zníženie oxidačného stresu, čo sa prejavilo prevahou TTV nad CRDR a súčasne vyššou mierou maturácie oocytov v porovnaní s nižšími koncentráciami. Naopak, vo FLI médiu viedla suplementácia eugenolom k postupnému nárastu CRDR, poklesu TTV a k zníženiu miery dosiahnutia štádia MII, čo poukazuje na narušenie redoxnej rovnováhy v tomto systéme.

Na základe týchto zistení možno konštatovať, že eugenol predstavuje potenciálne využiteľný doplnok maturačných médií, avšak jeho aplikácia si vyžaduje presnú optimalizáciu koncentrácie a zohľadnenie špecifik kultivačného systému. Pre jeho širšie uplatnenie sú potrebné ďalšie experimentálne štúdié.

Poďakovanie

Týmto by som sa chcel poďakovať doc. RNDr. Alexandre Rosenbaum Bartkovej, PhD., MBA, za jej podporu a motiváciu a za možnosť stáže na Ústave

živočišnej fyziológie a genetiky AV ČR v Liběchove.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SOLATI, A; TAGHVIMI, S; JAMALI, Z; VAHEDI, F; MOAZAMFARD, M; BAHMYARI, S et al., (2023). The Effect of Antioxidants on Increased Oocyte Competence in IVM: A Review. *Reproductive and Developmental Medicine*, vol. 7, no. 3, pp. 180–188. ISSN 2096-2924.
- [2] AGARWAL, A; DURAIRAJANAYAGAM, D and DU PLESSIS, SS, (2014). Utility of Antioxidants during Assisted Reproductive Techniques: An Evidence Based Review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 12, no. 1, pp. 112-112. ISSN 1477-7827.
- [3] WALLS, ML and HART, RJ, (2018). *In vitro* Maturation. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 53, pp. 60–72. ISSN 1521-6934.
- [4] JOMOVA, K; RAPTOVA, R; ALOMAR, SY; ALWASEL, SH; NEPOVIMOVA, E; KUČA, K et al., (2023). Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging. *Archives of Toxicology*, vol. 97, no. 2499-2574, pp. 2499–2574. ISSN 0340-5761.
- [5] IWATA, H, (2021). Resveratrol Enhanced Mitochondrial Recovery from Cryopreservation-Induced Damages in Oocytes and Embryos. *Reproductive Medicine and Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 419–426. ISSN 1445-5781.
- [6] ZABIHI, A; SHABANKAREH, HK; HAJARIAN, H and FOROUTANIFAR, S, (2021). *In vitro* Maturation Medium Supplementation with Resveratrol Improves Cumulus Cell Expansion and Developmental Competence of Sanjabi Sheep Oocytes. *Livestock Science*, vol. 243, pp. 104378-104378. ISSN 1871-1413.
- [7] DAVOODIAN, N; KADIVAR, A; AHMADI, E; NAZARI, H and MEHRBAN, H, (2021). Quercetin Effect on the Efficiency of Ovine Oocyte Vitrification at GV Stage. *Theriogenology*, vol. 174, pp. 53–59. ISSN 0093-691X.
- [8] JIAO, Y; WANG, Y; JIANG, T; WEN, K; CONG, P; CHEN, Y et al., (2022). Quercetin Protects Porcine Oocytes from *In vitro* Aging by Reducing Oxidative Stress and Maintaining the Mitochondrial Functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10. ISSN 2296-634X.
- [9] CATANDI, GD; CHENG, MH; CHICCO, AJ; CHEN, T and CARNEVALE, EM, (2023). L-Carnitine Enhances Developmental Potential of Bovine Oocytes Matured under High Lipid Concentrations *In vitro*. *Animal Reproduction Science*, vol. 252, pp. 107249-107249. ISSN 0378-4320.
- [10] MOHSEN, N; MEGAHED, A; MONIR, A; OKYERE, J; LIMITED, C; HEGAB, AR et al., (2024). The Effects of L-Carnitine on *In vitro* Maturation of Immature Bovine Oocytes. *Journal of Veterinary Healthcare*, vol. 3, no. 2, pp. 49–63.
- [11] AMANSYAH, A; MANALU, P and PURBA, RK, (2023). Recent Advances in *In vitro* Maturation (IVM): A Systematic Literature Review. *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*, vol. 3, no. 9. ISSN 2767-8326.
- [12] RATCHAMAK, R; AUTHAIDA, S; KOEDKANMARK, T; BOONKUM, W and CHANKITISAKUL, V, (2025). Coenzyme Q10 Supplementation Effects on *In vitro* Oocyte Maturation, Lipid Peroxidation, and Embryonic Development in Prepubertal and Aging Thai–Holstein Cows. *Animals*, vol. 15, no. 1, pp. 18. ISSN 2076-2615.
- [13] YANG, D; MU, Y; WANG, J; ZOU, W; ZOU, H; YANG, H et al., (2023). Melatonin Enhances the Developmental Potential of Immature Oocytes from Older Reproductive-Aged Women by Improving Mitochondrial Function. *Heliyon*, vol. 9, no. 9. ISSN 2405-8440.
- [14] LI, X; MU, Y; ELSHEWY, N; DING, D; ZOU, H; CHEN, B et al., (2021). Comparison of IVF and IVM Outcomes in the Same Patient Treated with a Modified IVM Protocol along with an Oocytes-Maturing System Containing Melatonin: A Pilot Study. *Life Sciences*, vol. 264, pp. 118706-118706. ISSN 0024-3205.
- [15] ULANOWSKA, M and OLAS, B, (2021). Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, pp. 3671. ISSN 1422-0067.
- [16] SILVA, AFB; LIMA, LF; MORAIS, ANP; LIENOU, LL; WATANABE, YF; JOAQUIM, DC et al., (2022). Oocyte *In vitro* Maturation with Eugenol Improves the Medium Antioxidant Capacity and Total Cell Number per Blastocyst: Eugenol Effect on *In vitro* Embryo Quality. *Theriogenology*, vol. 192, no. 192, pp. 109–115. ISSN 0093-691X.
- [17] VASCONCELOS, EM; COSTA, FC; AZEVEDO, AVN; BARROSO, PAA; DE ASSIS, EIT; PAULINO, LRFM et al.,

(2021). Eugenol Influences the Expression of Messenger RNAs for Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase 1 in Bovine Secondary Follicles Cultured *In vitro*. *Zygote*, vol. 29, no. 4, pp. 301–306. ISSN 0967-1994.

[18] DE OLIVEIRA, LRM; DE AQUINO, LVC; SANTOS, MV de O; FREITAS, VJ de F; BERTINI, LM and PEREIRA, AF, (2022). Antioxidant Effect of Bioactive Compounds Isolated from *Syzygium aromaticum* Essential Oil on the *In vitro* Developmental Potential of Bovine Oocytes. *Livestock Science*, vol. 260, pp. 104932. ISSN 1871-1413.

[19] DE OLIVEIRA, LRM; AQUINO, LVC; SANTOS, MVDO; FREITAS, VJDF; BERTINI, LM and PEREIRA, AF, (2022). Effects of Different Concentrations of Eugenol in Maturation Medium on Bovine Oocytes, Oxidative Status and Preimplantation Embryos. *Animal Production Science*, vol. 62, no. 2, pp. 142–151. ISSN 1836-0939.

[20] DE OLIVEIRA SANTOS, MV; GUTIERREZ, K; GLANZNER, WG; DE MACEDO, MP; CURRIN, L; PEREIRA, AF et al., (2026). Eugenol as a Natural Antioxidant for Porcine *In vitro* Embryo Production. *Theriogenology*, vol. 250, pp. 117697. ISSN 0093-691X.

Proteolytický systém u *Euglena gracilis*: Unikátne kalpaíny s WWE doménou

Proteolytic system in *Euglena gracilis*: Unique calpains with WWE domain

Vanessa Gelanová¹ – Dominika Vešelényiová²

^{1,2} Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹gelanova1@ucm.sk, ²dominika.veselenyiova@ucm.sk

Abstrakt

Kalpaíny predstavujú rodinu Ca²⁺-dependentných cysteínových proteáz s významnou regulačnou funkciou u eukaryotov, avšak ich diverzita u protist je stále nedostatočne preskúmaná. V tejto práci sme sa zamerali na identifikáciu a charakterizáciu nových typov kalpaínov u *Euglena gracilis*. Analýzou transkriptómových dát sme identifikovali dve sekvencie s unikátnou kombináciou katalytickej CysPC domény a WWE domény, ktorá doposiaľ nebola popísaná u iného študovaného organizmu.

Bioinformatické analýzy zahŕňali určenie hraníc domén, konzerváciu katalytickej triády (Cys, His, Asn) a predikciu terciárnej štruktúry pomocou AlphaFold2. Modely potvrdili zachovanie priestorovej organizácie aktívneho miesta. Následne boli príslušné transkripty dohľadane na nukleotidovej úrovni v transkriptóme a génóme *E. gracilis*, pričom sme identifikovali zodpovedajúce gény a popísali ich exon-intrónovú organizáciu.

Zistená doménová architektúra poukazuje na možnú líniovo-špecifickú evolučnú inováciu kalpaínov u euglenid a rozširuje súčasné poznatky o diverzite tejto proteázovej rodiny u jednobunkových eukaryotov.

Kľúčové slová: CysPC doména, *Euglena gracilis*, génová anotácia, kalpaíny, WWE doména

Abstract

Calpains represent a family of Ca²⁺-dependent cysteine proteases with important regulatory roles in eukaryotes; however, their diversity in protists remains explored. In this study, we focused on the identification and characterization of novel calpains in *Euglena gracilis*. Transcriptomic analysis revealed two sequences with a unique combination of a catalytic CysPC domain and a WWE domain, a domain

architecture that has not yet been described in any other studied organism.

The bioinformatic workflow included determination of domain boundaries, conservation of the catalytic triad (Cys, His, Asn), and tertiary structure prediction using AlphaFold2. The structural models confirmed preservation of the spatial organization of the active site. Subsequently, the corresponding transcripts were traced at the nucleotide level in both the transcriptome and genome of *E. gracilis*, enabling identification of the respective genes and characterization of their exon-intron organization.

The identified domain architecture suggests a possible lineage-specific evolutionary innovation of calpains in euglenids and expands current knowledge of the diversity of this protease family in unicellular eukaryotes.

Key Words: calpains, CysPC domain, *Euglena gracilis*, gene annotation, WWE domain

Úvod

Kalpaíny (EC 3.4.22.52) patria medzi cysteínové endopeptidázy, ktoré sa zapájajú do množstva biologických procesov. V bunkách štiepia cieľové proteíny, zabezpečujú ich post-translačnú modifikáciu a ovplyvňujú tak nielen výslednú štruktúru svojich substrátov, ale aj ich biologickú funkciu, lokalizáciu v bunke či výslednú stabilitu proteínov [1,2].

Nesprávna funkcia kalpaínov je však spojená so vznikom rôznych patologických stavov, ako sú neurodegeneratívne, metabolické a svalové ochorenia, či dokonca súvisia so vznikom rakoviny [3,4,5]. Práve preto sú kalpaíny študované prevažne u človeka a cicavcov, avšak vedomosti o kalpaínoch u nižších jednobunkových organizmoch sú značne obmedzené aj napriek výraznej expanzii kalpaínov u niektorých protist (napr. zástupcovia skupiny Kinetoplastida a Euglenida) [6,7,8,9].

Trieda Euglenida má jedinečné postavenie v rámci systému živých organizmov, pričom zástupcovia tejto skupiny sú známi svojou schopnosťou prispôbiť sa rôznym ekologickým prostrediam [10,11]. Jedným z najvýraznejších zástupcov triedy Euglenida je bičíkovec *Euglena gracilis*, ktorý v prostredí pôsobí ako primárny producent. Záujem vedcov však upútal vďaka svojej metabolickej flexibilitě – využíva rôzne zdroje výživy – a v závislosti od okolitých podmienok sa teda môže vyživovať autotrofne alebo heterotrofne [11,12].

E. gracilis je zaujímavá kombináciou rastlinných aj živočíšnych vlastností, preto sa často využíva ako modelový organizmus pre štúdium evolúcie, metabolizmu a špecifických reakcií na stresové podmienky [13]. Napriek výskumu však zostáva funkcia mnohých proteínových rodín, vrátane kalpaínov, v tejto skupine organizmov stále málo prebádaná.

Predchádzajúce bioinformatické analýzy identifikovali u *E. gracilis* viacero kalpaínových homológov, z ktorých mnohé majú netypickú štruktúru [7]. Táto skutočnosť poukazuje na prítomnosť viacerých unikátnych kalpaínových rodín, pričom ich štruktúra, biologická funkcia a aktivita zostávajú neznáme. Kalpaíny teda môžu u *E. gracilis* zohrávať špecifické, doteraz neobjasnené úlohy v metabolizme, bunkovej signalizácii alebo adaptácii na rôzne stresové podmienky.

V tejto štúdií skúmame diverzitu kalpaínov u bičíkovca *E. gracilis* so zameraním na kalpaíny s predikovanou WWE doménou, ktoré doteraz neboli popísané v žiadnej publikovanej štúdií. S využitím bioinformatických nástrojov sme charakterizovali nové kalpaínové gény a ich produkty, čo značne rozširuje súčasné poznatky o kalpaínoch v jednobunkových eukaryotoch. Otvárajú sa tak nové možnosti pre skúmanie ich evolúcie a biologickej funkcie.

1 Materiál a metódy

1.1 Identifikácia kalpaínov u *Euglena gracilis*

Vyhľadávanie kalpaínových proteáz v transkriptóme *E. gracilis* sme vykonali s využitím skrytého Markovho modelu (HMM). HMM sme zostavili z kalpaínových sekvencií pochádzajúcich z rôznych organizmov, ktoré sme získali z databázy UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Sekvencie v zostavenom vstupnom súbore sme zarovnali pomocou softvéru MAFFT [14]. Z viacnásobných sekvenčných zrovnání bol zostavený HMM softvérom HMMER 3.2.1. a použitím nástroja *hmmbuild* [15]. Vytvorený HMM bol následne aplikovaný na transkriptóm *E. gracilis* [16], čím boli

identifikované potenciálne sekvencie kalpaínov v študovanom organizme.

Pre potvrdenie homológie so známymi kalpaínmi boli potenciálne sekvencie analyzované pomocou nástroja BLASTp [17] a z hľadiska prítomnosti katalytickej CysPC domény charakteristickej pre kalpaínové proteázy. Konzervované domény boli v sekvenciách identifikované prostredníctvom nástroja *CD-Search* [18] a *InterProScan* [19], čím sme zistili hranice prítomných konzervovaných domén, zatriedili sekvencie do existujúcich kalpaínových rodín a zároveň sme eliminovali falošne pozitívne sekvencie neobsahujúce katalytickú doménu kalpaínov.

1.2 Charakterizácia vybraných kalpaínov

Pre ďalšie analýzy boli vybrané dva kalpaíny s nezvyčajnou doménovou architektúrou – obsahujúce WWE domény. Vybraným sekvenciám bola priradená predpokladaná lokalizácia v bunke s využitím viacerých predikčných programov: *DeepLoc* 2.0 [20], *TargetP* 2.0 [21], *SignalP* 6.0 [22] a *DeepMito* [23]. Terciárna štruktúra oboch sekvencií bola predikovaná programom *AlphaFold* 2.0 [24] a vizualizovaná v programe *Chimera* 1.18 [25].

1.3 Anotácia vybraných kalpaínových génov

Keďže gény kódujúce kalpaíny neboli v genóme *E. gracilis* doposiaľ identifikované, ani systematicky popísané, bolo potrebné vybrané kalpaínové sekvencie identifikované na úrovni transkriptómu presne mapovať do genómovej sekvencie a detailne charakterizovať ich exón-intrónové usporiadanie.

Ich anotácia bola vykonaná prostredníctvom bioinformatického softvéru *Geneious Prime* (<https://www.geneious.com/>), ktorý umožňuje zostaviť knižnicu pozostávajúcu z genómovej [26] a transkriptómovej [16] databázy pre *E. gracilis*. Pomocou nástroja BLAST sme identifikovali sekvenčné homologické oblasti v oboch knižniciach, ktoré vykazovali najvyššiu zhodu s vybranými kalpaínovými sekvenciami. Následne boli v homologických oblastiach určené hranice génov a otvorené čítacie rámce (ORF) a popísané gény boli porovnané s dostupnými transkriptómovými údajmi.

Týmto postupom sme získali prvé informácie o genómovej organizácii týchto atypických kalpaínov.

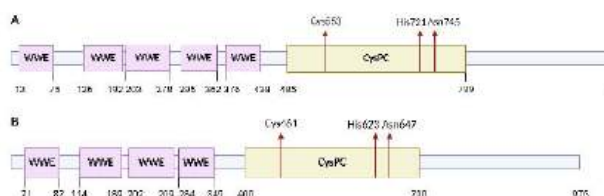
2 Výsledky a diskusia

In silico analýza transkriptómu *E. gracilis* ukázala prítomnosť dvoch proteínov patriacich do rodiny kalpaínov, ktoré vykazovali neobvyklú doménovú architektúru – kombináciu katalytickej CysPC domény (PF00648) a WWE domén (PF02825). Táto kombinácia

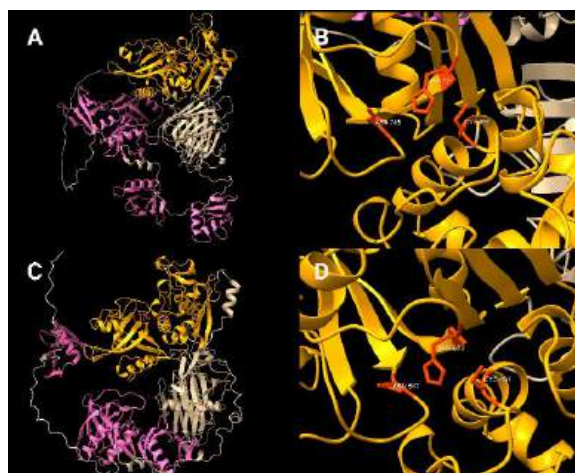
domén doposiaľ nebola popísaná u iného študovaného organizmu, pričom sa nenachádza ani v skupine Kinetoplastida, evolučne príbuznej skupine Euglenida [7,9]. Toto naznačuje možný líniovo-špecifický vývoj v rámci eugleníd.

Štúdium konzervovaných domén potvrdilo prítomnosť katalytickej CysPC domény charakteristickej pre kalpaíny v oboch sekvenciách, pričom katalytická triáda (Cys, His, Asn) tiež zostala zachovaná (Obr. 1). Prítomnosť WWE domén vo viacerých kópiách, ktoré sú typicky asociované s proteín-proteínovými interakciami a väzbou na poly (ADP-ribózu) [27,28] môže naznačovať, že identifikované kalpaíny sa môžu zapájať do iných metabolických dráh ako klasické, doteraz známe kalpaíny, napr. PAR (proteázami aktivované receptory) signálnych dráh. WWE kalpaíny tak môžu vykazovať rozšírenie ich funkcií aj nad rámec klasických zástupcov tejto proteínovej rodiny.

Predikcia terciárnej štruktúry ukázala konzervovanú organizáciu katalytického jadra CysPC domény, pričom modely vykazovali vysokú mieru spoľahlivosti v oblasti aktívneho miesta (Obr. 2). Pozície katalytických zvyškov taktiež zodpovedali priestorovému usporiadaniu známych kalpaínov, čo zvyrazňuje možnosť zachovania ich proteolytickej funkcie. Nižšia spoľahlivosť predikcie bola zaznamenaná len v oblastiach flexibilných slučiek spájajúcich jednotlivé domény, ktorých terciárna štruktúra býva často variabilná oproti konzervovaným doménam, čo môže súvisieť so zabezpečením aktivity kalpaínov.



Obr. 1 Schéma zobrazujúca doménovú architektúru *Euglena*-špecifických WWE kalpaínov so zvýraznenými hranicami konzervovaných domén a pozíciami katalytických zvyškov (Cys, His a Asn). A) C-WWE1 (HBDM01001463.1.p1); B) C-WWE2 (HBDM01077909).



Obr. 2 Predikované 3D modely štruktúr *Euglena*-špecifických WWE kalpaínov. A) kompletná štruktúra kalpaínu WWE1; B) katalytické miesto C-WWE1 so zvýraznenými aminokyselinovými zvyškami; C) kompletná štruktúra kalpaínu WWE2; D) katalytické miesto C-WWE2 so zvýraznenými aminokyselinovými zvyškami. Katalytická CysPC doména je zvýraznená žltou farbou, WWE domény sú zvýraznené ružovou farbou, katalytické zvyšky (Cys, His a Asn) sú zobrazené červenou farbou.

Nakoľko pôvodné sekvencie kalpaínov u *E. gracilis* boli identifikované na úrovni transkriptómu, gény, ktoré kódujú tieto proteíny, nie sú dodnes známe a popísané. *In silico* analýzou sme teda identifikovali gény zodpovedajúce WWE kalpaínom a následne sme určili ich exón-intrónovú organizáciu a dĺžku kódujúcich sekvencií. Základné charakteristiky identifikovaných génov sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1 Popis génov pre WWE kalpaíny identifikované v genóme *Euglena gracilis*.

Názov transkriptu	HBDM01001463.1 [16]	HBDM01077909.1 [16]
Dĺžka produktu	1 067 AK	960 AK
Dĺžka génu	57 705 nt	43 721 nt
Označenie úseku (genóm)	CP154956.1 [26]	CP154957.1 [26]
Chromozóm	3	4
Počet exónov	38	37

Dĺžka CDS	3 201 nt	2 880 nt
-----------	----------	----------

Záver

V tejto práci sme pomocou *in silico* analýz u bičkovca *Euglena gracilis* identifikovali a charakterizovali dva nové typy kalpainov s unikátnou kombináciou CysPC a WWE domén, ktorá zatiaľ u iných organizmov nebola popísaná. Pomocou bioinformatických programov sme potvrdili zachovanie katalytického jadra aj katalytickej triády (Cys, His, Asn), čo naznačuje možné zachovanie proteolytickej funkcie kalpainov.

Následná identifikácia a charakterizácia príslušných génov v genóme *E. gracilis* poskytla prvý ucelený pohľad na tieto atypické kalpainy. Získané výsledky naznačujú výraznú štrukturálnu diverzifikáciu kalpainov v skupine Euglenida a predstavujú tak základ pre budúce funkčné a evolučné štúdie týchto proteáz.

PodĎakovanie

Tento príspevok bol financovaný z Fondu pre podporu výskumu na Univerzite sv. Cyrila a Metoda v Trnave, evidovaný pod číslom FPPV-57-2026.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] JEONG, J.C.; SHIN, W.Y.; KIM, T.H.; KWON, C.H.; KIM, J.H.; KIM, Y.K. a KIM, K.H., (2011). Silibinin induces apoptosis via calpain-dependent AIF nuclear translocation in U87MG human glioma cell death. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, roč. 30, č. 1, s. 44-52. ISSN 1756-9966.
- [2] PIATKOV, K.I.; OH, J.-H.; LIU, Y. a VARSHAVSKY, A., (2014). Calpain-generated natural protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 111, č. 9, s. E817-E826. ISSN 1091-6490.
- [3] POTZ, B.A.; ADIB, M.R. a SELLKE, F.W., (2016). Role of Calpain in Pathogenesis of Human Disease Processes. *Journal of Nature and Science*, roč. 2, č. 9, s. 1-10. ISSN 2377-2700.
- [4] VISSING, J.; DAHLQVIST, J.R.; ROUDAUT, C.; POUPIOT, J.; RICHARD, I.; DUNO, M. a KRAG, T., (2020). A single c.1715G>C calpain 3 gene variant causes dominant calpainopathy with loss of calpain 3 expression and activity. *Human Mutation*, roč. 41, č. 9, s. 1507–1513, ISSN 1059-7794.
- [5] WANG, Y.; HERSHESON, J.; LOPEZ, D. a kol., (2016). Defects in the CAPN1 Gene Result in Alterations in Cerebellar Development and Cerebellar Ataxia in Mice and Humans. *Cell Reports*, roč. 16, č. 1, s. 79–91. ISSN 2211-1247.
- [6] RAWLINGS, N.D., (2015). Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases. *Biology Direct*, roč. 10, č. 1, s. 66. ISSN 1745-6150.
- [7] VEŠELÉNYIOVÁ, D., (2021). *Calpains – Cysteine proteases in euglenoid flagellates – structure of proteins and investigation of their evolution*. Dizertačná práca. Trnava: UCM v Trnave, 131 s.
- [8] ENNES-VIDAL, V.; BRANQUINHA, M.H.; DOS SANTOS, A.L.S. a D'AVILA-LEVY, C.M., (2021). The Diverse Calpain Family in Trypanosomatidae: Functional Proteins Devoid of Proteolytic Activity? *Cells*, roč. 10, č. 299, s. 1-11. ISSN 2073-4409.
- [9] ZHAO, S.; LIANG, Z.; DEMKO, V.; WILSON, R.; JOHANSEN, W.; OLSEN, O.A. a SHALCHIAN-TABRIZI, K., (2012). Massive expansion of the calpain gene family in unicellular eukaryotes. *BMC evolutionary biology*, roč. 12, s. 193. ISSN 14712148.
- [10] HE, J.; LIU, C.; DU, M.; ZHOU, X.; HU, Z.; LEI, A. a WANG, J., (2021). Metabolic Responses of a Model Green Microalga *Euglena gracilis* to Different Environmental Stresses. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, roč. 9, č. 662655. ISSN 2296-4185.
- [11] LEANDER, B.S.; LAX, G.; KARNKOWSKA, A. a SIMPSON, A.G.B., (2017). *Euglenida. Handbook of the Protists*. Roč. 2, s. 1047–1088. ISBN 978-3-319-28149-0.
- [12] INWONGWAN, S.; SRIWARI, S. a PUMAS, C., (2025). Metabolomic Insights into the Adaptations and Biotechnological Potential of *Euglena gracilis* Under Different Trophic Conditions. *Plants*, Roč. 14, č. 11, s. 1580. ISSN 2223-7747.
- [13] EBENEZER, T.E.; Low, R.S.; O'Neill, E.C. a kol., (2022). *Euglena International Network (EIN): Driving euglenoid biotechnology for the benefit of a challenged world*. *Biology Open*, roč. 11, č. bio059561, s. 1-8. ISSN 2046-6390.
- [14] NAKAMURA, T.; YAMADA, K.D.; TOMII, K. a HATOH, K., (2018). Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, roč. 34, č. 14, s. 2490-2492. ISSN 1460-2059.
- [15] POTTER, S.C.; LUCIANI, A.; EDDY, S.R.; PARK, Y.; LOPEZ, R. a FINN, R.D., (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, roč. 46, s. 200-204. ISSN 1362-4962.
- [16] CORDOBA, J.; PEREZ, E.; VAN VLIERBERGHE, M.; BERTRAND, A.R.; LUPO, V.; CARDOL, P. a BAURAIN, D., (2021). *De Novo Transcriptome Meta-Assembly of the Mixotrophic Freshwater Microalga Euglena gracilis*. *Genes*, roč. 12, č. 6, s. 842-851. ISSN 2073-4425.
- [17] ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. a LIPMAN, D.J., (1990). Basic local alignment search

- tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, roč. 215, č. 3, s. 403–410. ISSN 00222836.
- [18] MARCHLER-BAUER, A. a BRYANT, S.H., (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, roč. 32, Web Server Issue, s. W327-W331. ISSN 1362-4962.
- [19] BLUM, M.; ANDREEVA, A.; FLORENTINO a kol., (2025). InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Research*, 2025, roč. 53, č. D1, s. D444–D456. ISSN 0305-1048.
- [20] THUMULURI, V.; ARMENTEROS, J.J.A.; JOHANSEN, A.R.; NIELSEN, H. a WINTHER, O., (2022). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, roč. 50, č. W1, s. W228-W234. ISSN 1362-4962.
- [21] ARMENTEROS, J.J.A.; SALVATORE, M.; EMANUELSSON, O.; WINTHER, O.; HEIJNE, G.V.; ELOFSSON, A. a NIELSEN, H., (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, roč. 2, č. 5, s. 1-14. ISSN 2575-1077.
- [22] TEUFEL, F.; ALMAGRO ARMENTEROS, J.J.; JOHANSEN, A.R.; GÍSLASON, M.H.; PIHL, S.I.; TSIRIGOS, K.D.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. a NIELSEN, H., (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 2022, roč. 40, č. 7, s. 1023–1025. ISSN 1087 0156.
- [23] SAVOJARDO, C.; BRUCIAFERRI, N.; TARTARI, G.; MARTELLI, P.L. a CASADIO, R., (2020). DeepMito: accurate prediction of protein sub-mitochondrial localization using convolutional neural networks. *Bioinformatics*, 2020, roč. 36, č. 1, s. 56–64. ISSN 1367 4803.
- [24] ABRAMSON, J.; ADLER, J.; DUNGER, J. a kol., (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, roč. 630, s. 493-500. ISSN 1476-4687.
- [25] PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C. a FERRIN, T.E., (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, roč. 25, č. 13, s. 1605–1612. ISSN 0192-8651.
- [26] CHEN, Z.; DONG, Y.; DUAN, S.; HE, J.; QIN, H.; BIAN, C.; CHEN, Z.; LIU, C.; ZHENG, C.; DU, M.; YAO, R.; LI, C.; JIANG, P.; WANG, Y.; LI, S.; XIE, N.; XU, Y.; SHI, O.; HU, Z.; LEI, A.; ZHAO, A.L. a WANG, J., (2024). A chromosome-level genome assembly for the paramylon producing *Euglena gracilis*. *Scientific Data*, roč. 11, č. 780, s. 1-7. ISSN 2052-4463.
- [27] MÜNZKER, L.; KIMANI, S.W.; FOWKES, M.M.; DONG, A.; ZHENG, H.; LI, Y.; DASOVICH, M.; ZAK, K.M.; LEUNG, A.K.L.; ELKINS, J.M.; KESSLER, D.; ARROWSMITH, C.H.; HALABELIAN, L. a BÖTTCHER, J., (2024). A ligand discovery toolbox for the WWE domain family of human E3 ligases. *Communications Biology*, roč. 7, č. 901, s. 1-15. ISSN 2399-3642.
- [28] WANG, Z.; MICHAUD, G.A.; CHENG, Z.; ZHANG, Y.; HINDS, T.R.; FAN, E.; CONG, F. a XU, W., (2012). Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes and Development*, roč. 26, s. 235-240. ISSN 1549-5477.

Multimodálne fenotypovanie genotypu pšenice: analýza rastových a fyziologických charakteristík v podmienkach aplikácie zinku, mykorízy a vodného deficitu

Multimodal phenotyping of a wheat genotype: assessment of growth and physiological responses to zinc application, mycorrhizal inoculation and water deficit

Hlavatá Alexandra¹-Matušíková Ildikó¹-Hauptvogel Pavol²

¹Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Ústav chémie a environmentalistiky FPV, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, Slovensko

hlavata6@ucm.sk

Abstrakt

Deficit zinku postihuje približne 17 % svetovej populácie. V podmienkach klimatických zmien je nevyhnutné zvyšovať nutričnú kvalitu obilnín prostredníctvom agronomickej biofortifikácie. Analyzujeme viaceré kultivary pšenice tvrdej (*Triticum durum*) z hľadiska tolerancie voči zvýšeným koncentráciám Zn a schopnosti akumulovať tento prvok v zrne. Hodnotíme účinok aplikácie zinku, arbuskulárnych mykoríznych húb (AMF) a ich kombinácie, pričom deficit vody bol integrovaný ako kľúčový stresový faktor. Prostredníctvom fenotypizačných, molekulárno-biologických a analytických metód identifikujeme mechanizmy variability v akumulácii Zn a expresii vybraných génov. Osobitná pozornosť je venovaná parametrom fotosyntetického aparátu, ktorých stabilita predstavuje kľúčový predpoklad zachovania produkčného potenciálu a úspešnej biofortifikácie v podmienkach klimatických zmien.

Kľúčové slová: sucho, biofortifikácia, fenotypovanie, minerálna výživa, pšenica.

Abstract

Zinc deficiency affects approximately 17% of the world's population. Under climate change conditions, it is essential to improve the nutritional quality of cereals through agronomic biofortification. We analyze several cultivars of durum wheat (*Triticum durum*) in terms of tolerance to elevated Zn concentrations and their

ability to accumulate this element in the grain. We evaluate the effect of zinc application, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their combination, with water deficit integrated as a key stress factor. Through phenotyping, molecular-biological and analytical methods, we identify the mechanisms underlying variability in Zn accumulation and selected gene expression. Particular attention is paid to photosynthetic apparatus parameters, whose stability represents a key prerequisite for maintaining yield potential and successful biofortification under climate change conditions.

Keywords: drought, biofortification, phenotyping, mineral nutrition, wheat.

Úvod

Tvrďá pšenica predstavuje kľúčový zdroj energie a rastlinných bielkovín najmä v oblastiach severnej Afriky a Stredomoria, pričom jej význam narastá aj v kontexte globálnej potravinovej bezpečnosti [1]. Napriek jej produkčnému potenciálu zostáva obsah zinku v zrne často nedostatočný, čo je spôsobené limitovanou translokáciou Zn z koreňov do reprodukčných orgánov, ako aj prítomnosťou antinutričných látok (napr. fytátov), ktoré znižujú jeho biodostupnosť. Následný deficit mikroživín v populácii predstavuje závažný zdravotný problém spojený so zníženou imunitou, poruchami rastu a zvýšenou morbiditou [2] Biofortifikácia plodín, definovaná ako ciele zvýšenie koncentrácie mikroelementov v jedlých častiach rastlín prostredníctvom šľachtiteľských, agronomických

alebo biotechnologických prístupov, patrí medzi nákladovo efektívne a environmentálne udržateľné stratégie zmierňovania skrytého hladu [1, 2]. Agronomická biofortifikácia zinkom je v praxi najčastejšie využívaným postupom a zahŕňa pôdnu a/alebo foliárnu aplikáciu hnojív s cieľom zvýšiť jeho dostupnosť počas kritických fáz vývinu rastliny [2,3]. Úspešnosť tejto stratégie je však determinovaná viacerými faktormi, vrátane genotypovej variability, aplikačnej techniky, dĺžky vegetačného obdobia a interakcie s pôdnymi vlastnosťami [4] Zásadnú úlohu zohrávajú aj abiotické stresy, predovšetkým deficit vody, ktorý negatívne ovplyvňuje príjem živín, ich transport xylémom a floémom, ako aj remobilizáciu do zrna počas dozrievania [4,5]. Sucho zároveň modifikuje aktivitu fotosyntetického aparátu, redoxnú rovnováhu a metabolické toky, čím môže nepriamo limitovať efektívnosť akumulácie Zn [5]. Stabilita fotosyntetickej výkonnosti a zachovanie asimilačnej plochy tak predstavujú kľúčové faktory určujúce úspešnosť biofortifikačných zásahov v podmienkach klimatickej variability. Rozvoj genomických nástrojov, vrátane vysokokapacitného genotypovania, sekvenovania celého genómu a analýzy polymorfizmov jednotlivých nukleotidov, umožnil detailnejšie mapovanie kvantitatívnych znakov spojených s príjmom, transportom a ukladaním zinku aj u druhov s komplexným genómom, akým je pšenica [6]. Paralelne s tým sa fenotypizácia rastlín etablovala ako efektívny, prevažne neinvazívny prístup na hodnotenie morfológických a fyziologických znakov, vrátane rastovej dynamiky, architektúry koreňového systému, obsahu chlorofylu či parametrov fotosyntetickej efektívnosti. Integrácia genomických a fenotypových dát tak vytvára predpoklad pre identifikáciu genotypov s vysokou akumuláčnou kapacitou Zn a súčasne so zvýšenou toleranciou voči vodnému stresu [6,7].

Materiál a Metódy

V experimente sme sa zamerali na genotyp tvrdej pšenice PI 264934, ktorého kultivácia prebiehala v štyroch opakovaníach pre každý variant: Kontrola – pôdny substrát Klasmann; Mykoríza – Klasmannov substrát a aplikácia komerčnej zmesi mykoríznych húb (Symbivit) aplikovaných priamo do pôdy; aplikácia zinku (Zn) – Klasmann substrát a prídanie minerálneho hnojiva (vo forme $ZnSO_4$ v koncentrácií 5 mg Zn na kilogram pôdy); Mykoríza + Zn – substrát Klasmann a prídavok mykoríznych húb aj hnojiva so zinkom. Pre každý z týchto variantov bol integrovaný aj faktor deficitu vody (sucho), ktorý je vyhodnocovaný z hľadiska jeho vplyvu na akumuláciu Zn a morfo-fyziologické parametre

rastlín. Vodný stres bol indukovaný v dvoch fázach vývoja rastlín. Prvý krát bol aplikovaný na deň 41 s intenzitou 20 % (po dobu 15 dní), nasledovaný 9-dňovým rekonvalescenčným obdobím (deň 56). Druhý stres bol indukovaný na deň 65 s intenzitou 15 % (po dobu 7 dní).

Rastliny boli fenotypizované počas 7 týždňov až do obdobia reprodukčnej zrelosti a tvorby zŕn (Obr.1). Stanovené boli dynamika rastu rastlín (RGB zobrazenie), teplota listov (IR zobrazenie) a parametre fotosystému II (napr. fluorescencia chlorofylu FC) priamo na fenotypizačnej linke. Pre prezentačné účely uvádzame výsledky z morfológického parametru listovej plochy a fyziologické fenotypové ukazovatele.



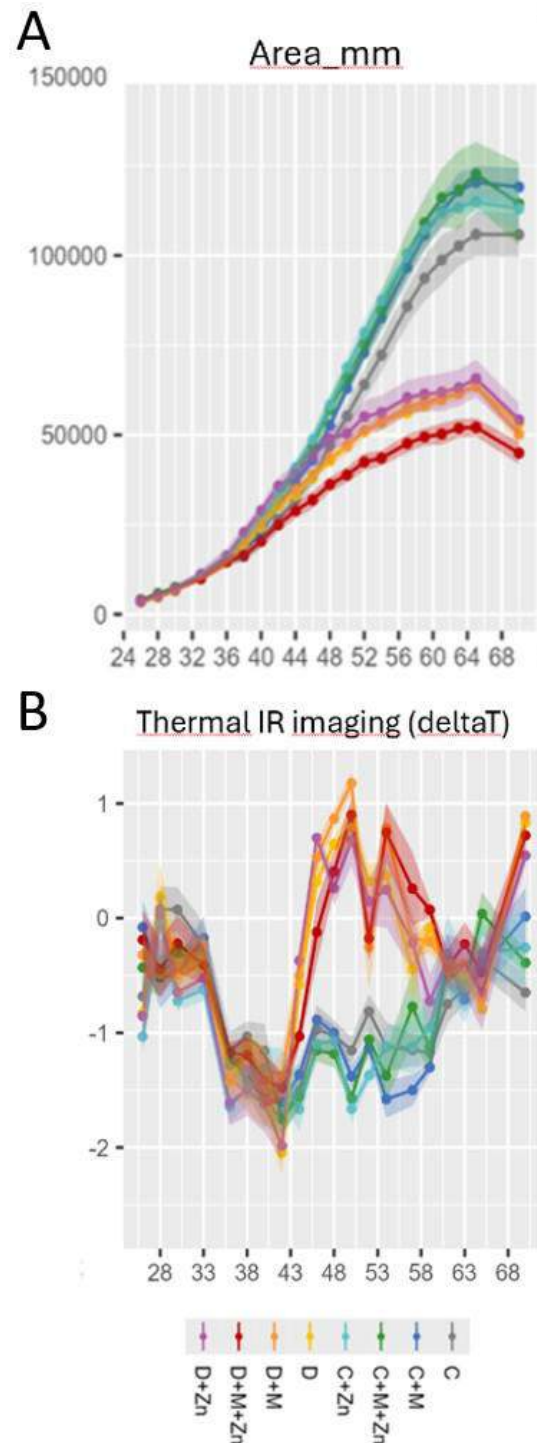
Obr. 1 Rastliny pšenice (*Triticum durum*) pestované v črepníkoch umiestnených na automatizovanej dopravníkovej fenotypovacej linke. Zdroj: PSI Photon System Instruments s.r.o, Drásov, ČR.

Vzorky zreých zŕn (200 mg) boli mineralizované v 8 ml koncentrovanej HNO_3 (Mikrovlnný digesčný systém Anton Paar) a obsah vybraných elementov ako zinok Zn, železo Fe, vápnik Ca a horčík Mg je vyhodnotený atómovou absorpčnou spektrometriou (ThermoScientific). Sledujeme aktivitu antioxidantných enzýmov a realizujeme komplexné molekulárne analýzy zamerané na transportné mechanizmy zinku v rastlinných pletivách. Získané údaje z fenotypizácie a biochemických analýz budú podrobené štatistickému vyhodnoteniu pomocou analýzy rozptylu (ANOVA).

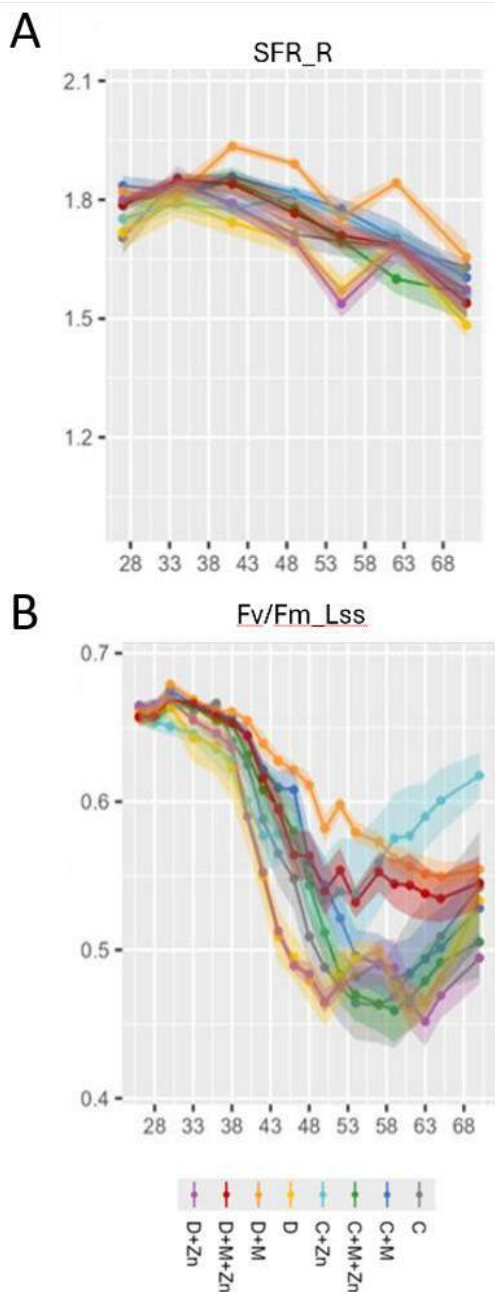
Výsledky a Diskusia

Časová analýza plochy nadzemnej časti (Area_mm) odrody PI 264934 preukázala výrazný vplyv stresového ošetrenia (D) aj aplikácie mykorízy (M) a zinku (Zn) na rast rastlín (Obrázok 2A). V počiatkových fázach experimentu (24–36 DAS)

neboli medzi variantmi pozorované významné rozdiely. Diferenciácia rastu sa začala prejavovať približne od 40. dňa po sejbe, pričom najvýraznejšia bola medzi 48.-60. dňom. Najvyššie hodnoty plochy dosiahli kontrolné varianty s aplikáciou mykorízy (C+M) a kombinácie mykoríza + zinok (C+M+Zn), ktorých maximálne hodnoty presiahli 120 000 mm² (Obrázok 2A). Variant C+Zn taktiež vykazoval zvýšenú akumuláciu biomasy v porovnaní s čistou kontrolou (C). Naopak, stresový variant bez doplnkov (D) dosiahol najnižšiu plochu (približne 45 000–55 000 mm²), čo predstavuje redukciiu približne o 50–60 % v porovnaní s najproduktívnejšími kontrolnými variantmi (Obrázok 2A). Aplikácia mykorízy (D+M), zinku (D+Zn) alebo ich kombinácie (D+M+Zn) zmiernila negatívny účinok stresu, avšak rastová odpoveď nedosiahla úroveň kontrolných rastlín. Aplikácia M alebo Zn pri strese teda zmiernila redukciiu rastu, avšak nedosiahla úroveň kontrolných podmienok. Analýza termálnych snímok (ΔT) odhalila výrazné rozdiely v teplote listov medzi jednotlivými variantmi (Obrázok 2B), čo odráža zmeny v transpirácii a vodnom režime rastlín. Stresové varianty vykazovali vyššie hodnoty ΔT (kladné alebo menej negatívne), čo indikuje zvýšenú teplotu listov a zníženú transpiráciu. Najvyššie hodnoty ΔT boli zaznamenané pri variante D, najmä medzi 48.-54. dňom experimentu (Obrázok 1B). Naopak, varianty s aplikáciou mykorízy (C+M, C+M+Zn) vykazovali stabilnejšie a nižšie hodnoty ΔT , čo naznačuje lepšiu reguláciu vodného režimu a efektívnejšie chladenie listov prostredníctvom transpiračného prúdu. Prechodné minimum ΔT okolo 43. dňa bolo pozorované naprieč všetkými variantmi (Obrázok 2B), čo môže súvisieť so zmenou environmentálnych podmienok alebo vývojovou fázou rastlín.



Obr 2. Výsledky fenotypovania pšenice PI 264934 v dvoch parametroch - ploche listu (Area_mm) a tepelnom zobrazení (Thermal IR imaging - deltaT) - v závislosti od času (dni po výsadbe, ~24-70 DAP). Rastliny boli rozdelené do 8 skupín podľa aplikovaných ošetrení: kontrola (C), sucho (D), a ich kombinácie s mykorhízou (M) a/alebo zinkom (Zn).



Obr. 3 Dva fyziologické parametre pšenice PI 264934 merané počas fenotypovania: SFR_R (Simple Fluorescence Ratio -indikátor obsahu chlorofylu) a Fv/Fm_{Lss} (maximálna kvantová účinnosť fotosystému II) v závislosti od času (28–70 DAP). Rovnaké skupiny ošetrení: kontrola (C), sucho (D), ± mykorhíza (M), ± zinok (Zn).

Hodnoty spektrálneho indexu SFR_R vykazovali miernu časovú dynamiku a relatívne menšiu diferenciáciu medzi variantmi v porovnaní s rastovými parametrami (Obrázok 3A). V počiatočných fázach experimentu (28–38 DAS) sa hodnoty pohybovali približne v intervale 1,75–1,85 bez výrazných rozdielov medzi ošetreniami. Od približne 48. dňa bol pozorovaný postupný pokles

SFR_R naprieč všetkými variantmi (Obrázok 3A), pričom najvýraznejší prepád bol zaznamenaný medzi 53.–58. dňom. Stresové varianty (D, D+Zn, D+M, D+M+Zn) vykazovali mierne nižšie hodnoty v neskoršej fáze experimentu v porovnaní s kontrolnými variantmi. Kontrola (C) a varianty s mykorízou si udržiavali relatívne vyššie hodnoty SFR_R až do záveru experimentu. Rozdiely medzi aplikáciou samotného zinku a mykorízy boli menej výrazné ako pri rastových parametroch, čo naznačuje, že SFR_R je citlivý skôr na celkový fyziologický stav než priamo na akumuláciu biomasy. Parameter Fv/Fm_{Lss} bol najcitlivejším indikátorom stresu a vykazoval výraznú diferenciáciu medzi variantmi a jasnú reakciu na stresové podmienky (Obrázok 3B). V počiatočnej fáze (28–33 DAS) sa hodnoty pohybovali okolo 0,65–0,67, čo indikuje fyziologicky stabilný fotosyntetický aparát. Od približne 38.–43. dňa bol zaznamenaný prudký pokles Fv/Fm_{Lss}, najmä pri stresových variantoch. Minimum bolo dosiahnuté medzi 48.–53. dňom, pričom hodnoty pri variante D klesli pod 0,50 (Obrázok 3B), čo signalizuje významné poškodenie alebo inhibíciu fotosystému II. Varianty s mykorízou (najmä C+M a C+M+Zn) vykazovali miernejší pokles a rýchlejšiu následnú stabilizáciu parametra. V závere experimentu si kontrolné varianty udržiavali vyššie hodnoty Fv/Fm_{Lss} v porovnaní so stresovými ošetreniami. Integrovaná analýza všetkých sledovaných parametrov poukazuje na jasne prepojenú fyziologickú odpoveď odrody Durablank na vodný stres. Najskôr bol zaznamenaný pokles fotosyntetickej efektivity (Fv/Fm_{Lss}), čo indikuje inhibíciu alebo poškodenie fotosystému II. Následne sa prejavilo zvýšenie teploty listov (ΔT), pravdepodobne v dôsledku stomatálneho uzatvárania a obmedzenia transpiračného chladenia. Tieto procesy viedli k redukcii rastovej dynamiky a akumulácie biomasy. Spektrálny index SFR_R reagoval menej dynamicky, čo naznačuje, že zmeny v obsahu chlorofylu alebo optických vlastnostiach listu boli sekundárne voči funkčnému poškodeniu fotosyntetického aparátu. Mykorízna inokulácia predstavovala najvýznamnejší stabilizačný faktor. Rastliny s aplikáciou M vykazovali vyššiu biomasu, nižšie ΔT a miernejší pokles Fv/Fm_{Lss}, čo poukazuje na zlepšený vodný režim a ochranu fotosyntetického aparátu. Pravdepodobným mechanizmom je zvýšená absorpcia vody a živín, vyššia hydraulická vodivosť koreňového systému a aktivácia ochranných metabolických dráh. Zinok mal pozitívny, ale menej výrazný účinok. Jeho efekt sa prejavil najmä ako čiastočné zmiernenie poklesu fotosyntetickej efektivity a rastu čo je v súlade so štúdiou Shoormij et al. (2024) [8]. Kombinácia M+Zn maximalizovala

rastový potenciál v optimálnych podmienkach, avšak v stresových podmienkach bol synergický efekt limitovaný dominantným vplyvom vodného deficitu.

Záver

Fenotypová analýza preukázala, že vodný stres výrazne ovplyvňuje fotosyntetickú efektívnosť, termálnu stabilitu aj rast odrody PI 264934. Najcitlivejším indikátorom stresu bol parameter Fv/Fm_Lss, ktorého pokles predchádzal zvýšeniu teploty listov a redukcii biomasy. Mykorízna inokulácia významne zvyšovala rezilienciu rastlín prostredníctvom stabilizácie fotosyntetického aparátu a zlepšenia vodného režimu. Zinok pôsobil ako podporný faktor, avšak jeho efekt bol sekundárny voči účinku mykorízy. Výsledky poukazujú na kľúčovú úlohu biologických ošetrovateľov pri zvyšovaní stresovej tolerancie pšenice a zdôrazňujú význam integrovaného fenotypovania pri hodnotení fyziologickej odozvy rastlín na abiotický stres.

Literatúra

- [1] Ana María MAGALLANES-LÓPEZ, Nayeli HERNANDEZ-ESPINOSA, Govindan VELU, Gabriel POSADAS, José CROSSA, Karim AMMAR, Carlos GUZMÁN, Variability in iron, zinc and phytic acid content in a worldwide collection of commercial durum wheat cultivars and the effect of reduced irrigation on these traits, *Food Chemistry*, Volume 237, 2017, Pages 499-505, ISSN 0308-8146,
- [2] SINGH S, KAUR J, RAM H, SINGH J, KAUR S. 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 2023 Apr 27. PMID: 37234132; PMCID: PMC10134721.
- [3] GUPTA OP, SINGH AK, SINGH A, SINGH GP, BANSAL KC, DATTA SK. Wheat Biofortification: Utilizing Natural Genetic Diversity, Genome-Wide Association Mapping, Genomic Selection, and Genome Editing Technologies. *Front Nutr*. 2022 Jul 12;9:826131. doi: 10.3389/fnut.2022.826131. PMID: 35938135; PMCID: PMC9348810.
- [4] WATT M, FIORANI F, USADE B, RASCHER U, MULLER O, SCHURR U. Phenotyping: New Windows into the Plant for Breeders. *Annu Rev Plant Biol*. 2020 Apr 29;71:689-712. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041124. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32097567.
- [5] Al-Quraan NA, Samarah NH, Tanash AA. Effect of drought stress on wheat (*Triticum durum*) growth and metabolism: insight from GABA shunt, reactive oxygen species and dehydrin genes expression. *Funct Plant Biol*. 2024 Jan;51(1):NULL. doi: 10.1071/FP22177. PMID: 36346967.
- [6] MAGHREBI M, MARÍN-SANZ M, MIRAS MORENO MB, QUAGLIATA G, CALDO F, GATTI N, MANNINO G, PESENTI M, D'ALESSANDRO S, NOCITO FF, LUCINI L, SESTILI F, ASTOLFI S, BARRO F, VIGANI G. The drought-induced plasticity of mineral nutrients contributes to drought tolerance discrimination in durum wheat. *Plant Physiol Biochem*. 2024 Oct;215:109077. doi: 10.1016/j.plaphy.2024.109077.
- [7] ARRIAGADA O, MENESES C, PEDRESCHI R, NÚÑEZ-LILLO G, MAUREIRA C, REVECO S, VILLARROEL V, STEINFORT Ú, ALBORNOZ F, CABAS-LÜHMANN P, SILVA M, MATUS I, SCHWEMBER AR. Combined multi-omics and physiological approaches to elucidate drought-response mechanisms of durum wheat. *Front Plant Sci*. 2025 May 15;16:1540179. doi: 10.3389/fpls.2025.1540179. PMID: 40443433; PMCID: PMC12119503.
- [8] Fatemeh SHOORMIJ, Aghafakhr MIRLOHI, Ghodrattollah SAEIDI, Mohammad R. Sabzalian, Mehran SHIRVANI, Zinc foliar application may alleviate drought stress in wheat species through physiological changes, *Plant Stress*, Volume 13, 2024, 100534, ISSN 2667-064X, <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100534>.

Podakovanie

Práca je podporovaná agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci grantu č. APVV-21-0504.

Genomický skrining druhu *Aeshna cyanea* s využitím RAPD markerov

Genomic screening of the species *Aeshna cyanea* with using RAPD markers

Zuzana Hrivňak Lehká¹ – Vladimír Langraf³ – Zuzana Schubertová² – Katarína Ražná²—
Kornélia Petrovičová²

^{1,3}Katedra zoológie a antropológie, FPVaI UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

¹ zuzana.hrivnak.lehka@ukf.sk, ² kornelia.petrovicova@gmail.com, ² zuzana.schubertova1@uniag.sk

² katarina.razna@uniag.sk ³ v.langraf@ukf.sk

² Ústav rastlinných a environmentálnych vied, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU v Nitre,

Trieda Andreja Hlinku 2, 949 01 Nitra

Abstrakt

Štúdia bola zameraná na porovnanie dvoch populácií vážok druhu *Aeshna cyanea* vyskytujúcich sa v environmentálne odlišných pomeroch. V jednom ponde (Michalštolňa) bola voda znečistená bankými vodami (*acid mine drainage*) a v druhom (Malá Vodárenská) neznečistená voda. Okrem bežných terénnych metód, ako je sledovanie jedincov, populácií a druhov, či odhady abundancie, boli odoberané exúviá. V rámci výskumu bola testovaná hypotéza o vplyve prostredia na genóm vážky, detekovateľný pomocou náhodných dekamérnych oligonukleotidov metódou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Skrining genomickej DNA z tracheálnych trubic exúvií pomocou primerov OPB 11 a OPB 18, poukázal na rozdielne RAPD profily medzi vzorkami. DNA odtlačky sa líšili nielen počtom amplifikovaných fragmentov, ktorý bol vyšší vo vzorkách z lokality Malá Vodárenská, ale aj veľkosťou. Obidva primery amplifikovali, pri vzorkách z tohto prostredia, výrazný fragment DNA o veľkosti 400 bp. Vzorky DNA z vážok z lokality Dolného Michalštolňanskeho tajchu vykazovali nižšiu amplifikáciu s výrazným 600 bp fragmentom. Pozorovanú rozdielnosť na úrovni náhodne amplifikovaných fragmentov DNA dotvárajú aj rozdielne hodnoty DBI indexu, ktorý bol v prípade vážok v znečistenej lokalite nižší.

Kľúčové slová: genomický skrining, *Aeshna cyanea*, znečistenie vody, RAPD markery, poudy,

Abstract

The study focused on comparing two populations of the dragonfly species *Aeshna cyanea* in ponds with different environments. In one pond, the water was polluted by acid mine drainage, while in the other, the water was unpolluted. In addition to common field methods such as monitoring individuals, populations

and species and estimating abundance, exuviae were collected. As part of the research, the hypothesis was tested that the environment influences the dragonfly genome, as detectable using random decamer oligonucleotides by the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method. Screening genomic DNA from the tracheal tubes of the exuviae using OPB 11 and OPB 18 primers revealed different RAPD profiles between the samples. Not only did the DNA fingerprints differ in the number of amplified fragments, which was higher in samples from the Dolný Michalštolňanský Tajch, but they also differed in size. Both primers amplified a significant 200 bp DNA fragment in samples from unpolluted environments. DNA samples from dragonflies from the Malá Vodárenská site showed lower amplification, with a significant 400 bp fragment. The observed differences in the level of randomly amplified DNA fragments are reflected in the values of the DBI index, which were lower for dragonflies from unpolluted sites.

Keywords: genomic screening, *Aeshna cyanea*, water pollution, RAPD markers, ponds

Úvod

Vplyvu kyslých bankých vôd na vodné ekosystémy v strednej Európe sa venovala len malá pozornosť [1]. Špecifický typ anorganického znečistenia vody známy ako kyslé banké vody (*acid mine drainage*) vzniká v dôsledku biologickej a chemickej oxidácie pyritu alebo iných minerálov obsahujúcich sulfidy, ktoré sú vystavené oksylichenej vode [2]. Účinky (*acid mine drainage*) môžu znížiť početnosť primárnych producentov a ich druhovú bohatosť [3–5] a významne zmeniť zloženie i funkčné vlastnosti vodnej fauny [6].

Hmyz predstavuje 75 % zaznamenaných živočíšnych druhov na Zemi. Niektoré druhy je ťažké identifikovať pre malé morfológické rozdiely. *A. cyanea* je vhodný modelový druh pre genetické analýzy, pre svoju veľkú

abundanciu. Na prekonanie týchto problémov boli vytvorené pokročilé molekulárne techniky na báze polymerázovej reťazovej reakcia (PCR), napr. polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RELP), náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (RAPD) a polymorfizmus dĺžky amplifikovaného fragmentu (AFLP). RAPD markery sa stali najbežnejším nástrojom na detekciu genetických rozdielov medzi jedincami [7]. Molekulárne genetické nástroje zohrávajú čoraz dôležitejšiu úlohu v ekológii a pomáhajú riešiť otázky genetickej podobnosti/odlišnosti a sociálnej organizácie, cez analýzu štruktúry populácie, až po určenie taxonomických vzťahov [8]. Pri hmyze DNA markery poskytujú informáciu, pomocou ktorej ekológovia odhadujú genetickú diverzitu [9]. Vďaka nízkym nákladom a efektívnosti získania výsledkov v krátkom čase, predstavuje technika RAPD účelný nástroj genomických analýz. Hlavným dôvodom úspechu RAPD metódy je získanie veľkého počtu amplifikovaných DNA fragmentov, ktoré vyžadujú malé množstvá DNA bez potreby klonovania, sekvenovania alebo inej formy molekulárnej charakterizácie genómu daného druhu [10]. V RAPD analýze sa používajú krátke primery, pomocou ktorých sú amplifikované náhodné oblasti genomického DNA. Vzniknuté amplikóny reprezentujú rôzne fragmenty DNA a variácie v ich prítomnosti alebo neprítomnosti vytvárajú genetický polymorfizmus [11].

Dragonfly Biotic Index (DBI) je biomonitorovací nástroj používajúci dospelé vážky, ktorý bol vyvinutý pre juhoafrické sladkovodné systémy [12]. Dá sa označiť aj ako bodovací systém založený na rozsahu rozšírenia vážok, stave ohrozenia a environmentálnej citlivosti [13]. DBI je nízkonákladová a ľahko použiteľná metóda, má ďalšie využitie ako metóda na hodnotenie kvality biotopov a obnovy v programoch obnovy. Je veľmi citlivý na stav biotopov, funguje na úrovni druhov a má veľký potenciál pre environmentálne hodnotenie a monitorovanie biodiverzity a kvality sladkej vody. DBI je známy tým, že uprednostňuje vzácne druhy uvedené v Červenej knihe. Jednoduché použitie a citlivosť indexu znamenajú, že je užitočným nástrojom na ochranu prírody [14].

Materiál a metodika

Študované lokality sa nachádzajú v orografickom celku Štiavnických vrchy [15]. Zber materiálu prebiehal počas sezón 2023, 2024 a 2025.

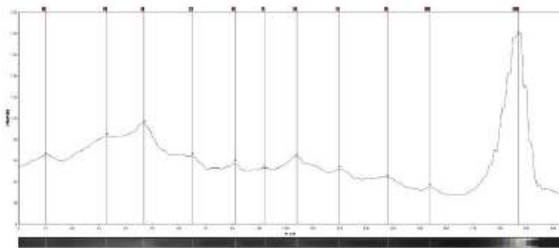
Dolný Michalštôľňanský tajch (GPS 48°27'56"N 18°53'54"E, 665 m n. m.) je znečistený bankými vodami [1] a nachádza sa v katastrálnom území mesta Banská Štiavnica, je situovaný do hornej časti mesta. Tajch má obvod 102,63 m a plochu 710,8 m². Zo severu a západu je obklopený lesným porastom, z juhu a východu urbanizovaným prostredím. Michalštôľňanský tajch má hlinité dno, po okrajoch je

porastený makrofytnou vegetáciou *Typha latifolia* a hladina je pokrytá druhom *Potamogeton* sp.

Tajch Malá Vodárenská (GPS 48°28'02"N 18°53'12"E, 752 m n. m.), patrí do k. ú. Banská Štiavnica, je situovaný v severozápadnej časti Štiavnických vrchov nad mestom Banská Štiavnica. Nádrž má obvod 65 m a plochu približne 311,76 m². Dno tajchu je prevažne hlinité v menšej mier pokryté malými kameňmi. Litorálna makrofytná vegetáciu tvorí 40 % obvodu. Dominantným druhom je *Equisetum fluviatile* v juhovýchodnej a severozápadnej časti.

Pomocou DBI sa hodnotila kvalita skúmaného územia. DBI zahŕňa kategórie ako ohrozenie, rozšírenie a senzitivitu [16]. Dospelce boli determinované podľa určovacieho kľúča [16] a larvy podľa [17].

Skríning DNA polymorfizmu pomocou RAPD markerov v závislosti od podmienok výskytu vážky, bol testovaný na genomického DNA izolovanej z tracheálnych trubíc z 30 kusov exúvií z každej lokality. Po oddelení tracheálnych trubíc z exúvií, boli tieto podrvené v tekutom dusíku. Izolácia celkovej DNA sa uskutočnila pomocou komerčnej izolačnej súpravy ISOLATE II Genomic DNA Kit (Meridian Bioscience). Proces izolácie DNA bol optimalizovaný vo viacerých krokoch; typ vstupného materiálu (celé exúviá, tracheálne trubice), dĺžka inkubácie vzoriek pri teplote 65°C (1, 2 a 3 hodiny), množstvo vymývacieho roztoku (100 µl, 2 × 50 µl). DNA bola kvantifikovaná spektrofotometricky prístrojom NanoPhotometer™ (IMPLEN). Genomický skríning sa uskutočnil aplikáciou dekamérnych RAPD primerov OPB11 (GTAGACCCGT) a OPB18 (CCACAGCAGT). Amplifikačná zmes obsahovala 2× EliZyme HS Robust MIX Red, 0,6 µmol-dm⁻³ vybraného primeru, DNA templát (30 ng) a ultračistú vodu do konečného objemu 10 µl. Množstvo DNA do reakcie bolo optimalizované (10 ng, 30 ng). Amplifikácia PCR sa uskutočnila na termocykléri C1000™ (BIO-RAD) s nasledovnými podmienkami: počiatočná denaturácia pri 94 °C počas 5 minút, po ktorej nasleduje 45 cyklov denaturácie pri 94 °C počas 1 minúty, naviazanie primerov pri 36 °C počas 1 minúty a polymerizácia pri 72 °C počas 2 minút. Posledný krok polymerizácie prebehol pri 72 °C počas 7 minút. Okrem optimalizačných amplifikácií, bola každá reakcia opakovaná dvakrát pre potvrdenie reprodukovateľných DNA fragmentov. Reakcie sa realizovali v dvoch opakovaniach. Elektroforetická separácia produktov po amplifikácii prebehla na 1,5 % agarózovom gély s pridaným interkalačným farbivom GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium). Veľkostný rebrík bol použitý Hyperladder 100 Lanes (Bioline). Vizualizácia elektroforeogramov bola realizovaná zobrazovacím systémom G-Box (SYNGENE). Elektroforeogramy boli vyhodnocované programom GelAnalyzer 23.1.1 (www.gelanalyzer.com) (Obr. č. 1).



Obr. č. 1 Fragments DNA detegované softvérom GelAnalyzer 23.1.1

Výsledky

Počas systematického výskumu realizovaného v rokoch 2023 – 2025 sme na lokalite Malá Vodárenská zaznamenali výskyt 18 dospelých jedincov vážok, ktoré patrili k 7 druhom (tab. 1) a zároveň 99 kusov exúvií druhu *Aeshna cyanea*.

Na lokalite Dolný Michalštôľňanský tajch bolo zaznamenaných 8 dospelých jedincov, zastupujúcich 6 druhov. Okrem toho boli na tejto lokalite identifikované exúviá dvoch druhov – *A. cyanea* (30 kusov) a *Anax imperator* (1 kus).

Eudominantným druhom na oboch lokalitách bol druh *A. cyanea*.

Získané výsledky odhaľujú rozdiely v druhovej diverzite a početnosti vážok medzi sledovanými lokalitami. Na lokalite Malá Vodárenská bola zistená vyššia početnosť aj druhová pestrosť v porovnaní s Dolným Michalštôľňanským tajchom, čo naznačuje, že podmienky prostredia sú na prvej lokalite priaznivejšie pre vývoj larválnych štádií i pre aktivitu dospelcov. Predpokladáme, že to je spôsobené znečistením vody na lokalite Dolný Michalštôľňanský tajch.

Hodnota DBI indexu bola vyššia na lokalite Malá Vodárenská (DBI 5) než na lokalite Dolný Michalštôľňanský tajch (DBI 3) (tab. č. 1) čo poukazuje na vyššiu druhovú diverzitu a celkovo priaznivejšie ekologické podmienky na tejto lokalite. Rozdiel medzi sledovanými lokalitami pravdepodobne súvisí s kvalitou vody – na Dolnom Michalštôľňanskom tajchu je voda znečistený kyslými bankými vodami. Tento faktor mohol mať negatívny vplyv na výskyt a početnosť citlivejších druhov vážok, ktoré uprednostňujú čisté a stabilné vodné prostredie.

Tab. č. 1. Dragonfly biotic index lokalít Dolný Michalštôľňanský tajch a tajch Malá Vodárenská

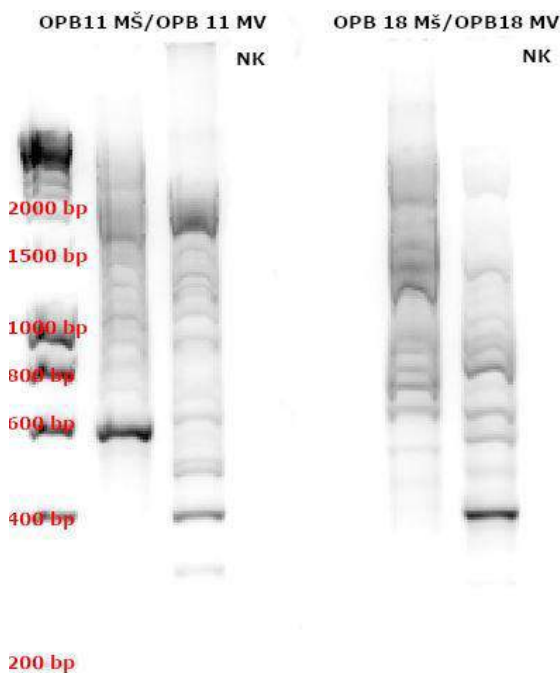
druh	Michalštôľňanský tajch		Malá Vodárenská	
	počet jedincov	DBI	počet jedincov	DBI
<i>Platycnemis pennipes</i> , (Pallas,1771)	0	0	5	1
<i>Enallagma cyathigerum</i> , (Charpentier 1840)	0	0	1	1
<i>Coenagrion puella</i> , (Linnaeus 1758)	2	0	4	0
<i>Ischnura elegans</i> , (Vander Linden 1820)	0	0	2	0
<i>Pyrrhosoma nymphula</i> , (Sulzer 1776)	2	0	2	0
<i>Aeshna cyanea</i> , (Müller 1764)	31	0	101	0
<i>Anax imperator</i> , Leach 1815	1	1	0	0
<i>Corudlia aenea</i> , (Linnaeus 1758)	0	0	1	3
<i>Sympetrum sanguineum</i> , (Müller 1764)	1	1	0	0
<i>Sympetrum vulgatum</i> , (Linnaeus 1758)	1	1	0	0
Σ	38	3	116	5

Pre genetické analýzy sme zvolili druh *Aeshna cyanea* (obr.č.2) vzhľadom na jeho euryektný charakter a širokú ekologickú valenciu. Tento druh sa na sledovaných lokalitách vyskytoval v hojnom počte, čo umožnilo odber dostatočne veľkej vzorky pre následné genetické analýzy. Exúvium predstavuje hodnotný, ľahko identifikovateľný materiál.



Obr.č.2: Druh *A. cyanea* pri emergencii

V rámci genomického skrínungu bol porovnaný profil amplifikovaných DNA fragmentov pomocou primerov OPB 11 a OPB 18 vzoriek populácií druhu *A. cyanea* z dvoch rozdielnych biotopov, z póndu so znečistenou vodou (acid mine drainage) a z póndu s neznečistenou vodou. Analýza poukázala na rozdielny počet, pozíciu, ako aj veľkosť jednotlivých DNA fragmentov (Obr. č. 3). Obidva primery amplifikovali väčší počet fragmentov vo vzorkách z lokality Malá Vodárenská v porovnaní s lokalitou



Obr.č.3: Profily DNA fragmentov amplifikovaných pomocou primerov OPB11 a OPB 18

Legenda: OPB11 MŠ – primer OPB11, vzorka z Dolného Michalštôľňanského tajchu; OPB 11 MV – primer

OPB11, vzorky z tajchu Malá Vodárenská; OPB18 MŠ – primer OPB11, vzorka z Dolného Michalštôľňanského tajchu; OPB 18 MV – primer OPB11, vzorka exúvií z tajchu Malá Vodárenská.

Dolný Michalštôľňanský tajch. Veľkostne aj pozične rovnaký fragment (400 bp) bol amplifikovaný primermi OPB 11 a OPB 18 pri vzorke pochádzajúcej z lokality Malá Vodárenská. Naopak, pri vzorke zo znečistenej lokality bol amplifikovaný výrazný fragment o veľkosti 600 bp, avšak len v prípade primera OPB 11. Amplifikácia uvedeného fragmentu bola s OPB 18 menej intenzívna.

Diskusia

DBI okrem toho, že hodnotí kvalitu biotopov [18], stanovuje priority ochrany [19], hodnotí atraktivnosť biotopov [20] a meria úspešnosť ekologickej obnovy [21]; sa využíva na monitorovanie reakcií spoločenstva na vplyv antropogénnej činnosti na biotopoch. Na lokalitách, ktoré sú degradované (acid mine drainage) býva nízka diverzita bentických bezstavovcov [22], čo bolo potvrdené aj v našom výskume z hľadiska diverzity druhov vážok

Kvalita vody sa v mnohých častiach sveta zhoršila v dôsledku antropogénnych aktivít, ako je napríklad výrazná urbanizácia, poľnohospodárske postupy, industrializácia a rast populácie [23]. Medzi negatívne faktory radíme aj kyslé banské vody (acid mine drainage) [1], ktoré postihli jednu z našich skúmaných lokalít. Ťažké kovy sa do životného prostredia dostávajú z rôznych zdrojov vrátane priemyslu, baníctva a poľnohospodárstva [24].

Analýza genetickej diverzity jedincov pochádzajúcich z rôznych lokalít pomocou molekulárnych markerov predstavuje významný nástroj na získanie poznatkov o genetickej variabilite, populačnej dynamike a úrovni biodiverzity. Tento typ analýzy umožňuje charakterizovať genetickú štruktúru populácií identifikovaním vzorcov genetických variácií v rámci populácií aj medzi nimi. Štúdium jedincov z odlišných geografických oblastí zároveň poskytuje priestor na pochopenie mechanizmov, ktorými genetická variabilita prispieva k adaptácii rastlín na špecifické lokálne environmentálne podmienky [25].

Predbežné výsledky poukazujú, že hypotéza o vplyve kvality životného prostredia vážky na jej genomický polymorfizmu je detekovateľná aj na úrovni náhodne amplifikovanej DNA metódou RAPD. Metódy založené na molekulárnych markeroch predstavujú jeden z možných prístupov pre identifikáciu polymorfizmu medzi jednotlivými genotypmi [26]. RAPD markery sú účinným nástrojom na rozlíšenie geograficky a geneticky izolovaných populácií a používajú sa na overenie existencie lokálne adaptovaných populácií v rámci druhu, ktoré mohli vzniknúť buď

prostredníctvom genetického výberu za rôznych environmentálnych podmienok, alebo v dôsledku genetického driftu [27].

Je možné predpokladať, že v dôsledku znečistenia prostredia dochádza k zapájaniu obranných a adaptačných mechanizmov genómu vážky, ktoré sa prejavujú špecifickým DNA odtlačkom. Uvedené výsledky medzi populáciami druhu *Aeshna cyanea* z oboch lokalít, naznačujú určitý stupeň genetickej diferenciácie, pravdepodobne ovplyvnený environmentálnymi podmienkami jednotlivých biotopov. Avšak v tejto fáze nie je možné špecifikovať o aké typy zmien, na úrovni genomickej DNA dochádza. Preto v rámci ďalší analýz plánujeme rozšíriť nielen počet vzoriek z rôznych lokalít, ale aj aplikáciu sekvenčne špecifických markerov, napr. transponovateľných prvkov, mikrosatelitnej DNA alebo stres-responzívnych markerov na báze sekvencií mikroRNA.

Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že hodnota indexu DBI bola vyššia na lokalite s neznečistenou vodou (*Malá Vodárenská*) než na lokalite so znečistenou vodou (*Dolný Michalštolňanský tajch*). Uvedený rozdiel poukazuje na výrazný vplyv kvality vody na druhovú diverzitu vážok, pričom priaznivejšie ekologické podmienky podporujú vyššiu druhovú aj početnostnú pestrosť. Dopady znečistenia prostredia boli zaznamenané formou rozdielnych DNA profilov vzoriek. Zistenia potvrdzujú, že kombinácia ekologických a genetických prístupov predstavuje účinný nástroj pri hodnotení stavu a ochrane vodných ekosystémov

PodĎakovanie

Tento výskum bol podporený grantmi VEGA 1/0603/25 integrácia dát (Big data) pre priestorové modelovanie biodiverzity v rôznych ekosystémových podmienkach, KEGA č. 010UKF-4/2025 dátová veda pre biológiu a KEGA č. 037SPU-4/2024 integrita dát v biologických a ekologických databázach.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SVITOK, Marek, NOVIKMEC, Milan, BITUŠÍK, Peter, MÁŠA Branislav, OBOŇA Jozef, OČADLÍK Miroslav, a MICHALKOVÁ Eva (2014). Benthic Communities of Low-Order Streams Affected by Acid Mine Drainages: A Case Study from Central Europe. *Water*. vol. 6, pp. 1312-1338; doi:10.3390/w6051312
- [2] BOULT, S., COLLINS, D.N, WHITE, K., N., CURTIS, C., D (1994). Metal transport in a stream polluted by acid mine drainage. The Afon Goch Anglesey, UK, *Environmentla pollution*, vol. 84 pp. 279 – 284.
- [3] NIYOGI, Dev, K., LEWIS, William, M., Jr., MCKNIGHT, Diane, M. (2002) Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems*, vol. 5, p. 554–567
- [4] BRAY, Jonathan. P., BROADY, Paul. A., NIYOGI, Dev K., HARDING, Jon, S. (2008). Periphyton communities in New Zealand streams impacted by acid mine drainage. *Marine Freshwater Reserach*, vol. 59, pp. 1084–1091
- [5] DE LA PEÑA, Santiago, BARREIRO, Rodolfo (2009). Biomonitoring acidic drainage impact in a complex setting using periphyton. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 150, pp. 351–363
- [6] HYNES, H.B. (1960). *The Biology of Polluted Waters*; Liverpool University Press: Liverpool, UK, p. 202. ISBN 0802016901
- [7] JAI, SUBODH Kumar, NEEKHRA, Bharat, PANDEY, Divya, JAIN, Kalpana, (2010). RAPD marker system in insect study: A review. *Journal of Biotechnology*, vol. 9, pp. 7–12
- [8] PARKES, Katharine, A, AMOS, William, MOORE, Norman, W. HOFFMAN, Joseph, I., MOORE Janet, (2009). Population structure and speciation in the dragonfly *Sympetrum striolatum/nigrescens* (Odonata: Libellulidae): An analysis using AFLP markers. *European journal of entomology*, vol. 106, pp. 179- 184 ISSN 1210-5759
- [9] HADRIS, H., BALICK, M., SCHERWATER, B., (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, vol. 1, pp. 55-63.
- [10] BARDAKCI, Fevzi, (2001) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkis Journal of Biology*, vol.25, pp. 185 – 196.
- [11] GANIE, Showkat. Hussain., UPADHYAY, Priti, DAS, Sandip, and PRASAD SHARMA, Maheshwer (2015). Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*, vol. 4, pp. 83–99.
- [12] SAMWAYS, Michael, J., SIMAIKA, John, P. (2016). Manual of Freshwater Assessment: Dragonfly Biotic Index. *South African National Biodiversity Institute*, vol. 21, pp. 581–582.
- [13] KIETZKA, Gabriella, James, PRYKE, J, S.; GAIGHER, René; SAMWAYS, Michael J. (2021). Webs of well-designed conservation corridors maintain river ecosystem integrity and biodiversity in plantation mosaics. *Biological conservation*. vol. 254, pp. 108965
- [14] SIMAIKA, John P., and SAMWAYS, Michael J., (2009). An easy-to-use index of ecological integrity for prioritizing freshwater sites and for assessing habitat quality. *Biodiversity and Conservation*, vol. 18, pp. 1171–1185.
- [15] MAZÚR, E. a LUKNIŠ, M. Geomorfologické členenie SR a ČSFR. (1986). Online. Verzia 2.0.008 Dátum aktualizácie 2025-07-08. Dostupné z: <https://app.sazp.sk/atlassr/> [citované 2025-11-20].
- [16] DOLNÝ, Aleš, HARABIŠ, Filip, and BÁRTA, Dan, (2016). *Vážky (Insecta: Odonata) České republiky*. Praha: Academia, 342 pp. ISBN978-80-200-2503-6
- [17] KOHL (2003) *Určovací klíč exuvií evropských druhů vážek (Odonata) podřádu Anisoptera*. Vlašim: Český svaz ochranců přírody Vlašim, 30 p. ISBN 80-86327-31-0
- [18] BRIGGS, Andrew, J., PRYKE, James, S., SAMWAYS, Michael, J., CONLONG, Des, E., (2019). Complementarity among dragonflies across a ponscape in a rural landscape mosaic. *Insect Conservation and Diversity*, vol. 12, pp. 241–250.
- [19] SIMAIKA, John, P., SAMWAYS, Michael, J., (2009). An easy-to-use index of ecological integrity for prioritizing freshwater sites and for assessing habitat quality. *Biodiversity and Conservation*, vol. 18, pp. 1171–1185
- [20] HARABIŠ, Filip, DOLNÝ, Aleš, (2018). Military training areas as refuges for threatened dragonfly species: Effect of spatial isolation and military activity. *Biological Conservation* , vol. 217, pp. 28–35.
- [21] SIMAIKA, John, P., SAMWAYS, Michael, J., (2012). Using dragonflies to monitor and prioritize lotic systems: a South African perspective. *Organisms Diversity & Evolution* 12, 251–259.
- [22] KIETZKA, Gabriella, J., PRYKE, James, S., SAMWAYS, Michael, J., 2015. Landscape ecological networks are successful in supporting a diverse dragonfly assemblage. *Insect Conserv. Divers.* 8, 229–237.
- [23] BAIG, Jameel, AHMED, Kazi, TASNEEM, Gul, ARAIN Muhamad, BALLAL, Afridi, HASAN, Imran, KANDHRO Ghulam, ABBAS, Sarfraz RAJA Adil, JAMALI, Muhammad KHAN, Shah ABDUL Quadir (2009) Evaluation of arsenic and other physico-chemical parameters of surface and ground water of Jamshoro, Pakistan. *Journal of Hazardous Materials*. vol. 166, pp. 662 – 669.
- [24] CAO Yaru, ZHANG Shirong, WANG Guiyin, Li T, XU Xiaoxun, DENG Ouping, ZHANG Yanzong, PU Yulin (2017). Enhancing the soil heavy metals removal efficiency by adding HPMA and PBTA along with plant washing agents. *Journal od Hazardous Materials*, vol. 339, pp. 33-42.

- [25] RAŽNÁ, Katarína, ČERTEKOVÁ, Simona, ŠTEFÚNOVÁ, Veronika, HABÁN, Miroslav, KORCZYK-SZABÓ, Joanna, ERNSTOVÁ, Martina. Lavandula spp. diversity assessment by molecular markers as a tool for growers. In *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. ISSN 2585-8246, 2023, vol. 7, no. 1, s. 27-39.
- [26] PATEL, Hardik. K., FOGAT, Ranbir Sushil, KUMAR, S., MISTRY, Jijgar G., & KUMAR, Mukesh (2015). Detection of genetic variation in *Ocimum* species using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, vol. 5, pp. 697–707.
- [27] FUCHS, H., GROSS, R., STEIN H., ROTTMANN O. (1998). Application of molecular genetic markers for the differentiation of bream (*Abramis brama* L.) populations from the rivers Main and Danube. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 14, pp. 49-55.

Štúdium neviničových izolátov HSVd na pochopenie širšieho hostiteľského okruhu v rámci Slovenska

Investigation of non-grapevine HSVd isolates to elucidate the broader host range within Slovakia

Jana Kemenczeiová^{1,2} – Sabína Petrášová¹ – Peter Alaxin² – 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, 845 05 Bratislava

¹kemenczeiova1@ucm.sk, ²peter.alaxin@savba.sk, ³petrasova7@ucm.sk, ⁴miroslav.glasa@savba.sk

Abstrakt

Hop stunt viroid je významný rastlinný patogén so širokým spektrom hostiteľov vrátane ovocných drevín. Napriek tomu, že na základe genomických údajov získaných z databáz je druhým najviac reportovaným hostiteľom moruša (*Morus spp.*), za jeho evolučne pôvodného hostiteľa je však považovaný vinič, u ktorého je priebeh HSVd infekcie bezpríznakový. Cieľom tejto práce bola detekcia a molekulárna charakterizácia HSVd v prirodzene infikovaných rastlinách moruše bielej (*Morus alba* L.) pochádzajúcich z rôznych lokalít Západného Slovenska a porovnanie získaných molekulárnych dát izolátov s referenčným izolátom pochádzajúcim z viniča. Prítomnosť viroidu bola potvrdená v troch vzorkách moruše pomocou RT-PCR, pričom amplifikované produkty boli následne analyzované Sangerovým sekvenovaním. Sekvenčná analýza preukázala 100 % nukleotidovú zhodu medzi izolátmi z moruše a izolátom HSVd z viniča, čo naznačuje možný mechnický alebo vektorom asistovaný prenos medzi hostiteľmi. Úroveň akumulácie RNA viroidu bola stanovená pomocou RT-qPCR, pričom výsledky kvantitatívne potvrdili prítomnosť viroidu práve v daných troch analyzovaných vzorkách. Ďalšie čiastkové výsledky poukázali na variabilnú hladinu infekčnej RNA medzi jednotlivými lokalitami. Sekundárna štruktúra RNA slovenských morušových izolátov bola predikovaná pomocou programu Mfold, pričom model s minimálnou voľnou energiou vykazoval typickú tyčinkovitú konformáciu charakteristickú pre členov čeľade *Pospiviroidae*.

Kľúčové slová: HSVd, moruša, RT-PCR, RT-qPCR, sekvenovanie

Abstract

Hop stunt viroid is an important plant pathogen with a broad host range, including grapevine fruit trees, with the most prevalent being mulberry trees (*Morus spp.*) based on the data from databases. However, the grapevine is considered its evolutionary original host, in which the course of HSVd infection is asymptomatic. The aim of this study was the detection and molecular characterization of HSVd in naturally infected white (common) mulberry plants (*Morus alba* L.) originating from different locations in western Slovakia, and the comparison of the obtained isolates with a reference isolate derived from grapevine. The presence of the viroid was originally confirmed in two samples by RT-PCR, and the amplified products were subsequently analyzed by Sanger sequencing. Sequence analysis revealed 100% nucleotide identity between the mulberry isolates and the grapevine-derived HSVd isolate, suggesting possible mechanical or vector-mediated transmission between hosts. The level of viroid RNA accumulation was determined by RT-qPCR, while result confirmed the presence of the viroid in these three previously analyzed samples. Other partial results indicated variability in infectious RNA level accumulation among the different locations. The secondary structure of the Slovak mulberry isolates was predicted using Mfold, and the minimum free energy model exhibited the typical rod-like conformation characteristic of members of the family *Pospiviroidae*.

Key Words: HSVd, mulberry, RT-PCR, RT-qPCR, sequencing

Úvod

Moruša biela (*Morus alba* L.), trvácna drevina z čeľade *Moraceae*, je dôležitá ekonomická a ekologická rastlina, ktorá je široko pestovaná na celom svete.

Okrem samotných jedlých plodov sú jej listy najlepším prírodným krmivom pre priadky morušové a ich kvalita a výnos zohrávajú dôležitú úlohu pre produkciu hodvábu [1]. Vírusové a subvírusové choroby moruše vážne ohrozujú normálny rast a vývoj rastlín, čím ohrozujú pestovateľský priemysel a s ním súvisiace ekonomické dopady. Medzinárodný výbor pre taxonómiu vírusov (ICTV) v súčasnosti uznáva päť druhov vírusov, ktoré infikujú morušu, a to vírus krúžkovitosti moruše (*Mulberry ringspot virus*) [2], vírus asociovaný s mozaikovou zvinutkou listov moruše (*Mulberry mosaic leaf roll-associated virus*) [3], vírus páskovania žíl moruše (*Mulberry vein banding associated virus*) [4], vírus zvrásnenosti listov moruše (*Mulberry crinkle leaf virus*) [5] a badnavírus moruše 1 (*Mulberry badnavirus 1*) [6].

Viroidy sú malé nekódujúce kruhové jednovláknové molekuly RNA, ktoré prirodzene infikujú rastliny [7]. Hoci sú doteraz najmenšími a najjednoduchšími známymi infekčnými patogénmi, s veľkosťami od 246 do 434 nukleotidov, spôsobujú ničivé choroby u mnohých druhov rastlín, ako sú kultúrne plodiny (ovocné dreviny, zelenina) či okrasné rastliny, čo často vedie k významným ekonomickým stratám. V závislosti od rozdielnej intracelulárnej lokalizácie a konformácie v rámci ich sekundárnych RNA štruktúr bolo 44 známych druhov viroidov klasifikovaných do dvoch čeľadí: *Pospiviroidae* a *Avsunviroidae*. Viroidy patriace do čeľade *Pospiviroidae*, kam patrí aj HSVd, sa replikujú v jadre prostredníctvom asymetrickej spôsobu replikácie mechanizmom rotujúcej kružnice (*rolling-circle*) a ich RNA tvoria tyčinkovité sekundárne štruktúry s piatimi doménami: centrálna konzervovaná oblasť (CCR); ľavá a pravá terminálna oblasť (T_L a T_R), oblasť patogenity (P) a oblasť variability (V) [8].

HSVd má široké spektrum hostiteľov, a preto predstavuje potenciálnu hrozbu pre poľnohospodársku produkciu vo svete. Medzi poľnohospodársky a ekonomicky dôležitých rastlinných hostiteľov, ktoré môžu byť infikované HSVd, patria napr. marhule, mandle (*Rosaceae*), figy, moruše (*Moraceae*), vinič (*Vitaceae*) či pistácie (*Anacardiaceae*), no v mnohých prípadoch môže byť infekcia spôsobená daným patogénom asymptomatická [9].

HSVd bol na území Slovenska identifikovaný predovšetkým vo viniči hroznorodom (*Vitis vinifera* L.) [9], ktorý je považovaný za evolučne pôvodného a najčastejšie infikovaného hostiteľa daného patogénu [11]. Vďaka rozšírenej a dlhodobej pestovateľskej tradícii viniča na našom území tak bol tento druh

viroidu skúmaný a potvrdený zatiaľ iba u tejto plodiny [9]. Na Slovensku preto dlhodobo chýbali molekulárne údaje charakterizujúce populačnú štruktúru HSVd aj u iných, neviničových hostiteľov. Na doplnenie dostupných údajov z databázy GenBank, ktorá uvádza morušu (*Morus* spp.) ako druhého najfrekvencovanejšieho hostiteľa HSVd, sme vykonali skrining tohto hostiteľa aj na našom území.

1 Materiál a Metódy

1.1 Zber vzoriek a izolácia RNA

Na preskúmanie prítomnosti HSVd v rastlinách moruše bielej (*M. alba* L.) sme od mája 2024 do júla 2025 uskutočnili terénny zber vo viacerých oblastiach západného Slovenska (Tabuľka 1). Ako rastlinný materiál sme prednostne použili listy moruše vykazujúce známky vírusovej infekcie (pruhovanie žilnatiny, kučeravosť listov, žlté škvrny, či listové deformácie). Okrem príznakových listov sme zozbierali aj listy bez symptómov infekcie (celkovo 44 vzoriek). Celkovú RNA sme extrahovali z listov pomocou kitu Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a pred ďalšou analýzou sme vzorky RNA skladovali pri -80 °C.

Tabuľka 1: Základné charakteristiky RT-PCR analyzovaných vzoriek moruší

Kód	Oblasť	Dátum zberu
RV45	Brodské	máj/2024
*RV57	Piešťany VÚRV	máj/2024
*RV58		
RV88	Bratislava ÚZ SAV	júl/2024
RV89		
RV90		
RV91		
RV92		
RV93		
RV94		
RV95		
RV96	Karlova Ves	júl/2024
RV203	Hruboňovo	máj/2025

RV204	Hruboňovo	máj/2025
RV205	Veľké Ripňany	máj/2025
RV206	Hruboňovo	máj/2025
RV207	Grinava	jún/2025
RV208	Pezinok	jún/2025
RV224 RV225	Nitra (Botanická záhrada)	jún/2025
RV226	Prašice	jún/2025
RV227	Preseľany	jún/2025
RV228 RV229	Urmince	jún/2025
RV230 RV231 RV232 *RV233 RV234 RV235 RV236 RV237 RV238	Urmince	jún/2025
RV239 RV240 RV241 RV242 RV243 RV244	Ceroviny	jún/2025
RV245	Pezinok	jún/2025
RV252 RV253	Siladice	jún/2025
RV254 RV255	Oponice	jún/2025

**Pozitívne vzorky overené aj Sanger sekvenovaním sú označené zelenou farbou.*

1.2 RT-PCR, Sangerovo sekvenovanie a predikcia sekundárnej štruktúry RNA

Celkovú RNA izolovanú zo vzoriek moruše sme použili ako templát pre dvojkrovovú RT-PCR. Prvým krokom bola príprava cDNA prostredníctvom AMV reverznej transkriptázy z celkovej RNA s použitím hexamérnych náhodných DNA primerov (oba od Promega, Madison, WI, USA). Alikvót cDNA sme následne použili ako templát v štandardnej primer špecifickej PCR na kompletnú amplifikáciu viroidovej sekvencie pomocou TaKaRa Ex Taq polymerázy (Takara Bio Inc., Shiga, Japonsko) a HSVd – špecifického páru primerov HSV-78P (5'-aaCCCGGGGCAACTCTTCTC-3'; sense) a HSV-83M (5'-aaCCCGGGGCTCTTTCTCA-3'; antisense, malé písmená predstavujú neviroidnú sekvenciu), čiastočne sa prekrývajúcej v centrálnej konzervovanej oblasti [11]. Podmienky cyklovania PCR boli nasledujúce: počiatočná denaturácia 95 °C počas 2 minút, 40 cyklov (denaturácia pri 95 °C 30s, anelácia 57 °C 30s, polymerizácia 72 °C 20s) a finálna polymerizácia pri 72 °C počas 5 minút. Amplifikované fragmenty PCR sme analyzovali elektroforézou v 3 % agarózovom géli (UltraPure™ Agarose-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vybrané amplikóny špecifickej veľkosti sme následne purifikovali z gélu pomocou kitu Wizard® SV Gel a PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Purifikované PCR produkty sme podrobili Sangerovmu sekvenovaniu (Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH, Ebersberg, Nemecko) s použitím rovnakých HSVd-špecifických primerov, ako sa použili pri RT-PCR.

Sekundárne RNA štruktúry slovenských morušových izolátov HSVd sme predikovali pomocou webového bioinformatického nástroja Mfold [10] (dostupný na <http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>). Predpovede boli vykonané v rámci predvolených parametrov pre kruhové molekuly RNA.

1.3 Detekcia HSVd metódou RT-qPCR

Detekcia amplifikácie PCR v reálnom čase (Tabuľka 2) bola založená na chémii TaqMan® (s využitím TaqMan™ Fast Advanced Master Mix – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), pričom sme použili interne navrhnuté HSVd-špecifické primery HSVd_101F (5'-CCAGCGAGAGGCGTG-3', sense) a HSVd_239bR (5'-GAACCGAGAGGTGATGCC-3', antisense), ktoré pokrývajú centrálnu, variabilnú a

pravú terminálnu doménu a aj próbu HSVd_133F-P1 (5'-CTCTGGAGTAGAGGCTCTGCCTTCG AAACA-3'), značené fluorofórom FAM na detekciu fluorescenčného signálu. Podmienky cyklovania RT-qPCR boli nasledovné: počiatočná denaturácia pri 95 °C počas 20 s; 40 cyklov (denaturácia pri 95 °C počas 3 s; kombinovaný krok anelácia/elongácie pri 60 °C počas 20s). Amplifikáciu a detekciu fluorescencie sme uskutočňovali na prístroji qTOWERirisReal-Time Thermal Cycler a bioinformatické vyhodnotenie výsledkov sme realizovali pomocou softvéru qPCRSoft RealTime (Analytik Jena, Jena, Nemecko). Počas celého testu sme opakovane používali ako internú pozitívnu kontrolu viničovú sekvenciu HSVd (SK11-21 clone1 – OP918913), klonovanú do plazmidu (pGEM®-T Easy Vector; Promega, Madison, WI, USA), pochádzajúcu z našej predchádzajúcej štúdie (Alaxin a kol., 2023). Negatívne kontroly predstavovali zdravé, neinfikované rastliny a zároveň sme aj zahrnuli pufrovú netemplátovú kontrolu (NTC).

Tabuľka 2: Vybrané vzorky moruší použité na hlbšiu analýzu prítomnosti HSVd prostredníctvom RT-qPCR

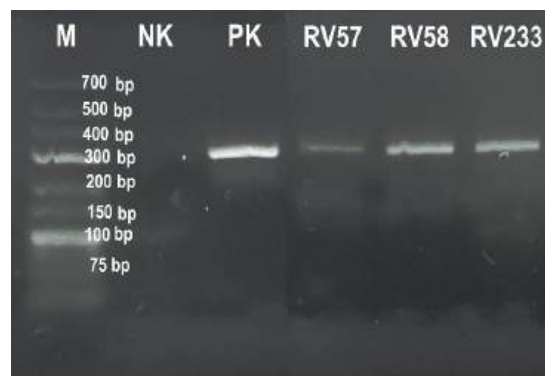
Kód	Oblasť
RV101	Pezinok
RV110	Pezinok
RV115	Trnava
RV186	Piešťany
RV204	Hruboňovo
RV205	Veľké Ripňany
RV207	Grinava
RV224	Nitra (Botanická záhrada)
RV226	Prašice
RV227	Preseľany
RV233 (interná PK)	Urmince
RV239	Ceroviny
RV245	Pezinok
RV252	Siladice
RV255	Oponice
RV305	Suchá nad Parnou
RV311	Plavecký Mikuláš

RT-qPCR pozitívne vzorky sú označené zelenou farbou. RT-qPCR negatívne vzorky sú označené červenou farbou.

2 Výsledky a diskusia

V našej práci sme realizovali štúdiu zameranú na skrining prítomnosti HSVd u neviničových hostiteľov (moruša) v rámci územia Slovenskej republiky. Pomocou detekčných primerov HSV-78P/HSV-83M [11] sa z kolekcie 44 analyzovaných vzoriek amplifikoval produkt očakávanej veľkosti (približne 300 bp) v troch vzorkách (RV57, RV58 a RV233) (Obr.1), pričom 41 zvyšných vzoriek vyšlo z prvotných RT-PCR analýz ako negatívne. Z uvedených dát sme stanovili zistenú prevalenciu HSVd u moruše na Slovensku, ktorá predstavuje 7,3 %.

Tento výsledok však môže byť do určitej miery ovplyvnený nerovnomerným geografickým rozložením publikovaných štúdií. Významná časť z dostupných molekulárnych dát o HSVd pochádza z Indie a z Číny, kde je pestovanie moruší úzko späté s produkciou hodvábu, ktorý má v týchto krajinách výrazný historický aj ekonomický význam. Zvýšený výskumný záujem o moruše v uvedených regiónoch tak mohol viesť k prípadnému skresleniu prevalenčných dát u tohto hostiteľa v databázach, ktoré vychádzajú v princípe najmä z celkového počtu samotných importovaných sekvencií. Tieto výsledky naznačujú, že hoci moruša predstavuje štatisticky významného hostiteľa HSVd, jej relatívne vysoká frekvencia v databázach môže odrážať skôr zvýšenú pestovateľskú intenzitu v daných oblastiach než skutočne vyššiu mieru infekcie v porovnaní s inými hostiteľskými druhmi [15, 12].



Obr. 1 Elektroforetická separácia RT-PCR produktov špecifických pre HSVd v 3 % agarózovom géli. Pozitívne vzorky RV57, RV58 a RV233 obsahujú band špecifickej veľkosti (približne 300 bp). M – marker (GeneRuler™ Low Range Ladder, Thermo Fisher Scientific); PK – pozitívna kontrola (OP918913); NK – negatívna kontrola

Tri pozitívne vzorky moruší mohli byť výsledkom nešpecifického mechanického (pracovné náradie) či vektorového (hmyz) prenosu viroidu, čo je pravdepodobne vzhľadom na blízkosť vinohradov v danej oblasti (najmä VÚRV v Piešťanoch), alebo sa mohla infekcia preniesť inými mechanizmami. Následne boli produkty RT-PCR priamo sekvenované, aby sme získali sekvenčné údaje charakterizujúce morušové HSVd izoláty.

Sekvenčná analýza týchto vzoriek (Obr. 2) ukázala úplnú sekvenčnú zhodu so slovenským viničovým izolátom označeným ako SK07-21 (reportovaná v GenBank databáze pod číslom OP918910) – patriacemu do jedného z dvoch hlavných sekvenčných klastrov objavených u tohto druhu hostiteľa [9] – čo podporuje hypotézu viničového pôvodu infekcie. V rámci Slovenska tak neboli identifikované žiadne nové hostiteľ špecifické mutácie charakteristické pre morušu, čo na druhej strane ale môže byť ovplyvnené aj samotným nízkym počtom pozitívnych vzoriek.

```
>RV57_HSVd
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCATGCAAGAAAAAACTTGGCAGGGAGGTACTTACCTGAGAAAGGAGCCCC
GGGGCAACTCTTCTCAGAAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGCCCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCTGCTTGGAAAC
ACCATCGATCGTCCCTTCTCTTTACCTTCTCTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGTTCGTGTC
CCAACCTGCTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCCGGATCCTCTTGA6CCCC

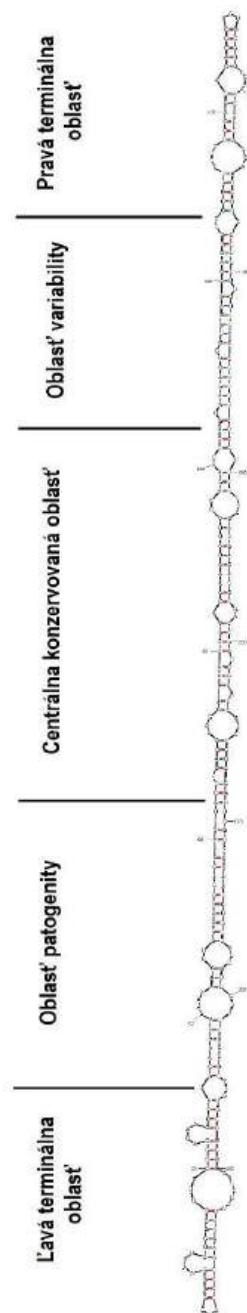
>RV58_HSVd
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCATGCAAGAAAAAACTTGGCAGGGAGGTACTTACCTGAGAAAGGAGCCCC
GGGGCAACTCTTCTCAGAAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGCCCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCTGCTTGGAAAC
ACCATCGATCGTCCCTTCTCTTTACCTTCTCTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGTTCGTGTC
CCAACCTGCTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCCGGATCCTCTTGA6CCCC

>RV233_HSVd
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCATGCAAGAAAAAACTTGGCAGGGAGGTACTTACCTGAGAAAGGAGCCCC
GGGGCAACTCTTCTCAGAAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGCCCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCTGCTTGGAAAC
ACCATCGATCGTCCCTTCTCTTTACCTTCTCTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGTTCGTGTC
CCAACCTGCTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCCGGATCCTCTTGA6CCCC

>OP918910 Hop stunt viroid isolate SK07_21, complete genome
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCATGCAAGAAAAAACTTGGCAGGGAGGTACTTACCTGAGAAAGGAGCCCC
GGGGCAACTCTTCTCAGAAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGCCCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCTGCTTGGAAAC
ACCATCGATCGTCCCTTCTCTTTACCTTCTCTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGTTCGTGTC
CCAACCTGCTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCCGGATCCTCTTGA6CCCC
```

Obr.2 Primárne sekvencie HSVd zo vzoriek moruše (RV57, RV58 a RV233) a viniča (OP918910) získané metódou Sangerovho sekvenovania (formát FASTA).

Sekundárna štruktúra RNA slovenských morušových izolátov HSVd bola predikovaná s cieľom posúdiť ich štruktúrnu integritu a biologickú relevantnosť. Všetky tri morušové izoláty HSVd zhodne vykazovali charakteristickú tyčinkovitú sekundárnu štruktúru typickú pre viroidy z čeľade *Pospiviroidae*. Získané sekvencie sme preto považovali za biologicky viabilné a schopné úspešnej infekcie. Predikcia sekundárnej štruktúry RNA pomocou programu M-Fold [10] (Obr. 3) ukázala, že aj samotná štruktúra bola úplne konzervovaná, čo vyplýva už aj so samotnej sekvenčnej zhody s izolátom Sk11-21_clone1 [9].

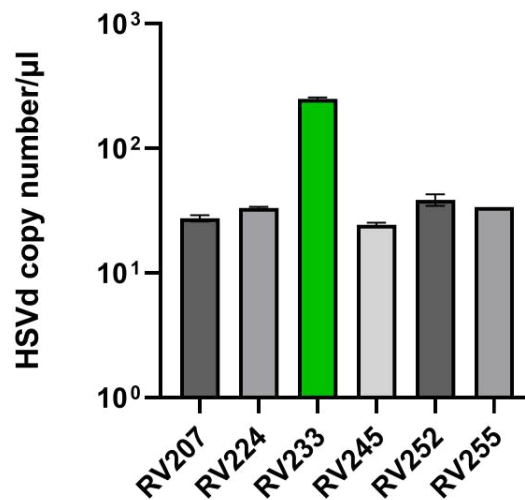


Obr. 3 Sekundárna štruktúra RNA izolátu HSVd (RV58) z moruše predikovaná programom Mfold na základe modelu minimálnej voľnej Gibbsovej energie ($\Delta G = -114,10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Molekula vytvára typickú tyčinkovitú (*rod-like*) konformáciu s vysokým stupňom intramolekulového párovania báz a prítomnosťou charakteristických *stem-loop* oblastí. Rovnakú sekundárnu štruktúru vytvárali aj izoláty RV57 a RV233.

Kvantitatívna PCR (RT-qPCR) s použitím TaqMan sondy bola zvolená na paralelné a citlivejšie potvrdenie prítomnosti HSVd, pričom sme na tento druh analýzy špecificky vybrali súbor vzoriek na základe prechádzajúceho RT-PCR skríningu s cieľom zachytiť aj čo najväčšie regionálne pokrytie (Tabuľka 2). V pôvodných troch analyzovaných vzorkách moruše zo Západného Slovenska sa opätovne potvrdila ich pozitivita vďaka relatívne vyšším hladinám RNA vo vzorkách v porovnaní so štandardom (plazmidová kontrola využitá na výpočet rovnice priamky z kalibračnej krivky). Avšak, niektoré ďalšie vzorky moruší (RV207; RV224; RV245; RV252; RV255) vykazovali nízke, no stabilné hodnoty akumulácie viroidovej RNA (Obr. 4), čo môže naznačovať prítomnosť veľmi slabej, no stále biologicky úspešnej infekcie HSVd. Tieto výsledky sú síce v kontraste s pôvodnými RT-PCR analýzami, pri ktorých vyšli dané vzorky negatívne, avšak RT-qPCR je oveľa citlivejšou metódou umožňujúcou presnejšiu a štatisticky významnejšiu detekciu amplifikačného signálu.

Metódy RT-qPCR s TaqMan sondami pre HSVd sú v literatúre považované za vysoko citlivé a špecifické, s diagnostickou a analytickou špecifickosťou až takmer 100 % pri detekcii viroidu v rôznych rastlinných hostiteľoch [12]. Rozdiely v hodnotách počtu kópií na 1 μl (*copy numbers/ μl*) medzi cDNA jednotlivých vzoriek naznačujú variabilitu množstva viroidovej RNA v prirodzene infikovaných jedincoch. V literatúre sa rovnaký typ variácie medzi rôznymi hostiteľskými vzorkami alebo podmienkami infekcie opisuje aj pri iných druhoch viroidoch, čo je často interpretované ako dôsledok rozdielneho stupňa akumulácie viroidu v závislosti od hostiteľského genotypu, environmentálnych faktorov či rozdielneho štádia infekcie [13].

Naše výsledky teda poukazujú na to, že moruša môže slúžiť ako významný rezervoár viroidovej infekcie, podobne ako iné druhy plodín a ovocných stromov, u ktorých bola prítomnosť HSVd preukázaná pomocou RT-PCR metód, a to aj napriek veľmi nízkym koncentráciám viroidovej RNA. Táto schopnosť perzistencie viroidu vo voľne rastúcej populácii moruší môže mať ekologický a epidemiologický význam, najmä ak ide o polykulturné pestovanie (blízkosť poľnohospodársky významných oblastí), kedy môže nastať mechanický prenos viroidu medzi rôznymi rastlinami [14].



Obr. 4 Graf znázorňujúci akumuláciu RNA HSVd v prirodzene infikovaných rastlinách moruše zozbieraných z rôznych lokalít Západného Slovenska. Analýza bola vykonaná z cDNA pripravených z celkovej RNA izolovanej z jednotlivých vybraných vzoriek. Každá vzorka bola analyzovaná v technickom triplikáte. Hodnoty počtu kópií viroidovej RNA na 1 μl cDNA (*copy numbers/ μl*) predstavujú pre jednotlivé vzorky: RV207 = 27,5 cps/ μl ; EV224 = 33,2 cps/ μl ; **RV233 = 249,0 cps/ μl** ; RV245 = 24,4 cps/ μl ; RV252 = 38,7 cps/ μl ; RV255 = 33,8 cps/ μl . Chybové úsečky u každej vzorky predstavujú odchýlku v rámci daného technického triplikátu.

Tento výsledok potvrdzuje prítomnosť HSVd vo väčšom množstve testovaných vzoriek, než bol pôvodných predpoklad iba na základe RT-PCR detekcie. Rozdielna citlivosť RT-qPCR a konvenčnej RT-PCR môže byť vysvetlená kombináciou biologických vlastností viroidu a technických rozdielov medzi použitými molekulárnymi metódami. RT-qPCR je všeobecne považovaná za metódu s vyššou citlivosťou v porovnaní s konvenčnou RT-PCR, pretože umožňuje detekciu amplifikačného produktu už počas exponenciálnej fázy reakcie pomocou fluorescenčného signálu. Vyššia citlivosť real-time assay v porovnaní s konvenčnou RT-PCR bola pre HSVd experimentálne potvrdená aj v štúdiu Papayiannis (2014), kde bola real-time metóda približne 1000-krát citlivejšia [12]. Tieto zistenia zdôrazňujú dôležitosť kombinácie viacerých molekulárných detekčných prístupov pri sledovaní viroidových infekcií, najmä v prípadoch s nízkou úrovňou akumulácie RNA alebo asymptomatickými, prípadne atypickými hostiteľmi

(akým môže byť aj moruša v prípade HSVd). Ďalšie rozsiahlejšie epidemiologické prieskumy a funkčné štúdie by mohli prispieť k lepšiemu pochopeniu šírenia HSVd medzi rôznymi hosťiteľmi a z toho vyplývajúcimi ekologickými implikáciami.

Záver

Výsledky tejto práce prvýkrát potvrdzujú prítomnosť HSVd na území Slovenska aj u iných, neviničových rastlinných hosťiteľov – moruše bielej (*M. alba* L.). Zistená 100 % nukleotidová zhoda v troch vzorkách s vysokým stupňom akumulácie viroidovej RNA s HSVd izolátom z viniča naznačuje možnú epidemiologickú prepojenosť infekcií medzi týmito dvoma hosťiteľmi. Moruša tak môže predstavovať ďalší potenciálny rezervoár HSVd infekcií, vznikajúci sekundárne v dôsledku prítomnosti týchto stromov v blízkosti vinohradníckych oblastí. Vinič v tomto epidemiologickom kontexte figuruje ako primárny zdroj HSVd infekcie, nakoľko udržiava v prírode výskyt aj takých sekvenčných variantov, ktoré sú schopné infikovať morušu. Toto riziko navyše zdôrazňuje aj schopnosť daného druhu viroidu perzistovať trvale u moruší už pri nízkych hodnotách akumulácie jeho infekčnej RNA. Získané výsledky môžu byť využité na optimalizáciu detekčných techník, či validáciu špecifických a citlivých nástrojov pre účely rutínnej diagnostiky, či optimalizáciu preventívnych opatrení.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená projektom APVV-22-0067 z Agentúry na podporu vedy a výskumu a grantom FPPV – 17 – 2026.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BATIHA, Gaber El-Saber; SNAFI, Ali Esmail Al; THUWAINI, Mahdi M; TEIBO, John Oluwafemi; SHAHEEN, Hazem M; AKOMOLAFE, Ayomide Peter; TEIBO, Titilate Kehinde Ayandeyi; KURAI SHY, Hayder M Al; GARBEEB, Ali I Al; ALEXIOU Athanosios and PAPADAKIS, Marios, (2023). *Morus alba*: a comprehensive phytochemical and pharmacological review. *Naunyn - Schmiedeberg's archives of pharmacology*, vol. 396, no. 7, pp. 1399 – 1413. DOI: 10.1007/s00210-023-02434-4
- [2] TSUCHIZAKI, Tsuneo; HIBINO, Hiroyuki and SAITO Yasuo, (1971). Mulberry Ringspot Virus Isolated from Mulberry Showing Ringspot Symptom. *Japanese Journal of Phytopathology*, vol. 37, no. 4, pp. 266 – 271. DOI: 10.3186/jjphytopath.37.266
- [3] LU, Quan – You; WU, Zu – Jian; XIA, Zhi – Song and XIE, Lian – Hui, (2015). A new nepovirus identified in mulberry (*Morus alba* L.) in China. *Archives of Virology*, vol. 160, pp. 851 – 855. DOI: 10.1007/s00705-014-2330-x
- [4] MENG, Jiaorong; LIU, PingPing; ZHU, Liling; ZOU, Chengwu; LI, Jieqiu and CHEN Baoshan, (2015). Complete Genome Sequence of Mulberry Vein Banding Associated Virus, a New Tospovirus Infecting Mulberry. *Plos One*, vol. 10, no. 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0136196
- [5] MA, Yuxin; NAVARRO, Beatriz; ZHANG, Zhixiang; LU, Meiguang; ZHOU, Xueping; CHI, Shenggi; DI SERIO, Francesco and LI Shifang, (2015). Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease. *Journal of General Virology*, vol. 96, no. 8, pp. 2421-2434 DOI: 10.1099/vir.0.000175
- [6] CHIUMENTI, Michaela; MORELLI, Massimiliano; DE STRADIS, Angelo; ELBEAINO, Toufic; STAVOLONE, Livia and MINAFRA, Angelantonio, (2016). Unusual genomic features of a badnavirus infecting mulberry. *Journal of General Virology*, vol. 97, no. 11, pp. 3073-3087. DOI: 10.1099/jgv.0.000600
- [7] FLORES, Ricardo; ZACHERT, Selma Gago; SERRA, Pedro, SANJUÁN, Rafael and ELENA, Santiago, (2014). Viroids: Survivors from the RNA World?. *Annual Review of Microbiology*, vol. 68, pp. 395 – 414. DOI: 10.1146/annurev-micro-091313-103416
- [8] DI SERIO, Francesco; OWENS, Robert; LI, Shi – Fang; MATOUŠEK, Jaroslav; PALLÁS, Vicente; RANGLES, John; SANO, Teruo; VERHOEVEN, Jacobus; VIDALAKIS, Geogios; FLORES, Ricardo and ICTV Report Consortium, (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Pospiviroidae. *Journal of General Virology*, vol. 102, no. 2. DOI: 10.1099/jgv.0.001543
- [9] ALAXIN, Peter; PREDAJŇA, Lukáš; ACHS, Adam; ŠUBR, Zdeno; MRKVOVÁ, Michaela and GLASA, Miroslav, (2023). Analysis of Hop Stunt Viroid Diversity in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Slovakia: Coexistence of Two Particular Genetic Groups. *Pathogens*, vol. 12, no. 2, pp. 205. DOI: 10.3390/pathogens12020205
- [10] ZUCKER, M, (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3406–3415. DOI: 10.1093/nar/gkg595
- [11] SANO, Teruo; MIMURA, Rie and OHSHIMA, Kazusato, (2001). Phylogenetic Analysis of Hop and

Grapevine Isolates of Hop Stunt Viroid Supports a Grapevine Origin for Hop Stunt Disease. *Virus Genes*, vol. 22, no. 1, pp. 53-59.

- [12] SHILPA, Natarajamurthy; SANO, Teruo and JANARDHANA, Gottravalli Ramanayaka, (2023). First report of hop stunt viroid (HSVd) infecting mulberry (*Morus alba*) in Karnataka state of India. *Disease Note*, vol. 105, pp. 1233 – 1234. DOI: 10.1007/s42161-023-01454-6
- [13] PAPAYIANNIS, Lambros C, (2014). Diagnostic real-time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of virological methods*, vol. 196, pp. 93-99. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.11.001
- [14] RAGOZZINO, E.; FAGGIOLI, F. and BARBA M., (2005). Distribution of Citrus Exocortis Viroid and Hop Stunt Viroid in Citrus Orchards of Central Italy as Revealed by One-Tube One-Step RT-PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 44, no. 3, pp. 322-326. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1807
- [15] MA, Yu; HAN, Tao-Tao; ZHANG, Peng; TANG, Jia-Xuan; SMITH, William Kojo; ZHONG, Kui; YU, Jing; CHENG, Yong-Yuan and ZHAO Weiguo, (2023). Occurrence and Pathogenicity of Hop Stunt Viroid Infecting Mulberry (*Morus alba*) Plants in China. *Plant Disease*, vol. 107, no. 10, pp. 2971-2977. DOI: 10.1094/PDIS-08-22-1865-RE

Effect of FLI medium (FGF2, LIF and IGF1) on mitochondrial gene expression of porcine oocytes derived from small follicles

Anna Ševčíková¹

Supervisor: Alexandra Rosenbaum Bartková^{2,3}

¹Department of Botany and Genetics, FNSal UKF in Nitra, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra,

²Department of Zoology and Anthropology, FNSal UKF in Nitra, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra

³IAPG CAS v.v.i., Rumburská 89, 277 21 Liběchov

¹ anna.sevcikova@ukf.sk, ² arbartkova@ukf.sk

Abstract

Oocyte maturation requires precise regulation of mitochondrial activity and redox balance. Porcine oocytes from small follicles (SF) exhibit reduced developmental competence compared to large follicle (LF) oocytes due to impaired mitochondrial dynamics. This study evaluated the effect of FLI medium and control TCM 199 on *in vitro* maturation (IVM).

Cumulus-oocyte complexes (COCs) isolated from SF and LF were cultured in both media and analysed at defined maturation stages. Gene expression of mitochondrial regulators (*MFN1*), mitochondrial transcription factors (*TFAM*, *TFB1M*), and the antioxidant enzyme *SOD2* was evaluated using qRT-PCR. FLI supplementation enhanced mitochondrial transcription and fusion dynamics by upregulating *MFN1* and maintaining higher *SOD2* expression in the MII stage. Furthermore, FLI regulated mitochondrial transcription through stage specific regulation of *TFAM* and *TFB1M*. Specifically, SF oocytes in FLI showed a distinct recovery of *TFAM* expression in the MII stage. Consequently, SF oocytes matured in FLI exhibited gene expression profiles resembling LF controls, indicating a partial restoration of molecular competence and improved cytoplasmic maturation.

Key Words: *in vitro* maturation, mitochondrial dynamics, oocyte competence, cumulus cells, porcine oocytes.

Introduction

Oocyte maturation represents a highly coordinated biological process involving nuclear progression, cytoplasmic reorganization, and metabolic remodeling [1]. While nuclear maturation is relatively well characterized, cytoplasmic maturation remains a critical determinant of developmental competence, particularly in livestock species such as the pig.

Adequate cytoplasmic maturation requires proper mitochondrial activity and redox homeostasis [2].

Porcine oocytes derived from small follicles (SF = 1–2 mm) typically have lower developmental competence compared to oocytes from large follicles (LF = 3–6 mm). This reduced competence has been associated with insufficient mitochondrial activity, altered mitochondrial dynamics and increased oxidative stress. Optimization of *in vitro* maturation (IVM) represents a key strategy for improving oocyte quality as IVM systems cannot fully replicate the follicular microenvironment [3].

Mitochondria play a central role in oocyte competence by regulating ATP production, reactive oxygen species (ROS) balance, and mitochondrial DNA (mtDNA) transcription [4, 5]. Genes involved in mitochondrial fusion - *MFN1* [6], transcriptional regulation - *TFAM*, *TFB1M* [7, 8], and antioxidant protection (*SOD2*) are particularly important during the GV-MI-MII transition [6].

This study aimed to evaluate whether supplementation with FLI medium could modulate mitochondrial dynamics and redox regulation, thereby improving the molecular competence of oocytes derived from small follicles.

1 Maturation media and follicle size effect

Oocyte competence, the ability to undergo meiosis, fertilization and development of the embryo, is a key determinant of IVF success [9]. In the porcine model, this competence is closely linked to follicle size. Oocytes from SF often show reduced developmental potential and incomplete cytoplasmic maturation compared to those from LF, primarily due to suboptimal mitochondrial activity [3].

The success of IVM depends on the culture

medium. Commonly used TCM 199 provides a basic metabolic environment but often fails to fully support those SF oocytes. In contrast, FLI medium, supplemented with FGF2, LIF and IGF1, more effectively mimics the follicular microenvironment. These growth factors activate key signalling pathways (e.g., MAPK/ERK and PI3K/AKT) that regulate metabolic activity and gene expression [3, 10].

Mitochondria are central regulators of this process, ensuring ATP production and redox balance. Meiotic progression requires coordinated structural and functional remodelling of mitochondria [4]. Therefore, monitoring genes involved in mitochondrial fusion, transcription and antioxidant defence is crucial for evaluating the impact of IVM on oocyte quality. This study aimed to determine if FLI medium can eliminate the differences between SF and LF competence by modulating these key molecular markers.

2 Mitochondrial regulation and dynamics during oocyte maturation

Mitochondria undergo structural and functional remodelling during IVM to meet the increased ATP demand of meiotic progression. This process requires coordinated expression of nuclear and mitochondrial genes [9, 11]. Mitochondrial transcription factors *TFAM* and *TFB1M* regulate mtDNA replication and transcription, ensuring the synthesis of essential respiratory chain components [7, 8].

The organization of the mitochondrial network is equally critical for oocyte quality. *MFN1*, a key mediator of mitochondrial fusion, maintains network integrity and optimizes oxidative phosphorylation. The upregulation of *MFN1* is linked to characteristic shifts in mitochondrial spatial distribution. While immature oocytes typically exhibit peripheral or diffused localization, progression toward the MII stage is marked by a transition to heterogeneous and clustered patterns [6].

These clusters, often localized perinuclearly, represent localized areas of high metabolic activity. This reorganization is essential for providing the energy required for spindle formation, chromosome segregation and polar body extrusion. Furthermore, increased metabolic activity and mitochondrial clustering require strong antioxidant defences [4, 5]. *SOD2* plays a vital role in neutralizing ROS within the mitochondrial matrix, protecting the oocyte from oxidative damage during critical transitions [6].

3 Methodology

The experimental design was established to compare

the molecular and cellular changes during porcine oocyte maturation under different culture conditions. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were categorized into experimental groups based on their follicular size and the maturation medium used (Tab. 1). For each experimental group, three independent replicates were performed, with 30 oocytes per group in each replicate. To capture the dynamic changes in gene expression, samples were analysed at three major meiotic stages: Germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) and metaphase II (MII).

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless specified otherwise. All plastic materials were purchased from Nunc. All media used were filtered and pre-warmed to 38.5°C before use.

3.1 Collection and classification of Cumulus-oocyte complexes

Porcine ovaries were obtained from a local slaughterhouse. COCs were aspirated and classified according to follicle size as SF and LF. Their quality was further assessed based on morphological characteristics, with only the highest quality COCs with compact cumulus and homogenous cytoplasm being selected for IVM.

3.2 In vitro maturation

COCs were cultured for 44 hours at 38.5°C in 5% CO₂ in either control TCM 199 medium or optimized FLI medium. Oocytes were collected at GV (0 h), MI (24 h), and MII (44 h) stages for further analysis. The detailed distribution of the experimental groups across these media and maturation stages is summarized in Tab 1.

Tab 1 Experimental groups for IVM

	TCM 199		FLI	
	SF	LF	SF	LF
GV	SF_GV	LF_GV	SF_GV	LF_GV
MI	SF_TMI	LF_TMI	SF_FMI	LF_FMI
MI	SF_TMII	LF_TMII	SF_FMII	LF_FMII

3.3 RNA isolation and qRT-PCR

After mechanical removal of cumulus cells, 20 oocytes per experimental group (Tab. 1) were processed for total RNA isolation using the RNAqueous Micro Kit. Gene expression was assessed by one-step qRT-PCR using a Rotor-Gene 3000 cyclor. Primers were designed and optimized using Beacon designer software (Tab 2).

Relative gene expression was calculated using

comparative analysis software. *YWHAG* served as the reference gene for porcine oocytes. Targeted genes included:

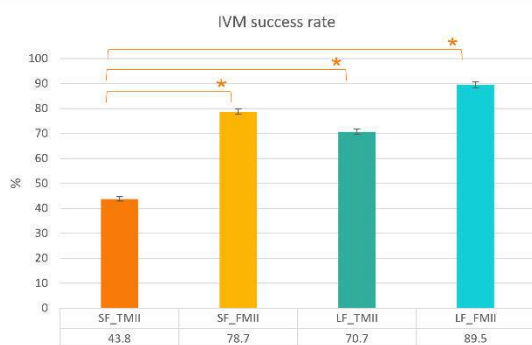
- Mitochondrial regulation: *TFAM*, *TFB1M*, *MFN1*
- Redox regulation: *SOD2*

4 Results and discussion

4.1 *In vitro* maturation

The success of IVM was evaluated by the ability of oocytes to reach the MII stage, characterized by the extrusion of the first polar body. Our results confirm that follicle size is a critical determinant of developmental competence. In the control TCM 199 medium, SF oocytes reached the MII stage with significantly lower efficiency (43.8%) compared to LF oocytes (70.7%). However, supplementation with the optimized FLI medium (FGF, LIF and IGF1) led to a significant improvement in maturation rates, reaching 78.7% for SF oocytes and 89.5% for LF oocytes.

These findings indicate that FLI significantly enhances oocyte quality, particularly by eliminating the statistical difference between SF and LF groups. While SF oocytes in TCM 199 were developmentally compromised, those matured in FLI achieved maturation levels comparable to both LF_TMI and LF_FMII groups. Our LF_FMII results (89.5%) closely correlate with those reported in literature, where the successful rates of those oocytes were about 89%, which support the superior efficacy of FLI medium in porcine models [3, 10, 12, 13].



Graph 1 IVM success rate; * $p < 0.05$

4.2 Gene expression (qRT-PCR)

The expression patterns of key markers for mitochondrial regulation and redox homeostasis were analysed to assess the impact of the culture

environment and follicle size on oocyte molecular competence.

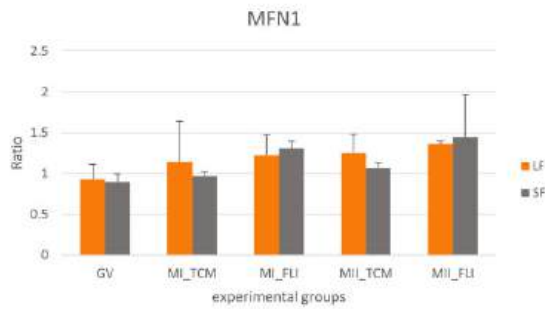
Mitochondria undergo structural and functional remodelling to meet the high energy demands of meiotic division. *MFN1* is essential for mitochondrial fusion, maintaining a healthy network capable of efficient ATP production. Our results showed an increasing expression pattern of *MFN1* across all experimental groups during IVM. While *MFN1* levels were notably lower in the SF TCM groups (MI_TCM and MII_TCM), the use of FLI medium promoted an upward trend in SF oocytes (MI_FLI and MII_FLI). This suggests that FLI medium supports the formation of a robust mitochondrial network, which is vital for preventing oxidative stress and maintaining oocyte quality [6].

Furthermore, mitochondrial transcription is driven by the coordinated action of *TFAM* and *TFB1M*. We observed a peak in *TFAM* expression during the MI stage, followed by a decrease in MII, suggesting that peak metabolic demand occurs during spindle formation and chromosome segregation, decreasing once the oocyte reaches meiotic arrest at MII. This dual functionality of *TFAM* in recruiting RNA polymerase and facilitating mtDNA transcription is critical during periods of high metabolic demand [8]. In SF oocytes cultured in FLI, the expression of *TFB1M* showed a slight increase in the MII stage, whereas LF FLI groups maintained consistently higher levels from the MI stage onwards. This indicates that FLI medium helps restore the transcriptional stability of mitochondria in less competent oocytes.

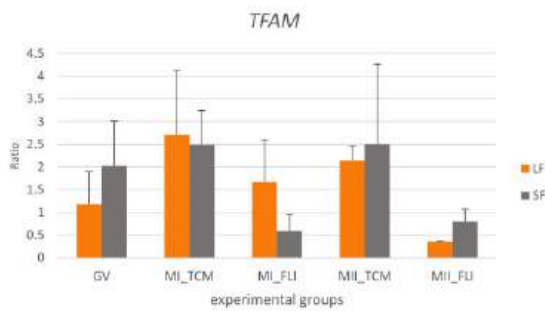
The intensified mitochondrial metabolism during IVM leads to the generation of ROS, which can damage DNA and proteins. *SOD2* acts as a crucial mitochondrial antioxidant enzyme that mitigates this oxidative stress. Our data revealed that while *SOD2* expression tended to decrease in TCM 199 groups during the transition to MII, FLI supplementation maintained or even enhanced these transcript levels. This indicates a superior antioxidant capacity in FLI matured oocytes. Which shows, that adequate *SOD2* expression is vital for maintaining cellular homeostasis, and our results suggest that FLI medium provides a protective environment that prevents impaired maturation caused by oxidative damage [7].

The qRT-PCR data suggest that FLI medium does not merely support nuclear maturation but actively modulates the transcriptional profile of the oocyte toward a more competent metabolic state. By enhancing mitochondrial dynamics (via *MFN1*) and stabilizing the transcriptional and antioxidant

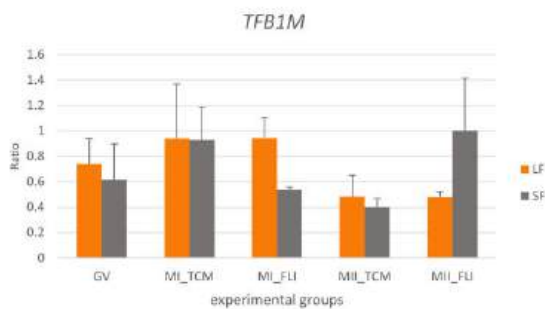
machinery (via *TFAM*, *TFB1M*, and *SOD2*), the FLI supplementation effectively bridges the molecular gap between SF derived oocytes and the more competent LF group. This compensatory effect allows SF oocytes to achieve a molecular signature comparable to LF controls, explaining the improved developmental success observed in our IVM experiments.



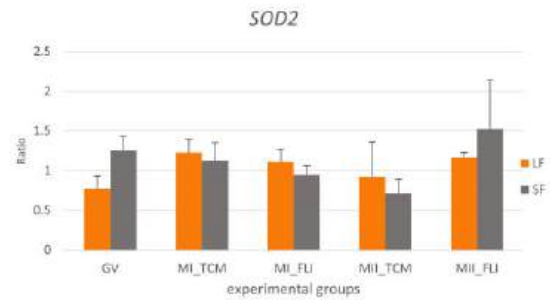
Graph 2 *MFN1* expression during IVM



Graph 3 *TFAM* expression during IVM



Graph 4 *TFB1M* expression during IVM



Graph 4 *SOD2* expression during IVM

5 Conclusion

This study demonstrates that the optimized FLI medium significantly improves the developmental potential of porcine oocytes, particularly those derived from small follicles. Our findings indicate that the specific combination of growth factors (FGF2, LIF, and IGF1) modulates key molecular pathways essential for successful cytoplasmic maturation. By mimicking the follicular microenvironment more effectively than traditional media, such as TCM 199. The FLI system provides the necessary signals for oocytes to overcome the developmental delay often associated with smaller follicle sizes.

A major finding of this research is the compensatory effect observed in developmentally compromised SF oocytes when cultured in FLI medium. The supplementation of FLI led to a restoration of mitochondrial competence, evidenced by the upregulation of *MFN1*, which suggests enhanced mitochondrial fusion and network reorganization. This structural remodelling is critical for meeting the high metabolic demands of meiotic progression. Furthermore, the increased expression of *TFAM* and *TFB1M* indicates a more robust regulation of mitochondrial DNA transcription, while the maintenance of *SOD2* levels points to a strengthened antioxidant defence, protecting the oocytes from oxidative stress during the transition to the MII stage.

In summary, SF oocytes matured in FLI medium exhibit gene expression profiles that closely approach those of highly competent LF controls. These results emphasize that optimizing the IVM microenvironment can effectively bridge the competence gap between different follicle sizes by targeting mitochondrial functionality and molecular stability. Such findings are crucial for improving the efficiency of assisted reproductive technologies in porcine models and offer valuable insights into the metabolic requirements of mammalian oocytes during maturation.

Acknowledgements

I would like to express sincere gratitude to my supervisor doc. RNDr. Alexandra Rosenbaum Bartková, PhD., MBA, for her professional guidance, continuous support, valuable scientific insight, and constructive feedback throughout the preparation of this work.

References

- [1] JIANG, Yao; HE, Yingting; PAN, Xiangchun; WANG, Penghao; YUAN, Xiaolong; MA, Bin, (2023). Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro mammals. *International Journal of Molecular Science*, 24, 9059. <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>.
- [2] YAMADA, Masayasu; ISAJI, Yuuki, (2011). Structural and functional changes linked to, and factors promoting cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 10(2), 69-79. <https://doi.org/10.1007/s12522-011-0079-4>.
- [3] BARTKOVÁ, Rosenbaum, Alexandra; NĚMCOVÁ, Lucie; KINTEROVÁ, Veronika; RADOVÁ, Dominika; STREJČEK, František; TORALOVÁ, Tereza; LAURINČÍK, Jozef; PROCHÁZKA, Radek, (2024). Meiotic and developmental competence of growing pig oocytes derived from small antral follicles is enhanced in culture medium containing FGF2, LIF, and IGF1 (FLI medium). *Journal of Ovarian Research*, 17(1). doi: 10.1186/s13048-024-01360-0.
- [4] KIRILLOVA, Anastasia; SMITZ, E., J., Johan; SUKHIKH, T., Gennady; MAZUNIN, Ilya, (2021). The role of mitochondria in oocyte maturation. *Cells*, 10(9), 1-17.
- [5] KIM, Kyunga; KENIGSBURG, Shlomit; JURISICOVA, Andrea; BENTOV, Yaakov, (2019). The role of mitochondria in oocyte and early embryo health. *OBM Genetics*, 3(1), 1-29.
- [6] SIDARALA, (2022). Mitofusin 1 and 2 regulation of mitochondrial DNA content is a critical determinant of glucose homeostasis. *Nature Communications*, 13.
- [7] KOH, Jin-Ho; KIM, Yong-Woon; SEO, Dae-Yun; SOHN, Tae-Seo, (2021). Mitochondrial TFAM as a signaling regulator between cellular organelles: A perspective on metabolic diseases. *Diabetes & Metabolism Journal*, 45(6), 853-865. Doi: 10.4093/dmj.2021.0138
- [8] RAMACHANDRAN, Aparna; BASU, Urimimala; SULTANA, Shemila; NADAKUMAR, Divya; PATEL, S. Smita, (2017). Human mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M work synergistically in promoter melting during transcription initiation. *Nuclei Acids Research*, 45(2), 861-874.
- [9] MAO, Luna; LOU, Hangying; LOU, Yiyun; WANG, Ning; JIN, Fan, (2014). Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(3), 284-299.
- [10] BARTKOVÁ, Rosenbaum, Alexandra; NĚMCOVÁ, Lucie; STREJČEK, František; GAD, Ahmed; KINTEROVÁ, Veronika; MOROVIČ, Martin; BENC, Michal; PROCHÁZKA, Radek; Laurinčík, Jozef, (2024). Impact of media supplements FGF2, LIF and IGF1 on the genome activity of porcine embryos produced *in vitro*. *Scientific Reports*, 14(1).
- [11] ALBAL, Serrano, María; SILVESTRI, Giuseppe; KIAZIM, G., Lucas; VINING, M., Lucy; ZAK, J., Louisa; WALLING, A., Grant; HAIGH, M., Alexandra; HARVEY, C., Simon; HARVEY, E., Katie; GRIFFIN, K., Darren, (2022). Supplementation of porcine in vitro maturation medium with FGF2, LIF, and IGF1 enhances cytoplasmic maturation in prepubertal gilts oocytes and improves embryo quality. *Zygote*, 30(6), 801-808.
- [12] PROCHÁZKA, Radek; BARTKOVÁ, Alexandra; NĚMCOVÁ, Lucie; MURÍN, Matěj; GAD, Ahmed; MARCOLLOVÁ, Kateřina; KINTEROVÁ, Veronika; LUCAS-HAHN, Andrea; LAURINČÍK, Jozef, (2021). The role of MAPK3/1 and AKT in the acquisition of high meiotic and developmental competence of porcine oocytes cultures in vitro in FLI medium, *International Journal of Molecular Science*, 22(20).
- [13] YUAN, Ye; SPATE, D., Lee; REDEL, K., Bethany; TIAN, Yuchen; ZHOU, Jie; PRATHER, S., Randall; ROBERTS, Michael, R., (2017). Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proceeding of the National Academy of Science*, 114(29), 5796-5804.

Tab 2 Primers

Transcript	Primers (5'–3')	Length (bp)	Tan (°C)	GenBank Accession Number
<i>MFN1</i>	TTG GCC CTA CAA ATG CTCAG GTG GTC CAA GTCAGC CTCTC	241	58	NM_001315732.1
<i>TFAM</i>	GCG CTC TCC GTT CAG TTT TG TGC CAG TCT GCC CTA TAA GC	237	55	NM_001130211.1
<i>TFB1M</i>	TCT GCC TTT TAG TGT ATC AAC GCT GTT TGC TTC CAG TAG TA	190	55	NM_001128475.1
<i>SOD2</i>	AGACCTGATTACCTGAAAGC CTTGATGTACTCGGTGTGAG	110	55	NM_214127.2
<i>YWHAG</i>	CAG CCC ACT CAC CCC ATT AG TGC TGA TCG CTT GTC CAG AG	218	58	XM_005661962.3

Založenie a charakterizácia línie kmeňových buniek sidy obojpohlavnej

Establishment and Characterization of a Stem Cell Line of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby

Simona Slobodová¹ – Šarlota Kaňuková^{1,2} – Ján Kraic^{1,2}

¹Oddelenie biotechnológií, ÚBB, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

²Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

slobodova5@ucm.sk, sarlota.kanukova@ucm.sk, jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt

Práca je zameraná na založenie a charakterizáciu línie rastlinných kmeňových buniek *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby, odvodených z bunkovej suspenznej kultúry vzniknutej z kalusového pletiva. Suspenzia bola počas 12 mesiacov kontinuálne udržiavaná v kontrolovaných *in vitro* podmienkach, čo viedlo k vytvoreniu homogénnej suspenzie pozostávajúcej prevažne z jednotlivých buniek. Kmeňové a dediferencované bunky boli rozlíšené farbením Neutral Red a kvantifikované počas 42-dňového kultivačného cyklu. Podiel kmeňových buniek vzrástol z 58,33 % na 92,91 %, zatiaľ čo dediferencované bunky tvorili len 7,09 % populácie. Hustota kmeňových buniek sa ustálila na približne 55×10^5 buniek/ml. Uvedené výsledky potvrdzujú vznik stabilnej bunkovej línie vhodnej na ďalšie experimentálne zamerané na sekundárne metabolity alebo scale-up.

Kľúčové slová: *in vitro*, bunková suspenzná kultúra, kmeňové bunky, sida obojpohlavná

Abstract

The study focuses on the establishment and characterization of a plant stem cell line of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby, derived from a cell suspension culture originating from callus tissue. The suspension was maintained continuously for 12 months under controlled *in vitro* conditions, resulting in a homogeneous culture composed predominantly of single cells. Stem and dedifferentiated cells were distinguished using Neutral Red staining and quantified over a 42-day cultivation cycle. The proportion of stem cells increased from 58.33% to 92.91%, while dedifferentiated cells accounted for only 7.09% of the population. The density of stem cells stabilized at approximately 55×10^5 cells/ml. These results confirm the establishment of a stable cell line suitable for

further experiments focused on secondary metabolites or scale-up applications.

Key Words: *in vitro*, cell suspension culture, stem cells, Virginia mallow

Úvod

Sida hermaphrodita (L.) Rusby (sida obojpohlavná) je viacročná bylina patriaca do čeľade *Malvaceae* (slezovité). Rastlina pochádza zo Severnej Ameriky, no v súčasnosti sa pestuje aj v Európe, najmä ako energetická plodina s vysokou produkciou biomasy. Rastlina nachádza uplatnenie pri výrobe biopalív, papiera a v environmentálnych technológiách, napríklad pri fytooremediácii pôd [1,2,3]. Napriek hospodárskemu významu je biologický a biochemický potenciál tohto druhu stále nedostatočne preskúmaný.

Rod *Sida* zahŕňa približne 200 druhov rastlín rozšírených v tropických a subtropických oblastiach sveta. Viaceré z nich sú známe obsahom sekundárnych metabolitov s farmakologickými účinkami. Alkaloidy, flavonoidy a fenolické zlúčeniny izolované z druhov rodu *Sida* sú predmetom záujmu v tradičnej aj modernej medicíne [4,5,6]. V porovnaní s inými druhmi rodu však *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby zostáva z hľadiska chemického zloženia a biologických vlastností málo preskúmaná.

Produkcia biologicky aktívnych látok priamo z rastlín pestovaných v prirodzených podmienkach je ovplyvnená mnohými faktormi, ako sú klimatické podmienky, kvalita pôdy či vegetačné obdobie. Tieto obmedzenia je možné prekonať využitím *in vitro* kultivačných systémov. *In vitro* pletivové systémy predstavujú kultúry rastlín, ich častí, pletív alebo buniek, ktoré rastú za aseptických a kontrolovaných podmienok [7]. Rastlinné pletivové a bunkové kultúry umožňujú stabilnú produkciu biomasy v kontrolovanom prostredí a predstavujú vhodný model na štúdium rastu

buniek, rozmnožovanie rastlín a syntézy sekundárnych metabolitov [8,9].

Osobitné postavenie v *in vitro* systémoch majú kmeňové bunky, ktoré si zachovávajú schopnosť dlhodobej proliferácie. Vďaka tomu predstavujú perspektívny zdroj rastlinného materiálu pre biotechnologické aplikácie. Rastlinné bunky produkujú široké spektrum metabolitov rôznej chemickej povahy, pričom extrakty získané z rastlinných kmeňových buniek predstavujú významný zdroj biologicky aktívnych zlúčenín a sekundárnych metabolitov [10, 11].

Cieľom práce bolo založiť a charakterizovať líniu kmeňových buniek *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby získanú z kalusu odvodeného zo stonkového pletiva a kvantifikovať zmeny v zastúpení kmeňových a dediferencovaných buniek počas dlhodobej kultivácie.

1 Materiál a metódy

1.1 *In vitro* klíčenie semien

Semená rastliny *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby sme získali z génovej banky NPPC – Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. Pred samotnou kultiváciou boli semená skarifikované v koncentrovanej kyseline sírovej počas 20 minút. Následne sme ich opláchli pod tečúcou vodou, vysušili a povrchovo sterilizovali najprv v 96 % etanole počas 30 sekúnd a potom v 4,7 % roztoku chlórnanu sodného počas 10 minút. Po sterilizácii boli semená štyrikrát premyté destilovanou vodou. Takto pripravené semená sme kultivovali na Murashige a Skoog médiu [12] s polovičnou koncentráciou solí a vitamínov (½ MS), obsahujúcom 3 % (w/v) sacharózy a 0,8 % (w/v) agaru, pričom pH média bolo upravené na 5,7 - 5,8. Kultúry boli inkubované pri teplote 23 ± 2 °C za podmienok fotoperiód 16 hodín svetla a 8 hodín tmy.

1.2 Indukcia kalogenézy

Na iniciáciu tvorby kalusového pletiva sme použili 4-týždňové rastliny pochádzajúce z *in vitro*. Ako explantáty sme využili stonkové segmenty. Stonky sme narezali na segmenty dlhé približne 5 mm a kultivovali na pevnom kultivačnom MS médiu s vitamínmi, obsahujúce 3% (w/v) sacharózy a 0,8 % (w/v) agaru, s pH upraveným na 5,7 - 5,8. Do média boli pridané dve varianty rastových regulátorov: (i) 1 mg/L IBA + 0,5 mg/L BAP a (ii) 1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L KIN. Kultivácia prebiehala v tme pri teplote 23 ± 2 °C. Subkultivácia explantátov sa vykonávala v 4-týždňových intervaloch na médiu rovnakého zloženia.

1.3 Založenie bunkovej suspenznej kultúry

Bunkové suspenzné kultúry boli iniciované z kalusového pletiva odvodeného zo stonkových explantátov *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby. Na ich založenie sa použilo tekuté MS médium rovnakého základného zloženia ako médium využitie pri indukcii kalusov, pričom bolo doplnené jednou kombináciou rastových regulátorov, t.j. 1 mg/L 2,4-D a 0,5 mg/L KIN. Kultivácia prebiehala v tme pri teplote 23 ± 2 °C na orbitálnej trepačke pri frekvencii 110 rpm. Pasážovanie sa uskutočňovalo v 14-dňových intervaloch, resp. v závislosti od hustoty suspenzie. Suspenzné kultúry boli kontinuálne udržiavané za rovnakých podmienok po dobu jedného roka pred založením experimentov.

1.4 Založenie línie kmeňových buniek

Bunkovú suspenznú kultúru sme rozdelili do 100 ml Erlenmeyerových baniek, do ktorých sme napipetovali 15 ml sterilného kultivačného média a pridali 5 ml bunkovej suspenzie. Kultivácia prebiehala v tme pri teplote 23 ± 2 °C na orbitálnej trepačke pri frekvencii 110 rpm.

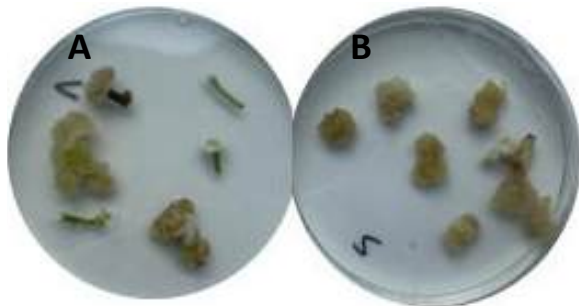
Mikroskopickú analýzu buniek v bunkových suspenzných kultúrach sme vykonali farbením vakuol upravenou metódou podľa Lee a kol. (2010) [10]. Stanovenie typu buniek prítomných v kultúre sme vykonávali v pravidelných intervaloch, t.j. každé 3 - 4 dni. Z bunkovej suspenzie sme odobrali 1 ml vzorky a zmiešali ju s farbivom Neutral red v pomere 1:1. Vzorky sme centrifugovali 5 minút pri 800 x g a následne sme ich premyli v 0,1 M fosfátovom pufrí (pH 7,2) [13]. Bunky sme následne pozorovali svetelným mikroskopom Leica DM6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) a ich množstvo sme stanovili pomocou Bürkerovej komory. Experiment sme realizovali v troch opakovaniach a celkové trvanie experimentu bolo 42 dní.

2 Výsledky a diskusia

Pre založenie kalusovej kultúry sme v našej štúdiu využili stonkové explantáty. Pri výbere rastlín pre indukciu kalogenézy *in vitro* sme uprednostnili rastliny s dlhšími internódiami. Podľa štúdie od Kaňukovej a kol., v ktorej porovnávali explantáty z listov, listových stopiek, koreňov a stoniek, boli práve stonkové segmenty najvhodnejším explantátom pre založenie a dlhodobú kultiváciu kalusov zo sily obojpohlavnej, keďže už po 12 dňoch kultivácie dochádzalo k tvorbe kalusu [14].

Na MS médiách s prídavkom oboch kombinácií rastových regulátorov sa vytvorili kalusy s rôznym zafarbením, od svetložltej cez žltú, bielu, až po hnedú a čiernu. Čierna farba kalusu bola znakom nekrózy už

stonkového explantátu. Jednou z možných príčin nekrózy je prítomnosť fenolických látok, ktoré sa do média vylučujú z reznej rany rastliny a bránia v raste kultúry a spôsobujú aj zmenu farby [15]. Z hľadiska štruktúry boli po štyroch týždňoch všetky kalusy kompaktné. Pri pasážovaní stonkových segmentov na čerstvé kultivačné médiá s rovnakými rastovými regulátormi sme pozorovali, že najtvrdšie boli biele kalusy, ktoré výrazne prevažovali na médiu s prídavkom IBA + BAP. Kalusy kultivované na médiách s obsahom IBA + BAP boli po ôsmich týždňoch kompaktné a tvrdé. Kompaktné kalusy je potrebné pri prenose do tekutého média viac rozdrviť, aby sme zabránili vzniku agregátov. Naopak na médiu s prídavkom 2,4-D + KIN sme zaznamenali tvorbu väčších vodnatých a rozpadavých kalusov žltej farby (obr. 1). Práve rozpadavé kalusy sú vhodnejšie na založenie bunkových suspenzných kultúr.



Obrázok 1: Porovnanie kalogenézy po ôsmich týždňoch kultivácie na MS médiu s prídavkom IBA + BAP (A) a na MS médiu s prídavkom 2,4-D + KIN (B).

V našom experimente sme na založenie bunkových suspenzných kultúr využili 8 týždňové kalusy indukované na MS médiách s prídavkom rastových regulátorov 2,4-D + KIN. Každé dva týždne sme kultúry hodnotili, pričom sme zaznamenali postupný rozpad bunkových agregátov na jednotlivé bunky a zmenu zákalu média z čírej na svetložltú farbu. Rovnakú farebnú zmenu zaznamenali v štúdiu Ali a kol. [16]. Zmena farby na žltú až hnedú môže byť spôsobená zmenou pH média v rôznych štádiách rastu buniek, taktiež sekréciou fenolov a iných zlúčenín, zvýšenou hustotou buniek a vyčerpaním živín [14].

Po približne 15 týždňoch kultivácie vykazovala bunková suspenzná kultúra sidy obojpohlavnej morfológiu zodpovedajúcu kultúre jednotlivých buniek rastlinnej bunkovej suspenzie. Kultúra pozostávala prevažne z jednotlivých buniek, pričom agregáty sa vyskytovali len minimálne alebo vôbec (obr. 2). Takto pripravená suspenzia bola kultivovaná počas 12

mesiacov a následne použitá na založenie línií rastlinných kmeňových buniek.



Obrázok 2: Bunková suspenzná kultúra sidy obojpohlavnej na MS médiu s prídavkom 2,4-D + KIN po 15 týždňoch kultivácie.

Dlhodobá kultivácia suspenznej kultúry (12 mesiacov) viedla k úplnému rozpadu bunkových agregátov a vzniku homogénnej populácie jednotlivých buniek. Homogenizácia suspenzie zlepšuje dostupnosť živín a kyslíka pre jednotlivé bunky, čo podporuje bunkové delenie a stabilizáciu rastu kultúry [8]. Konzistencia kultúry sa postupne menila na charakteristickú „apple sauce like“ štruktúru, čo značí vysoký stupeň rozptýlenia buniek (obrázok 3). Takáto homogenita je zásadná pre stabilitu kultúry a umožňuje presnú identifikáciu a kvantifikáciu buniek nachádzajúcich sa v kultúre.



Obrázok 3: Homogénna bunková suspenzná kultúra vytvorená po roku kultivácie v MS médiu s obsahom 1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L KIN.

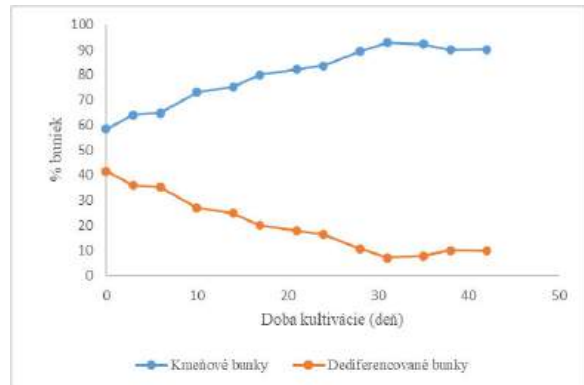
V bunkovej suspenznej kultúre sme predpokladali prítomnosť kmeňových buniek, keďže Kaňuková a kolektív potvrdili ich prítomnosť v kalusových kultúrach sidy obojpohlavnej [14]. Identifikáciu v bunkových suspenzných kultúrach sme realizovali pomocou lipofilného farbiva Neutral Red, ktoré sa selektívne akumuluje vo vakuolách v závislosti od pH [17, 18]. Morfológická analýza preukázala rozdiely medzi bunkovými typmi, dediferencované bunky obsahovali jednu dominantnú vakuolu, zatiaľ čo

kmeňové bunky sa vyznačovali veľkým počtom drobných vakuol (obr. 4). Tento znak predstavuje spoľahlivý morfológický marker pluripotentného stavu buniek. Identifikácia buniek predstavuje dôležitý krok v charakterizácii kultúry a predchádza samotnej kvantifikácii buniek.



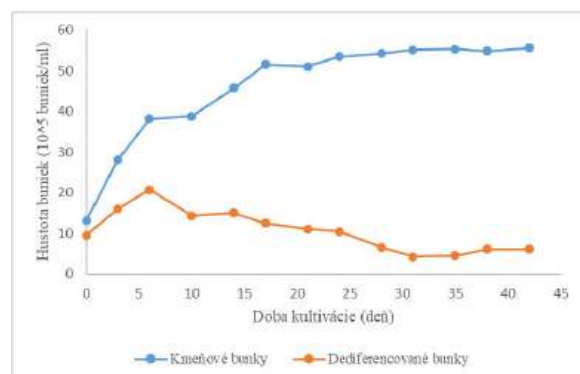
Obrázok 4: Odlišenie kmeňových buniek (červená šípka) a dediferencovaných buniek (čierna šípka) z bunkových suspenzných kultúr sidy obojpohlavnej.

Kvantitatívna analýza potvrdila dynamickú zmenu zastúpenia typov buniek počas dlhodobej kultivácie. Na začiatku experimentu predstavovali kmeňové bunky 58,33 % populácie, pričom dediferencované bunky tvorili 41,67 %. V priebehu kultivácie percento kmeňových buniek postupne rástlo až na 92,91 %, a naopak percento dediferencovaných buniek klesalo až na hodnotu 7,09 %. Postupný nárast podielu kmeňových buniek naznačuje selekčný tlak kultivačných podmienok v prospech pluripotentných buniek. Takýto selekčný efekt môže súvisieť s hormonálnym zložením média, keďže auxíny a cytokiníny regulujú rovnováhu medzi proliferáciou a diferenciáciou buniek v *in vitro* kultúrach [19, 20]. Najvyšší podiel kmeňových buniek bol zaznamenaný v neskorej fáze kultivácie (31. deň), keď kultúra vstupovala do stacionárnej až regresnej fázy rastu (Obr. 5). Tento trend je v súlade s pozorovaniami Kaňukovej a kol. [14], ktorí uvádzajú, že zvyšujúca sa homogenita suspenzie podporuje stabilizáciu kmeňovej bunkovej populácie.



Obrázok 5: Množstvo kmeňových a dediferencovaných buniek v bunkovej suspenznej kultúre sidy obojpohlavnej v závislosti od doby kultivácie.

Počas kultivácie bola hustota buniek kvantifikovaná podľa metodiky Kaňuková a kol. [14], ktorá umožňuje samostatne určiť početnosť kmeňových a dediferencovaných buniek v suspenzii. Hustota kmeňových buniek postupne rástla až do stabilizácie na úrovni približne 55×10^5 buniek/ml, pričom maximálna hodnota bola zaznamenaná v 42. dni kultivácie. Dediferencované bunky vykazovali odlišnú dynamiku rastu; najvyššiu hustotu, $20,70 \times 10^5$ buniek/ml, dosiahli na 6. deň, po ktorom nasledoval postupný pokles ich zastúpenia v bunkovej suspenzii (obr. 6). Stabilizovaná hustota kmeňových buniek poukazuje na potenciál kultúry pre dlhodobé biotechnologické využitie a produkciu sekundárnych metabolitov.



Obrázok 6: Zmena hustoty kmeňových a dediferencovaných buniek v bunkovej suspenznej kultúre sidy obojpohlavnej v priebehu kultivácie.

Záver

V práci sa podarilo úspešne založiť stabilnú bunkovú líniu sidy obojpohlavnej, ktorá sa po dlhodobej suspenznej kultivácii vyznačovala vysokou homogenitou a dominantným zastúpením rastlinných kmeňových buniek. Počas 42-dňového kultivačného cyklu vzrástol ich podiel zo 58,33 % na 92,91 % a hustota sa stabilizovala na približne 55×10^5 buniek/ml, zatiaľ čo dediferencované bunky tvorili len minimálnu časť kultúry. Získaná línia predstavuje spoľahlivý systém proliferujúcich rastlinných buniek a poskytuje vhodný základ pre ďalší výskum a biotechnologické aplikácie vyžadujúce stabilný zdroj bunkovej biomasy a rastlinných metabolitov.

PodĎakovanie

Práca vznikla s podporou Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a Fondu na podporu výskumu Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave (projekt FPPV-30-2026 v rámci Plánu obnovy a odolnosti pre Slovensko).

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] NAHM, M.; MORHART, C., (2018). Virginia mallow (*Sida hermaphrodita* (L.) Rusby) as perennial multipurpose crop: biomass yields, energetic valorization and management perspectives. *GCB Bioenergy*, vol. 10, no. 6, pp. 393–404. ISSN 1757-1707.
- [2] ANTONKIEWICZ, J.; JASIEWICZ, C., (2002). The use of plants accumulating heavy metals for detoxication of chemically polluted soils. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, vol. 5, pp. 1–10. ISSN 1505-0297.
- [3] BORKOWSKA, H.; WARDZIŃSKA, K., (2003). Some effects of *Sida hermaphrodita* cultivation on sewage sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 12, no. 1, pp. 119–122. ISSN 1230-1485.
- [4] JOSEPH, B. et al., (2011). Effect of bioactive compounds and its pharmaceutical activities of *Sida cordifolia* (Linn.). *International Journal of Biological & Medical Research*, vol. 2, pp. 1038–1042. ISSN 0976-6685.
- [5] DHALWAL, K. et al., (2010). Optimization and validation of reverse phase HPLC and HPTLC method for simultaneous quantification of vasicine and vasicinone in *Sida* species. *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 4, pp. 1289–1296. ISSN 1996-0875.
- [6] DINDA, B. et al., (2015). The genus *Sida* L. – a traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 176, pp. 135–176. ISSN 1872-7573.
- [7] THORPE, T., (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, vol. 37, no. 2, pp. 169–180. ISSN 1559-0305.
- [8] MUSTAFA, N. R. et al., (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, vol. 6, no. 6, pp. 715–742. ISSN 1750-2799.
- [9] KOLEWE, M. E. et al., (2008). Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics*, vol. 5, no. 2, pp. 143–256. ISSN 1543-8392.
- [10] LEE, E. K. et al., (2010). Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature Biotechnology*, vol. 28, pp. 1213–1220. ISSN 1087-0156.
- [11] ZHOU, P. et al., (2015). Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, pp. 7035–7045. ISSN 0175-7598.
- [12] MURASHIGE, T.; SKOOG, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497. ISSN 1399-3054.
- [13] KAŇUKOVÁ, Š.; LENKAVSKÁ, K.; GUBIŠOVÁ, M.; KRAIC, J., (2024). Suspension culture of stem cells established of *Calendula officinalis* L. *Plants (Basel)*, vol. 13, no. 2. ISSN 2223-7747.
- [14] KAŇUKOVÁ, Š. et al., (2022). Establishment of stem cell-like cells of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby from explants containing cambial meristems. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 14. ISSN 1422-0067.
- [15] KUMAR, P. et al., (2015). Evaluation of different carbon sources for high frequency callus culture with reduced phenolic secretion in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. SVPR-2. *Biotechnology Reports*, vol. 7, pp. 72–80. ISSN 2215-017X.
- [16] ALI, M. et al., (2013). Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 400–406. ISSN 1872-633X.
- [17] DUBROVSKY, J. G. et al., (2006). Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. *Annals of Botany*, vol. 97, no. 6, pp. 1127–1138. ISSN 0305-7364.
- [18] EHARA, M. et al., (1996). Uptake of neutral red by the vacuoles of green alga, *Micrasterias pinnatifida*.

Plant and Cell Physiology, vol. 37, no. 6, pp. 734–741. ISSN 1471-9053.

- [19] SUGIYAMA, M., (2015). Plant cell differentiation and dedifferentiation. *Development, Growth & Differentiation*, vol. 57, no. 4, pp. 306–312. ISSN 1440-169X.
- [20] PASTERNAK, T. P.; STEINMACHER, D., (2024). Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro. *Plants (Basel)*, vol. 13, no. 2, art. 327. ISSN 2223-7747.

Fyziologická odpoveď borovice čiernej na kmene *Dothistroma pini* v podmienkach *in vitro*

Physiological Response of *Pinus nigra* to *Dothistroma pini* Strains under *In Vitro* Conditions

Lucia Sporinová¹ – Beáta Piršelová² – Libuša Lengyelová³ – Emília Ondrušková⁴

^{1, 2, 3} Katedra botaniky a genetiky, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra,
^{4, 5} Ústav ekológie lesa, Oddelenie fytopatológie a mykológie ÚEL SAV, v. v. i., Akademická 2, 949 01 Nitra

¹lucia.sporinova@ukf.sk, ²bpirselova@ukf.sk, ³lengyelova@ukf.sk, ⁴ondruskova@ife.sk

Abstrakt

Cieľom práce bolo zhodnotiť fyziologické zmeny druhu *Pinus nigra* počas infekcie patogénom *Dothistroma pini* (kmene CMW 41493 a M 0646) v podmienkach *in vitro*. Počas 21-týždňového experimentu bol sledovaný obsah fotosyntetických pigmentov, prolínu a celkových polyfenolov, pričom prítomnosť patogénu bola overená konvenčnou PCR. V úvodnej fáze bol vo všetkých variantoch zaznamenaný pokles pigmentov a nárast prolínu a polyfenolov, čo naznačuje významný vplyv aklimácie na podmienky rastovej komory. Výraznejšia stresová odpoveď bola pozorovaná pri kmeni CMW 41493, kde bol patogén molekulárne potvrdený. Výsledky naznačujú, že prolín predstavuje citlivý marker stresu a že fyziologická odpoveď hostiteľa je ovplyvnená fázou infekcie, aj podmienkami kultivácie.

Kľúčové slová: *Dothistroma pini*, *Pinus nigra*, asimilačné pigmenty, prolín, celkové polyfenoly

Abstract

The aim of this study was to evaluate the physiological changes of *Pinus nigra* during infection by *Dothistroma pini* (strains CMW 41493 a M 0646) under *in vitro* conditions. Throughout the 21-week experiment, the content of photosynthetic pigments, proline, and total polyphenols was monitored, and the presence of the pathogen was confirmed by conventional PCR. In the initial phase, all variants showed a decrease in pigment content and an increase in proline and polyphenols, indicating a significant acclimation effect to the growth chamber conditions. A more pronounced stress response was observed in plants inoculated with strain CMW 41493, where the pathogen was molecularly confirmed. The results suggest that proline is a sensitive stress marker and that the host's physiological response is influenced by both the infection stage and cultivation conditions.

Key Words: *Dothistroma pini*, *Pinus nigra*, photosynthetic pigments, proline, polyphenols

Úvod

Vitalita zástupcov čeľade *Pinaceae* je významne ovplyvňovaná červenou sypavkou – ochorením indukovaným vreckatými hubami *Dothistroma septosporum* a *Dothistroma pini*. Ochorenie má celosvetový charakter, avšak geografická distribúcia patogénov nie je totožná. Na rozdiel od druhu *D. septosporum*, ktorého prítomnosť bola potvrdená na oboch pologuliach, výskyt *D. pini* je zriedkavejší a potvrdený iba na severnej pologuli [1]. Navyše vykazuje *D. pini* vnútrodruhovou molekulárnu variabilitu v rámci ITS oblasti, na základe ktorej sa v súčasnosti rozlišuje šesť známych haplotypov. Tie sa vyznačujú rozdielnym geografickým rozšírením, pričom na území Európy boli potvrdené iba tri [2].

V súvislosti s týmto ochorením prejavuje zvýšenú citlivosť *Pinus nigra*, a to najmä ako alochtónny druh [3]. Otázkou, ktorá doposiaľ nebola zodpovedaná, je, či môže *D. pini* rovnakého haplotypu, avšak rôznej proveniencie, vyvolávať u *P. nigra* rozdielnu mieru patogenity.

1 Metodika práce a metodika skúmania

Metodicky bola práca realizovaná na Ústave ekológie lesa Slovenskej akadémie vied, v. v. i. v Nitre a na Katedre botaniky a genetiky na Fakulte prírodných vied a informatiky, UKF v Nitre. Za účelom vyhodnotenia miery patogenity dvoch kmeňov *Dothistroma pini* – majúcich rôzny geografický pôvod, sledovali sa vybrané fyziologické a biochemické parametre inokulovaných semenáčov *P. nigra*.

1.1 Nádobový pokus

Trojročné sadenice *Pinus nigra* (Lesy SR – Škôlkarské stredisko Hladomer) vysadené do črepníkov s objemom 1,5 L, naplnených substrátom pre ihličnany (Zemina pre konifery a okrasné dreviny, Rašelina, Soběslav, Česko) boli inokulované každá po 30 mL pripravenej inokulačnej suspenzie spór *D. pini* (s koncentráciou 2×10^6 spór/mL destilovanej vody) pomocou

univerzálneho ručného rozprašovača. Desať sadeníc bolo inokulovaných kmeňom M 0646 – pochádzajúcim zo Slovenska, desať sadeníc kmeňom CMW 41493 – pochádzajúcim z Francúzska a desať sadeníc destilovanou vodou (kontrola). Následne boli umiestnené do rastových komôr APT.lineTM KBWF (E5.1) (BINDER GmbH, Tuttlingen, Nemecko) s podmienkami simulujúcimi denný režim: 16 h svetla pri 20 °C, 8 h tmy pri 12 °C; relatívna vlhkosť 80 %. Zavláčovanie sa realizovalo podľa potreby – po preschnutí vrchnej časti substrátu, ale tak, aby nepreschol koreňový bal. Počas prvých piatich dní experimentu boli sadenice obalené plastovými vreckami, ktoré zabraňovali vyschnutiu inokulačnej zmesi a súčasne podporovali prienik patogénov do pletív hostiteľa. Za účelom získania materiálu boli vykonané odbery ihlíc z apikálnej a bazálnej časti sadeníc s cieľom zachytiť vertikálnu variabilitu v rámci rastliny. Do vzoriek boli zahrnuté jednorôčné aj dvojročné ihlice, pričom vek ihlíc nebol hodnotený ako samostatný faktor a všetky odobraté ihlice boli analyzované spoločne v rámci jednotlivých variantov. 0. odber sa uskutočnil bezprostredne pred inokuláciou, 1. odber po 7 týždňoch, 2. odber po 14 týždňoch a 3. odber na záver experimentu t. j. po 21 týždňoch po inokulácii. Rastlinný materiál z jednotlivých odberov slúžil na realizáciu fyziologických a biochemických analýz, pričom vzorky z posledného odberu boli vyhodnotené aj molekulárne – za účelom potvrdenia prítomnosti patogénu.

1.2 Molekulárne potvrdenie prítomnosti patogénov vo vzorkách ihlíc

Ihlice boli povrchovo sterilizované pretretím buničínovými štvorčekmi nasiaknutými 95 % etanolom a prirodzene vysušené na sterilnom filtračnom papieri. Z takto ošetrovaných ihlíc boli vyrezané plodničky s nepatrnou časťou okolitého pletiva, ako aj tie časti ihlíc, na ktorých sa prejavili farebné zmeny. Extrakcia DNA sa uskutočnila pomocou kitu E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) určeného pre hubové organizmy, a to podľa postupu uvedeného výrobcom. DNA bola rozpustená v 50 µl sterilnej deionizovanej vody a uchovaná pri -20 °C.

Na stanovenie prítomnosti *D. pini* v extraktoch DNA bola použitá konvenčná PCR. Reakčná zmes s objemom 20 µl obsahovala 2 ng/µl DNA templátu, druhovo a pohlavne špecifické primery (10 pmol/µl), polymerázový mix 5 × HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estónsko) a vodu pre molekulárne reakcie doplnenú do objemu 20 µl. Boli použité primery DpiniMat1f2 (AGTAAGCGACGCGCTCCCATG) a DotMat1r (TTGCCTGACCGGCTGCTGGTG) špecifické pre *D. pini* a jej MAT 1-1-1 párovací typ, ale aj primery DpiniMat2f (GTAAGTGATCGTTGAACATGC) a DotMat2r (CTGGTCGTGAAGTCCATCGTC) špecifické pre *D. pini*

párovacieho typu MAT1-2 [4]. PCR sa uskutočnila v 200 µl mikroskúmavkách za cyklických podmienok: iniciačná denaturácia pri 95 °C po dobu 15 min; 40 cyklov: denaturácia pri 95 °C po dobu 20 s, hybridizácia pri 65 °C po dobu 30 s, elongácia pri 72 °C po dobu 40 s; záverečná elongácia pri 72 °C po dobu 5 min. Špecifickými primermi podľa boli amplifikované úseky s dĺžkou 820 bp pre párovací typ MAT 1-1-1 a 480 bp pre MAT 1-2 párovací typ stanovené pomocou 100 bp DNA markera (Solis BioDyne, Tartu, Estónsko). Ultračistá voda bola použitá ako kontrola pre negatívnu amplifikáciu [4].

PCR produkty boli vizualizované pomocou horizontálnej elektroforézy na 1% (w/v) TBE agarózovom géle s farbičkou Simply Safe (EURx Ltd. Gdansk, Poland).

1.3 Detekcia obsahu fotosyntetických pigmentov

Obsah fotosyntetických pigmentov bol stanovený v acetónovom extrakte podľa metodiky Lichtenthaler a Wellburn [5]. Sledovanými parametrami boli chlorofyl *a* (Chl *a*), chlorofyl *b* (Chl *b*) a celkové karotenoidy. Koncentrácie boli prepočítané na mg.g⁻¹ čerstvej hmotnosti (FW). Merania sa realizovali v troch opakovaniach pre každý variant experimentu.

1.4 Stanovenie obsahu prolínu

Obsah prolínu bol stanovený spektrofotometricky pomocou ninhydrínového činidla podľa metodiky Bates et al. [6]. Koncentrácia prolínu bola stanovená na základe kalibračnej krivky pripravenej zo štandardného roztoku čistého prolínu a vyjadrená v µmol prolínu.mg⁻¹ FW. Merania sa realizovali v troch opakovaniach pre každý variant.

1.5 Stanovenie obsahu celkových polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov bol stanovený podľa metodiky Márquez-García [7].

Obsah celkových polyfenolov bol vyjadrený ako µg ekvivalentov kyseliny galovej.mg⁻¹ FW a stanovený na základe kalibračnej krivky pripravenej zo štandardných roztokov kyseliny galovej. Každý variant experimentu bol analyzovaný v troch opakovaniach.

1.6 Štatistické spracovanie výsledkov

Namerané hodnoty boli spracované pomocou programu Microsoft Excel. Štatistická významnosť rozdielov medzi sledovanými skupinami bola hodnotená pomocou Studentovho *t*-testu.

2 Výsledky a diskusia

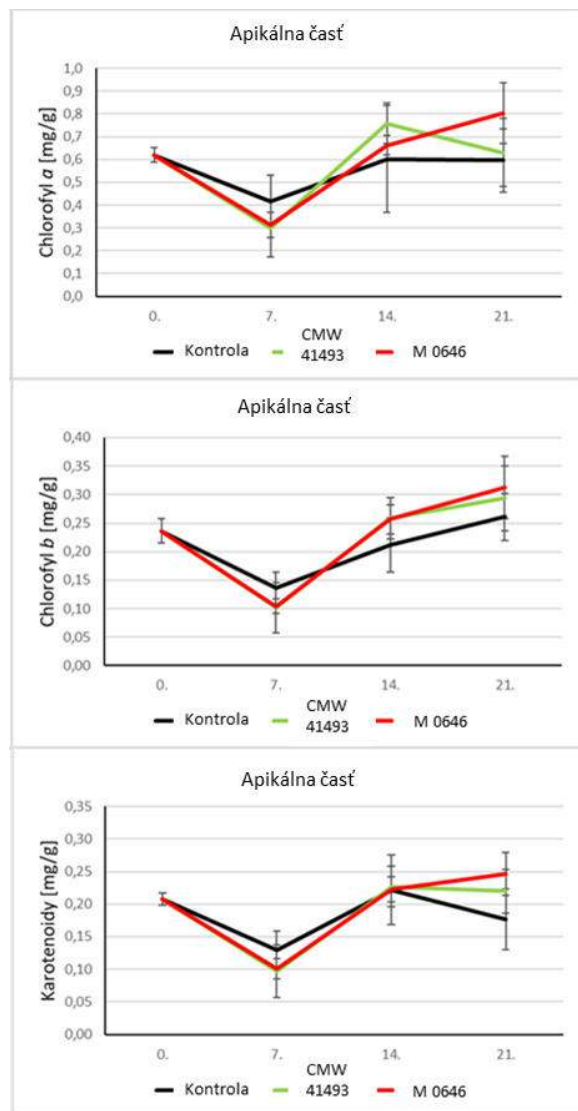
2.1 Molekulárne potvrdenie prítomnosti patogénu vo vzorkách ihlíc

Prítomnosť patogénu bola na základe PCR potvrdená vo vzorkách sadeníc inokulovaných kmeňom CMW 41493. Vo vzorkách sadeníc inokulovaných kmeňom M 0646

prítomnosť patogénu molekulárne potvrdená nebola, ako ani u kontrolných sadeníc.

2.2 Detekcia obsahu fotosyntetických pigmentov

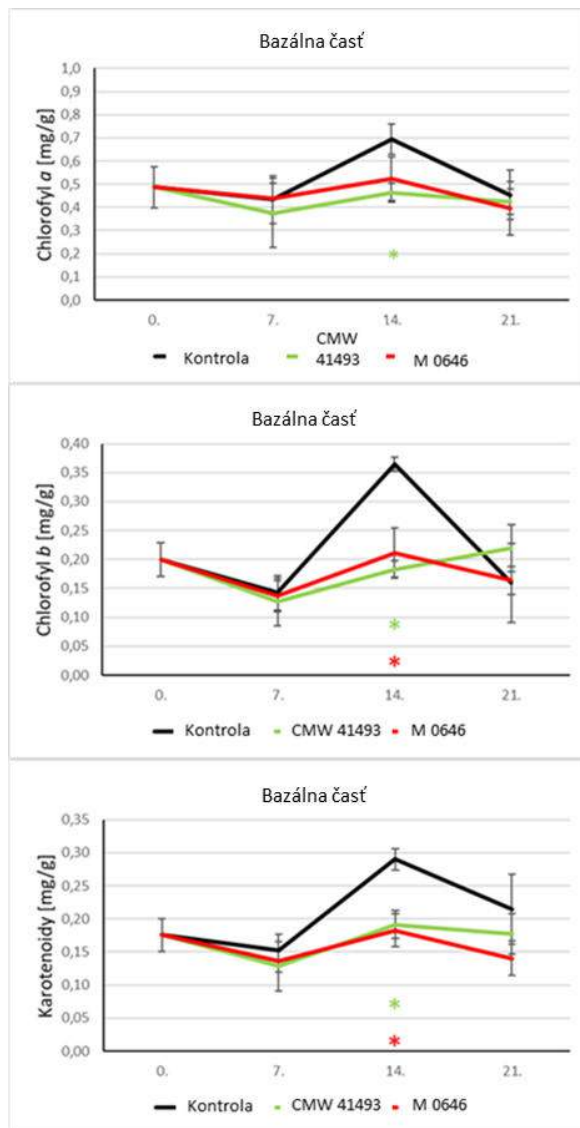
Obsah fotosyntetických pigmentov sa menil v závislosti od polohy ihlič na sadeniach, od použitého kmeňa *D. pini*, ako aj od fázy experimentu (Graf 1A, Graf 1B).



Graf 1A Obsah fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidov) v ihliciach odobratých z apikálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma kmeňmi *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SDEV.

Vo všeobecnosti obsah pigmentov počas prvých 7 týždňov experimentu klesal tak v kontrolných, ako aj infikovaných ihliciach, pričom nebol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými variantmi experimentu. Po 7 týždňoch došlo k nárastu

obsahu pigmentov v ihliciach všetkých variantov, s výraznejším nárastom v bazálnych ihliciach kontrolných sadeníc.



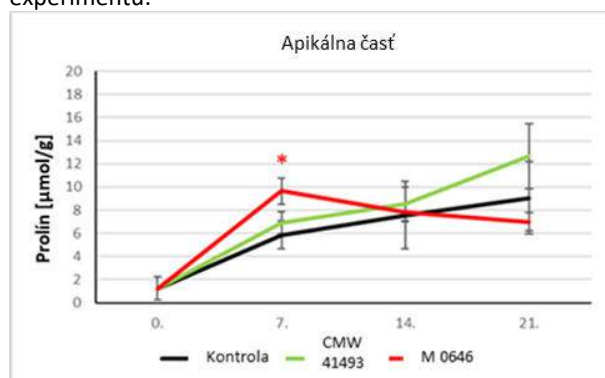
Graf 1B Obsah fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidov) v ihliciach odobratých z bazálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SDEV. * - štatisticky významná zmena oproti kontrole pre $p < 0,05$.

Na konci 14. týždňa experimentu bol obsah pigmentov v bazálnych ihliciach inokulovaných sadeníc nižší oproti kontrole: v prípade kmeňa M 0646 bol obsah Chl *a* nižší o 24 %, Chl *b* o 42 % a karotenoidov o 37 %. V prípade kmeňa CMW 41493 bol obsah Chl *a* nižší o 33 %, Chl *b* o 50 % a karotenoidov o 34 %. V prípade apikálnych ihlič sme výraznejšie rozdiely medzi kontrolou a infikovanými variantmi v tejto fáze experimentu nezaznamenali. V poslednej fáze experimentu bola reakcia apikálnych a bazálnych ihlič rozdielna. V

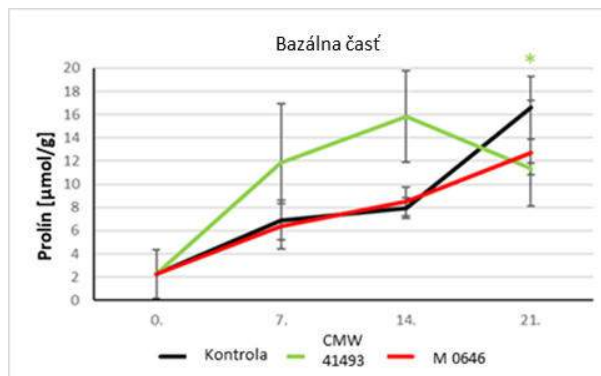
bazálnych ihliciach sme zaznamenali opätovný pokles obsahu pigmentov v jednotlivých variantoch experimentu (okrem Chl *b*, kt. naďalej mierne rástol v ihliciach CMW 41493), pričom k záveru experimentu sa stierali rozdiely medzi kontrolou a inokulovanými variantmi. Obsah pigmentov v apikálnych ihliciach inokulovaných sadeníc prevýšil v závere experimentu obsah pigmentov v ihliciach kontroly, avšak zmeny oproti prvej a druhej fáze experimentu boli variabilné v závislosti od variantu experimentu ako aj typu pigmentu. Zatiaľ čo sa obsah Chl *a* v kontrolných ihliciach ďalej nemenil, v prípade CMW 41493 klesol a v prípade M 0646 naďalej mierne rástol. Obsah Chl *b* ďalej rástol v ihliciach všetkých variantov. Obsah karotenoidov v ihliciach kontrolných rastlín klesol, v prípade CMW 41493 sa ďalej nemenil a v prípade M 0646 mierne rástol.

2.3 Stanovenie obsahu prolínu

Obsah prolínu – podobne ako obsah pigmentov – bol závislý tak od testovaného kmeňa *D. pini*, ako aj od polohy ihlíc na sadeniach, či časovej fázy experimentu. Vo všeobecnosti obsah prolínu rástol počas celej doby experimentu v apikálnych, aj bazálnych ihliciach *P. nigra*, a to u kontrolných, ako aj stresovaných rastlín (Graf 2A, Graf 2B). Výnimkou bol pokles obsahu prolínu v bazálnych ihliciach sadeníc inokulovaných CMW 41493 v poslednej fáze experimentu, a tiež pokles v apikálnych ihliciach inokulovaných kmeňom M 0646 v druhej a tretej fáze experimentu. Obsah prolínu sa v bazálnych ihliciach rastlín inokulovaných kmeňom M 0646 v porovnaní s kontrolou významne nemenil. V prípade apikálnych ihlíc inokulovaných kmeňom M 0646 sme však zaznamenali výraznejší nárast obsahu prolínu (o 64 % vyšší obsah prolínu oproti kontrolám po 7 týždňoch experimentu) a následný pokles v ďalších fázach experimentu.



Graf 2A Obsah prolínu v ihliciach odobratých z apikálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma kmeňmi *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646) (n=3). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer ± SDEV. * - štatisticky významná zmena oproti kontrole pre $p < 0,05$.

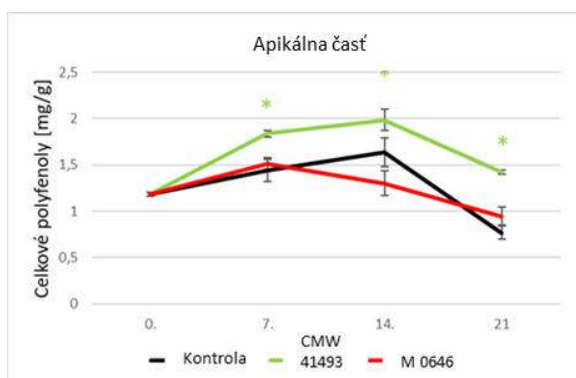


Graf 2B Obsah prolínu v ihliciach odobratých z bazálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma kmeňmi *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646) (n=3). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer ± SDEV. * - štatisticky významná zmena oproti kontrole pre $p < 0,05$.

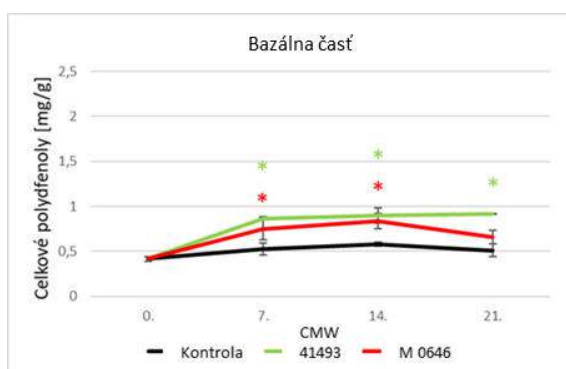
Zatiaľ čo obsah prolínu v apikálnych ihliciach inokulovaných CMW 41493 sledoval do 14. týždňa trend kontroly a v poslednej fáze experimentu dosiahol ešte vyšší nárast (obsah prolínu o 40 % vyšší oproti kontrole), obsah prolínu nameraný v ihliciach bazálnych častí sadeníc bol v prvých dvoch fázach experimentu podstatne vyšší (o 72 % po 7. týždni a až o 100 % po 14. týždni v porovnaní s kontrolou), avšak v tretej fáze došlo k významnému prepadu a obsah prolínu bol v porovnaní s kontrolami významne nižší (o 32 %).

2.4 Stanovenie obsahu celkových polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov (PF) (Graf 3A, Graf 3B) v prvej rastovej fáze (do 7. týždňa) experimentu vo vzorkách všetkých skúmaných sadeníc (aj kontrolných) vzrástol: v bazálnych ihliciach bol obsah celkových PF o 65 % vyšší oproti kontrole v prípade kmeňa CMW 41493 a o 43 % v prípade kmeňa M 0646. Vo vrchných ihliciach bol nameraný obsah PF vyšší oproti kontrolám pri CMW 41493 o 28 % a pri M 0646 o 5 %. V druhej fáze experimentu vo všeobecnosti trend narastania obsahu PF pokračoval s výnimkou vrchných ihlíc sadeníc inokulovaných kmeňom M 0646, kde bol zaznamenaný o 20 % nižší obsah PF oproti kontrole. V poslednej fáze experimentu bol naopak pozorovaný pokles obsahu celkových PF vo všetkých variantoch okrem bazálnych ihlíc sadeníc infikovaných kmeňom CMW 41493 (obsah PF v týchto ihliciach naďalej mierne rástol). Vo všeobecnosti celkový obsah PF v ihliciach bazálnej časti rastlín bol nižší ako v apikálnych ihliciach.



Graf 3A Obsah celkových polyfenolov v ihliciach odobratých z apikálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma kmeňmi *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646) (n=3). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SDEV. * - štatisticky významná zmena oproti kontrole pre $p < 0,05$.



Graf 3B Obsah celkových polyfenolov v ihliciach odobratých z bazálnej časti sadeníc. Odbery vzoriek sa uskutočnili v 0., 7., 14. a 21. týždni po inokulácii dvoma kmeňmi *Dothistroma pini* (CMW 41493, M 0646) (n=3). Údaje v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SDEV. * - štatisticky významná zmena oproti kontrole pre $p < 0,05$.

2.5 Diskusia

Fyziologická odpoveď druhu *Pinus nigra* na infekciu patogénom *Dothistroma pini* bola výrazne ovplyvnená nielen samotnou prítomnosťou patogénu, ale aj podmienkami kultivácie v rastovej komore. Úvodný pokles fotosyntetických pigmentov a súčasný nárast prolínu a polyfenolov vo všetkých variantoch naznačuje aklimácie, ktorý môže dočasne maskovať skoré prejavy patogenézy. Výraznejšie rozdiely medzi variantmi sa prejavili až po stabilizácii podmienok, pričom kmeň CMW 41493 vyvolal intenzívnejšiu stresovú odpoveď, čo korešponduje s jeho molekulárne potvrdenou prítomnosťou. Zvýšený obsah prolínu poukazuje na jeho úlohu ako citlivého indikátora stresu, zatiaľ čo vyšší obsah polyfenolov môže naznačovať aktiváciu obranných mechanizmov hostiteľa. Skutočnosť, že fyziologické zmeny boli zaznamenané aj vo variante bez

molekulárne potvrdenej infekcie, poukazuje na komplexnosť interakcie hostiteľ – patogén a na možný vplyv environmentálnych faktorov. Výsledky zároveň potvrdzujú, že interpretácia fyziologických parametrov v podmienkach *in vitro* vyžaduje zohľadnenie aklimácie a dlhodobého kultivačného stresu.

Záver

Výsledky preukázali, že fyziologická odpoveď druhu *Pinus nigra* na infekciu patogénom *Dothistroma pini* je výrazne závislá od fázy experimentu a kombinácie stresových faktorov. V úvodnej fáze dominovala aklimácia na podmienky rastovej komory, čo sa prejavilo poklesom fotosyntetických pigmentov a zvýšením obsahu prolínu a polyfenolov aj v kontrolnom variante. V strednej fáze sa najvýraznejšie prejavili rozdiely medzi variantmi, pričom kmeň CMW 41493 vyvolal intenzívnejšiu stresovú odpoveď (najmä zvýšenie obsahu prolínu a polyfenolov), čo korešpondovalo s molekulárnym potvrdením prítomnosti patogénu.

V neskoršej fáze experimentu sa fyziologické zmeny pravdepodobne odvíjali nielen od patogenézy, ale aj od dlhodobej kultivácie v komore. Prolín sa z hodnotených parametrov javí ako najcitlivejší marker stresovej odpovede. Získané výsledky naznačujú, že obranné mechanizmy borovice sa uplatňujú až po fáze aklimácie a ich intenzita je ovplyvnená virulenciou kmeňa. Pre hlbšie pochopenie interakcie hostiteľ – patogén bude potrebné doplniť skoršiu molekulárnu a mikroskopickú detekciu infekcie.

Poďakovanie

Táto práca podporená grantom VEGA 2/0034/25 Genetická diverzita a patogenita vybraných húb, ktoré kolonizujú *Pinus* sp. Zvlášť by som sa rada poďakovala svojej školiteľke pani doc. RNDr. Beáte Piršelovej, PhD. a konzultantke pani Ing. Emílii Ondruškovej, PhD.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] FRASER, S. et al., (2015). A review of *Pinaceae* resistance mechanisms against needle and shoot pathogens with a focus on the *Dothistroma*–*Pinus* interaction. *Forest Pathology*, vol 46, no. 5, pp. 453-471. ISSN 1439-0329.
- [2] BARNES, I. et al., (2016). Neotypification of *Dothistroma septosporum* and epitypification of *D. pini*, causal agents of *Dothistroma* needle blight of pine. *Forest Pathology*, vol. 46, no. 5, pp. 388-407. ISSN 1439-0329.
- [3] TOMEŠOVÁ-HAATAJA, V. et al., (2016). Červená sypavka borovice v Českej republike. ISBN 978-80-7458-033-8.
- [4] GROENEWALD, M. et al., (2007). Characterisation and distribution of mating type genes in the

Dothistroma needle blight pathogens. *Phytopathology*, vol. 97, no. 7, pp 825-834. ISSN 1943-7684.

- [5] LICHTENTHALER, H.K. and WELLBURN, A.R., (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, vol. 11, pp. 591-592. ISSN 0300-5127.
- [6] BATES, L.S.; WALDREN, R.P.A. and TEARE, I.D., (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Online. *Plant and soil*, vol. 39, pp. 205-207. ISSN 0032-079X.
- [7] MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; FERNÁNDEZ-RECAMALES, M.Á. and CÓRDOBA, F., (2012). Effects of cadmium on phenolic composition and antioxidant activities of *Erica andevalensis*. *Journal of Botany*, vol. 2012, no. 1, pp. 1-6. ISSN 2090-0120.

Vplyv MCP-1 na vybrané funkcie granulóznych buniek

The effect of MCP-1 on selected functions of granulosa cells

Daniela Vnuková^{1, 1} – Barbora Loncová^{1, 2}

¹Katedra zoológie a antropológie, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra

¹ daniela.vnukova@ukf.sk, ²bloncova@ukf.sk

Abstrakt

Reprodukcia je proces, ktorý je ovplyvnený tukovým tkanivom, konkrétne ním produkovanými signálnymi molekulami (adipokínmi), ktoré ovplyvňujú množstvo biologických procesov. Medzi ne patrí aj MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1).

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv MCP-1 na základné ovariálne funkcie (viabilita, proliferácia, apoptóza) v koncentrácii 10 ng/ml, pričom sme použili analýzy: CCK-8 (viabilita buniek), BrdU (proliferácia buniek), TUNEL (apoptóza buniek), RT-qPCR (relatívna expresia markerov PCNA a Bax) a imunocytochemická analýza (markerov PCNA a Bax).

Zistili sme, že MCP-1 v skúmanej koncentrácii signifikantne zvýšilo viabilitu a proliferáciu ovariálnych granulóznych buniek ošípanej. Signifikantne znížilo apoptózu kultivovaných buniek. Tieto výsledky naznačujú, že MCP-1 je potenciálnym stimulatorom ovariálnych funkcií vaječníkov ošípanej.

Kľúčové slová: MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), adipokíny, granulózne bunky, ovariálne funkcie

Abstract

Reproduction is a process influenced by adipose tissue, specifically by signaling molecules (adipokines) that affect a number of biological processes. These include MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1).

The aim of our work was to determine the effect of MCP-1 on basic ovarian functions (viability, proliferation, apoptosis) at a concentration of 10 ng/ml, using the following analyses: CCK-8 (cell viability), BrdU (cell proliferation), TUNEL (cell apoptosis), RT-qPCR (relative expression of PCNA and Bax markers), and immunocytochemical analysis (PCNA and Bax markers).

We found that MCP-1 at the concentration studied statistically significantly increased the viability and proliferation of porcine ovarian granulosa cells. It statistically reduced the apoptosis of cultured cells. These results suggest that MCP-1 is a potential stimulator of porcine ovarian functions.

Key Words: MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), adipokines, granulosa cells, ovarian functions

Úvod

Samičia reprodukcia je úzko prepojená s metabolizmom [1], ktorý je regulovaný tzv. adipokínmi produkovanými tukovým tkanivom [2], čo je vysoko aktívny metabolický a endokrinný orgán [3]. Tieto signálne molekuly [4], ktorých expresia bola dokázaná aj v rôznych typoch tkanív – vrátane tkanív samičej reprodukčnej sústavy [5], koordinujú množstvo biologických procesov, ako napr. zápalové a imunitné reakcie, energetický výdaj, citlivosť na inzulín [4] a reprodukčné procesy [6]. Štúdie dokazujú, že adipokíny dokážu ovplyvniť reprodukciu priamo alebo nepriamo [5].

Medzi adipokíny patrí MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), ktorý bol objavený v roku 1989 [7]. Okrem tukového tkaniva je produkovaný endotelialnými bunkami a makrofágmi [8].

MCP-1 je najrozsiahlejšie študovaný chemokín, pričom jeho štúdium sa za posledné dve desaťročia exponenciálne zvýšilo, predovšetkým v dôsledku jeho úlohy v etiológii ochorení súvisiacich s obezitou a cukrovkou [7]. Avšak tento adipokín má kľúčovú úlohu v zápalových reakciách [9], podieľa sa na fyziológii a transporte leukocytov [10], a taktiež sa predpokladá jeho úloha v rôznych ochoreniach [11], ako napr. PCOS [12] a karcinogéze [13]. Úloha MCP-1 bola dokázaná v reprodukčných procesoch [5], napr. luteolýze (zvýšené hladiny mRNA boli zistené po luteolýze u potkanov, oviec, ošípaných, kráv a žien) [10].

Avšak výskum MCP-1 v zdravých ovariálnych granulóznych bunkách je veľmi obmedzený, konkrétne prebehli výskumy v kultivovaných granulóznych bunkách králikov [14] a mačiek [15]. Výsledkom týchto výskumov bolo zistenie, že MCP-1 je stimulatorom študovaných ovariálnych funkcií. Avšak vplyv MCP-1 na funkcie ovariálnych granulóznych buniek u ošípanej, získaných z predpubertálnych vaječníkov, nebol doteraz skúmaný, pričom práve poznatky získané u tohto druhu môžu poskytnúť cenné informácie

z hľadiska biologického a ekonomického významu, ale aj o ľudskom zdraví vzhľadom na podobnosti medzi ošípanými a ľuďmi [16].

1 Materiál a metodika

Experimentálna časť sa uskutočnila vo výskumnom laboratóriu FPVal UKF v Nitre.

1.1 Biologický materiál

Naším biologickým materiálom bolo 18 vaječníkov predpubertálnych ošípaných, ktoré sme získali z bitúnku Chovmat F.U., s.r.o. (Rastislavice, okres Nové Zámky, Slovensko). Vaječníky boli prepravované v termoske naplnenej fyziologickým roztokom izbovej teploty. Spracovanie biologického materiálu prebehlo do 6 hodín od porážky ošípaných.

1.2 Príprava a spracovanie ovariálnych granulóznych buniek

Vaječníky boli premyté etylalkoholom a fyziologickým roztokom, pričom následne sme metódou aspirácie izolovali zo zdravých ovariálnych folikulov (neprejavovali žiadne známky atrézie alebo poškodenia), folikulárnu tekutinu. Tá bola v ďalšom kroku zcentrifugovaná (10 min; 1500 otáčok/min), čím sme oddelili granulózne bunky od zvyšku folikulárnej tekutiny.

Získané granulózne bunky sme premyli v sterilom kultivačnom médiu DMEM/F12 1:1 (BioWhittaker TM, Verviers, Belgicko). V rovnakom type média, doplnenom o 1% antibiotikum-antimykotikum (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 10% fetálne telacie sérum (South America Origin, Bio-West Inc., Logan, UT, USA), sme bunky resuspendovali.

Stanovili sme koncentráciu a viabilitu buniek vo vzorke bunkovej suspenzie doplnenej o Trypánovú modrú (1:1 pomer), pričom sme využili automatické počítadlo buniek (Countess™ 3 FL Automated Cell Counter, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, MA USA).

Koncentráciu buniek sme ďalej upravili na 10^4 - 10^5 buniek/ml média a rozpipetovali do:

- 96-jamkové kultivačné platničky (Brand®, Wertheim, Nemecko; 100 µl suspenzie/jamka) – analýzy: CCK-8, BrdU, TUNEL;
- 16-jamkové kultivačné platničky typu Chamber slide (NuncInc., International, Naperville, USA; 200 µl/jamka) – imunocytochemická analýza;
- 24-jamkové kultivačné platničky (Nunc™ Roskilde, Dánsko; 1000 µl/jamka) – RT-qPCR .

1.3 Kultivácia ovariálnych granulóznych buniek

Vysadené bunky sme predkultivovali po dobu 48 hodín ($37,5^\circ\text{C}$ v 5% CO_2), aby sa vytvorila 70-90% konfluentná monovrstva. Po ukončení predkultivácie sme vymenili kultivačné médium.

Kontrolné skupiny buniek boli kultivované bez MCP-1, pričom pre ostatné skupiny buniek sme si pripravili požadovanú koncentráciu MCP-1 (10 ng/ml) (Active Bioscience GmbH, Hamburg, Germany). Tento prídavok predstavoval 10% objemu jamky kultivačnej platničky. Bunky sme následne nechali kultivovať ďalších 48 hodín ($37,5^\circ\text{C}$ v 5% CO_2).

1.4 Analýzy

Po ukončení kultivácie sme spracovali kultivované bunky na analýzy: CCK-8, BrdU, TUNEL, imunocytochemická a RT-qPCR analýza.

CCK-8 analýza

Využili sme Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Abcam, Cambridge, UK) na stanovenie viability buniek, pričom sme postupovali podľa inštrukcií výrobcu. Absorbanciu sme odmerali ELISA readerom (Thermo Fisher Scientific, Inc.), pri vlnovej dĺžke 450 nm.

BrdU analýza

Na stanovenie proliferácie kultivovaných buniek sme využili dostupnú kolorimetrickú súpravu (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany), ktorá je založená na meraní inkorporácie 5-bróm-2'-deoxyuridínu (BrdU) počas syntézy DNA. Pri analýze sme postupovali podľa pokynov výrobcu a absorbanciu sme stanovili pri vlnovej dĺžke 450 nm ELISA readerom (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

TUNEL analýza

Na zmeranie apoptotickej DNA fragmentácie sme použili TUNEL analýzu (HT TiterTACSTM Assay Kit, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA), pričom sme postupovali podľa inštrukcií výrobcu a TUNEL pozitívne (apoptotické) bunky sme merali pri vlnovej dĺžke 450 nm, a to ELISA readerom (Thermo Fisher Scientific, Inc.), pričom následne sme vypočítali pomer TUNEL pozitívnych buniek k celkovému počtu buniek.

Imunocytochemická analýza

Táto analýza nám slúžila na kvantitatívne zhodnotenie prítomnosti PCNA (marker proliferácie) a Bax (marker apoptózy) v ovariálnych bunkách ošípanej [17, 18].

Bunky boli premyté a fixované paraformaldehydom a opätovne premyté v PBS roztoku. Následne sme ich

kultivovali v 1% roztoku kozieho séra (blokovací roztok, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), v PBS (izbová teplota, 1 hod. – zablokovanie nešpecifickej väzby antiséra).

Ďalším krokom bola kultivácia buniek v prítomnosti monoklonálnych primárnych protilátok proti PCNA a Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), pri izbovej teplote a v trvaní 1 hod. Pre vizualizáciu primárnej protilátky sme bunky inkubovali počas 1 hod v prítomnosti sekundárnej prasacej protilátky proti myšacím IgG. Tá bola značená chrenovou peroxidázou (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Na vizualizáciu pozitívneho signálu sme bunky farbili s DAB (3,3'-diaminobenzidínovým substrátom) (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Nemecko) (1 h) a premyli sme ich v PBS. Prekryli sme ich kvapkou montovacieho média Vecta Mount® (Vector Laboratories, Newark, Kalifornia, USA) a krycím sklíčkom. Bunky sme pozorovali pod svetelným mikroskopom (na základe hnedého sfarbenia DAB peroxidázy). Stanovili sme pomer zafarbených buniek k celkovému počtu buniek.

RT-qPCR analýza

Extrakcia RNA a syntéza cDNA: RNA bola extrahovaná z buniek pomocou kitu RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko), podľa inštrukcií výrobcu. Kvalita získanej RNA bola zmeraná Quantus Fluorometrom (Promega, Madison, WI, USA). RNA bola reverznou transkripciou prepísaná do cDNA použitím RT² First Strand cDNA synthesis kit (Qiagen) podľa pokynov výrobcu. cDNA bola následne uskladnená pri -20°C.

PCR analýza: k získanej cDNA sme pridali RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen), pričom mix bol nanosený do 96-jamkových platní, ktoré obsahovali vopred pripravené sady primerov RT² Profiler PCR Array (Qiagen) a na analýzu sme využili prístroj ABI 7500 RT PCR instrument (Applied Biosystems). Boli použité nasledovné podmienky:

- 10 min/95°C;
- 15 s/95°C (40 cyklov);
- 1 min/60°C.

Dáta (hodnoty CT) boli exportované ako Excel súbor, pričom boli analyzované pomocou softvéru GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen). Ako referenčné gény nám slúžili GAPDH, ACTG1 a ACTA1. Softvérom RefFinder sme vybrali najvhodnejší na normalizáciu – GAPDH [19].

Štatistická analýza

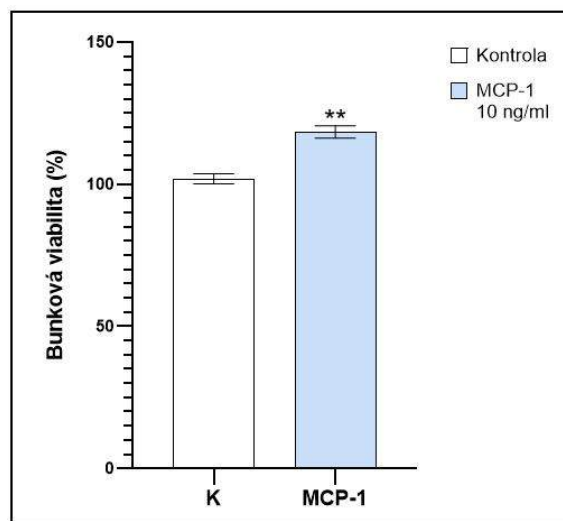
Naše výsledky sú uvedené ako priemer hodnôt, pričom tieto hodnoty boli získané z 3 samostatných experimentov. Na analýzu sme využili softvér GraphPad Prism 11.0.0 (GraphPad Software, Boston, MA). Normalita bola overená Shapiro-Wilkovým testom a ďalšia štatistická analýza bola vykonaná Studentovým t-testom a one-way ANOVA. Za štatisticky významné boli považované hodnoty $p < 0,05$.

2 Výsledky a diskusia

V našej práci sme skúmali vplyv MCP-1, v koncentrácii 10 ng/ml, na funkcie ovariálnych granulóznych buniek ošpaných: viabilitu, proliferáciu a apoptózu.

2.1 Viabilita kultivovaných granulóznych buniek

MCP-1 zvýšil viabilitu kultivovaných buniek (Graf 1), čo sa zhoduje s poznatkami zistenými v predchádzajúcich štúdiách v zajačích [14] a mačacích granulóznych bunkách [15], kde skúmali rôzne koncentrácie tohto adipokínu, vrátane 10 ng/ml, ktorá bola skúmaná v tejto práci.



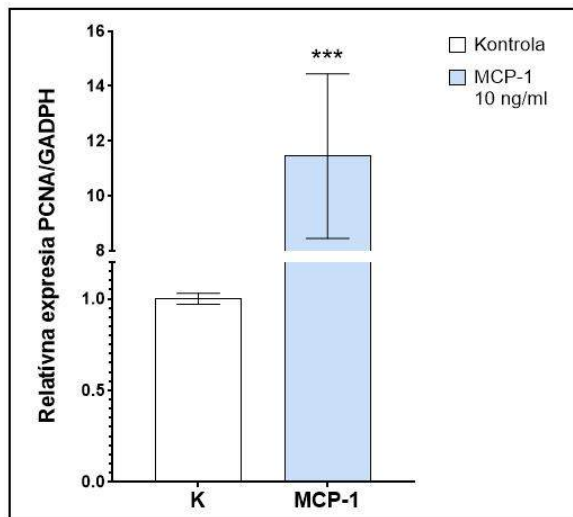
Graf 1 Vplyv MCP-1 na viabilitu kultivovaných granulóznych buniek v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

2.2 Proliferácia kultivovaných granulóznych buniek

Proliferácia buniek je zložitý a nevyhnutný proces pre vývoj a homeostázu organizmu, pri ktorom bunky prechádzajú bunkovým cyklom. Ak však príde k chybám alebo abnormalitám, ktoré narušia rovnováhu medzi bunkovou proliferáciou a apoptózou, môžu vzniknúť závažné problémy, ako napr. atrezia až vývoj nádorov [20]. Proliferácia je proces, ktorý zahŕňa aktiváciu rôznych génov, expresiu proteínov a následnú replikáciu DNA [21]. Preto sme proliferáciu ovariálnych granulóznych buniek hodnotili na niekoľkých úrovniach:

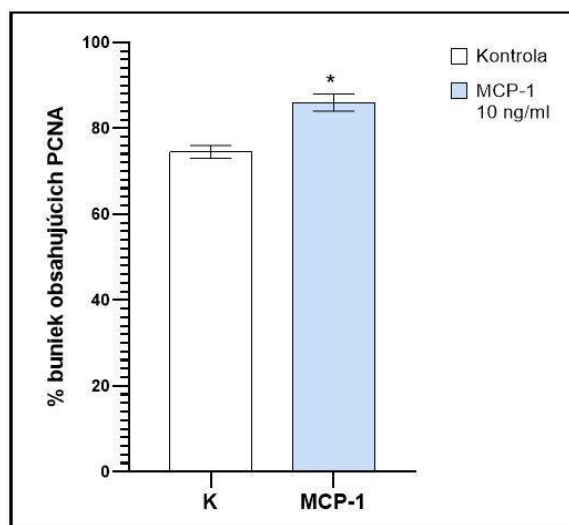
1. pomocou RT-qPCR analýzy sme hodnotili relatívnu expresiu markeru PCNA;
2. pomocou imunocytochemickej analýzy sme potvrdili, či je tento marker prítomný;
3. pomocou BrdU analýzy sme zistili celkovú proliferáciu.

PCNA je jadrový proteín, ktorý reguluje bunkový cyklus a podieľa sa na syntéze DNA, kedy hladina tohto markera stúpa, pred syntézou DNA, s prechodom bunky z G1 a do S-fázy a klesá počas M-fázy. Keďže do veľkej miery odzrkadľuje aktivitu bunkovej proliferácie, je často používaný ako marker proliferácie zdravých a nádorových buniek [22]. Jeho relatívnu expresiu sme merali pomocou RT-qPCR analýzy, kde sme zistili, že relatívna expresia PCNA bola signifikantne zvýšená (Graf 2) u buniek ošetrených MCP-1 (10 ng/ml).



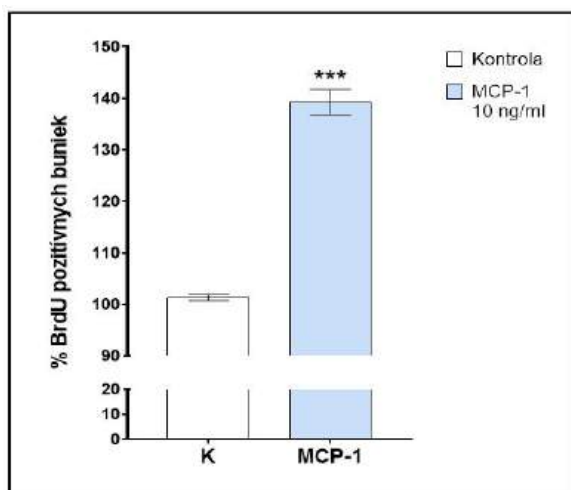
Graf 2 Vplyv MCP-1 na relatívnu expresiu markeru PCNA v kultivovaných granulóznych bunkách v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

Imunolokalizáciou jadrovej PCNA je možné hodnotiť proliferáciu buniek, pričom expresia sa indukuje pri stimulácii proliferácie a klesá pri diferenciácii buniek, čím predstavuje spoľahlivý index bunkovej proliferácie v normálnych tkanivách [23]. Po pridaní MCP-1 sa signifikantne zvýšilo percento počtu buniek obsahujúcich PCNA oproti kontrolnej skupine (Graf 3). Podľa našich informácií bol marker proliferácie PCNA hodnotený iba v štúdií [15], na mačacích granulóznych bunkách. V tejto štúdií zisťovali vplyv rôznych koncentrácií MCP-1, vrátane 10 ng/ml. Výsledky tejto štúdie sú zhodné s našimi.



Graf 3 Vplyv MCP-1 na akumuláciu markeru PCNA v kultivovaných granulóznych bunkách v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

Rozdiel medzi analýzou BrdU a predchádzajúcimi analýzami proliferácie: počas tejto analýzy dochádza k inkorporácii 5-bróm-2'-deoxyuridínu (BrdU) iba v priebehu syntézy DNA [24]. Výsledok tejto analýzy je zhodný s našimi predchádzajúcimi zisteniami – koncentrácia 10 ng/ml MCP-1 signifikantne zvyšuje percento BrdU pozitívnych buniek po ošetrení našou testovacou látkou (Graf 4). Táto analýza bola použitá pri hodnotení výsledkov v štúdií [14], kde bol zistený rovnaký efekt MCP-1 v koncentrácii 10 ng/ml.



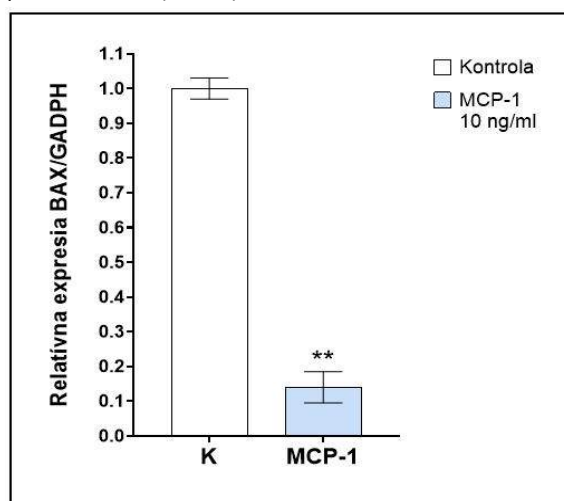
Graf 4 Vplyv MCP-1 na proliferáciu kultivovaných granulóznych buniek (BrdU analýza) v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

2.3 Apoptóza kultivovaných granulóznych buniek

Apoptóza je proces, ktorý je charakterizovaný sériou porúch bunkovej štruktúry, ktoré prispievajú nielen k smrti buniek, ale tiež pripravujú bunky na odstránenie fagocytmi [25]. Tento proces prebieha vo všetkých fázach folikulogenézy a je regulovaný predovšetkým granulóznymi bunkami, ktoré ako prvé podliehajú apoptóze [26]. Bolo identifikovaných niekoľko hlavných ciest, pričom my sme si vybrali bližšie preskúmať mitochondriálnu dráhu [27], kde kontrolou proapoptotických a antiapoptotických intracelulárnych signálov, zohrávajú dôležitú úlohu členovia génovej rodiny Bcl-2 [28]. Bax je proapoptotický proteín, ktorý patrí do génovej rodiny Bcl-2 a za normálnych podmienok je neaktívny, ale počas apoptózy sa translokuje do mitochondrií [29]. Aktivácia tohto proteínu predstavuje kľúčový iniciačný krok mitochondriálnej apoptózy, pretože vedie k permeabilizácii vonkajšej mitochondriálnej membrány [30]. Analýzou jeho expresie RT-qPCR a zistením jeho prítomnosti pomocou imunocytochémie nám umožnilo zachytiť skoré štádium apoptózy, ešte pred vznikom DNA fragmentácie, ktorú sme hodnotili TUNEL analýzou.

Relatívnu expresiu Bax sme zmerali RT-qPCR analýzou, kde sme zistili, že expresia Bax bola

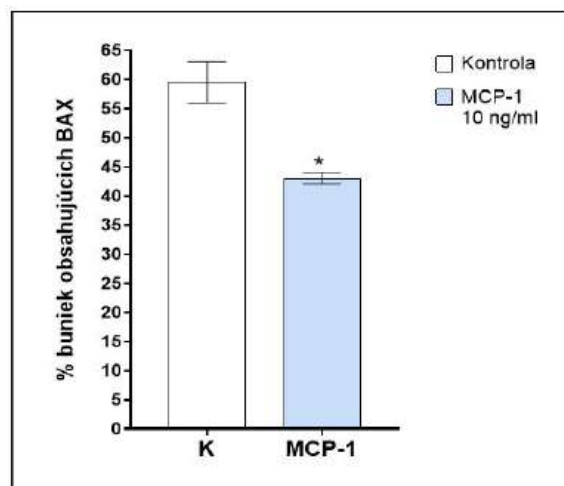
signifikantne znížená u buniek ošetrených MCP-1 oproti kontrole (Graf 5).



Graf 5 Vplyv MCP-1 na relatívnu expresiu markeru Bax v kultivovaných granulóznych bunkách v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

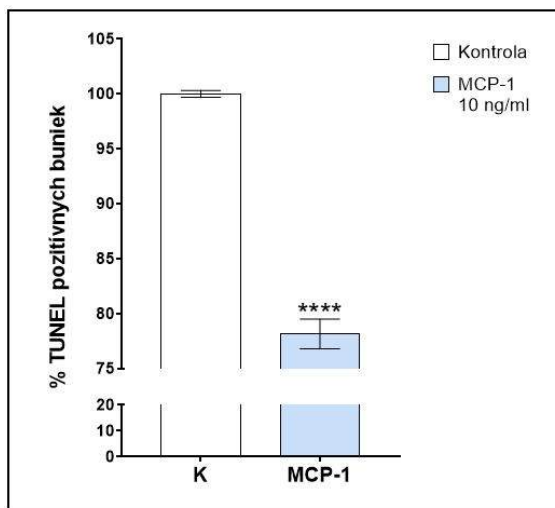
Pomocou imunocytochémie, sme zhodnotili počet buniek obsahujúcich Bax (Graf 6), pričom sme pozorovali signifikantné zníženie opäť u kultivovaných buniek s MCP-1. Na základe nami dostupnej literatúry, sme zistili, že v štúdiu [15], skúmali taktiež vplyv MCP-1 na prítomnosť Bax pomocou imunocytochémie. Naše zistenia sa zhodujú s touto štúdiou.



Graf 6 Vplyv MCP-1 na akumuláciu markeru Bax v kultivovaných granulóznych bunkách v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

Poslednou bola TUNEL analýza, kde sme zistili extrémne významné štatistické zníženie v experimentálnej skupine, kultivovanej s MCP-1 (Graf 7). Podľa našich zistení sa naše výsledky zhodujú s preukázanými výsledkami na králičích ovariálnych granulóznych bunkách [14] v rovnakej koncentrácii MCP-1.



Graf 7 Vplyv MCP-1 na apoptózu kultivovaných granulóznych buniek (TUNEL analýza) v koncentrácii 0 ng/ml (kontrola) a 10 ng/ml MCP-1. Za štatisticky významné boli považované hodnoty, kde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z 3 nezávislých experimentov.

Na základe našich výsledkov, môžeme konštatovať, že MCP-1, v testovacej koncentrácii 10 ng/ml, ovplyvnil skúmané funkcie granulóznych buniek. Hoci je tento adipokín predmetom mnohých výskumov, jeho vplyv na ovariálne funkcie predpubertálnych ošípaných, nebol skúmaný. Bol skúmaný jeho vplyv na maturáciu oocytov, taktiež kumulárne bunky oocytov [31], kde taktiež MCP-1 signifikantne znížil apoptózu (konkrétne relatívnu expresiu Bax) a pri oocytoch zvýšil relatívnu expresiu PCNA. Ďalej bol skúmaný jeho vplyv na základné funkcie u králikov [14] a mačiek [15], pričom u tohto druhu bol skúmaný aj vplyv MCP-1 a jeho receptora na podporu stimulácie prechodu z primordiálnych na primárne folikuly [32].

Granulózne bunky zohrávajú kľúčovú úlohu v procese vývoja folikulov [33], pričom tento vývoj začína proliferáciou granulóznych buniek [34]. Nielen, že úzko spolupracujú s oocytom od okamihu vytvorenia folikulu [35], ale plnia množstvo rozličných funkcií [36]. Granulózne bunky taktiež zohrávajú rozhodujúcu úlohu aj v patologickej folikulogéze pri benígnych

ochoreniach, ako napr. PCOS (syndróm polycystických vaječníkov), predčasná ovariálna insuficiencia, ale aj malígnych ochoreniach ako nádory vaječníkov [33].

Keďže bola dokázaná dôležitá úloha MCP-1 v procese zápalu, kde priťahuje alebo zvyšuje expresiu iných zápalových faktorov alebo buniek, bol priamo alebo nepriamo zapojený do patogenézy mnohých ochorení [37]. V rámci reprodukcie je skúmaný predovšetkým vzhľadom na endometriózu, kde boli zistené zvýšené hladiny tohto adipokínu sére, ale aj peritoneálnej tekutine [38]. Avšak abnormálne hladiny MCP-1 sú spájané s nepriaznivými výsledkami tehotenstva, ako napr. spontánne potraty, preeklampsia a predčasný pôrod [39]. Okrem iného, MCP-1 preukázal aj pozitívnu súvislosť s PCOS, kde sa autori domnievajú, že MCP-1 by mohol byť vhodným diagnostickým markerom mnohých ochorení [40].

Záver

V tejto práci sme skúmali vplyv MCP-1 na funkcie granulóznych buniek ošípaných – viabilitu, pričom procesy proliferácie a apoptózy sme skúmali na viacerých úrovniach. Zistili sme, že MCP-1 v koncentracii 10 ng/ml, zvýšil viabilitu a proliferáciu, pričom znížil apoptózu kultivovaných ovariálnych buniek. Naše výsledky sa zhodujú s výsledkami predchádzajúcich štúdií.

Naše výsledky naznačujú, že MCP-1 môže predstavovať potenciálny stimulátor reprodukčných funkcií, ale aj diagnostický marker pre mnohé ochorenia, vrátane tých, čo súvisia so samičou reprodukciou. Na to sú ale potrebné ďalšie *in vivo*, *in vitro* a klinické štúdie.

Podakovanie

Chcela by som sa poďakovať mojej školiteľke Mgr. Barbore Loncovej, PhD., za trpezlivosť, podporu, odborné rady a usmernenia, a za všetok venovaný čas.

Práca bola realizovaná za finančnej podpory projektu VEGA 1/0133/25.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] FONTANA, Roberta; DELLA TORRE, Sara (2016). The Deep Correlation between Energy Metabolism and Reproduction: A View on the Effects of Nutrition for Women Fertility. *Nutrients*, vol. 8, is. 2, 87. ISSN 2072-6643.
- [2] ANAYA, Elizabeth S; DE GROOT, Evelyn; LYDON, John P; PANGAS, Stephanie A; HARTIG, Sean M (2024). Contributions of white adipose tissue to

- energy requirements for female reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, vol. 35, 9, pp. 809–820. ISSN 1879-3061.
- [3] RAUCCI, R.; RUSOLO, F.; SHARMA, A.; COLONNA, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. (2013). Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine*, vol. 61, is. 1, pp. 1-14. ISSN 1043-4666.
- [4] METZ, Sophia; HUANG, Lam Opal; KILPELÄINEN, Tuomas O (2020). Genetic variation, adipokines, and cardiometabolic disease. *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 52, pp. 33-39. ISSN 1471-4892.
- [5] NIKANFAR, Saba; OGHBAEI, Hajar; RASTGAR REZAEI, Yeganeh; ZAREZADEH, Reza; JAFARI-GHARABAGHLOU, Davoud; REZA NEJABATI, Hamid; BAHRAMI, Zahra; BLEISINGER, Nathalie; SAMADI, Naser; FATTABI, Amir; NOURI, Mohammad; DITTRICH, Ralf (2021). Role of adipokines in the ovarian function: Oogenesis and steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 209. ISSN 0960-0760.
- [6] YONG, Wei; WANG, Jiajia; LENG, Yan; LI, Lijie; WANG, Han (2023). Role of Obesity in Female Reproduction. *International Journal of Medical Sciences*, vol. 20, is. 3, pp. 366-375.
- [7] PANEE, Jun (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*, vol. 60, is. 1, pp. 1-12. ISSN 1043-4666.
- [8] CHEN, Airu; MUMICK, Sheena; ZHANG, Chunsheng; LAMB, John; DAI, Hongyue; WEINGARTH, Drew; MUDGETT, John; CHEN, Howard; MACNEIL, Douglas J.; REITMAN, Marc L.; SU Qian (2012). Diet Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and its Impact on Obesity. *Obesity Research*, vol. 13, is. 8, pp. 1311-1320. ISSN1930-739X.
- [9] BRÜNNERT, Daniela; KUMAR, Vijay; KAUSHIK, Vibha; EHRHARDT, Jens; RAJ CHAHAR, Kirti; KUMARI SHARMA, Phulwanti; ZYGMUNT, Marek; GOYAL, Pankaj (2021). Thrombin impairs the angiogenic activity of extravillous trophoblast cells via monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1): A possible link with preeclampsia. *Reproductive Biology*, vol. 21, is. 3. ISSN 1642-431.
- [10] PENNY, LA (2000). Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. *Reviews of Reproduction*, vol. 5, is. 2, pp. 63-66. ISSN 1741-7899.
- [11] DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, SAWAYA BE. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 29, is. 6, pp. 313-326. ISSN 1557-7465.
- [12] HUA, Weihong; QIAOA, Jie; YANGA, Yan; WANGA, Lina; LIA, Rong (2011). Elevated C-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 157, is. 1, pp. 53-56. ISSN 1872-7654.
- [13] SUNDARAM, Sneha ; YAN, Lin (2020). Adipose monocyte chemotactic protein-1 deficiency reduces high-fat diet-enhanced mammary tumorigenesis in MMTV-PyMT mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 77. ISSN 0955-2863.
- [14] SIROTKIN, Alexander V.; FABOVÁ, Zuzana; LONCOVÁ, Barbora; HARRATH, Abdel Halim (2024). The basic functions of rabbit ovarian granulosa cell are regulated by adipokines monocyte chemoattractant protein-1 and plasminogen activator inhibitor-1. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 88. ISSN 0739-7240.
- [15] SIROTKIN, Alexander V.; FABOVÁ, Zuzana; LONCOVÁ, Barbora; HARRATH, Abdel Halim (2024). The novel stimulators of feline ovarian granulosa cell functions: Monocyte chemoattractant protein-1 and plasminogen activator inhibitor-1. *Reproductive Biology*, vol. 24, is. 3. ISSN 1642-431X.
- [16] BASINI, G.; GRASELLI, F. (2025). Gonadotropins, local factors and a variety of adipokines contribute to regulate swine granulosa cell function. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 91. ISSN 0739-7240.
- [17] GAUMER, S.; GUÉNAL, I.; BRUN, S.; THÉODORE, L.; MIGNOTTE, B. (2000). Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in Drosophila. *Cell Death & Differentiation*, vol. 7, pp. 804–814. ISSN 1476-5403.
- [18] OSBORN, Mary; BRANDFASS, Susanne (2006). Chapter 68 - Immunocytochemistry of Frozen and of Paraffin Tissue Sections. *Cell Biology (Third Edition)*, Academic Press, pp. 563-569. ISBN 9780121647308.
- [19] XIE, F.; WANG, J.; ZHANG, B. (2023). RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes., *Funct. Integr. Genomics*. 23, 125.
- [20] BARBOSA, M. I. A.; BELINHA, J.; NATALJORGE, R. M.; CARVALHO, A. X. (2023). Computationally modelling cell proliferation: A review. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, vol. 39, is. 7. ISSN 2040-7947.
- [21] BRISTOW, Sara L.; LEMAN, Adam R.; HAASE, Steven B. (2014). Cell Cycle-Regulated

- Transcription: Effectively Using a Genomics Toolbox. Effectively Using a Genomics Toolbox. In: Noguchi, E., Gadaleta, M. (eds) *Cell Cycle Control. Methods in Molecular Biology*, vol 1170. Humana Press, New York, NY. ISBN: 978-1-4939-0888-2.
- [22] YE, Xiaolan; LING, Bai; XU, Hanrong; LI, Gongqi; ZHAO, Xinguo; XU, Jiangyan; LIU, Jun; LIU, Liangeng (2020). Clinical significance of high expression of proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung cancer. *Medicine*, vol. 99, is. 16. ISSN 1536-5964.
- [23] HALL, P. A.; LEVISON, D. A.; WOODS, A. L.; YU, C. C.-W.; KELLOCK, D. B.; WATKINS, J. A.; BARNES, D. M.; GILLET, C. E.; CAMPLEJOHN, R.; DOVER, R.; WASEEM, N. H. LANE, D. P. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms. *The Journal of Pathology*, vol. 162, is. 4, pp. 285-294. ISSN 1096-9896.
- [24] CONNOLLY, K M; BOGDANFFY, M S (1993). Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 41, is. 1. ISSN 1551-5044.
- [25] TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, pp. 231-241. ISSN 1471-0080.
- [26] ALMEIDA, Camila P.; SILVEIRA, Camila O.; FERREIRA, Enio F.; FERREIRA, Marcia C.; OLIVEIRA, Gabriella G.; VELOSO, Emerson S.; SILVA, Felipe H.S.; COELHO, Santuza S.; MORAES, Leonardo M.; REIS, Fernando M.; DEL PUERTO, Helen L. (2021). Pro-caspase-3 is constitutively expressed in luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Acta Histochemica*, vol. 123, is. 2. ISSN 0065-1281.
- [27] JU, Wenhan; ZHAO, Shuai; LI, D; ZHANG, Jinfu; XIANG, Shan; LIAN, Fang (2025). Targeting programmed cell death with natural products: a potential therapeutic strategy for diminished ovarian reserve and fertility preservation. *Front. Pharmacol.*, vol. 16.
- [28] SHI1, Xiaoyan; GUAN, Zhiqiang; YU, Jianning; LIU, Honglin (2020). Follicle Stimulating Hormone Inhibits the Expression of p53 UpRegulated Modulator of Apoptosis Induced by Reactive Oxygen Species Through PI3K/Akt in Mouse Granulosa Cells. *Physiological Research*, vol. 69, pp. 687-694. ISSN 1802-997.
- [29] WANG, Xian-Long; WU, Yi; TAN, Lu-Bin; TIAN, Zhen; LIU, Jing-Hao; ZHU, De-Sheng; ZENG, Shen-Ming (2012). Follicle-stimulating Hormone Regulates Pro-apoptotic Protein Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death-Extra Long (BimEL)-induced Porcine Granulosa Cell Apoptosis. *Cell biology*, vol. 287, is. 13. ISSN 0021-9258.
- [30] SPITZ, Adam Z.; GAVATHIOTIS, Eviropidis (2022). Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 43, is. 3, pp. 206-220. ISSN 1873-3735.
- [31] KIM, Sohee; OH, Dongjin; CHOI, Hyerin; KIM, Mirae; CAI, Lian; JAWAD, Ali; ZHENG, Haomiao; LEE Joohyeong; KIM, Eunhye; HYUN, Sang-Hwan (2023). The effect of C-C motif chemokine ligand 2 supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation. *Front. Vet. Sci.*, vol. 10.
- [32] GAMALERI, Yamila; FERMAN, Delfina Sol; TING, Alison; DASCAL, Eduardo Raúl; LOMNICZI, Alejandro; JAWORSKI, Juan Pablo; PELUFFO, Marina Cinthia (2025). Novel direct effect of CCR2 receptor on follicle activation process. *Front. Endocrinol.*, vol. 16.
- [33] TU, Jiajie; CHEUNG, Albert Hoi-Hung; CHAN, Clement Leung-Kwok; CHAN, Wai-Yee (2019). The Role of microRNAs in Ovarian Granulosa Cells in Health and Disease. *Front. Endocrinol.*, vol. 10.
- [34] SANTOS CAVALCANTI, Giovanna; CARVALHO, Kátia Cândido; FERREIRA, Cecília da Silva; CHEDRAUI, Peter; MONTELEONE, Pedro Augusto Araújo; BARACAT, Edmund Chada; SOARES JÚNIOR, José Maria (2023). Granulosa cells and follicular development: a brief review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 69 (6).
- [35] BAUMGARTEN, Sarah C.; STOCCO, Carlos (2018). Granulosa Cells. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, Academic Press, pp. 8-13. ISBN 9780128151457.
- [36] FROST, E R; FORD, E A; TAYLOR, G; BOEING, S; BECKETT, E L; ROMAN, S D; LOVELL-BADGE, R; MCLAUGHLIN, E A; SUTHERLAND, J M (2021). Two alternative methods for the retrieval of somatic cell populations from the mouse ovary. *Molecular Human Reproduction*, vol. 27, is. 6. ISSN 1460-2407.

- [37] SINGH, Sanjiv; ANSHITA, D; RAVICHANDIRAN, V (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.*, vol. 20, is. 101.
- [38] HEIDARI, Sahel; KOLAHDOUZ-MOHAMMADI, Roya; KHODAVERDI, Sepideh; TAJIK, Nader; DELBANDI, Ali-Akbar (2021). Expression levels of MCP-1, HGF, and IGF-1 in endometriotic patients compared with non-endometriotic controls. *BMC Women's Health*, vol. 21, 422. ISSN 1472-6874.
- [39] LIN, Zhi; SHI, Jia-Lu; CHEN, Min; ZHENG, Zi-Meng; LI, Ming-Qing; SHAO, Jun (2023). CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Front. Immunol.*, vol. 13.
- [40] ALESI, Simon; TEEDE, Helena; MORAN, Lisa; ENTICOTT, Joanne; DE SILVA, Kushan, MOUSA, Aya (2024). Exploring Causal Associations Between Serum Inflammatory Markers and Female Reproductive Disorders: A Mendelian Randomisation Study. *Biomolecules*, vol. 14, is. 12. ISSN 2218-273X.

SEKCIA

PHD. II



Príprava inovatívneho sorbentu na báze biouhlia funkcionalizovaného 2-(hydroxymetyl)-12-crown-4 éterom pre selektívnu sorpciu lítia

Preparation of an innovative sorbent based on biochar functionalized with 2-(hydroxymethyl)-12-crown-4 ether for selective sorption of lithium

Kristína Beliančinová¹ – Madhav Prabhakar Chavhan² – Vladimír Frišták³

¹ Ústav chémie a environmentálnych vied, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

² Katedra chémie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita

³ Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Trnavská univerzita v Trnave

¹ beliancinova1@ucm.sk, ² madhav.chavhan@osu.cz, ³ vladimir.fristak@truni.sk

Abstrakt

Sorpcia predstavuje efektívny spôsob získavania Li z vodných roztokov a kvapalných odpadov. Prítomnosť kompetitívnych iónov môže významne ovplyvniť sorpciu Li a preto cieľom tejto práce bolo pripraviť selektívny sorbent na báze biouhlia z čerešňových kôstok ako vstupného prekursora. Biouhlie pripravené pri 500 °C (BC) v procese pomalej pyrolýzy sme funkcionizovali pomocou 2-(hydroxymetyl)-12-crown-4 éteru (F-BC). Materiál bol charakterizovaný pomocou FT-IR analýzy a testovaný v základných sorpčných experimentoch. Sorpčné experimenty potvrdili nárast sorpčnej kapacity pri funkcionizovanom biouhli (F-BC) takmer 20-krát oproti nefunkcionizovanému (BC). Na základe výsledkov kompetície, F-BC predstavuje vysoko selektívny sorbent pre Li⁺ aj vo vzorkách s ekvivalentnou prítomnosťou iných jednomocných (Na⁺, K⁺) ako aj dvojmocných iónov (Ca²⁺, Mg²⁺). Výsledky naznačujú potenciál pripraveného materiálu pre selektívne získavanie Li z komplexných kvapalných matric.

Kľúčové slová: biouhlie, crown éter, modifikácia, Li, sorpčná separácia

Abstract

Sorption represents an effective method for the recovery of Li from aqueous solutions and liquid waste. The presence of competing ions can significantly affect Li sorption, therefore, the aim of this work was to prepare a selective sorbent based on biochar derived from cherry pits as the precursor material. Biochar prepared at 500 °C (BC) via slow pyrolysis was functionalized using 2-(hydroxymethyl)-12-crown-4

ether (F-BC). The material was characterized by FT-IR analysis and tested in basic sorption experiments. The sorption experiments confirmed an almost 20-times higher sorption capacity for the functionalized biochar (F-BC) compared to the non-functionalized biochar (BC). Based on the competition results, F-BC represents a highly selective sorbent for Li⁺ even in samples containing equivalent concentrations of other monovalent (Na⁺, K⁺) as well as divalent ions (Ca²⁺, Mg²⁺). The results indicate the potential of the prepared material for the selective recovery of Li from complex liquid matrices.

Key Words: biochar, crown ether, modification, Li, sorption separation

Úvod

Rozvoj spoločnosti a neustály dopyt po nových produktoch a technológiách generujú každoročne milióny ton ťažkých kovov, ktoré sa pri nesprávnej manipulácii s priemyselnými odpadmi dostávajú do povrchových a podzemných vôd. Tieto kontaminanty vo vode majú však často vysokú hodnotu a ich spätné získanie môže podporiť udržateľnejšiu výrobu [1]. Navyše, nevyvážená celosvetová ponuka zdrojov Li⁺ a nestabilná geopolitická situácia vedú k naliehavej potrebe recyklácie lítia resp. k využívaniu nových alternatívnych zdrojov. Napríklad získavanie Li⁺ z morskej vody je spojené s viacerými technologickými výzvami, pretože v porovnaní s inými kationmi obsahuje morská voda Li⁺ v nízkych koncentráciách. Preto je kladený dôraz na vývoj pokrokových metód na extrakciu a sorpčnú separáciu Li⁺ z vodných roztokov a kvapalných odpadov ako napríklad dialýza, iónové výmenné živice, membránové technológie a adsorpcia. Na rozdiel od adsorpčných metód všetky ostatné

prístupy vykazujú niekoľko obmedzení, ako napríklad obrovské požiadavky na spotrebu energie, tvorbu škodlivých vedľajších produktov a neefektívnosť samotného procesu [2].

Metódy získavania Li^+ na báze adsorpcie sú založené na použití špecializovaných adsorpčných materiálov, ktoré majú vysokú afinitu k iónom lítia, čo umožňuje selektívne zachytávanie Li^+ z vodných roztokov [3].

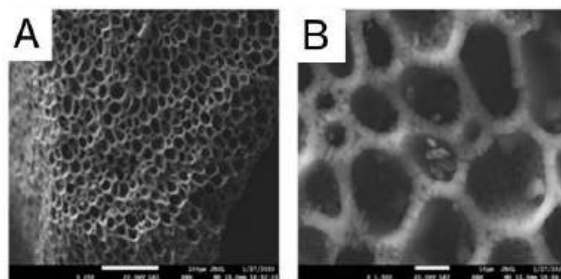
Crown étery (z angl. *crown ethers* – CE) sú makrocyclické zlúčeniny, ktorých štruktúra sa skladá z 3 až 20 atómov kyslíka spojených 2 alebo viacerými atómami uhlíka. Tieto makromolekuly môžu byť buď substituované, alebo nesubstituované. Táto trieda organických zlúčenín má zaujímavú štruktúru tvorenú hydrofóbnym kruhom obklopujúcim hydrofilnú dutinu, čo im umožňuje tvoriť komplexy s iónmi kovov [4]. Taktiež môžu viazať rôzne katióny prostredníctvom iónových dipólových interakcií [5]. Napríklad 18-crown-6 vykazuje väzbovú schopnosť s iónmi K^+ a 12-crown-4 má tendenciu tvoriť komplexy s Li^+ . Vďaka tejto schopnosti majú CE široké uplatnenie v chémii, biotechnológii a biochémií [4]. Zheng a kol. (2021) pripravili rôzne nanovláknové membrány, z ktorých jedna bola funkcionalizovaná pomocou CE. Maximálna sorpčná kapacita tejto membrány bola 168 mg/g pri pH 7 s vysokou selektivitou pre Li^+ . Po piatich cykloch si tento materiál zachovával 88,31 % adsorpčnú kapacitu, čo dokazuje jeho dobrú regeneračnú schopnosť [6]. Využívajú sa aj rôzne uhlíkové materiály ako nosiče CE. Z tohto dôvodu by biouhlie, ako tuhý produkt termochemickej konverzie s vysokým obsahom uhlíka (zvyčajne > 60% hmotnosti) [7] mohol predstavovať vhodnú alternatívu k uhlíkovým materiálom ako nosič CE.

Cieľom našej práce bolo posúdiť využiteľnosť biouhlia pripraveného z potravinárskeho odpadu (čerešňových kôstok) ako nosiča pre syntézu vysoko funkcionalizovaného povrchu, ktorý bude efektívny a selektívny pri sorpcii Li z vodných roztokov.

1 Materiály a metódy

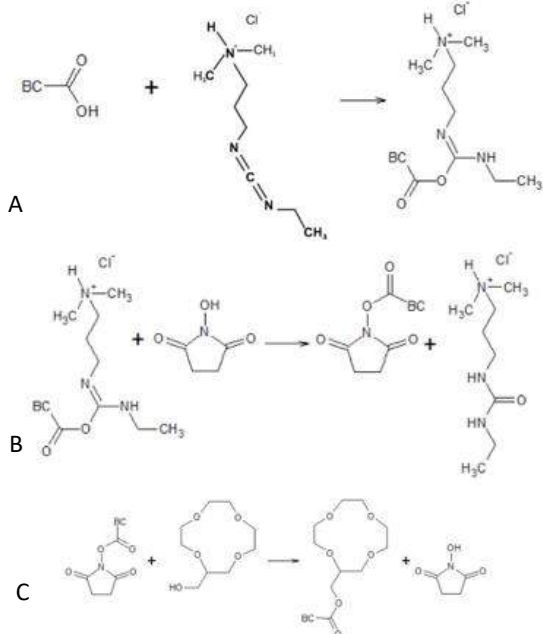
1.1 Príprava a 2H12C4 funkcionalizácia biouhlia

Biouhlie (BC) bolo pripravené z čerešňových kôstok pri teplote 500°C v procese pomalej pyrolýzy v prostredí N_2 (2l/min) pyrolýznym reaktorom PYREKA 2.1 (Pyreg, Dörth, Nemecko). Pripravený pyrolýzný produkt (Obr.1) bol zhomogenizovaný a presitovaný.



Obr. 1 SEM snímky BC pri zväčšení 250 (A) a 1500 (B) krát.

V prvom kroku aktivácie bolo biouhlie modifikované procesom oxidácie, s využitím HNO_3 ako oxidačného činidla s cieľom zavedenia $-\text{COOH}$ skupín na povrch sorbentu. K 10 g biouhlia sa pridal 300 mL 20 % HNO_3 a počas 4 h bola suspenzia miešaná na magnetickom miešadle pri 300 rpm a teplote 90°C . Následne bola zmes prefiltrovaná a premývaná deionizovanou vodou, pokiaľ pH filtrátu nedosiahlo ≥ 7 . Po filtrácii bolo biouhlie vysušené pri 60°C do konštantnej hmotnosti. V druhom kroku (Obr.2) sme k 1 g aktivovaného biouhlia pridali 20 mL bezvodého DMF a miešali 10 min. Do suspenzie sme za stáleho miešania pridali 6,1 mg DMAP. DMAP urýchľuje tvorbu esterov s povrchovými funkčnými skupinami modifikovaného biouhlia a zároveň minimalizuje výskyt vedľajších reakcií. Zmes sme ochladili na teplotu $0-5^\circ\text{C}$ v ľadovom kúpeli. V malej suchej skúmavke sme rozpustili 0,288 g EDC*HCl a 0,173 g NHS v 4 mL DMF pri teplote 4°C . Tento aktivačný roztok sme po kvapkách pridali do suspenzie biouhlia. Vzniknutú suspenziu sme miešali 1 h pri 22°C . Následne sme rozpustili 0,155 g 2H12C4 v 3 mL DMF a tento roztok pridali po kvapkách do suspenzie biouhlia za stáleho miešania pri 22°C po dobu 18 h. Funkcionalizovaný sorbent (F-BC) sme oddelili od reakčného roztoku vákuovou filtráciou s postupnou sériou premyvov pomocou DMF (odstránenie vedľajších produktov a nezreagovaných reaktantov), metanolu (odstránenie zvyškov organických látok) a deionizovanej vody (na odstránenie solí a vo vode rozpustných vedľajších produktov). Pripravené sorbenty BC a F-BC boli presitované pre získanie frakcie < 0,07 mm, ktorá bola následne použitá pre FT-IR analýzu a sorpčné charakteristiky.



Obr.2 Modifikácia BC a príprava F-BC s 2H12C4; (A) aktivácia -COOH pomocou EDC, (B) tvorba NHS-esteru – stabilizácia aktivovaného -COOH, (C) reakcia NHS-esteru s 2H12C4

1.2 FTIR analýza

Infračervenú spektroskopiu s Fourierovou transformáciou (FTIR) sme vykonali pomocou prístroja Cary 630 (Agilent, USA) s využitím metódy zoslabeného úplného obrazu (ATR). Touto analýzou sme podrobili vzorky vstupnej biomasy, BC-H₂O a BC-2H12C4. Všetky analyzované vzorky boli zhomogenizované a bez ďalšej úpravy nanosené na Ge-kryštál v dostatočnom množstve, aby vzorka pokryla celú jeho plochu. FTIR spektrá boli vyhotovené v oblasti stredných dĺžok 650-4000 cm⁻¹ s rozlíšením 4 cm⁻¹ a počtom skenov 64. Pred každým meraním vzorky, bolo vykonané meranie pozadia (čistého kryštálu) za účelom odstránenia interferencií. Meranie prebiehalo v transmisnom móde.

1.3 Sorpčné experimenty

Pre opisanie sorpčných vlastností BC a F-BC pre separáciu Li⁺ z vodných roztokov boli sledované vplyv času kontaktu medzi sorbentom a sorbátom, vplyv počiatočnej koncentrácie sorbátu ako aj kompetícia vybraných jednomocných (Na⁺, K⁺) a dvojmocných (Ca²⁺, Mg²⁺) iónov v ekvimolárnych koncentráciách (1:1). Na výpočet množstva Li, ktoré sa sorbovalo

pomocou sorbentov na báze BC a F-BC sme vychádzali zo základného vzťahu:

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq}) \cdot V}{m}$$

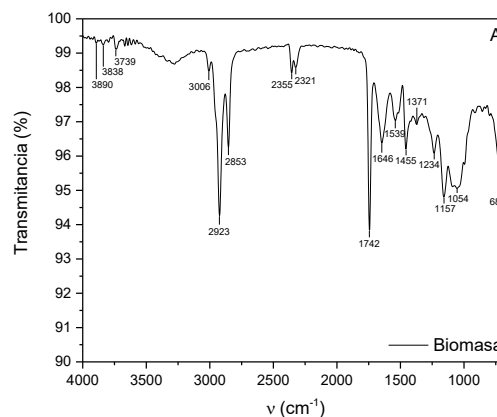
kde Q_{eq} vyjadruje množstvo sorbovaného Li (mg/g), C_0 vyjadruje počiatočná koncentrácia Li v roztoku (mg/L), C_{eq} predstavuje rovnovážnu koncentráciu Li v roztoku po sorpcii (mg/L), V je objem roztoku (L) a m je hmotnosť sorbentu (g)

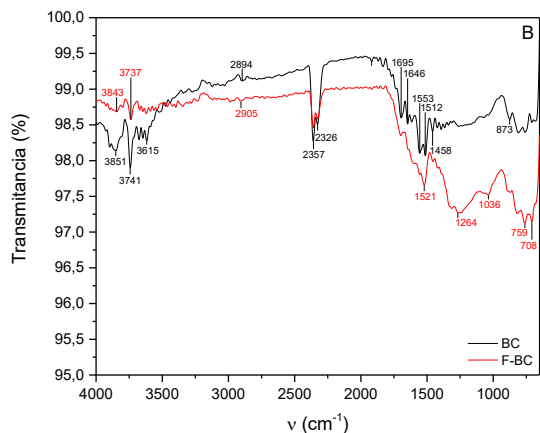
Koncentrácie nesorbovaného Li boli v roztoku po sorpcii stanované pomocou F-AAS (Agilent AA240) v absorpčnom ako aj emisnom móde. Pre optimalizáciu a kalibráciu stanovenia Li bol použitý referenčný materiál s c Li= 1000mg/L (Sigma-Aldrich, Nemecko). V prípade rovnovážnej sorpcie sme získané experimentálne dáta vyhodnotili pomocou modelov adsorpčných izoteriem podľa Langmuira a Freundlicha [8].

2 Výsledky a diskusia

2.1 FTIR analýza

Na základe získaných IČ spektier sme dokázali identifikovať rôzne funkčné skupiny na povrchu vstupnej biomasy (Obr.3A) čerešňových kôstok a na povrchu biouhlia BC ako aj 2H12C4-funkcionalizovaného F-BC (Obr.3B). V spektre vstupnej biomasy sme identifikovali prítomnosť širokého pásu v oblasti 3200 - 4000 cm⁻¹, ktorý zodpovedá vibráciám O-H a môže naznačovať povrchovú hydratáciu alebo prítomnosť kyslíkatých funkčných skupín. Tieto pásy sú často široké a intenzívne, čo taktiež odráža prítomnosť vodíkových väzieb [9, 10].





Obr.3 FTIR spektrá vstupnej biomasy (A) a vzoriek sorbentov BC a F-BC (B).

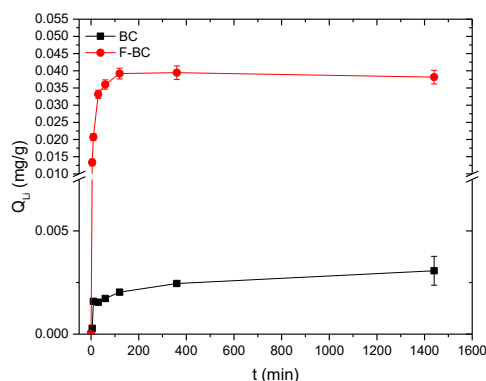
V oblasti v $\sim 3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ môžeme vidieť intenzívne absorpčné pásy, ktoré na základe literatúry možno pripísať C-H valenčným vibráciám metylových a metylénových skupín [11]. V oblasti $2325\text{--}2360\text{ cm}^{-1}$ sme identifikovali pás, ktorý by mohol zodpovedať prítomnosti atmosférického oxidu uhličitého (CO_2), keďže všetky vzorky sú pórovitého charakteru [12]. V spektre vstupnej biomasy sme identifikovali absorpčný pás v oblasti v $1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, ktorý zodpovedá vibráciám dvojitej väzby C=O skupín, konkrétne ketónov a karboxylových kyselín [13]. Pri v $\sim 1640\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$ sa nachádzajú pásy, ktorých prítomnosť môže zodpovedať výskytu a vibrácií C=C aromatických väzieb, ktoré sú prítomné v rastlinných materiáloch [14]. Pás nachádzajúci sa v $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ naznačuje, že funkčné skupiny O-CH₃ (metoxylové) prispievajú k základnej štruktúre fenypropánových jednotiek lignínu [15]. Pri v $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$ je jasný pás, ktorý zodpovedá C-H pochádzajúce z celulózy, hemicelulózy a lignínu. Pás pri v 1234 cm^{-1} zodpovedajúci C-C a C-O vibráciám pochádzajúcim z lignínu a C-O-C pri 1157 cm^{-1} z celulózy a hemicelulózy [16]. Infračervené vibrácie pri v $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$, ktoré zodpovedajú C-O alebo deformácii -OH, naznačujú prítomnosť éterov a esterov, ktoré pôsobia ako spojovací článok medzi rôznymi monomérmi lignocelulóзовých zložiek, ako aj zložkami fenypropánových jednotiek spojených s lignínom. Intenzívnejší absorpčný pás pri v $\sim 685\text{ cm}^{-1}$ naznačuje prítomnosť mono-, polycyklických a substituovaných aromatických zlúčenín prispievajúcich k základnej štruktúre lignocelulóзовých zložiek biomasy [15].

Pri vzorkách biouhlia (Obr. 3B) sme charakterizovali niekoľko pásov. Pri vzorke BC sme popísali rovnaké pásy ako sa vyskytujú aj vo vzorke biomasy, a to konkrétne pri v $3200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ sme pozorovali vibrácie O-H [9], pri v $2910\text{--}2890\text{ cm}^{-1}$ C-H valenčné vibrácie [11] a $2325\text{--}2360\text{ cm}^{-1}$ charakteristické pre CO_2 [12]. Pri v $1695\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ sme pozorovali pás charakteristický pre vibrácie aromatických väzieb C=C. Pre delokalizované konjugované väzby C=C v aromatických kruhoch je charakteristické pásmo vibrácií pri v $1560\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ [14]. Pri vlnóčte 1458 cm^{-1} sme pozorovali pás typický pre deformačné vibrácie metylénových (CH_2) a metylových (CH_3) skupín [9]. Pás pri v $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ je charakteristický pre deformácie -CH vibrácií, ktoré naznačujú rekombináciu a tvorbu aromatickej štruktúry [12].

V FT-IR spektre pre vzorku F-BC sme okrem pásov popísaných pri vzorke BC pozorovali absorpčné pásy pri 1264 cm^{-1} a 1036 cm^{-1} . Pás pri 1264 cm^{-1} zodpovedá vibráciám C-O (acetylestery) a 1036 cm^{-1} pre C-O vibráciám a deformáciám OH skupín prítomných v éteroch a esteroch [17].

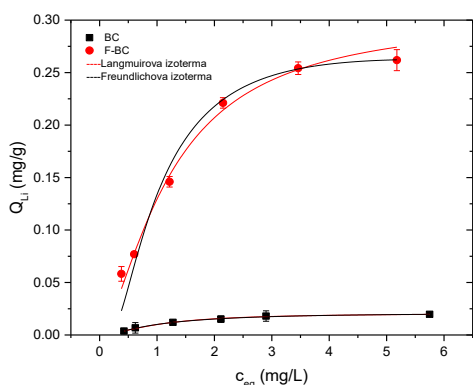
2.2 Sorpčné experimenty

Sorpčné charakteristiky skúmaných sorbentov poukazujú na využiteľnosť pripraveného funkcionalizovaného biouhlia F-BC pre efektívnu sorpčnú separáciu Li z vodných roztokov. Chemická modifikácia biouhlia zvýšila sorpčnú kapacitu (Q_{eq}) BC takmer 20-krát. Na základe sorpčnej kinetiky (Obr.4) vieme popísať sorpčný proces ako pomerne rýchly proces, ktorého sorpčná rovnováha sa ustáľuje do 120 min kontaktného času.



Obr. 4 Kinetika sorpcie Li sorbentami na báze BC a F-BC (čas kontaktu 5-1440 min; $c_0 = 1\text{ mg/L}$; $\text{pH} = 6,7$; sorbent/sorbát: 2,5 g/L)

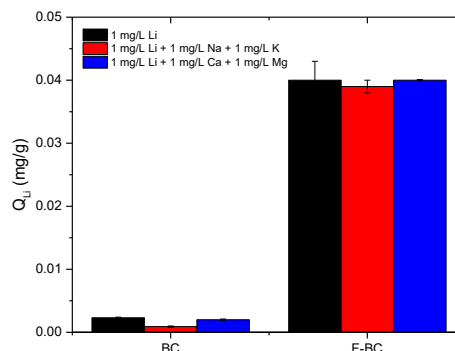
Vplyv počiatočnej koncentrácie Li na sorpčnú kapacitu BC a F-BC poukázal na potenciálnu saturáciu inovatívneho sorbentu už pri zvolenom koncentračnom rozmedzí 0,5-6 mg/L (Obr.5). Experimentálne dáta boli opísané empirickými modelmi Langmuirovej a Freundlichovej adsorpčnej izotermy. Vyššiu efektivitu fitovania sme dosiahli pri Langmuirovej izoterme s hodnotou koeficientu determinácie $R^2=0,999$ pre BC aj F-BC. Získané parametre izotermy ďalej poukazujú na predikované hodnoty Q_{max} pre F-BC 0,32 mg/g a BC 0,02 mg/g.



Obr. 5 Závislosť sorpčnej kapacity BC a F-BC pre Li za podmienok: čas kontaktu 120 min; $c_0 = 0,5-6$ mg/L; pH =6,2-6,5; sorbent/sorbát: 3 g/L. Experimentálne dáta fitované adsorpčnými izotermami podľa Langmuira a Freundlicha

Pre posúdenie selektivity pripraveného sorbentu na báze F-BC sme realizovali sériu experimentov zameranú na sledovanie vplyvu ekvivalentných koncentrácií jednomocných (Na^+ , K^+) a dvojmocných (Ca^{2+} , Mg^{2+}) iónov na sorpciu Li^+ pri koncentrácii 1 mg/L. Ako je zrejme z Obr.6, sorbent F-BC predstavuje oproti BC vysokoselektívny sorbent. Kompetícia jednomocných iónov nepotvrdila štatisticky významný pokles koncentrácie sorbovateľného Li^+ v porovnaní s BC, kde bol pokles pri skupina jednomocných iónov bol viac ako 50 %. Pri dvojmocných iónov a F-BC sa rovnako nepotvrdil kompetičný vplyv na sorpčnú kapacitu v porovnaní s BC, kde bol pokles Q_{eq} 14 %. Zheng a kol. (2021), využili modifikáciu nanomateriálov pomocou crown éteru, kedy dokázali vysokú selektivitu takto modifikovaného materiálu pre Li^+ v prítomnosti kompetitívnych jednomocných a dvojmocných iónov (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+}). Túto selektivitu pripisujú jedinečnej štruktúre 2-(hydroxymetyl)-12-crown-4

éteru, ktorého priemer dutiny je veľmi podobný polomeru iónov Li^+ [6].



Obr. 6 Vplyv jednomocných iónov (Na^+ a K^+) ako aj dvojmocných (Ca^{2+} a Mg^{2+}) iónov na sorpčnú kapacitu BC a F-BC pre Li (za podmienok čas kontaktu 120 min; $c_0 = 1$ mg/L; $c_0 (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}) = 1$ mg/L; pH = 6,5; sorbent/sorbát: 3 g/L)

Záver

Aplikácia sorbentov selektívnych pre Li predstavuje efektívny spôsob extrakcie Li z vodných matric, ako je napríklad morská voda. Sorpčná kapacita pre biouhlie funkcionalizované pomocou 2-(hydroxymetyl)-12-crown-4 éterom dosahovala hodnoty takmer 20-krát vyššie ako nefunkcionalizované biouhlie (BC). Sorpčný proces Li F-BC sorbentom predstavuje pomerne rýchly proces a k saturácii biouhlia Li dochádza do 120 min kontaktného času. Sorpčný proces je opísateľný adsorpčným modelom Langmuirovej izotermy. Hodnota parametra Q_{max} získaná nelineárnou regresnou analýzou pre F-BC bola 0,32 mg/g v porovnaní s BC 0,02 mg/g. Sorbent F-BC vykazuje vysokú selektivitu pre Li^+ v prítomnosti kompetičných jednomocných a dvojmocných iónov (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+}). Z týchto výsledkov vyplýva, že nami pripravené funkcionalizované biouhlie (F-BC) je vhodné pre selektívnu sorpciu iónov Li z vodných roztokov a kvapalných odpadov.

Podakovanie

Práca bola podporená projektom Fakulty prírodných vied UCM (FPPV-29-2026) a Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaM (VEGA1/0110/26).

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] OBAR, Farah; PRADHAN, Snigdhendubala; MACKEY, Hamish R. and MCKAY, Gordon (2024). Removal of lithium from aqueous solution by spent ground activated biochar. *Process safety and Environmental Protection*, vol. 184, pp 680-689, ISSN 1744-5820
- [2] KAMRAN, Urooj; PARK, Soo-Jin (2020) MnO₂-decorated biochar composites of coconut shell and rice husk: An efficient lithium ions adsorption-desorption performance in aqueous media. *Chemosphere*, vol. 260, ISSN 1879-1298
- [3] KRISHNAN, Renjith; GOPAN, Gokul (2024) A comprehensive review of lithium extraction: From historical perspectives to emerging technologies, storage, and environmental considerations. *Cleaner Engineering and Technology*, vol. 20, ISSN 2666-7908
- [4] ULLAH, F (2022) Heterocyclic crown ethers with potential biological and pharmacological properties: From synthesis to applications. *Applied Science*, vol. 12, ISSN 2076-3417
- [5] WU, Yi-Hong (2025) Resin functionalized with 2-(hydroxymethyl)-12-crown-4 ether for selective adsorption of lithium ions desilication solution of coal-based solid waste. *Separation and Purification Technology*, vol. 355, ISSN 1383-5866
- [6] ZHENG, Xudong; LI, Ang; ZHANG, Yuzhe; LI, Zhongyu (2021) Crown ether grafted graphene oxide/chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber membrane for highly selective adsorption and separation of lithium ion. *Nanomaterials*, vol. 11, ISSN 2079-4991
- [7] SANTOS, Diego C.B.D.; EVARISTO, Rafael B.W.; DUTRA, Romulo C.; SUAREZ, Paulo A.Z.; SILVEIRA, Edgar A.; GHESTI, Grace F. (2025) Advancing biochar applications: A review of production processes, analytical methods, decision criteria, and pathways for scalability and certification. *Sustainability*, vol. 17, ISSN 2071-1050
- [8] PIPÍŠKA, Martin; REMENÁROVÁ, Lucia (2014). Environmentálne biotechnológie: Biosorpcia toxických látok. Trnava: UCM, 182 s. ISBN: 978-80-8205-531-7
- [9] LIU, Yongliang; He, Zhongqi; UCHIMIYA, Minori (2015) Comparison of biochar formation from various agricultural by-products using FTIR spectroscopy. *Modern applied science*, vol. 9, ISSN 1913-1852
- [10] JANU, Rainer; MRLIK, Verena; RIBITSCH, Doris; HOFMAN, Jakub; SEDLÁČEK, Petr; BIELSKÁ, Lucie; SOJA, Gerhard (2021) Biochar surface functional groups as affected by biomass feedstock, biochar composition and pyrolysis temperature. *Carbon Resources Conversion*, vol. 4, p. 36-46, ISSN 2588-9133
- [11] ŠEBEK, Jiří; KNAANIE, Roie; ALBEE, Brain, POTMA, Eric O.; GERBER, R. Benny (2013) Spectroscopy of the C-H stretching vibrational band in selected organic molecules. *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 117, p. 7442-7452, ISSN 1520-5215
- [12] MCCALL, Monica A.; WATSON, Jonathan S.; TAN, Jonathan S. W.; SEPTON, Mark A. (2025) Biochar stability revealed by FTIR and machine learning. *ACS Sustainable Resources Management*, vol. 5, p. 842-852, ISSN 2837-1445
- [13] FRIŠTÁK, Vladimír; BOŠANSKÁ, Diana; PIPÍŠKA, Martin; ĎURIŠKA, Libor; BELL, Stephen M.; SOJA, Gerhard (2022) Physicochemical characterization of cherry pits-derived biochar. *Materials*, vol. 15, ISSN 1996-1944
- [14] BINIAK, S.; TRYKOWSKI, G.; WALCZYK, M.; RICHERT, M. (2016) Thermo-chemical modification of low-dimensional carbons: an infrared study. *Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 83, p. 580-585, ISSN 1573-8647
- [15] SAHOO, Kedar; KUMAR, Ankit; CHAKRABORTY, Jyoti Prasad (2021) A comparative study on valuable products: bio-oil, biochar, non-condensable gases from pyrolysis of agricultural residues. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, vol. 23, p. 186-204, ISSN 1611-8227
- [16] XU, Feng; YU, Jianming; TESSO, Tesfaye; DOWELL, Floyd; WANG, Donghai (2013) Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, vol. 104, p. 801-809, ISSN 1872-9118
- [17] KLOSS, Stefanie; ZEHETNER, Franz; DELLANTONIO, Alex; HAMID, Raad; OTTNER, Franz; LIEDTKE, Volker; SCHWANNINGER, Manfred; GERZABEK, Martin H.; SOJA, Gerhard (2012) Characterization of slow pyrolysis biochars: Effects of feedstocks and pyrolysis temperature on biochar properties. *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, p. 990-1000, ISSN 1537-2537

Potlačenie hyperhydricity a chlorózy *Sida rhombifolia* L. v podmienkach *in vitro*

Suppression of hyperhydricity and chlorosis in *Sida rhombifolia* L. under *in vitro* conditions

Juraj Habdák¹ – Ján Kraic^{1,2}

¹Oddelenie biotechnológií, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu
2, 917 01 Trnava,

²Výskumný ústav rastlinnej výroby, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum,
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

¹ habdak1@ucm.sk, ³ jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt

Druh sida kosoštvorcolistá (*Sida rhombifolia* L.) patrí medzi liečivé rastliny využívané v systémoch tradičnej medicíny Ázie, Afriky a Ameriky. V tradičnej ajurvédскеj medicíne je známa pod názvom „Mahabala“, kde našla svoje uplatnenie najmä pri liečbe zápalových a respiračných ochorení. Produkcia rastlinnej biomasy *in vitro* je počas fázy multiplikácie často komplikovaná fyziologickými poruchami. Cieľom práce bolo podporiť proliferáciu výhonkov z nodálnych segmentov a eliminovať fyziologické poruchy, hyperhydricitu a chlorózu, modifikáciou bazálneho média Murashige a Skoog (MS). Výsledky ukázali, že štandardná koncentrácia sacharózy (30 g/L) viedla k inhibícii rastu a nežiaducej kalogenéze. Zníženie koncentrácie sacharózy (10 - 20 g/L) stimulovalo predĺžovanie výhonkov, ale vyvolalo hyperhydricitu. Prídavok Ca²⁺ vo forme 3 mM Ca(NO₃)₂ alebo CaCl₂ potlačil hyperhydricitu pletív, v dôsledku iónového antagonizmu však došlo k prejavom chlorózy. Modifikácia média prídavkom 0,75 mM MgSO₄ + 3 mM Ca(NO₃)₂ eliminovala chlorózu a zabezpečila vitálny rast výhonkov s priemernou dĺžkou stoniek 2,24 ± 0,26 cm. **Kľúčové slová:** *in vitro* kultúra, *Sida rhombifolia* L., hyperhydricita, chloróza

Abstract

The plant species Arrowleaf sida (*Sida rhombifolia* L.) is a medicinal plant used in the traditional medicine systems of Asia, Africa, and the Americas. In traditional ayurvedic medicine, it is known as "Mahabala," where it has found applications mainly in the treatment of inflammatory and respiratory diseases. The production of plant biomass *in vitro* is often complicated by physiological disorders during the multiplication phase. The aim of this work was to support shoot proliferation

from nodal segments and eliminate physiological disorders, hyperhydricity and chlorosis, by modifying the Murashige and Skoog (MS) basal medium. Results showed that the standard sucrose concentration (30 g/L) led to growth inhibition and undesirable callogenesis. Reducing the sucrose concentration (10-20 g/L) stimulated shoot elongation but induced symptoms of hyperhydricity. Addition of Ca²⁺ in the form of 3 mM Ca(NO₃)₂ or CaCl₂ suppressed tissue hyperhydricity, but due to ionic antagonism, chlorosis was observed. Modification of the medium with the addition of 0.75 mM MgSO₄ + 3 mM Ca(NO₃)₂ eliminated chlorosis and ensured vital shoot growth with an average stem length of 2.24 ± 0.26 cm. **Key Words:** *in vitro* culture, *Sida rhombifolia* L., hyperhydricity, chlorosis

Úvod

Rastlinný druh *Sida rhombifolia* L., označovaný aj ako „Arrowleaf sida“ alebo „Mahabala“ je trváca rastlina pochádzajúca z Ázie, rozšírená aj v tropických a subtropických oblastiach Ameriky a Afriky [1]. *S. rhombifolia* je oceňovaná predovšetkým pre svoje antioxidačné, protizápalové, analgetické a antibakteriálne účinky [2,3,4,5]. Liečivý potenciál druhu je determinovaný prítomnosťou sekundárnych metabolitov, ku ktorým patria najmä chinazolinové alkaloidy vazicín a vazicinón, saponíny, steroidy a fenolové zlúčeniny [6]. Využitie biotechnologických prístupov *in vitro* ponúka efektívne riešenie limitácií konvenčného pestovania. Mikropropagácia *in vitro* umožňuje rýchlu, udržateľnú a štandardizovanú produkciu geneticky uniformného rastlinného materiálu [7]. Okrem produkcie kompletných regenerantov poskytujú techniky *in vitro* aj možnosť cielej produkcie sekundárnych metabolitov v kontrolovaných podmienkach prostredníctvom

kalusových alebo bunkových suspenzných kultúr [8]. Tieto systémy umožňujú reguláciu biosyntetických dráh a elimináciu sezónnej variability, čo je v súlade s modernými trendmi farmaceutického výskumu.

Stabilita a kvalita *in vitro* kultúr môže byť ovplyvnená nežiaducimi fyziologickými poruchami, ktoré vznikajú ako dôsledok abiotického stresu v uzavretom kultivačnom systéme. Hyperhydricita predstavuje komplexnú morfológickú a fyziologickú poruchu charakterizovanú nadmernou hydratáciou medzibunkových priestorov apoplastu a deficitom lignifikácie bunkových stien [9]. Hyperhydricita sa prejavuje sklovitým vzhľadom, zmenšenou listovou plochou a zvýšenou lámavosťou pletív, ktoré vedú k zníženej regeneračnej kapacite výhonkov a ich následnému úhynu počas procesu aklimatizácie. Fyziologickou poruchou je aj chloróza, charakterizovaná redukciami asimilačných pigmentov a poruchou fotosyntetickej aktivity. V podmienkach *in vitro* kultúr môže byť jej vznik spojený s nerovnováhou makroprvkov v kultivačnom médiu, napríklad so zníženou dostupnosťou Mg^{2+} , ktorý je esenciálnou súčasťou molekuly chlorofylu [10]. Dôležitým faktorom sú aj iónové interakcie medzi kationmi Ca^{2+} a Mg^{2+} , ovplyvňujúce ich príjem a vnútrobunkovú homeostázu. Práve eliminácia spomenutých fyziologických porúch je kľúčová pre stabilitu rastlinných *in vitro* systémov. Odborná literatúra venovaná mikropropagácii *S. rhombifolia* je však v tejto oblasti, aj napriek liečivému potenciálu uvedeného druhu, značne limitovaná.

Cieľom našej práce bolo podporiť proliferáciu výhonkov z nodálnych segmentov *Sida rhombifolia* L. prostredníctvom modifikácie zloženia bazálneho média, bez použitia exogénnych rastových regulátorov. Naš *in vitro* kultivačný systém zahŕňal prípravu donorových rastlín zo semien, odber explantátov a monitorovanie vplyvu rôznych koncentrácií sacharózy, ako aj prídavkov vápnika a horčíka na elimináciu hyperhydricity a chlorózy.

1 Materiál a metódy

1.1 Rastlinný materiál

Semená druhu *Sida rhombifolia* L. boli získané z rastlín pestovaných v Amerike. Pred založením *in vitro* kultúr boli semená chemicky skarifikované koncentrovanou kyselinou sírovou a povrchovo sterilizované 70 % etanolom a 4,7 % roztokom NaClO.

1.2 In vitro kultivácia

Klíčenie semien prebiehalo na kultivačnom médiu MS v kultivačnej miestnosti s teplotou 23 ± 2 °C a fotoperiodou 16 hodín svetlo, 8 hodín tma. Nodálne segmenty boli odoberané po 4 týždňoch od vyklíčenia semien. Zvýšenie koncentrácie vápenatých iónov v štandardnom médiu MS bolo zabezpečené prídavkom 3 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ alebo $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ zo zásobných roztokov s koncentráciou 3 M. Zvýšenie koncentrácie horečnatých iónov bolo dosiahnuté prídavkom 0,75 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ktorý bol do média pridaný zo zásobného roztoku s koncentráciou 1,5 M. Kultivácia explantátov prebiehala za rovnakých podmienok ako fáza klíčenia. Rast stonky bol hodnotený meraním dĺžok po 4 týždňoch kultivácie.

2 Výsledky a diskusia

Modifikácia zloženia bazálneho média Murashige & Skoog (MS) [11] sa ukázala ako kľúčový faktor pre úspešnú *in vitro* mikropropagáciu druhu *Sida rhombifolia* L.. Médium so zníženou koncentráciou sacharózy malo pozitívny vplyv na rast a predlžovanie výhonkov v porovnaní s médiom MS so štandardnou koncentráciou sacharózy 30 g/l (MS30). Rastové parametre bolo po štyroch týždňoch kultivácie možné hodnotiť pri všetkých variantoch, avšak kvalita výhonkov bola výrazne ovplyvnená prítomnosťou fyziologických porúch v závislosti od zloženia média. Štandardná koncentrácia sacharózy v médiu MS30 viedla k najpomalšiemu predlžovaniu stonky s priemernou dĺžkou $1,95 \pm 0,28$ cm (Tabuľka 1). Pri uvedenej koncentrácii sme zároveň pozorovali nežiaducu tvorbu kalusu v bazálnej časti explantátov, čo môže súvisieť s vysokým osmotickým potenciálom média [12]. Zníženie koncentrácie sacharózy na 20 a 10 g/L stimulovalo predlžovanie stoniek na $2,22 \pm 0,24$ cm, resp. $2,53 \pm 0,24$ cm.

Tab. 1 Vplyv koncentrácie sacharózy v médiu MS s obsahom 30 g/L (MS30), 20 g/L (MS20) a 10 g/L (MS10) na rast výhonkov *Sida rhombifolia* L. po 4 týždňoch kultivácie.

Médium	Priemerná dĺžka stonky [cm]
MS 30	$1,95 \pm 0,28$
MS 20	$2,22 \pm 0,24$
MS 10	$2,53 \pm 0,24$

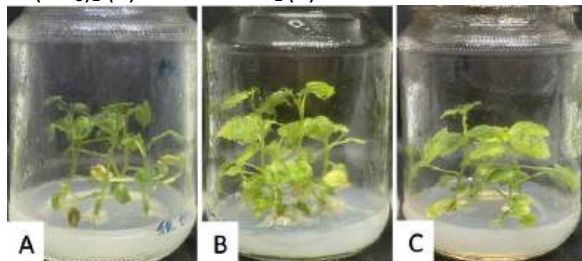
Zníženie koncentrácie sacharózy síce pozitívne ovplyvnilo rastové parametre, zároveň však viedlo k rozvoju hyperhydricity, ktorá sa prejavila sklovitosťou pletív výhonkov. Na elimináciu hyperhydricity sme médium MS10 obohatili o Ca^{2+} v koncentrácii 3 mM vo forme $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ alebo CaCl_2 . Prídavok vápnika úspešne eliminoval prejavy hyperhydricity a spevnil pletivá výhonkov. V súlade s našimi zisteniami bolo potvrdené aj Machadom a kol. [13], že zvyšovanie koncentrácie CaCl_2 v kultivačnom médiu potlačuje prejavy hyperhydricity. Najvýraznejšie predĺženie stonky sme v rámci experimentálnej práce zaznamenali po 4 týždňoch kultivácie na médiu MS10 s prídavkom $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pri ktorých dosiahla priemerná dĺžka stonky $3,55 \pm 0,85$ cm (Tabuľka 2). Na médiu s prídavkom $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bol rast stonky v porovnaní s dusičnanovou formou menej výrazný ($2,65 \pm 0,64$ cm).

Tab. 2 Priemerná dĺžka stoniek výhonkov *S. rhombifolia* L. na médiách MS10 s prídavkom 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ alebo CaCl_2 .

Prídavok soli	Priemerná dĺžka stonky [cm]
3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$3,55 \pm 0,85$
3 mM CaCl_2	$2,65 \pm 0,64$

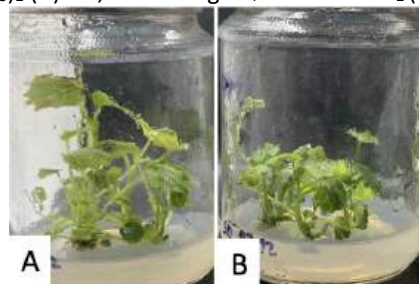
Rozdiel v kvalite pletív *S. rhombifolia*, medzi výhonkami s prejavom hyperhydricity na médiu MS10 a výhonkami na médiách s prídavkom Ca^{2+} je zdokumentovaný na Obrázku 1. Zvýšená koncentrácia vápnika v médiu však vyvolala sekundárnu fyziologickú poruchu – chlorózu pletív. Tento jav bol pravdepodobne spôsobený v dôsledku iónového antagonizmu, pri ktorom nadbytok vápnika inhiboval príjem horčíka.

Obr. 1 Porovnanie vývinu výhonkov z nodálnych segmentov *Sida rhombifolia* L. po 4 týždňoch kultivácie na médiu MS10 (A) a médiách MS10 s prídavkom 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (B) a 3 mM CaCl_2 (C).



Finálna modifikácia média preto zahŕňala prídavok 0,75 mM MgSO_4 k variantom médií obohatených o Ca^{2+} . Táto úprava viedla k úplnej eliminácii chlorózy a zabezpečila produkciu vizuálne zdravých, sýtozelených pletív výhonkov (Obr. 2). Priemerná dĺžka stonky pri kombinovanej suplementácii Ca^{2+} a Mg^{2+} mierne klesla v porovnaní s médiom, ktoré bolo obohatené len o prídavky Ca^{2+} (Tab. 2).

Obr. 2 Porovnanie vývinu výhonkov z nodálnych segmentov *Sida rhombifolia* L. po 4 týždňoch kultivácie na médiu MS10 prídavkom 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (A) a 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM CaCl_2 (B).



Na médiu s prídavkom 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ bola zaznamenaná priemerná dĺžka stoniek $2,24 \pm 0,26$ cm, pri médiu doplnenom o 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM CaCl_2 bola priemerná dĺžka stoniek $1,98 \pm 0,15$ cm. Napriek menším priemerným dĺžkam bola však celková vitalita rastlinného materiálu výrazne vyššia. Modifikácia média MS10, doplnená o 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, preto predstavuje vhodné východisko pre nadväzujúce experimenty. Výhonky kultivované z nodálnych segmentov na uvedenom médiu môžu byť použité pre ďalšiu fázu kultivácie zameranú na indukciu koreňovej sústavy (rizogenézu). Indukcia rizogenézy následne umožní produkciu kompletných a životaschopných regenerantov pripravených na proces aklimatizácie.

Záver

V rámci experimentálnej práce sme sa zamerali na modifikáciu zloženia kultivačného média pre mikropropagáciu liečivého druhu sida kosoštvorcolistá (*Sida rhombifolia* L.) s využitím nodálnych segmentov. Výsledky práce potvrdili, že zníženie koncentrácie sacharózy zo štandardných 30 g/L na 10 g/l v médiu MS bolo vhodné pre podporu rastu výhonkov. Zníženie koncentrácie sacharózy však vyvolalo fyziologickú poruchu v podobe hyperhydricity. Suplementácia média prídavkom 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sa ukázala ako vhodná pre elimináciu hyperhydricity a podporu rastu

výhonkov. Následnou korekciou iónového antagonizmu medzi Ca^{2+} a Mg^{2+} prídavkom 0,75 mM MgSO_4 sme dosiahli produkciu vitálnych výhonkov bez prejavov chlorózy. Modifikáciou kultivačného média MS10 s 0,75 mM MgSO_4 + 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sme dosiahli rast výhonkov s priemernou dĺžkou stoniek $2,24 \pm 0,26$ cm. Napriek dostupnosti všeobecných protokolov pre *in vitro* kultúry, fyziologické odpovede druhu *Sida rhombifolia* L. na odlišné koncentrácie zložiek kultivačných médií neboli objasnené. Limitovaná dostupnosť relevantných vedeckých zdrojov poukazuje na výraznú medzeru, čím sa naša práca stáva východiskom pre ďalší rozvoj techník mikropropagácie liečivých druhov rodu *Sida* L..

PodĎakovanie

Príspevok vznikol s finančnou podporou Fakulty prírodných vied UCM prostredníctvom projektu č. FPPV-43-2026.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] JIMÉNEZ-FERRER, E.; HERRERA-RUIZ, M.; CAMPOS-VIDAL, Y.; FLORES-FRANCO, G.; MONTERROSAS-BRISSON, N., (2025). *Sida* L.: Ethnobotany, pharmacology, and phytochemistry: A review. *Plants (Basel)*, vol.19, no. 14:3115. ISSN 2223-7747.
- [2] ARCINIEGAS, A.; PEREZ-CASTORENA, A.L.; NIETO-CAMACHO, A.; KITA, Y.; DE VIVAR, A.R. Anti-hyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and metabolites from *Sida acuta* and *Sida rhombifolia*. *Química Nova*, vol. 2, no 40, pp 176-181. ISSN 1678-7064.
- [3] KONATÉ, K.; HILOU, A.; MAVOUNGOU, J.F.; LEPENGUE, A.N.; SOUZA, A.; BARRO, N.; DATTE, J.Y.; M'BATCHI, B.; NACOULMA, O.G., (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 11, no. 5, pp. 1-6. ISSN 1476-0711.
- [4] XU, Z.; GAO, P.; LIU, D. ; SONG, W.; ZHU, L.; LIU, X., (2022). Chemical composition and in vitro antioxidant activity of *Sida rhombifolia* L. volatile organic compounds. *Molecules*, vol. 20, no. 27:7076. ISSN 1420-3049.
- [5] RODRIGUES, F.C. and DE OLIVEIRA, A. F. M., (2020) The genus *Sida* L. (Malvaceae): An update of its ethnomedicinal use, pharmacology and phytochemistry. *The South African Journal of Botany*, vol. 8, pp. 432-462. ISSN 0254-6299.
- [6] CHAVES, O. S.; TELES, Y. C. F.; MONTEIRO, M. M.; MENDES, L. G.; AGRA, M. F.; BRAGA, V. A.; SILVA, T. M. S.; SOUZA, M. F. V., (2017). Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. *Molecules*, vol. 22, no. 1:94. ISSN 1420-3049.
- [7] JURAEV, Z.; KORIEV, M.; SHOKIROVA, G., (2025). *In vitro* micropropagation for standardizing medicinal plants: a systems-based case study of *Hibiscus sabdariffa* and *Glycyrrhiza glabra*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol. 61, pp. 1066–1077. ISSN 1054-5476.
- [8] FAZILI, M. A.; BASHIR, I.; AHMAD, M.; UBAID, Y.; SYED, N. G., (2022). *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, vol 46, no. 35. ISSN 2522-8307.
- [9] KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T., (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 77, pp. 181-191. ISSN 0167-6857.
- [10] GUO, W.; NAZIM, H.; LIANG, Z.; YANG, D., (2016). Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *The Crop Journal*, vol. 4, no. 2, 2016, pp. 83-91. ISSN 2214-5141.
- [11] MURASHIGE, T. and SKOOG, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497. ISSN 1399-3054.
- [12] CHEN, Y. and DRIBNENKI P., (2004). Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture. *Plant Cell Reports*, vol. 5, no. 23, pp. 272-276. ISSN 0721-7714.
- [13] MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; FILHO, J. C. B.; ZANETTE, F., (2014). Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of in vitro regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill.. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, no. 5, pp. 636-643. ISSN 1678-4324.

Využitie dostupných digitálnych zobrazovacích zariadení na nedeštruktívne hodnotenie chlorofylov a rastu biomasy v rastlinách

Use of available digital imaging devices for non-destructive assessment of chlorophyll and biomass growth in plants

Pavol Hlubina – Ľubica Uváčková

Ústav biológie a biotechnológie, Fakulta prírodných vied UCM v Trnave,

Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

hlubina1@ucm.sk, lubica.uvackova@ucm.sk

Abstrakt

Pri experimentoch s rastlinami v kultivačných miestnostiach je limitujúcim faktorom včasná diagnostika ich reakcie na zvolené ošetrenia. Bežne používané biochemické a molekulárne metódy vyžadujú deštrukciu vzoriek. Ak rastlina nereaguje na zvolené ošetrenie, úprava vstupných podmienok môže byť obmedzená, pretože po mesiacoch rastu končí vegetačné obdobie, v ktorom rastlina vie prirodzene prosperovať. Týmto môže výskumný tím stratiť rok, kým budú znovu vhodné podmienky na rovnaký začiatok experimentu so zmenenými vstupmi.

Definovaný problém riešia rýchle, lacné a nedeštruktívne metódy zberu biologických dát. Tie s vysokou mierou presnosti identifikujú reakcie ošetrení v porovnaní s kontrolou v jednotkách dní, či dokonca hodín. Ukázali sme, že na zber biologických dát postačia aj dostupné digitálne technológie, kvalitné objektívy v lepších smartfónoch. V spojení s vhodnou bioinformatickou analýzou údajov umožňujú vyhodnotiť množstvo chlorofylov, pričom tieto nedeštruktívne metódy signifikantne korelovali s biochemickými analýzami.

Kľúčové slová: Chlorofyl, bioinformatika, rastliny, stres, nedeštruktívne

Abstract

When experimenting with plants in cultivation rooms, early diagnosis of their response to selected treatments is a limiting factor. Relying solely on biochemical and molecular methods of stress identification after the experiment is over can be crucial for the successful completion of the project. The defined problem

can be solved by selecting fast, inexpensive, and non-destructive methods that can identify treatment responses with a high degree of accuracy in a matter of days or even hours. We have shown how the collection of biological data using available digital technologies, high-quality lenses in smartphones, in conjunction with subsequent bioinformatic data analysis, can evaluate chlorophyll values in a timely manner with statistically significant accuracy compared to biochemical methods without the need to destroy samples.

Key Words: Chlorophyll, Bioinformatic, Plants, Stress, Non-destructive

Úvod

Bežné prístupy pri kvantifikácii reakcií rastlín na stres sa tradične spoliehajú na deštruktívne biochemické testy, vrátane extrakcie chlorofylov a karotenoidov [1], alebo na špecializované multispektrálne optické prístroje.

Hoci tieto metódy zostávajú zlatým štandardom pre presnú identifikáciu cieľových molekúl, sú časovo náročné, závislé od činidiel a vyžadujú laboratórnu infraštruktúru, ktorá nie je vždy dostupná, najmä v raných fázach skríningu alebo v prostredí výskumu s obmedzenými zdrojmi. Okrem toho deštruktívny odber vzoriek vylučuje opakované merania tých istých rastlín, čo znižuje časové rozlíšenie údajov pri sledovaní reakcií na stres.

Digitálna analýza obrazu sa stala nedeštruktívnym a čoraz dostupnejším doplnkom klasických biochemických metód. Základným princípom hodnotenia rastlín na

báze RGB (red-green-blue) je, že viditeľné zmeny farby listov a semenáčikov – najmä postupná strata zelenej farby spojená s degradáciou chlorofylu v dôsledku stresu – môžu byť zachytené, kvantifikované a sledované prostredníctvom analýzy červeného (R), zeleného (G) a modrého (B) farebného kanála štandardných digitálnych fotografií [2, 3]. Niekoľko indexov odvodených z hodnôt RGB preukázalo silnú koreláciu s obsahom chlorofylu a celkovou vitalitou rastlín, vrátane indexu nadbytku zelenej farby ($ExG = 2G - R - B$), normalizovaného rozdielu zeleného kanála (NDG), indexu zelených listov (GLI) a indexu viditeľnej odolnosti voči atmosferickým vplyvom (VARI) [4–6]. Tieto indexy umožňujú extrakciu biologicky významných informácií z obrázkov, ktoré nevyžadujú špecializované zariadenie na snímanie.

Integrácia takýchto indexov s časovou sériou snímok umožňuje aj kinetickú analýzu reakcií na stres prostredníctvom výpočtu plochy pod krivkou (AUC) [7, 8]. Prístupy založené na AUC sú dobre zavedené vo farmakológii a ekotoxikológii na charakterizovanie reakcií závislých od dávky a času, pretože zachytávajú veľkosť aj časovú dynamiku biologickej reakcie. Pri aplikácii na údaje pochádzajúce zo snímokovania rastlín umožňuje analýza AUC senzitívne rozlíšenie účinkov jednotlivých ošetrení, ktoré môžu byť štatisticky nevýznamné v jednotlivých časových bodoch, ale jasne sa odlišujú, ak sa zohľadní kumulatívna trajektória reakcie daného ošetrenia. To je obzvlášť cenné v experimentoch v raných fázach rastu, kde sú individuálne denné odchýlky vysoké, ale konzistentné smerové trendy môžu mať rozdielny interpretačný význam.

Významným, hoci často podceňovaným vývojom v tejto metodologickej oblasti je vhodnosť spotrebiteľských fotoaparátov v smartfónoch, ako zariadeniach na získavanie obrazov pre kvantitatívne hodnotenie biomasy rastlín. Moderné fotoaparáty v smartfónoch – vrátane tých, ktoré sú integrované do bežne dostupných zariadení – obsahujú obrazové senzory s vysokým rozlíšením (zvyčajne 12 megapixelov a viac), automatickú korekciu bielej farby a štandardizované farebné profily, ktoré za kontrolovaných, alebo čiastočne kontrolovaných svetelných podmienok poskytujú obrazové

záznamy s dostatočnou farebnou vernosťou na výpočet RGB indexu [3, 9].

Rozlišovacia schopnosť hodnotenia fytotoxicity na základe obrazu však spočíva najmä v metodike následného spracovania, vrátane segmentácie obrazu, výberu oblasti záujmu, výpočtu indexov a štatistického modelovania. Niekoľko nezávislých validačných štúdií potvrdilo, že indexy RGB odvodené z fotografií smartfónov úzko korelujú so spektrofotometrickými meraniami chlorofylu, čo potvrdzuje vedeckú dôveryhodnosť tohto prístupu [2, 9–11].

V tejto práci sme porovnali digitálne zobrazovanie pomocou smartfónu v kombinácii s výpočtom zelenej časti RGB indexu s kinetickou analýzou založenou na AUC. Porovnávali sme tri vybrané plodiny, každú v štyroch ošetreniach. Spolu sme tak porovnávali snímokovanie s biochemickou extrakciou chlorofylu v 12 individuálnych ošetreniach.

1. Metodológia

1.1 Rastlinný materiál

Pri experimente sme použili tri druhy rastlín – rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum*), datelinu plazivú (*Trifolium repens*) a kukuricu siatu (*Zea mays*). Na každý druh a ošetrenie sme zasadili desať semien do črepníkov obsahujúcich 0,125 litra komerčne zakúpeného pôdneho substrátu spojeného s aditívami v rámci jednotlivých ošetrení: ošetrenie A (kontrola), ošetrenie B (45 g mykoríznych húb), ošetrenie C (mikroplasty), ošetrenie D (kombinácia mykoríznych húb + mikroplasty). V ošetreniach s mykoríznyimi hubami sme použili komerčne dostupný prípravok SYMBIVIT® – mykorízne huby, kód produktu: 99902241. AMF boli zapracované do pôdy počas výsadby semien. Symbivit obsahuje bioaktívne častice (spóry, časti mycélia a kolonizované korene rastlín) piatich európskych druhov mykoríznych húb viazaných na prírodné ílovité nosiče: *Claroideoglobus etunicatum*, *C. claroideum*, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis geosporum*, *F. mosse*, bioaditíva podporujúce vývoj mykoríznej symbiózy (prírodné humáty, výťažky z morských rias, mleté kamene), práškový biologicky rozložiteľný polyakrylamidový gél. V ošetreniach s

mikroplastmi sme použili amínom modifikované FluoSpheres™, 0.2 μm, (505/515) v koncentrácii 850 častíc na gram pôdy. Rastliny boli pestované od apríla do mája 2025 v kultivačnej miestnosti s fotoperiódou 16 hodín svetla a 8 hodín tma, s maximálnou intenzitou osvetlenia 11 450 lx a teplotou do 28 °C. Tieto experimentálne podmienky vychádzajú z nastavenia širšieho experimentu, ktorý sleduje vplyv environmentálne vyšších koncentrácií znečistenia mikroplastmi na rôzne typy poľnohospodárskych plodín.

1.2 Stanovenie fyziologických parametrov

Obsah pigmentov v listoch sme stanovili metódou podľa protokolu Lichtenthalera a Wellburna [1], pričom sme ako rozpúšťadlo použili 95-percentný etanol. Supernatant po centrifugácii pri 8000 rpm počas 2 minút sme preniesli do 1,5 ml eppendorfovej skúmavky a absorbanciu supernatantu sme merali pri troch rôznych vlnových dĺžkach svetla (663 nm, 646 nm, 470 nm). Absorbanciu sme stanovili pomocou laboratórneho spektrofotometra BioTek Synergy H1 s 96-jamkovou platňou.

1.3 Bioinformatická analýza a štatistika

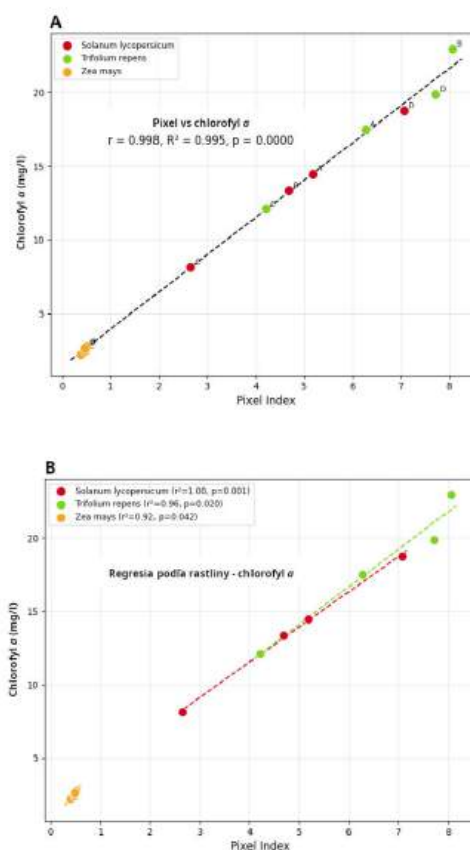
Štatistickú analýzu a kvantifikáciu zelenej farby (tzv. zelený pixel) sme robili v programe Python 3 s využitím knižnice SciPy [12]. Pre každú frakciu chlorofylu (*a*, *b*) sme vypočítali Pearsonov korelačný koeficient (*r*) a koeficient determinácie (*R*²) s cieľom kvantifikovať lineárny vzťah medzi indexom zelených pixlov a biochemickým obsahom chlorofylu. Lineárna regresia bola vykonaná pomocou funkcie `scipy.stats.linregress`. Všetky analýzy sme vykonali na základe priemerov ošetrení (*n* = 12 pre tri druhy rastlín a štyri ošetrenia). Regresiu sme vyrátali aj samostatne pre každý druh (*n* = 4). Štatistickú významnosť sme akceptovali pri *p* < 0,05.

2. Výsledky a diskusia

Vo všetkých druhoch a spôsoboch ošetrenia (*n* = 12) sme pozorovali štatisticky významnú pozitívnu koreláciu medzi hodnotami zeleného pixelu (GPI – Green Pixel Index) a obsahom chlorofylu *a* (Graf 1), (Pearson *r* = 0,998, *R*² = 0,996, *p* < 0,0001; Spearman *ρ* = 1,000, *p* <

0,0001). Tento lineárny vzťah naznačuje, že metóda zelených pixelov zachytáva v podstate rovnaký biologický signál ako deštruktívna biochemická extrakcia, aspoň na úrovni priemeru každého ošetrenia.

Korelácia medzi GPI a samotným chlorofylom *b* (Graf 2) bola stredná (*r* = 0,925, *R*² = 0,856, *p* < 0,0001). Tieto rozdiely naznačujú, že zelený kanál digitálnych obrazov je prevažne citlivý na chlorofyl *a*, ktorý je primárnym fotosynteticky aktívnym pigmentom a dominantným absorbentom v červenej a modrej spektrálnej oblasti [11]. Chlorofyl *b*, ktorý slúži primárne ako doplnkový pigment a absorbuje silnejšie pri kratších vlnových dĺžkach, prispieva zrejme proporcionálne menej k signálu zeleného pixelu. Táto interpretácia je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré uvádzajú, že indexy založené na odrazivosti sú úzko spojené s chlorofylom *a* viac ako s chlorofylom *b* [13].

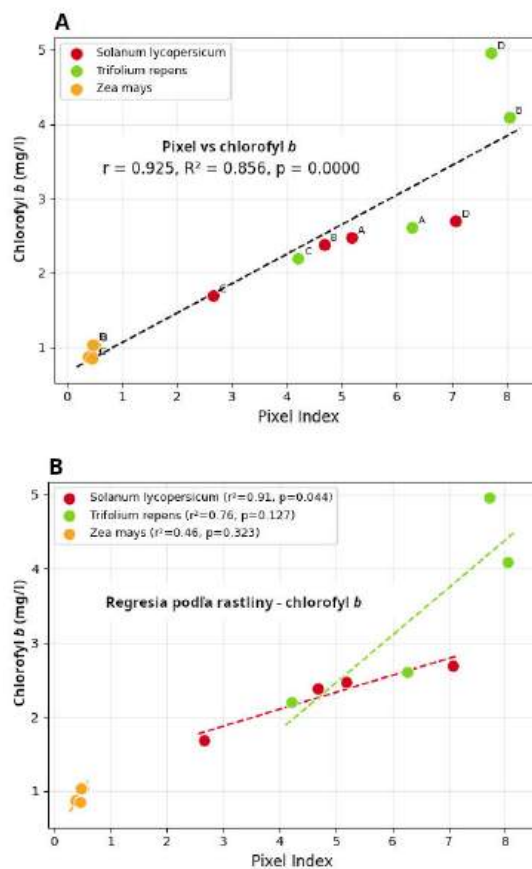


Graf 1: Korelácia medzi hodnotami zeleného pixelu (Pixel Index) a obsahom chlorofylu *a* pre všetky vzorky spolu (graf A) a pre každú rastlinu samostatne (graf B).

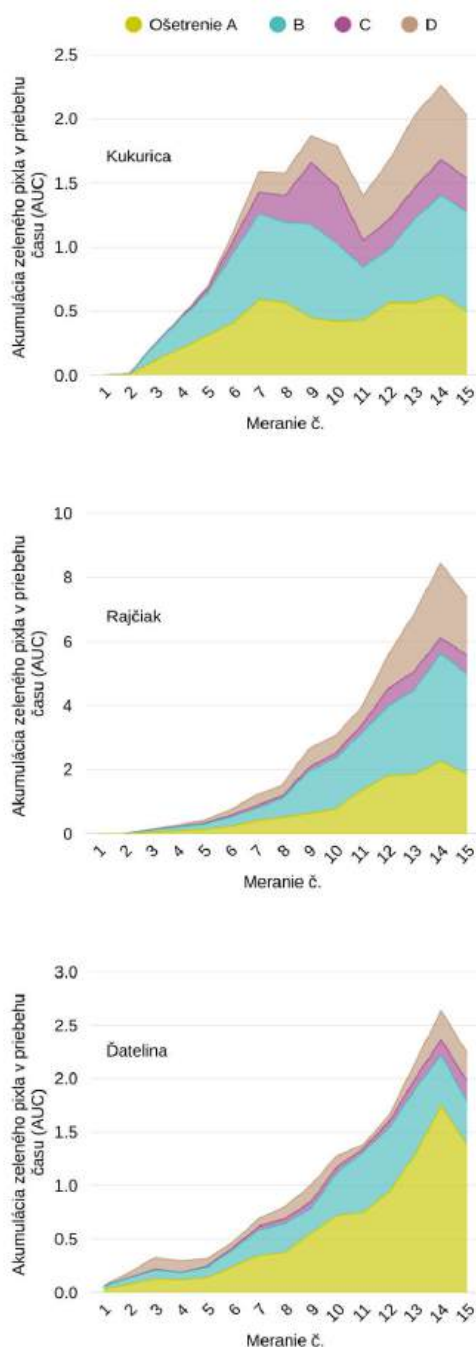
Pri samostatnej analýze podľa druhov (n = 4 na druh) korelácia medzi GPI a chlorofylom *a* zostala významná pre všetky tri druhy. Najsilnejší vzťah vykazoval rajčiak ($r = 0,999$, $R^2 = 0,999$, $p = 0,001$), nasledovaný ďatelinou ($r = 0,980$, $R^2 = 0,960$, $p = 0,020$) a kukuricou ($r = 0,958$, $R^2 = 0,917$, $p = 0,042$). Mierne nižšia, ale stále významná korelácia v kukurici môže odrážať užší absolútny rozsah hodnôt chlorofylu v rámci jednotlivých ošetrení v tomto druhu (2,2 – 2,8 mg/l), čo znižuje štatistickú silu pri $n = 4$, a nie skutočnú odchýlku od lineárneho vzťahu.

Je zaujímavé, že regresné sklony sa líšia medzi druhmi (kukurica - 4,45, paradajka - 2,40, ďatelina biela - 2,56), čo naznačuje, že hoci GPI spoľahlivo hodnotí účinky ošetrenia v rámci každého druhu, univerzálny konverzný faktor nemožno aplikovať na všetky druhy bez špecifickej kalibrácie pre daný druh samostatne. Z biologického hľadiska je to zdôvodniteľné, pretože morfológia listov, hrúbka, povrchová štruktúra a pomer chlorofylu *a* k *b* sa môžu medzi druhmi značne líšiť a ovplyvňovať vzťah medzi intenzitou pixelov a obsahom extrahovateľného pigmentu [8].

Kvantifikácia zeleného pixelu v čase umožňuje sledovať aj dynamiku v raste biomasy, ktorá je zásadná pre rýchlu identifikáciu reakcie rastlín na ošetrovanie. Graf 3 zobrazuje porovnanie nárastu biomasy pre jednotlivé ošetrenia na základe výpočtu plochy pod krivkou AUC. Rozdielna dynamika prírúbania biomasy zobrazuje individuálnu reakciu rastlín na prítomnosť mykorrhíznych húb (ošetrovanie B), aj na stres v podobe mikroplastov (ošetrovanie C). Rast biomasy v ošetrovaniach s mikroplastmi, ako permanentným stresorom, je zároveň u všetkých troch rastlín najnižší, čo je vidieť najmä pri samotnom ošetrovaní len s týmto stresorom (ošetrovanie C).



Graf 2: Korelácia medzi hodnotami zeleného pixelu (Pixel Index) a obsahom chlorofylu *b* pre všetky vzorky spolu (graf A) a pre každú rastlinu samostatne (graf B).



Graf 3: Rast biomasy v čase pre tri sledované rastliny (kukurica, rajčiak, Ďatelina) a jednotlivé ošetrenia (A-D).

Záver

Výsledky naznačujú, že kvantifikácia zelených pixelov zaznamenaných digitálnou kamerou v bežnom smartfóne a následnou podrobnou bioinformatickou analýzou, poskytuje informácie porovnateľné s biochemickým

stanovením chlorofylu *a* na úrovni ošetrovania, s podstatnou praktickou výhodou – je nedeštruktívna, rýchla a nákladovo nenáročná. V kontrolovanom prostredí kultivačnej miestnosti mala metóda identifikácie zelených obrazových bodov štatisticky významnú a pozitívnu koreláciu s obsahom chlorofylu *a* u všetkých troch sledovaných druhov rastlín, rajčiak jedlý (*S. lycopersicum*), Ďatelina plazivá (*T. repens*) a kukurica siata (*Z. mays*), v rámci všetkých štyroch ošetrení.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] DOBROWSKI, S. *et al.* Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. In *Remote Sensing of Environment*. 2005. Vol. 97, no. 3, s. 403–414.
- [2] HASSANIJALILIAN, O. *et al.* Chlorophyll estimation in soybean leaves infield with smartphone digital imaging and machine learning. In *Computers and Electronics in Agriculture*. 2020. Vol. 174, s. 105433.
- [3] LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Methods in Enzymology*. 1987. Vol. 148, no. C, s. 350–382.
- [4] MACCIONI, A. *et al.* New vegetation indices for remote measurement of chlorophylls based on leaf directional reflectance spectra. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. Vol. 61, no. 1–2, s. 52–61.
- [5] RICCARDI, M. *et al.* Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. In *Photosynthesis Research*. 2014. Vol. 120, no. 3, s. 263–272.
- [6] RIGON, J.P.G. *et al.* A novel method for the estimation of soybean chlorophyll content using a smartphone and image analysis. In *Photosynthetica*. 2016. Vol. 54, no. 4, s. 559–566.
- [7] SIMS, D.A. - GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. In *Remote Sensing of Environment*. 2002. Vol. 81, no. 2–3, s. 337–354.

- [8] SINGH, A. et al. Machine Learning for High-Throughput Stress Phenotyping in Plants. In Trends in Plant Science. 2016. Vol. 21, no. 2.
- [9] VIRTANEN, P. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. In Nature Methods. 2020. Vol. 17, no. 3, s. 261–272.
- [10] VOLLMANN, J. et al. Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean. In Computers and Electronics in Agriculture. 2011. Vol. 75, no. 1, s. 190–195.
- [11] WOLEVER, T.M.S. Effect of blood sampling schedule and method of calculating the area under the curve on validity and precision of glycaemic index values. In British Journal of Nutrition. 2004. Vol. 91, no. 2, s. 295–300.
- [12] WU, C. et al. Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. In Agricultural and Forest Meteorology. 2008. Vol. 148, no. 8–9, s. 1230–1241.
- [13] YADAV, S.P. et al. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. In Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2010. Vol. 100, no. 2, s. 183–188.

Nutričné a senzorické vlastnosti domácich kysnutých žemlí s prídavkom bôbu obyčajného (*Vicia faba* L.)

Nutritional and sensory properties of homemade yeast-leavened rolls enriched with faba bean (*Vicia faba* L.)

Daniel Jánoška¹ – Michaela Havrlentová^{1,2}

¹Oddelenie biotechnológií, ÚBB, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

¹janoska1@ucm.sk, ¹michaela.havrlentova@ucm.sk, ²michaela.havrlentova@nppc.sk

Abstrakt

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv zmesných múk s prídavkom bôbu obyčajného (*Vicia faba* L.) na nutričné a senzorické vlastnosti inovatívneho pekárenského výrobku. Pripravené boli múky s 5, 10 a 20 % podielom nenaklíčeného a naklíčeného semena bôbu, z ktorých sa následne upiekli domáce kysnuté žemle. Hotové výrobky boli podrobené senzorickému hodnoteniu a nutričnej analýze (obsah škrobu, proteínov a celkovej potravinovej vlákniny). Výsledky preukázali, že s narastajúcim množstvom bôbu v múkach aj v žemliach dochádza k zníženiu obsahu škrobu a zvýšeniu obsahu proteínov a vlákniny. Vo vzorkách s obsahom naklíčeného bôbu boli tieto zmeny výraznejšie. Po vyhodnotení dotazníku senzorického hodnotenia dosiahol 5 % prídavok múky z oboch typov bôbu najlepšie výsledky v porovnaní s kontrolou.

Kľúčové slová: funkčné potraviny, strukoviny, nutričné zloženie, senzorické hodnotenie

Abstract

The aim of the study was to evaluate the effect of composite flours enriched with faba bean (*Vicia faba* L.) on the nutritional and sensory properties of an innovative bakery product. Flours containing 5, 10, and 20% of non-germinated and germinated faba bean were prepared and used to bake homemade yeast rolls. The final products were subjected to sensory evaluation and nutritional analysis (starch, protein, lipid, and total dietary fiber content). The results showed that increasing the proportion of faba bean in both flours and rolls led to a decrease in starch content and an increase in protein and dietary fiber content. These changes were more pronounced in samples containing germinated faba bean. Sensory evaluation revealed that a 5% addition of flour from both types of faba bean achieved the best results compared to the control.

Key Words: functional food, legumes, nutritional composition, sensory evaluation

Úvod

Stravovacie návyky dnešnej ľudskej populácie charakterizované konzumáciou rýchleho občerstvenia a sladených nápojov sú považované za zásadné rizikové faktory pre vznik chronických civilizačných ochorení, akými sú ochorenia kardiovaskulárnej sústavy alebo diabetes mellitus [1]. Z tohto dôvodu je v spoločnosti v čoraz väčšej miere zaznamenaný trend v príprave a konzumácii tzv. funkčných potravín. Funkčné potraviny sú potraviny, ktoré majú okrem základnej energetickej hodnoty aj pridanú hodnotu pozitívne vplyvajúcu na zdravotný stav konzumenta [2].

Vhodnou surovinou pri ich vývoji sú strukoviny, vďaka ich priaznivému nutričnému zloženiu. Táto skupina potravín sa považuje za dôležitú súčasť kvalitnej stravy, nakoľko sú dôležitými zdrojmi živín, ako sú proteíny, lipidy, sacharidy, vitamíny, minerály a potravinová vláknina. Významným nástrojom na zvýšenie nutričnej hodnoty strukovín je klíčenie. Tento proces vedie k aktivácii endogénnych enzýmov, ktoré čiastočne degradujú zásobné látky a zároveň môže dôjsť k zvýšeniu biologickej dostupnosti niektorých živín [3]. Súčasne môže klíčenie prispieť k zníženiu obsahu antinutričných látok [4] a k zmenám senzorických vlastností výsledného produktu.

Na základe súčasných trendov v potravinárstve bolo preto hlavným cieľom našej práce pripraviť funkčnú potravinu na pekárenskej báze zo zmesných múk s prídavkom bôbu obyčajného a analyzovať jeho vplyv na nutričné a senzorické vlastnosti finálneho výrobku.

1 Materiál a metódy

1.1 Materiál

Pracovali sme so semenami bôbu obyčajného (*Vicia faba* L.) odrody Fernando, ktorý bol vypestovaný v roku 2023 na Výskumnom pracovisku v Borovciach (súčasť

NPPC). Semená sme pred klíčením očistili, päťkrát premyli destilovanou vodou a 24 h namáčali v destilovanej vode pri 19 °C v tme. Následne klíčili 72 h pri 20 °C v tme a pri 75 % vlhkosti. Po vyklíčení boli sušené pri 50 °C a pomleté na veľkosť častíc 0,5 mm.

Zmesné múky boli pripravené zmiešaním pšeničnej hladkej múky (Sama[®], Penam Slovakia, a. s., Nitra) s múkou z nenaklíčeného a naklíčeného bôbu v koncentráciách 5, 10 a 20 %. Z pripravených zmesných múk boli následne vyrobené domáce kysnuté žemle s cieľom dosiahnuť vhodné reologické, senzorické a nutričné vlastnosti prijateľné pre spotrebiteľa. Výroba prebehla v spolupráci s Hotelovou akadémiou Ľudovíta Wintera v Piešťanoch.

Receptúra na prípravu domácich kysnutých žemlí zahŕňala tieto suroviny: 250 g múky, 10 g droždia, 17 g kryštálového cukru, 125 ml mlieka, 1 celé vajce a 1 vaječný žltok, 7 g soli a 33 g masla. Mlieko laboratórnej teploty bolo zmiešané s cukrom a droždím, čím sa vytvoril kvások, ktorý sme nechali kysnúť počas 15 minút. Následne sme k vykysnutému kvásu pridali roztopené maslo, 1 celé vajce a 1 vaječný žltok. Všetky suroviny sme následne zmiešali s múkou a soľou a cesto sme vymiesili pomocou univerzálneho kuchynského robota RM-200 H. Vymiešané cesto sme nechali kysnúť pri laboratórnej teplote v tme počas 45 minút. Po prvotnom vykysnutí bolo cesto rozdelené na zhruba 80 g časti, z ktorých sme vytvarovali bochníky polguľovitého tvaru a nechali dokysnúť počas 15 minút. Pred samotným pečením sme bochníky potreli rozmiešaným vaječným žltkom. Pečenie prebiehalo v elektrickom konvektomate značky Lainox pri 180 °C teplote počas 15 minút. Hotové žemle boli následne analyzované v čerstvom aj sušenom stave. Žemle sme pred sušením nakrájali na kúsky s rozmermi 1 x 1 cm a sušili počas 5 dní pri laboratórnej teplote a pravidelne ich otáčali.

1.2 Metódy

Vzorky boli pred analýzou zomleté na utracentrifugačnom mlyne ZM 100 na hrúbku 0,5 mm a skladované v uzatvárateľných nádobách v tme pri teplote 19 °C. Tesne pred analýzou vzorky sme uskutočnili stanovenie obsahu sušiny pri teplote 110 °C automatickým analyzátorom sušiny MA 45, aby sme obsah kvalitatívnych parametrov prepočítali na obsah sušiny vo vzorke. Analyzovali sme múky, ako aj z nich upečené žemle. Obsah celkového škrobu sme určili polarimetrickou metódou podľa Ewersa (STN 1011-37). Na základe optickej aktivity glukózy sme vypočítali koncentráciu škrobu vo vzorke. Výsledky sme stanovili

na základe prepočítacieho faktora 5,4734 (pšeničná múka) alebo 5,4348 (bôb obyčajný) x optická otáčavosť (α). Na analýzu celkovej potravinovej vlákniny, enzymaticko-gravimetrickou metódou, sme použili súpravu „Total dietary fiber assay procedure“ (K-TDFR, TDF 10/99) od firmy Megazyme Ltd. Pri stanovení obsahu proteínov sme stanovili obsah dusíka Dumasovou metódou (CNS-2000, Elemental Analyzer, LECO Corp., USA) a vynásobili faktorom 5,70 (pšeničná múka) a 5,71 (bôb obyčajný) pre výpočet množstva proteínov.

Počas prípravy domácich kysnutých žemlí sme hodnotili správanie múk pri miesení, kysnutí aj po tepelnej úprave v porovnaní s kontrolou. Po upečení sa posudzoval tvar, farba a celková štruktúra výrobku. Po rozkrojení aj farba, konzistencia a pórovitosť striedky. Senzoricky sme hodnotili chuť, prítomnosť netradičných príchutí a lepivosť v ústach. Kvalita výrobkov bola zároveň posudzovaná dotazníkom senzorického hodnotenia vyplneným 15 respondentmi, ktorými boli študenti HAĽW v Piešťanoch. Jednotlivé parametre boli hodnotené na škále od 1 do 5 bodov, pričom celkový počet bodov bol 45 (Tabuľka 1).

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

Tvar výrobku	5	výrazne klenutý a pravidelný tvar
	4	mierne klenutý, takmer pravidelný
	3	slabšie klenutý
	2	nepravidelný tvar
	1	plochý tvar
Farba kôrky	5	typická farba, prirodzený lesk
	4	svetlejší alebo tmavší odtieň, lesklý povrch
	3	svetlá alebo tmavá farba bez lesku
	2	veľmi tmavý, veľmi svetlý odtieň
	1	spálený povrch
Vôňa kôrky/striedky	5	intenzívna a charakteristická vôňa
	4	mierne oslabená aróma
	3	slabá aróma
	2	takmer žiadna vôňa
	1	cudzí alebo rušivá aróma
Chuť kôrky/striedky	5	veľmi príjemná chuť
	4	klasická chuť typická pre žemle
	3	menej výrazná chuť
	2	kyslásty nádych
	1	neprirodzená, rušivá chuť
Pórovitosť striedky	5	rovnomé rozmiestnenie, jemné steny, póry strednej veľkosti
	4	menej rovnomerné rozmiestnenie, jemné steny, póry strednej veľkosti
	3	nepravidelná štruktúra, hrubšie steny, malé dutiny
	2	striedka sa drobí, hrubé steny, husté póry
	1	mazľavá konzistencia, striedka sa oddeľuje od kôrky, takmer bez pórov

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

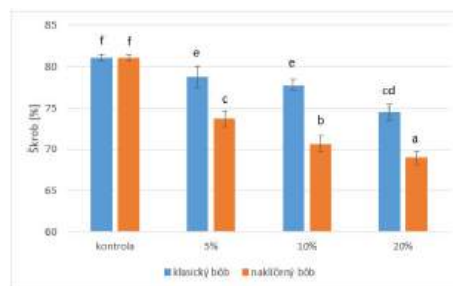
Farba striedky	5	typická, bežná farba
	4	jemný farebný nádych
	3	silnejší odtieň
	2	tmavšia farba než obvykle
	1	veľmi tmavá striedka
Tvrdosť striedky	5	výnimočne mäkká
	4	mäkšia než priemer
	3	stredná tvrdosť
	2	tvrdšia striedka
	1	veľmi tvrdá
Lepivosť striedky (pri dlhšom žutí k podnebiu)	5	takmer nelepivá, ľahko sa oddeľuje
	4	nízka lepivosť, striedka sa oddeľuje
	3	stredná lepivosť
	2	výrazná lepivosť
	1	veľmi lepivá, ťažko sa oddeľuje
Celkový dojem	5	výnimočne kvalitný výrobok
	4	veľmi dobrý dojem
	3	priemerná kvalita
	2	podpriemerný výsledok
	1	veľmi slabý celkový dojem

Výsledky analýzy vybraných nutričných parametrov bôbu obyčajného, ako aj percentuálne obsahu stanovovaných kvalitatívnych ukazovateľov v zmesných múkach a aj vo finálnych pekárenských výrobkoch, sme vyhodnotili štatisticky pomocou analýzy ANOVA a následne post hoc Tukeyho testom HSD (Honestly Significant Difference) pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$ pomocou štatistického programu IBM SPSS Statistics 22.0.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Vybrané kvalitatívne parametre vo vzorkách analyzovaných múk

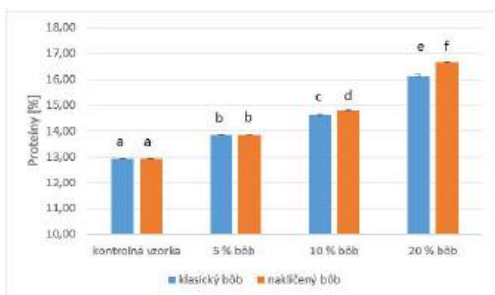
Priemerný percentuálny obsah škrobu v pšeničnej hladkej múke bol $81,10 \pm 0,35$ % (Graf 1). Pri zmesných múkach pripravených zo vzorky klasického bôbu obyčajného sme pozorovali pokles v obsahu škrobu až na $74,51 \pm 1,01$ % vo vzorke s 20 % bôbu. Klesajúcu tendenciu v obsahu škrobu so zvyšujúcim sa množstvom bôbu sme pozorovali aj pri vzorkách s prídavkom múky z naklíčeného bôbu v ešte výraznejšej miere, nakoľko sme vo vzorke s 20 % obsahom bôbu pozorovali $68,97 \pm 0,72$ % škrobu. Výsledky sme vyhodnotili aj štatisticky, pričom štatisticky významné rozdiely boli medzi všetkými múkami, okrem múk s 5 a 10 % obsahom klasického bôbu.



Graf 1 Grafické vyhodnotenie obsahu škrobu v analyzovaných múkach. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Klasický a naklíčený bôb boli analyzované samostatne.

K poklesu obsahu škrobu v zmesných múkach s pribúdajúcim množstvom bôbu dochádzalo v dôsledku nariadenia pšeničnej hladkej múky s bôbovou múkou, ktorá má viac ako o polovicu menej škrobu. Tento pokles bol zásadnejší pri múkach s prídavkom naklíčeného bôbu, nakoľko pri klíčení dochádza k rozkladu škrobu pomocou amylolytických enzýmov. Zmeny v obsahu škrobu v dôsledku klíčenia naznačujú aj výsledky z odbornej literatúry. Vo vzorkách sóje fazuľovej po 72 hodinách klíčenia došlo k poklesu obsahu škrobu o zhruba 4 % [5]. Uppal a Bains v štúdiu z roku 2012 tiež stanovili pokles v obsahu škrobu vo fazuliach mungo, v semenách cíceru baranieho aj vigny čínskej o 2 až 6 % [6].

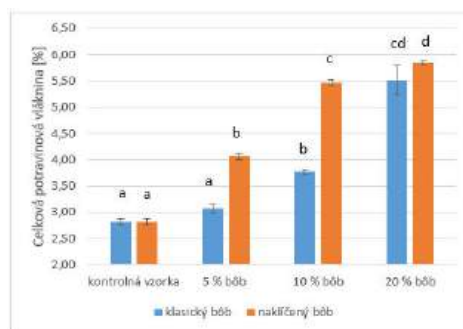
Obsah proteínov v kontrolnej vzorke múky bol na úrovni $12,92 \pm 0,02$ % (Graf 2). Pri zmesných múkach oboch typov sme so zvyšujúcou sa koncentráciou bôbu pozorovali aj zvyšujúcu sa koncentráciu proteínov, pričom hodnota proteínov u oboch typoch múk bola veľmi porovnateľná, avšak u múk z naklíčeného bôbu bola vyššia ($16,66 \pm 0,02$ % pri vzorke s 20 % obsahom) v porovnaní s múkami z klasického bôbu ($16,15 \pm 0,03$ % pri vzorke s 20 % obsahom). Výsledky sme aj štatisticky vyhodnotili a významné rozdiely sme stanovili medzi všetkými zmesnými múkami v porovnaní s kontrolnou vzorkou.



Graf 2 Grafické vyhodnotenie obsahu proteínov v analyzovaných múkach. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Klasický a naklíčený bôb boli analyzované samostatne.

Na rozdiel od škrobu, pri obsahu proteínov došlo v zmesných múkach k nárastu, nakoľko bôb obyčajný má podstatne vyšší obsah proteínov v porovnaní s pšeničnou múkou. Prídavkom bôbu s vyšším obsahom proteínov (28,71 %) teda dochádza k nárastu ich obsahu v zmesných múkach. Vyšší nárast je viditeľný pri múkach s naklíčeným bôbom, keďže pri klíčení dochádza k nárastu obsahu proteínov. Mitharwal a Chauhan (2022) zistili, že po 72 hodinovom klíčení čiernych sójových bôbov došlo k nárastu obsahu proteínov z 39,46 % na 43,30 % [5].

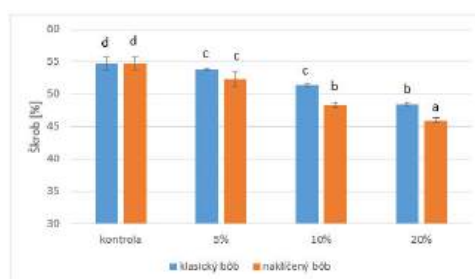
Obsah celkovej potravinovej vlákniny v pripravených zmesných múkach bol najnižší v kontrolnej pšeničnej hladkej múke ($2,82 \pm 0,06$ %) (Graf 3). S narastajúcou koncentráciou bôbovej múky oboch typov sme pozorovali aj nárast percentuálneho obsahu tohto kvalitatívneho parametra, pričom pri múkach z naklíčeného bôbu bol nárast výraznejší ($5,84 \pm 0,05$ % vo vzorke s 20 % obsahom) v porovnaní s múkami z klasického bôbu ($5,52 \pm 0,28$ % vo vzorke s 20 % obsahom). Výsledky sme vyhodnotili štatisticky, pričom významné rozdiely z hľadiska obsahu celkovej potravinovej vlákniny v porovnaní s kontrolnou vzorkou sme zaznamenali pri všetkých zmesných múkach okrem 5 % múky z klasického bôbu. S prídavkom bôbovej múky dochádza k nárastu obsahu vlákniny, nakoľko hladká pšeničná múka je na vlákninu veľmi chudobná, keďže je zbavená všetkých otrúb a klíčkov, zdrojov potravinovej vlákniny. Hladká pšeničná múka obsahuje len zhruba 4 % vlákniny [7].



Graf 3 Grafické vyhodnotenie obsahu celkovej potravinovej vlákniny v analyzovaných múkach. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Klasický a naklíčený bôb boli analyzované samostatne.

2.2 Vybrané kvalitatívne parametre vo vzorkách domácich kysnutých žemlí

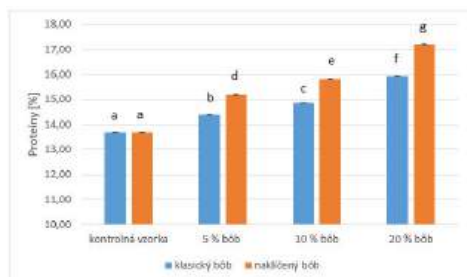
Žemľa pripravená z kontrolnej pšeničnej hladkej múky obsahovala $54,69 \pm 1,00$ % škrobu (Graf 4). So zvyšujúcou sa koncentráciou bôbovej múky sme pozorovali klesajúcu tendenciu v obsahu škrobu v oboch typoch vzoriek, avšak pri žemliach pripravených z múk z naklíčeného bôbu bol pokles obsahu škrobu výraznejší ($45,96 \pm 0,34$ % vo vzorke s 20 % obsahom) v porovnaní s múkami z nenaklíčeného bôbu ($48,46 \pm 0,28$ % vo vzorke s 20 % obsahom). Po štatistickom vyhodnotení sme významné rozdiely v obsahu škrobu v porovnaní s kontrolnou vzorkou pozorovali pri všetkých vzorkách. Avšak štatisticky významné rozdiely medzi múkami z klasického a naklíčeného bôbu sme pozorovali až pri múkach s 10 a 20 % obsahom.



Graf 4 Grafické vyhodnotenie obsahu škrobu v domácich kysnutých žemliach pripravených z analyzovaných múk. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

Prídavok bôbu ovplyvňuje fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu, ktoré zohrávajú významnú úlohu pri pečení a do veľkej miery ovplyvňujú aj reologické a štruktúrne vlastnosti finálnych výrobkov. Prídavok múky z bôbu môže zvýšiť teploty želatinizácie škrobu v porovnaní s kontrolou. Môže tiež znížiť želatinizačnú entalpiu v obohatených vzorkách, čo naznačuje zníženú schopnosť škrobu viazať vodu. Tiež môže znížiť teplotu retrogradácie škrobu, čo môže ovplyvniť textúru produktov, najmä cestovín, po uvarení [8]. Na pozitívne vlastnosti škrobu vplyva aj nakličovanie bôbových semien, ktoré po prídavku do funkčných potravín podstatne zvyšujú jeho *in vitro* stráviteľnosť [9].

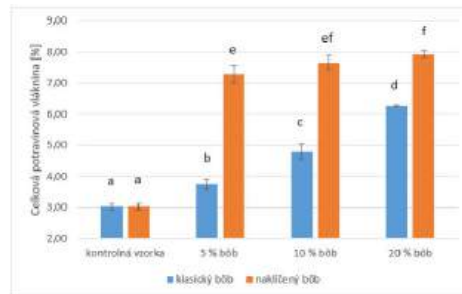
Ďalším stanovovaným parametrom vo vzorkách domácich kysnutých žemlí bol obsah proteínov (Graf 5). Vo vzorke pripravenej z kontrolnej pšeničnej hladkej múky sme zaznamenali najnižší obsah proteínov ($13,69 \pm 0,01$ %). Podobne ako pri škrобе, aj tu sme pozorovali so zvyšujúcou sa koncentráciou bôbu rastúcu tendenciu v obsahu proteínov v oboch typoch vzoriek - $15,93 \pm 0,01$ % (20 % bôb) a $17,20 \pm 0,04$ % (20 % nakličovaný bôb). Štatistickým vyhodnotením sme zistili štatisticky významné rozdiely z hľadiska obsahu proteínov v porovnaní s kontrolnou vzorkou vo všetkých vzorkách žemlí pripravených zo zmesných múk oboch typov.



Graf 5 Grafické vyhodnotenie obsahu proteínov v domácich kysnutých žemliach pripravených z analyzovaných múk. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

Obsah celkovej potravinovej vlákniny v domácich kysnutých žemliach pripravených z kontrolnej pšeničnej hladkej múky bol $3,03 \pm 0,10$ % (Graf 6). S rastúcim množstvom bôbu v pripravených žemliach sme pozorovali aj nárast tohto kvalitatívneho parametra pri vzorkách s obsahom klasického (20 % bôb = $6,28 \pm 0,03$ %) aj nakličovaného bôbu (20 % bôb = $7,92 \pm 0,11$ %). Vo všetkých vzorkách žemlí sme

pozorovali aj štatisticky významné rozdiely z hľadiska obsahu tohto ukazovateľa v porovnaní s kontrolnou vzorkou.



Graf 6 Grafické vyhodnotenie obsahu celkovej potravinovej vlákniny v domácich kysnutých žemliach pripravených z analyzovaných múk. Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (HSD – Honestly Significant Difference, hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

Naše výsledky z hľadiska zmien v obsahoch analyzovaných nutričných parametrov v upečených výrobkoch korešpondujú aj s výsledkami mnohých štúdií z odbornej literatúry. Napríklad Gangola a kol. (2022) pripravovali sucháre obohatené o múku z bôbu obyčajného. Zistili, že prídavkom 40 % bôbovej múky došlo k poklesu množstva škrobu z 61,8 % na 51,6 % a k nárastu obsahu proteínov (z 16,2 na 22,0 %), tuku (z 4,2 na 7,1 %) a celkovej potravinovej vlákniny (z 6,3 na 8,9 %) [10]. Na základe týchto výsledkov tiež možno predpokladať, že aj vyššie koncentrácie bôbovej múky než použité v našom experimente môžu pozitívne vplyvať na nutričné zloženie obohatených potravín.

2.3 Reologické a senzorické hodnotenie domácich kysnutých žemlí

V úvodnej fáze technologického procesu sme hodnotili správanie zmesných múk počas miesenia cesta v porovnaní s kontrolnou pšeničnou múkou. Cestá pripravené zo zmesných múk sa vyznačovali tmavším sfarbením, vyššou lepivosťou a náročnejšou manipuláciou v porovnaní s kontrolou. Počas kysnutia cesta sme nezaznamenali výrazné rozdiely v náraste objemu medzi vzorkami. Hmotnosť ciest sa pohybovala od 460 – 467 g, pri vzorkách s nakličovaným bôbom 470 – 474 g.

V ďalšej fáze sme hodnotili vplyv tepelného spracovania na vlastnosti finálnych výrobkov. Po upečení sa pri všetkých vzorkách, vrátane kontroly, objavili praskliny po bokoch žemlí. Nakoľko došlo k týmto povrchovým narušeniam a deformáciám pri

všetkých pripravených vzorkách, nemôžeme tento negatívny efekt pripísať použitiu bôbovej múky. Dôvodov, pre ktoré mohlo dôjsť k týmto povrchovým deformáciám je viacero. Jedným z nich môže byť nevhodný pomer medzi surovinami vo vodnej fáze v porovnaní so surovinami v pevnej fáze. Pravdepodobným problémom by mohlo byť väčšie množstvo vaječ používanej pri príprave cesta, ktoré mohlo príliš nariadiť samotné cesto. Existuje však mnoho faktorov, ktoré ovplyvňujú celkovú štruktúru pekárenských výrobkov a narušenie ich gluténovej siete, ako je rýchlosť miesenia cesta, množstvo soli, teplota pri pečení, vlhkosť pri pečení a mnohé iné. Na základe týchto vzniknutých deformácií teda bude v budúcnosti potrebné upraviť danú receptúru, aby sme sa vyhlili týmto negatívnym efektom a získali produkt, ktorý bude z hľadiska tvaru a štruktúry akceptovateľnejší finálnym konzumentom. Po skončení technologického procesu sme vo všetkých vzorkách vyhodnotili ich základné fyzikálne parametre, ako sú hmotnosť, dĺžka, šírka a výška. Medzi výrobkami sme nezistili významné rozdiely a hodnoty boli veľmi podobné bez ohľadu na použitý typ múky.

Upečené žemle pripravené s prídavkom múky z nenaklíčeného bôbu obyčajného pri pohľade zhora a pohľade z boku sú viditeľné na Obrázku 1.



Obr. 1 Upečené žemle s prídavkom múky z nenaklíčeného bôbu obyčajného pri pohľade zhora (horná časť obrázka) a z boku (dolná časť obrázka). Zľava: kontrolná vzorka; 5 % bôb; 10 % bôb; 20 % bôb.

Upečené žemle pripravené s prídavkom múky z naklíčeného bôbu obyčajného pri pohľade zhora a pohľade z boku sú viditeľné na Obrázku 2. Pri žemli s 20 % obsahom bôbu je viditeľné, že má tmavšiu kôrku v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Môže to byť spôsobené v dôsledku štiepenia škrobu amylolytickými enzýmami počas klíčenia bôbu na jednoduchšie cukry, ktoré v dôsledku Maillardových reakcií pri tepelnej úprave mohli ovplyvniť farbu finálneho výrobku [11].



Obr. 2 Upečené žemle s prídavkom múky z naklíčeného bôbu obyčajného pri pohľade zhora (horná časť obrázka) a z boku (dolná časť obrázka). Zľava: kontrolná vzorka; 5 % naklíčený bôb; 10 % naklíčený bôb; 20 % naklíčený bôb.

Upečené domáce kysnuté žemle sme následne prične rozrezali v strede a vizuálne hodnotili farbu striedky, úroveň pórovitosti, ako aj celkovú konzistenciu striedky, pričom žemle po rozkrojení sú viditeľné na Obrázku 3 (nenaklíčený bôb).



Obr. 3 Upečené žemle s prídavkom múky z klasického bôbu obyčajného po rozkrojení. Zľava: kontrolná vzorka; 5 % bôb; 10 % bôb; 20 % bôb.

Na Obrázku 4 sú viditeľné žemle po rozkrojení pripravené zo zmesných múk s obsahom múky z naklíčeného bôbu. V porovnaní s kontrolnou vzorkou sme pri žemliach s obsahom bôbovej múky pozorovali mierne tmavšie zafarbenie a bolo vidieť, ako žemle strácajú pórovitosť, resp. póry boli až príliš veľké. Takisto bolo viditeľné pri niektorých žemliach s vyšším obsahom bôbu, že striedka je mierne tuhšia v porovnaní s kontrolnou vzorkou.



Obr. 4 Upečené žemle s prídavkom múky z naklíčeného bôbu obyčajného po rozkrojení. Zľava: kontrolná vzorka; 5 % naklíčený bôb; 10 % naklíčený bôb; 20 % naklíčený bôb.

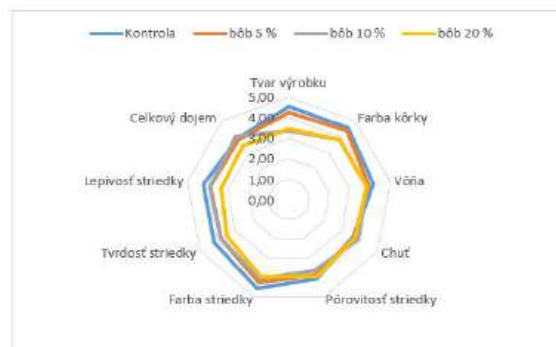
Fyzikálno-chemické vlastnosti múk, akými sú absorpcia vody, kapacita viazania oleja a kapacita zadržiavania vody sa s dĺžkou klíčenia zvyšujú, čo sú faktory, ktoré môžu pozitívne vplyvať aj na kvalitu finálneho výrobku [12]. Enzýmy, ktoré sa počas klíčenia podieľajú na rozklade škrobu a proteínov, ako napríklad α -amylázy a exoproteázy, tiež zohrávajú významnú úlohu pri ovplyvňovaní mnohých funkčných a

reologických vlastností chleba, akými sú vyšší špecifický objem, pórovitosť, ako aj vyššia pevnosť a svetlejšia farba kôrky [13]. V našom prípade sa to však nepotvrdilo, nakoľko sme nepozorovali zásadné zmeny v štruktúre našich pekárenských výrobkov s obsahom naklíčeného bôbu v porovnaní so žemľami s obsahom klasického bôbu.

V záverečnej fáze sme sa zamerali na sledovanie senzorických parametrov pripravených žemlí. Pri 5 % prídavku bôbovej múky sa prejavila jemná strukovinová chuť s pozitívnym vplyvom na celkový dojem. Pri 10 % podiele bola chuť výraznejšia, avšak bez negatívneho vplyvu na textúru, lepivosť či tvrdosť. Výraznejšie zmeny sa prejavili pri 20 % podiele bôbovej múky, kde bola strukovinová chuť a aróma intenzívna a menej prijateľná. Táto intenzita bola miernejšia pri vzorke z 20 % naklíčeného bôbu, nakoľko pri klíčení mohlo dôjsť k zníženiu obsahu trieslovín a iných aromatických látok, ako sú napríklad hexanal, nonanal, 2-heptanón a 2-pentylfurán [14], čo mohlo mať pozitívny efekt na senzorické vlastnosti. V porovnaní so zvyšnými vzorkami sme pri žemli s 20 % obsahom bôbu pozorovali lepivejšiu striedku a žemľa bola tvrdšia a suchšia v porovnaní s predchádzajúcimi.

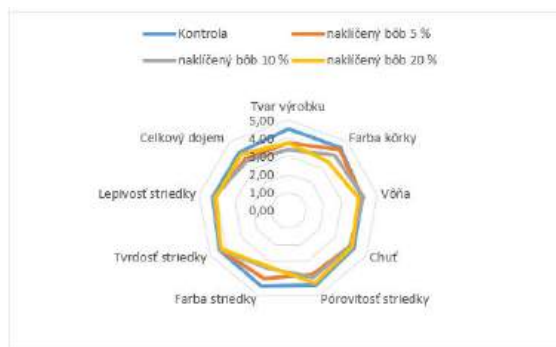
2.4 Dotazník senzorického hodnotenia domácich kysnutých žemlí

Najvyšší priemerný počet bodov získala kontrolná vzorka zo pšeničnej múky (37,80) (Graf 7). So zvyšujúcou sa koncentráciou bôbovej múky vo vzorke sme pozorovali klesajúcu tendenciu v priemernom počte dosiahnutých bodov, kde najnižší počet bodov dosiahla vzorka s 20 % obsahom bôbovej múky (33,13). Ako je viditeľné aj na grafe, nižší počet bodov v porovnaní s kontrolnou vzorkou sme zaznamenali hlavne pri ukazovateľoch, ako je tvar výrobku, farba a vôňa. Vyšší priemerný počet bodov u vzoriek s obsahom bôbovej múky v porovnaní s kontrolou sme pozorovali iba pri chuti. Najvyšší priemerný počet bodov za celkový dojem z výrobku dosiahla vzorka s 10 % obsahom bôbovej múky (4,00).



Graf 7 Celkové výsledky senzorického hodnotenia domácich kysnutých žemlí s 5 – 20 % prídavkom múky zo semien bôbu obyčajného.

Žemle s 5 % podielom naklíčenej bôbovej múky dosiahli 36,18 bodov, pri 10 % podiele naklíčenej 34,96 bodov a pri 20 % podiele 35,11 bodu, teda viac než 10 % vzorka (Graf 8). Rozdiely oproti kontrolnej vzorke sa prejavili pri rovnakých ukazovateľoch ako pri nenaklíčenom bôbe, pričom kontrola dosiahla najvyššie priemerné hodnoty vo všetkých parametroch. Najviac porovnateľné výsledky sme dosiahli pri vôni, chuti, tvrdosti a lepivosti striedky. Na rozdiel od klasickej bôbovej múky dosiahla vzorka z 20 % naklíčenej bôbovej múky vyššie hodnotenie než 10 % vzorka. Kontrolná vzorka zároveň získala najvyššie hodnotenie za celkový dojem (4,20).



Graf 8 Celkové výsledky senzorického hodnotenia domácich kysnutých žemlí s 5 – 20 % prídavkom múky z naklíčených semien bôbu obyčajného.

Záver

Zistili sme, že so zvyšujúcim sa podielom nenaklíčeného aj naklíčeného semena bôbu v zmesných múkach klesal obsah škrobu a zvyšoval sa obsah proteínov a celkovej potravinovej vlákniny. Z nutričného hľadiska dosahovali priaznivejšie hodnoty múky s obsahom naklíčeného bôbu.

Zistili sme, že po upečení domácich kysnutých žemlí sme v porovnaní so zmesnými múkami zaznamenali pokles v obsahu škrobu a nárast v obsahu proteínov a celkovej potravinovej vlákniny. Tieto zmeny boli výraznejšie vo vzorkách s obsahom naklíčeného bôbu v porovnaní s nenaklíčeným.

Po vyhodnotení dotazníku senzorickeho hodnotenia pripravených finálnych výrobkov sme zistili, že najlepšie výsledky v porovnaní s kontrolou z hľadiska bodového hodnotenia dosiahli žemle s prídavkom 5 % nenaklíčeného aj naklíčeného bôbu.

Podakovanie

Predložená práca bola financovaná zo zdrojov MPRV SR v rámci riešenia úlohy VaV „Potenciál znižovania rizík v udržateľných pestovateľských postupoch“ a vďaka podpore projektu č. APVV-23-0375 Agentúrou na podporu výskumu a vývoja Slovenskej republiky.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MENG, Yantong; LI, Siqi; KHAN, Jabir; DAI, Zijian, LI, Chang et al. (2021). Sugar- and artificially sweetened beverages consumption linked to type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and all-cause mortality: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrients*, vol. 13, no. 8. ISSN 2072-6643.
- [2] TEMPLE, Norman J. 2022. A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers in Nutrition*, vol. 9, 957516. ISSN 2296-861X.
- [3] ATUDOREI, Denisa; STROE, Silviu-Gabriel; CODINA, Georgiana Gabriela. 2020. Physical, physiological and minerals changes of different legumes types during the germination process. *Ukrainian Food Journal*, vol. 9, no. 4. ISSN 2313-5891.
- [4] ANAEMENE, Doris – FADUPIN, Grace. 2022. Anti-nutrient reduction and nutrient capacity of fermentation, germination and combined germination-fermentation in legume processing. *Applied Food Research*, vol. 2, no. 1. ISSN 2772-5022.
- [5] MITHARWAL, Swati – CHAUHAN, Komal 2022. Impact of germination on the proximate composition, functional properties, and structural characteristics of black soybean (*Glycine max* L. Merr). *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 46, no. 12. ISSN 1745-4549.
- [6] UPPAL, Veny – BAINS, Kiran. 2012. Effect of germination periods and hydrothermal treatments on in vitro protein and starch digestibility of germinated legumes. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, no. 2. ISSN 0975-8402.
- [7] SHEWRY, Peter R.; PRINS, Anneke; KOSIK, Ondrej; LOVEGROVE, Alison. 2024. Challenges to increasing dietary fiber in white flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 72, no. 24. ISSN 1520-5118.
- [8] TAZRART, Karima; ZAIDI, Farid; SALVADOR, Ana; HAROS, Claudia Monika. 2019. Effect of broad bean (*Vicia faba*) addition on starch properties and texture of dry and fresh pasta. *Food Chemistry*, vol. 278. ISSN 1873-7072.
- [9] SETIA, Rashim; DAI, Zhixin; NICKERSON, Michael T.; SOPIWNYK, Elaine; MALCOLMSON, Linda et al. 2019. Impacts of short-term germination on the chemical compositions, technological characteristics and nutritional quality of yellow pea and faba bean flours. *Food Research International*, vol. 122. ISSN 1873-7145.
- [10] GANGOLA, Manu Pratap; RAMADOSS, Bharathi Raja; JAISWAL, Sarita; FABEK, Hrvoje; TULBEK, Mehmet et al. 2022. Nutritional composition and *in vitro* starch digestibility of crackers supplemented with faba bean whole flours, starch concentrate, protein concentrate and protein isolate. *Foods*, vol. 11, no. 5. ISSN 2304-8158.
- [11] ATUDOREI, Denisa; ATUDOREI, Olivia and CODINA, Georgiana Gabriela. 2022. The impact of germinated chickpea flour addition on dough rheology and bread quality. *Plants*, vol. 11, no. 9. ISSN 2223-7747.
- [12] LIU, Yu; XU, Meijuan; JING, Luzhen; GONG, Bing; GOU, Min et al. 2018. The compositional, physicochemical and functional properties of germinated mung bean flour and its addition on quality of wheat flour noodle. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 55, no. 12. ISSN 0975-8402.
- [13] KOSTYUCHENKO, M.; MARTIROSYAN, V.; NOSOVA, M.; DREMUCHEVA, G.; NEVSKAYA, E. et al. 2021. Effects of α -amylase, endo-xylanase and exoprotease combination on dough properties and bread quality. *Agronomy Research*, vol. 19, no. S3. ISSN 1406-894X.
- [14] AKKAD, Rami; BUCHKO, Amanda; JOHNSTON, Stuart P.; HAN, Jay; HOUSE, James D. et al. 2021. Sprouting improves the flavour quality of faba bean flours. *Food Chemistry*, vol. 364. 130355. ISSN 1873-7072.

Adaptácia salicylátovej metódy na stanovenie koncentrácie amónnych iónov v rámci fermentačnej produkcie poly-3-hydroxybutyrátu baktériami druhu *Cupriavidus necator*

Adaptation of the salicylate method for the determination of ammonium ion concentration in the fermentation production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*

Ľubomíra Jurečková¹ – Daniela Chmelová² – Miroslav Ondrejovič³

^{1,2,3}Oddelenie biotechnológií, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹jureckova1@ucm.sk, ²daniela.chmelova@ucm.sk, ³miroslav.ondrejovic@ucm.sk

Abstrakt

Baktérie druhu *Cupriavidus necator*, ako aj mnohí ďalší producenti, akumulujú polyhydroxyalkanoáty pri limitácii zdroja dusíku v kultivačnom médiu. Preto je kontrola koncentrácie dusíku počas kultivácie *C. necator* kľúčovým faktorom vhodným pre riadenie akumulácie P3HB. Ako vhodná metóda na stanovenie amónnych iónov v kultivačnom médiu sa javí salicylátová metóda. Preto cieľom našej práce bolo adaptovať metódu pre stanovenie amónnych iónov v médiu využívanom na produkciu P3HB baktériami druhu *C. necator* a vyhodnotiť možný interferenčný vplyv prítomných minerálnych zložiek. Experimentálne sme dokázali, že stanovenie je potrebné rozdeliť na dva kroky, pričom v prvom kroku je zmiešaná vzorka s reagensiou 1 a až po 30 minútach inkubácie pri laboratórnej teplote je vhodné do reakcie pridať reagensiu 2. Takto realizovaná analýza nebola ovplyvnená žiadnou zo zložiek minerálneho média využívaného pre kultiváciu *C. necator*. Vhodnosť upravenej salicylátovej metódy sme overili pri stanovení obsahu síranu amónneho v médiu po 48-hodinovej kultivácii *C. necator*.

Kľúčové slová: *Cupriavidus necator* DSM 545, dusík, fermentácia, poly-3-hydroxybutyrát, salicylát sodný

Abstract

Bacteria *Cupriavidus necator*, as well as many other microbial producers, accumulate polyhydroxyalkanoates under conditions of nitrogen limitation in the cultivation medium. Therefore, precise control of nitrogen concentration during *C. necator* cultivation represents a key parameter for regulating P3HB accumulation. The salicylate method appears to be a suitable analytical approach for the determination of ammonium ions in the cultivation medium. The aim of this study was to adapt the method for the determination of ammonium ions in the medium used for P3HB production by *C. necator* and to evaluate the potential interference caused by the mineral components present in the medium. Our

experimental results demonstrated that the analytical procedure must be divided into two sequential steps. In the first step, the sample is mixed with reagent 1, followed by a 30-minute incubation at room temperature, subsequently, reagent 2 is added to the reaction mixture. When performed under these conditions, the analysis was not affected by any of the components of the mineral medium used for *C. necator* cultivation. The suitability of the modified salicylate method was validated by determining the ammonium sulfate concentration in the medium after 48 hours of *C. necator* cultivation.

Keywords: *Cupriavidus necator* DSM 545, nitrogen, fermentation, poly-3-hydroxybutyrate, sodium salicylate

Úvod

Akumulácia plastového odpadu v životnom prostredí v súčasnosti predstavuje jednu z najväčších environmentálnych výziev 21. storočia, pričom ich hromadenie má výrazný negatívny dopad tak na život človeka, ako aj život iných živých organizmov. S cieľom eliminovať negatívny environmentálny charakter týchto plastov, vzhľadom na narastajúcu svetovú produkciu syntetických plastov, ktorá vzrástla 230-násobne v porovnaní s ich produkciou v polovici 20. storočia [1], sa pozornosť súčasného výskumu zameriava na hľadanie environmentálne prijateľnejších alternatív.

Vhodnou alternatívou k syntetickým plastom na báze ropných produktov je skupina biopolymérov označovaných ako polyhydroxyalkanoáty (PHA). V súčasnosti najviac študovaným zástupcom PHA je poly-3-hydroxybutyrát (P3HB), ktorý okrem svojich priaznivých vlastností, akými sú biokompatibilita, biodegradovateľnosť, netoxickosť, hydrofóbnosť a nepriepustnosť pre plyny, disponuje technologickými vlastnosťami najviac porovnateľnými s polypropylénom (PP) [2].

P3HB je biopolyester produkovaný rôznymi druhmi mikroorganizmov v podobe intracelulárnych granúl sférického tvaru slúžiacich ako zásoba zdroja uhlíka a energie. Počet a veľkosť granúl P3HB v produkčných bunkách je závislý tak od genotypu⁵⁴⁹

producenta, ako aj kultivačných podmienok [3, 4, 5, 6]. Spomedzi prirodzených mikrobiálnych producentov P3HB si najväčšiu pozornosť získal bakteriálny druh *Cupriavidus necator*, schopný akumulácie P3HB až do 80% (w/w) suchej hmotnosti biomasy [7, 8, 9, 10]. K syntéze P3HB v bunkách baktérií *C. necator* dochádza za nepriaznivých environmentálnych podmienok. Preto sa najčastejšie produkcia P3HB realizuje pri absencii niektorej zo základných živín, akými sú dusík, fosfor, horčík a síra. Menej často sa uvádza zvýšenie osmotického tlaku alebo navodenie anaeróbných podmienok. Dôležité je, aby bol v kultivačnom prostredí prítomný zdroj uhlíku v dostatočnom množstve [11, 12, 13, 14].

Na základe výsledkov dosiahnutých vo viacerých experimentálnych článkoch je zjavné, že pre priemernú produkciu P3HB baktériami druhu *C. necator* je vhodné použiť dvoj krokovú fermentáciu. Uvedený spôsob fermentácie pozostáva z dvoch ľahko od seba odlišiteľných fáz [15, 16, 17, 18]. Prvá, propagačná fáza produkcie, je zameraná na rast biomasy producenta v nutrične vyváženom kultivačnom médiu. Biomasa získaná pri týchto podmienkach disponuje len minimálnym obsahom P3HB vo svojom intracelulárnom priestore. Kľúčovým aspektom determinujúcim prechod z propagačnej fázy fermentácie do druhej, produkčnej fázy, je obmedzenie niektorej zo základných živín, najčastejšie zdroja dusíka prítomného vo forme amónnych iónov. V produkčnej fáze fermentácie je koncentrácia reziduálnej bunkovej biomasy (z *angl.* non-PHA cell mass = NPCM), takmer konštantná, pričom dochádza práve k zvyšovaniu koncentrácie P3HB v produkčných bunkách. Vzhľadom na kľúčovú úlohu koncentrácie zdroja dusíka v procese biosyntézy P3HB je nevyhnutné efektívne monitorovanie spotreby zdroja dusíka v rámci fermentačnej produkcie P3HB baktériami druhu *C. necator*.

Na základe dostupnej literatúry máme niekoľko možností stanovenia koncentrácie zdroja dusíka vo fermentačnom médiu, a to pomocou kolorimetrických metód [19], metódou podľa Kjeldahla [20, 21], použitím ión-selektívnych elektród [19, 22, 23], iónovo-výmennej chromatografie [24, 25], infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou [26], ako aj pomocou ^1H NMR spektroskopie [27]. V súčasnosti najviac využívanými metódami stanovenia amónnych iónov sú práve kolorimetrické metódy vzhľadom na ich dostupnosť, finančnú nenáročnosť, jednoduchú realizáciu a medzu stanovitelnosti. Medzi kolorimetrické metódy využívané na stanovenie amónnych iónov patrí Nesslerova metóda [19, 28, 29], indofenolová metóda založená na Berthelotovej reakcii, ako aj salicylátová metóda, ktorá vznikla modifikáciou Berthelotovej reakcie nahradením fenolu salicylátom sodným. Hlavným úskalím tak Nesslerovej, ako aj indofenolovej metódy je prítomnosť problematických zložiek reagensí, a to ortuti v rámci Nesslerovho činidla a fenolu pri indofenolovej metóde. Ako vhodná a environmentálne

prijateľnejšia alternatíva k uvedeným metódam sa preto javí práve salicylátová metóda, v ktorej sa namiesto fenolu využíva ako fenolová zlúčenina salicylát sodný. Účinnosť a efektívnosť uvedenej metódy však závisí od viacerých parametrov, akými sú koncentrácia jednotlivých zložiek reakčnej zmesi, reakčná doba a prítomnosť minerálnych zložiek v analyzovaných vzorkách. Preto cieľom uvedenej práce bolo hodnotiť vplyv zloženia a koncentrácie zložiek reakčnej zmesi, ako aj možnú interferenciu s anorganickými zložkami kultivačného média za účelom adaptácie metodického postupu na kvantitatívne stanovenie koncentrácie zdroja dusíka v médiách používaných na fermentačnú produkciu P3HB baktériami druhu *C. necator*.

1 Materiál a metódy

1.1 Produkčný organizmus

Bakteriálnu kultúru *Cupriavidus necator* DSM 545 sme získali z Nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr GmbH (DSMZ, Nemecko). Baktérie sme uchovávali na mäsopeptónovom agare (MPA) s 1% (w/v) prídavkom agaru, pričom v pravidelných 7-dňových intervaloch sme kultúru preniesli na čerstvé MPA médium.

1.2 Kolorimetrické stanovenie koncentrácie amónnych iónov

1.2.1 Zloženie reakčnej zmesi

Pri identifikácii vplyvu prítomnosti nitroprusidu sodného na priebeh kolorimetrického stanovenia amónnych iónov sme k roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 μl) v koncentračnom rozmedzí 10 – 1 000 mg/l pridal reagensiu 1A alebo 1B (100 μl), pričom reagensia 1A obsahovala salicylát sodný (200 mmol/l) a nitroprusid sodný (1 mmol/l), ktorých zásobné roztoky sme bezprostredne pred reakciou zmiešali v pomere 1:1 (v/v), a reagensia 1B bola tvorená len roztokom salicylátu sodného v koncentrácii 400 mmol/l.

Takto pripravenú reakčnú zmes sme inkubovali počas 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne sme pridal 50 μl reagensie 2 (roztok chlórnanu sodného v 0,5 mol/l roztoku NaOH s obsahom približne 0,44% aktívneho chlóru). Mikrotitračnú platničku sme prekryli transparentnou fóliou a počas 60 minút sme kontinuálne merali absorbančiu pripraveného roztoku pri vlnovej dĺžke 630 nm.

1.2.2 Vplyv koncentrácie salicylátu sodného na priebeh reakcie

S cieľom hodnotiť vplyv rôznej koncentrácie salicylátu sodného (zložka reagensie 1) na priebeh reakcie sme k roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 μl) v koncentračnom rozmedzí 10 – 100 mg/l pridal reagensiu obsahujúcu roztok salicylátu sodného s koncentráciou 12,5 – 200 mmol/l a roztok nitroprusidu sodného s koncentráciou 1 mmol/l, ktorých zásobné roztoky sme bezprostredne

pred reakciou zmiešali v pomere 1:1 (v/v).

Reakciu sme nechali prebiehať počas 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne sme pridali 50 µl reagentie 2 (roztok chlórnanu sodného v 0,5 mol/l roztoku NaOH s obsahom približne 0,44% aktívneho chlóru). Mikrotitračnú platničku sme prekryli transparentnou fóliou a po uplynutí 15 minút sme stanovili absorbanciu pripraveného roztoku pri vlnovej dĺžke 630 nm.

1.2.3 Stanovenie vplyvu anorganických zložiek kultivačného média na kolorimetrické stanovenie

Vplyv anorganických zložiek kultivačného média na kolorimetrické stanovenie koncentrácie amónnych iónov pomocou salicylátovej metódy sme hodnotili pri vybraných koncentráciách fosforečnanov (20 – 100 mmol/l), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,05 – 0,80 g/l) a citronanu železito-amónneho (0,0125 – 0,2000 g/l). Okrem uvedených zložiek obsahovali modelové vzorky $(NH_4)_2SO_4$ v koncentrácii 0,8 g/l a glukózu v koncentrácii 30 g/l. Takto pripravené vzorky sme následne narieslili (8x, 10x, 16x, 20x a 40x) za účelom vytvorenia hodnotiteľného koncentračného gradientu nášho analytu.

V mikrotitračnej platničke sme 100 µl takto pripravených roztokov zmiešali s reagentiou 1, obsahujúcou vodný roztok salicylátu sodného (25 mmol/l) a vodný roztok nitroprusidu sodného (1 mmol/l), ktorých zásobné roztoky sme bezprostredne pred analýzou zmiešali v pomere 1:1 (v/v). Po uplynutí 30 minút inkubácie reakčnej zmesi pri laboratórnej teplote sme pridali 50 µl reagentie 2 (roztok chlórnanu sodného v 0,5 mol/l roztoku NaOH s obsahom približne 0,44% aktívneho chlóru). Mikrotitračnú platničku sme prekryli transparentnou fóliou a po uplynutí 15 minút sme stanovili absorbanciu pripraveného roztoku pri vlnovej dĺžke 630 nm.

1.2.4 Stanovenie amónnych iónov v reálnych vzorkách

Na overenie metódy stanovenia v reálnych vzorkách sme použili kultivačné médium po fermentácii *C. necator* pripravené podľa Jurečková a kol. (2023) [30]. Kultivačné médium pozostávalo z roztoku minerálnych zložiek (7,69 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$; 2,85 g/l KH_2PO_4 ; 2,70 g/l $(NH_4)_2SO_4$; 0,20 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,05 g/l citronan železito-amónny), pričom ako zdroj uhlíka sme využili glukózu v koncentrácii 15 g/l. Hodnotu pH kultivačného média sme nastavili na pH 7,1.

Pripravené kultivačné médiá sme sterilizovali v autokláve pri 121°C počas 20 minút, pričom zdroj uhlíka sme sterilizovali oddelene. Kultivačné médiá sme následne očkovali v pomere 1:60 (v/v) bakteriálnou suspenziou *C. necator* s optickou hustotou buniek ekvivalentnou 5,3 McFarlandových jednotiek (z angl. McFarland unit = MFU). Fermentácia prebiehala dynamickým spôsobom pri teplote 30°C počas 48-hodín.

Po ukončení fermentácie sme biomasu *C. necator* odstredili pri 10 000 rpm počas 5 minút, pričom získaný supernatant sme následne 50-krát narieslili destilovanou vodou. Takto narieslené vzorky sme analyzovali postupom uvedeným v Kapitole 1.2.3. Výslednú koncentráciu amónnych iónov sme vypočítali na základe kalibračnej krivky zostrojenej pre štandardné roztoky $(NH_4)_2SO_4$ v koncentračnom rozsahu 10 – 100 mg/l.

Na overenie správnosti získaných výsledkov sme využili metódu štandardného prídavku, pri ktorej sme k supernatantu získanému po odstredení biomasy *C. necator* pridali roztok $(NH_4)_2SO_4$ v koncentrácii 1,0 g/l v pomere 1:1 (v/v). Pripravený roztok sme následne 50-krát narieslili destilovanou vodou a analyzovali postupom uvedeným v Kapitole 1.2.3. Výslednú koncentráciu amónnych iónov sme vypočítali na základe kalibračnej krivky zostrojenej pre štandardné roztoky $(NH_4)_2SO_4$ v koncentračnom rozsahu 10 – 100 mg/l.

1.3 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Všetky nami namerané výsledky sme analyzovali a vyhodnotili pomocou programu Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Každý experiment bol realizovaný v troch paralelných meraniach.

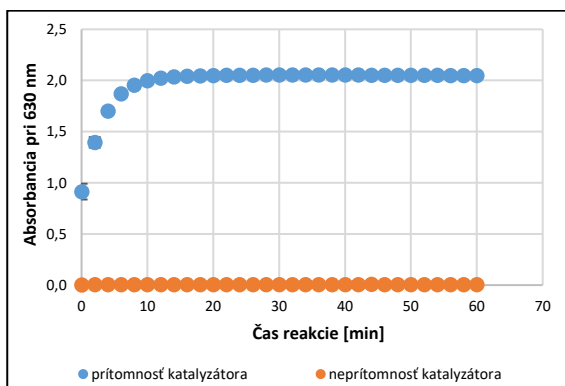
2 Výsledky a diskusia

2.1 Kolorimetrické stanovenie koncentrácie amónnych iónov

2.1.1 Zloženie reakčnej zmesi

Nitroprusid sodný v Berthelotovej reakcii plní funkciu katalyzátora reakcie. Avšak porovnaním metodických postupov uvádzaných v experimentálnych článkoch využívajúcich Berthelotovu reakciu pre stanovenie koncentrácie amónnych iónov je zrejme, že kým niektoré autorské kolektívy uvádzajú nitroprusid sodný ako súčasť reakčnej zmesi [31, 32, 33, 34, 35, 36], iní jeho použitie neuvádzajú [37]. Preto sme sa rozhodli overiť potrebu prítomnosti nitroprusidu sodného v reakčnej zmesi na priebeh stanovenia amónnych iónov salicylátovou metódou. Pri tomto stanovení sme využili roztok salicylátu sodného s koncentráciou 200 mmol/l a síranu amónneho s koncentráciou 30 mg/l. Výsledky sú uvedené na Grafe 1.

Na základe našich výsledkov uvedených na Grafe 1 je zrejme, že v prípade absencie nitroprusidu sodného ako ko-zložky reagentie 1 nedochádza k vzniku modro-sfarbeného komplexu po prídavku reagentie 2. Preto sme nitroprusid sodný v koncentrácii 1 mmol/l používali vo všetkých nasledujúcich experimentoch. Nami navrhnuté zloženie reakčnej zmesi pozostávajúcej z dvoch postupne pridávaných reagentí je v súlade s literatúrou [32, 33, 35].



Graf 1 Kinetika zmeny absorbčnej odozvy reakčnej zmesi pri stanovení amónnych iónov salicylátovou metódou v závislosti od prítomnosti nitroprusidu sodného ako katalyzátora.

2.1.2 Vplyv koncentrácie salicylátu sodného na priebeh reakcie

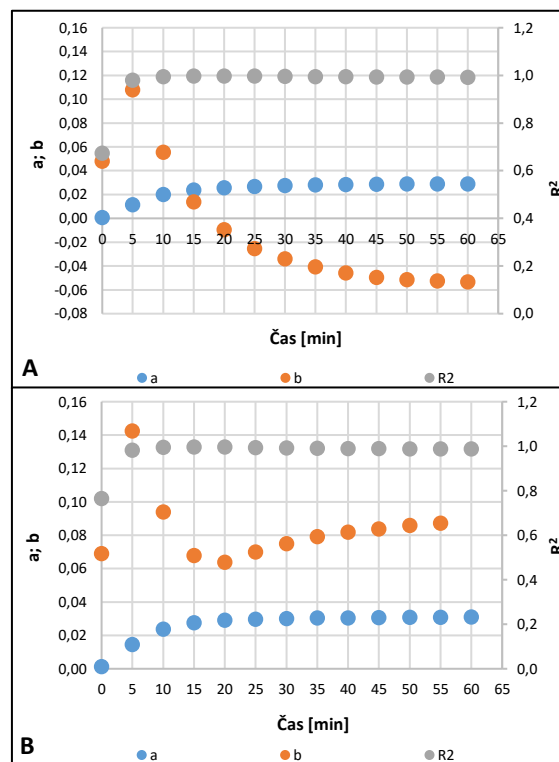
V literatúre sa stretávame so širokou škálou využívaných koncentrácií salicylátu sodného pri detekcii amónnych iónov [31, 32, 33, 34, 35, 36]. Preto sme hodnotili vplyv koncentrácie salicylátu sodného v koncentračnom rozsahu 12,5 až 200 mmol/l na odozvu získanú pri stanovení roztokov síranu amónneho v koncentračnom rozsahu 10 až 100 mg/l. Experiment sme hodnotili na základe smernice (a), absolútnej hodnoty (b) a koeficientu determinácie (R^2) vytvorenej lineárnej závislosti absorbčnej odozvy roztokov pri vlnovej dĺžke 630 nm od koncentrácie analytu. Výsledky experimentov sú uvedené v Tabuľke 1.

c_n [mmol/l]	a	b	R^2
200	0,0343	0,7569	0,8995
100	0,0358	0,4049	0,9576
50	0,0327	0,1511	0,9906
25	0,0274	0,0677	0,9958
12,5	0,0238	0,0137	0,9967

Tabuľka 1 Experimentálne získané hodnoty závisle premenných, a to smernice (a), absolútnej hodnoty (b) a koeficientu determinácie (R^2) lineárnej regresie vytvorenej lineárnej závislosti absorbčnej odozvy roztokov pri vlnovej dĺžke 630 nm od koncentrácie analytu po 15 minútach inkubácie pri laboratórnej teplote od prídavku reagentu 2 do reakčnej zmesi, pričom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bol v koncentračnom rozsahu 10 – 100 mg/l.

Na základe našich výsledkov môžeme uviesť, že s klesajúcou východiskovou koncentráciou salicylátu sodného v reakčnej zmesi dochádza tak k poklesu smernice z 0,03 pri 200 mmol/l až po 0,02 pri 12,5 mmol/l salicylátu sodného, ako aj absolútnej hodnoty (b). Okrem toho je zjavné, že so znižovaním koncentrácie salicylátu sodného dochádza k zvyšovaniu koeficientu determinácie (R^2), čo naznačuje lepší opis závislosti medzi koncentráciou síranu amónneho (analytu danej metódy stanovenia)

a absorbčnou odozvou hodnotenou pomocou mikroplatničkového čítača. Na základe týchto výsledkov sme vybrali koncentrácie salicylátu sodného (12,5 a 25 mmol/l), v prípade ktorých sme vykonali kinetickú analýzu prebiehajúcej reakcie. Výsledky hodnotenia kinetiky stanovenia pri vybraných koncentráciách salicylátu sodného je možné vidieť na Grafe 2.



Graf 2 Vplyv východiskovej koncentrácie salicylátu sodného 12,5 mmol/l (A) a 25 mmol/l (B) na hodnotené závisle premenné, a to smernicu (a), absolútnu hodnotu (b) a koeficient determinácie (R^2) pri lineárnej regresii.

Z priebehu kinetiky je evidentné, že v reakčnej zmesi po pridaní reagentu 2 dochádza k dvom fázam reakcie. V prvej fáze reakcie je možné sledovať zvýšenie absolútnej hodnoty (b) lineárnej regresie kalibrácie amónnych iónov až do doby ustálenia hodnoty smernice (a) tejto regresie. Následne nastáva druhá fáza reakcie, ktorá je typická poklesom absolútnej hodnoty (b) lineárnej regresie kalibrácie amónnych iónov. Vzhľadom na výrazný prejav druhej fázy pri 12,5 mmol/l koncentrácii salicylátu sodného (Graf 2A) aj po ustálení hodnoty smernice (a) lineárnej regresie kalibrácie amónnych iónov sme ako východiskovú koncentráciu salicylátu sodného pre naše ďalšie experimenty zvolili 25 mmol/l, pričom pri tejto koncentrácii je vhodné reakčnú zmes po prídavku 2. reagentu inkubovať 15 minút pri laboratórnej teplote. Vzhľadom na rozsiahlu variabilitu koncentrácií salicylátu sodného uvádzaných v experimentálnych článkoch, ako aj metodických prístupov k uvedenej metodike sa líši aj doba priebehu reakcie do vytvorenia stabilného farebného produktu od 20 až do 60 minút [31, 32, 35]. Nami dosiahnuté výsledky sú najviac

porovnateľné s metodickým postupom, ktorý vo svojej práci využili Cogan a kol. (2014) [32]. Na základe ich výsledkov určili, že vhodná doba reakcie je 20 minút a koncentrácia salicylátu sodného 172,5 mmol/l, avšak ich reakčné prostredie netvorila destilovaná voda ako v našom prípade, ale 0,5 mol/l NaOH [32].

2.1.3 Stanovenie vplyvu anorganických zložiek kultivačného média na kolorimetrické stanovenie

Na základe literatúry je možné predpokladať interferenciu pri stanovení amónnych iónov salicylátovou metódou v našich kultivačných médiách predovšetkým vplyvom anorganických zložiek [32]. Preto sme hodnotili vplyv zložiek minerálneho média ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, citronan železito-amónny) v koncentráciách, v ktorých sa môžu vyskytovať pri produkcii P3HB baktériami druhu *C. necator* na základe zmeny smernice (a) a absolútnej hodnoty (b) lineárnej regresie kalibrácie pre štandardné roztoky $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v koncentračnom rozsahu 10 – 100 mg/l. Výsledky sú uvedené v Tabuľke 2.

Ko-zložka média	Koncentrácia	a	b
C (PO_4^{3-}) [mM]	20	0,0248	0,2689
	40	0,0248	0,2656
	60	0,0245	0,2927
	80	0,0245	0,2581
	100	0,0248	0,2666
C ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) [g/l]	0,05	0,0252	0,2555
	0,1	0,0253	0,2199
	0,2	0,0256	0,2251
	0,4	0,0251	0,2576
	0,8	0,0258	0,1917
C (citronan železito-amónny) [g/l]	0,0125	0,026	0,1797
	0,025	0,0243	0,2845
	0,05	0,0248	0,2757
	0,1	0,0248	0,2656
	0,2	0,0247	0,3514
Kontrola	-	0,0238	0,0137

Tabuľka 2 Experimentálne získané hodnoty závisle premenných, a to smernice (a) a absolútnej hodnoty (b) lineárnej regresie po 15 minútach po prídavku reagentu 2 do reakčnej zmesi, pričom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bol v koncentračnom rozsahu 10 – 100 mg/l.

Porovnaním nami získaných experimentálnych dát je zrejmé, že v prípade našich anorganických zložiek kultivačného média nepozorujeme významný vplyv na smernicu lineárnej regresie stanovenia amónnych iónov pomocou salicylátovej metódy. Cogan a kol. (2014) [32] vo svojej experimentálnej práci popisuje pri fosforečnanových iónoch interferenciu na úrovni 1,52% zistenej odchýlky merania, pričom pri iónoch železa je to len na úrovni 0,78%. Najvyššiu mieru interferencie pozorovali

pri iónoch medi, na úrovni 33,02%, ktoré však nie sú súčasťou nami využívaného kultivačného média.

2.1.4 Stanovenie amónnych iónov v reálnych vzorkách

Za účelom overenia možnosti implementácie nami adaptovaného metodického prístupu na kvantifikáciu amónnych iónov vo fermentačnom médiu používanom na produkciu P3HB baktériami druhu *C. necator* sme v kultivačnom médiu získanom po 48-hodinovej fermentácii stanovili koncentráciu amónnych iónov. Na základe našich výsledkov sme stanovili koncentráciu amónnych iónov 2,2 g/l, pričom východisková koncentrácia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na začiatku fermentácie bola 2,7 g/l. Pokles koncentrácie amónnych iónov je fyziologicky primeraný, a preto je možné potvrdiť, že stanovenie nami modifikovanou salicylátovou metódou je využiteľné pre hodnotenie obsahu amónnych iónov v médiu určenom pre kultiváciu *C. necator* počas produkcie P3HB.

Správnosť dosiahnutých výsledkov sme overili metódou štandardného prídavku. Po prídavku roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v koncentrácii 1,0 g/l k supernatantu získanému odstredení biomasy *C. necator* sme pomocou salicylátovej metódy stanovili koncentráciu amónnych iónov 1,6 g/l, čo zodpovedá zmiešaniu dvoch roztokov s koncentraciami amónnych iónov na úrovni 1,0 a 2,2 g/l v pomere 1:1 (v/v).

Záver

Modifikovaná Berthelotova reakcia, označovaná ako salicylátová metóda, predstavuje efektívnu, cenovo-dostupnú a súčasne dostatočne citlivú metódu na stanovenie amónnych iónov vo vzorkách kultivačného média. Nami navrhnutou úpravou metodického postupu za účelom výberu zloženia reakčnej zmesi, vhodnej koncentrácie salicylátu sodného, ako aj doby reakcie sa nám podarilo úspešne aplikovať metódu pri hodnotení miery využitia zdroja dusíka po fermentácii baktériami druhu *C. necator*.

Poďakovanie

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00499 a projektu FPPV-42-2026.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] OECD, (2022). *Global plastics outlook: policy scenarios to 2060*. Paris: OECD Publishing, pp. 21-34. ISBN 978-92-64-89881-3.
- [2] CHODÁK, I. and BLACKBURN, R. S., (2009). Sustainable synthetic fibres: the case of poly(hydroxyalkanoates) (PHA) and other fibres. In BLACKBURN, R. S. (Eds.). *Sustainable Textiles*. Sawston: Woodhead Publishing, pp. 88-112. ISBN 978-1-84569-453-1.

- [3] WILLIAMSON, D. H. and WILKINSON, J. F., (1958). The isolation and estimation of the polyhydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, vol. 19, no. 1, pp. 198-209. ISSN 2059-9323.
- [4] LUNDGREN, D. G.; PFISTER, R. M. and MERRICK, J. M., (1964). Structure of poly-hydroxybutyric acid granules. *Journal of General Microbiology*, vol. 34, no. 3, pp. 441-446. ISSN 2059-9323.
- [5] BEEBY, M.; CHO, M.; STUBBE, J.A. and JENSEN, G. J., (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, vol. 194, no. 5, pp. 1092-1099. ISSN 1098-5530.
- [6] WAHL, A.; SCHUTH, N.; PFEIFFER, D.; NUSSBERGER, S. and JENDROSSEK, D., (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, vol. 12, 262. ISSN 1471-2180.
- [7] ŠPOLJARIĆ, I. V. 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. *Journal of Biotechnology*, vol. 168, no. 4, pp. 625-635. ISSN 1873-4863.
- [8] YOUSUF, R. G. and WINTERBURN, J. B., (2016). Date seed characterisation, substrate extraction and process modelling for the production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, vol. 222, pp. 242-251. ISSN 0960-8524.
- [9] ZHILA, N. O. et al. (2021). Properties of degradable polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by a new strain, *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1, from various carbon sources. *Polymers*, vol. 13, no. 18, 3142. ISSN 2073-4360.
- [10] KISELEV, E. G.; DEMIDENKO, E. V.; ZHILA, N. O.; SHISHATSKAYA, E. I. and VOLOVA, T. G., (2022). Sugar beet molasses as a potential C-substrate for PHA production by *Cupriavidus necator*. *Bioengineering*, vol. 9, no. 4, 154. ISSN 2306-5354.
- [11] BLUNT, W.; LEVIN, D. B. and CICEK, N., (2018). Bioreactor operating strategies for improved polyhydroxyalkanoate (PHA) productivity. *Polymers*, vol. 10, no. 11, 1197. ISSN 2073-4360.
- [12] NYGAARD, D.; YASHCHUK, O.; NOSEDA, D. G.; ARAOZ, B. and HERMIDA, É. B., (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. *Heliyon*, vol. 7, no. 1, e05979. ISSN 2405-8440.
- [13] VALENCIA, A. I. S. et al. (2021). Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Journal of Water Process Engineering*, vol. 40, 101975. ISSN 2214-7144.
- [14] MADHUSOODANAN, G.; HARIHARAPURA, R. C. and SOMASHEKARA, D., (2022). Dissolved oxygen as a propulsive parameter for polyhydroxyalkanoate production using *Bacillus endophyticus* cultures. *Environment, Development and Sustainability*, vol. 24, pp. 4641-4658. ISSN 1387-585X.
- [15] ARAGAO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L. and PAREILLEUX, A., (1996). Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*, vol. 18, no. 8, pp. 937-942. ISSN 1573-6776.
- [16] DALSASSO, R. R.; PAVAN, F. A.; BORDIGNON, S. E.; de ARAGÃO, G. M. F. and POLETTO, P., (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, vol. 85, pp. 12-18. ISSN 1359-5113.
- [17] NYGAARD, D.; YASHCHUK, O. and HERMIDA, É. B., (2019). Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon*, vol. 5, no. 3, e01374. ISSN 2405-8440.
- [18] RONĎOŠOVÁ, S.; LEGERSKÁ, B.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. and MIERTUŠ, S., (2022). Optimization of growth conditions to enhance PHA production by *Cupriavidus necator*. *Fermentation*, vol. 8, no. 9, 451. ISSN 2311-5637.
- [19] ZHOU, L. and BOYD, C. E., (2016). Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquaculture*, vol. 450, pp. 187-193. ISSN 0044-8486.
- [20] LENNOX, L. J. and FLANAGAN, M. J. (1982). An automated procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. *Water Research*, vol. 16, no. 7, pp. 1127-1133. ISSN 0043-1354.
- [21] DEVANI, M. B.; SHISHOO, CH. J.; SHAH, S. A. and SUHAGIA, B. N., (1989). Spectrophotometric method for microdetermination of nitrogen in Kjeldahl digest. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, vol. 72, no. 6, pp. 953-956. ISSN 1944-7922.
- [22] WEN, Y.; MAO, Y.; KANG, Z. and LUO, Q., (2019). Application of an ammonium ion-selective electrode for the real-time measurement of ammonia nitrogen based on pH and temperature compensation. *Measurement*, vol. 137, pp. 98-101. ISSN 0263-2241.
- [23] HONG, S. et al. (2025). Ion-selective electrodes for soil nutrient monitoring of potassium and nitrogen-related ions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 999, 119613. ISSN 1572-6657.
- [24] MICHALSKI, R. and KURZYCA, I., (2006). Determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 15, no. 1, pp. 5-18. ISSN 2083-5906.
- [25] PONTES, F. V. M. et al. (2009). A simplified version of the total kjeldahl nitrogen method using an ammonia extraction ultrasound-assisted

- purge-and-trap system and ion chromatography for analyses of geological samples. *Analytica Chimica Acta*, vol. 632, no. 2, pp. 284-288. ISSN 0003-2670.
- [26] DEAN, A. P.; SIGEE, D. C.; ESTRADA, B. and PITTMAN, J. K., (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 12, pp. 4499-4507. ISSN 0960-8524.
- [27] ASSAFIRI, A.; JIA, CH.; THOMAS, D. S.; HIBBERT, D. B. and ZHAO, CH., (2024). Fast and sensitive detection of ammonia from electrochemical nitrogen reduction reactions by ^1H NMR with radiation damping. *Small Methods*, vol. 8, no. 8, 2301373. ISSN 2366-9608.
- [28] LEONARD, R. H., (1963). Quantitative range of Nessler's reaction with ammonia. *Clinical Chemistry*, vol. 9, no. 4, pp. 417-422. ISSN 1530-8561.
- [29] KRUG, F. J.; RŮŽIČKA, J. and HANSEN, E. H., (1979). Determination of ammonia in low concentrations with Nessler's reagent by flow injection analysis. *Analyst*, vol. 104, no. 1234, pp. 47-54. ISSN 1364-5528.
- [30] JUREČKOVÁ, Ľ.; CHMELOVÁ, D. and ONDREJOVIČ, M., (2023). The effect of cultivation conditions on polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *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.
- [31] BOWER, C. E., and HOLM-HANSEN, T., (1980). A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 37, pp. 794-798. ISSN 1205-7533.
- [32] COGAN, D. et al. (2014). The development of an autonomous sensing platform for the monitoring of ammonia in water using a simplified Berthelot method. *Analytical Methods*, vol. 6, no. 19, pp. 7606-7614. ISSN 1759-9679.
- [33] REMISZEWSKA, E. et al. (2019). Enzymatic method of urea determination in LTCC microfluidic system based on absorption photometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 285, pp. 375-384. ISSN 0925-4005.
- [34] FORNELLS, E. et al. (2020). Integrated 3D printed heaters for microfluidic applications: Ammonium analysis within environmental water. *Analytica Chimica Acta*, vol. 1098, pp. 94-101. ISSN 0003-2670.
- [35] GINER-SANZ, J. J.; LEVERICK, G.; PÉREZ-HERRANZ, V. and SHAO-HORN, Y., (2021). Optimization of the salicylate method for ammonia quantification from nitrogen electroreduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 896, 115250. ISSN 1572-6657.
- [36] DEBRUILLE, K. et al. (2024). Portable IC system enabled with dual LED-based absorbance detectors and 3D-printed post-column heated micro-reactor for the simultaneous determination of ammonium, nitrite and nitrate. *Analytica Chimica Acta*, vol. 1304, 342556. ISSN 0003-2670.
- [37] OCAMPO-LÓPEZ, C.; COLORADO-ARIAS, S. and RAMÍREZ-CARMONA, M., (2015). Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. *Journal of Applied Research and Technology*, vol. 13, no. 5, pp. 498-503. ISSN 2448-6736.

Syntéza a štúdium medzimolekulových interakcií heterometalických Ni(II)-4f(III) komplexov

Synthesis and study of intermolecular interactions of heterometallic Ni(II)-4f(III) complexes

Dominika Kendrová¹ – Cyril Rajnák¹ – Erika Samoľová² – Franz Renz³

¹Ústav Chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

²Fyzikálny ústav, Akadémia vied ČR, Na Slovance 1999/2, 182 00 Praha 8

³Inštitút koordinačnej chémie, Leibniz University Hannover, Callinstrasse 1, 30167 Hannover

kendrova1@ucm.sk, rajnak@ucm.sk, samolova@fzu.cz, franz.renz@kci.uni-hannover.de

Abstrakt

V priebehu posledného desaťročia sa vo vedeckej literatúre pozoruje rastúci záujem o problematiku molekulových magnetov a pomalej magnetickej relaxácie. Významnú pozornosť si získala najmä syntéza heterometalických 3d-4f komplexov. Kombináciou vlastností jednotlivých centrálnych atómov spolu s pôsobením externých stimulov, napr. teploty, je možné dosiahnuť pozoruhodné fyzikálno-chemické vlastnosti, a to nielen v oblasti pomalej magnetickej relaxácie.

Pripravené boli nové štvorjadrové heterometalické 3d-4f komplexy $[\text{Ni}_2\text{Dy}_2(\text{L}^1)(\text{NO}_3)_2(\text{DMF})_2]$ (**1**) a $[\text{Ni}_2\text{Er}_2(\text{L}^1)(\text{NO}_3)_2(\text{DMF})_2]$ (**2**) (kde L^1 je Schiffova báza pripravená kondenzáciou 5-bromo-3-metoxysalicylaldehydu a 2-amino-*p*-cresolu), ktoré boli charakterizované monokryštálovou röntgenovou difraktometriou. Geometria koordinačného polyédra komplexov bola detailne študovaná výpočtom geometrického indexu CShM v programe SHAPE. Štúdium medzimolekulových interakcií bolo uskutočnené Hirshfeldovou povrchovou analýzou v programe CrystalExplorer.

Kľúčové slová: 3d-4f prvky, heterometalické komplexy, medzimolekulové interakcie

Abstract

Over the past decade, an increasing interest in molecular magnets and slow magnetic relaxation has been observed in the scientific literature. Particular attention has been devoted to the synthesis of heterometallic 3d-4f complexes. By combining the properties of individual central atoms together with the influence of external stimuli, such as temperature, remarkable physicochemical properties can be achieved, not only in the field of slow magnetic relaxation.

New tetranuclear heterometallic 3d-4f complexes $[\text{Ni}_2\text{Dy}_2(\text{L}^1)(\text{NO}_3)_2(\text{DMF})_2]$ (**1**) and

$[\text{Ni}_2\text{Er}_2(\text{L}^1)(\text{NO}_3)_2(\text{DMF})_2]$ (**2**) (where L^1 is a Schiff base prepared by the condensation of 5-bromo-3-methoxysalicylaldehyde and 2-amino-*p*-cresol) were synthesized and characterized by single-crystal X-ray diffraction. The geometry of the coordination polyhedron of the complexes was studied in detail by calculating the CShM geometric index using the SHAPE program. The study of intermolecular interactions was carried out using Hirshfeld surface analysis implemented in the CrystalExplorer program.

Key Words: 3d-4f elements, heterometallic complexes, intermolecular interactions

Úvod

Výskum v oblasti koordinačnej, aplikovanej analytickej chémie a magnetochemie sa orientuje na štúdium jednomolekulových magnetov (Single-Molecule Magnets, SMM), ktoré predstavujú špecifickú triedu molekulových materiálov schopnú uchovávať magnetickú informáciu na úrovni jednej molekuly. To z nich robí perspektívnych kandidátov pre budúce aplikácie v oblasti dátových úložísk. Medzi najviac skúmané SMM patria komplexy obsahujúce ióny lantanoidov, ktoré vďaka výraznej magnetickej anizotropii a veľkému orbitálnemu momentu vykazujú magnetické správanie pri nízkych aj vyšších teplotách. Osobitná pozornosť sa venuje heterometalickým 3d-4f komplexom, v ktorých sa kombinuje 3d prechodný kov (Ni(II), Zn(II), Cu(II)) so 4f lantanoidovým iónom (Dy(III), Er(III), Eu(III)) [1-7].

V roku 2024 publikovali Mičová R. a kol. vedecký článok, v ktorom opísali prípravu a charakterizáciu nového heptanukleárneho komplexu s jadrom $\{\text{Dy}_2\text{Cu}_5\}$ [8]. Tento komplex pozostáva z dvoch iónov dysporózia Dy(III) a piatich iónov medi Cu(II), ktoré sú vzájomne prepojené prostredníctvom kyslíkových a chloridových mostíkov. Pri syntéze bol použitý ligand odvodený od Schiffovej bázy typu salen. Získaný komplex kryštalizuje

v triklinickej kryštálovej sústave s priestorovou grupou $P1$. Centrálny atóm Cu(II) má tetra-, penta- a hexakoordinované usporiadanie, zatiaľ čo ióny Dy(III) sú nonakoordinované. Elektrónová štruktúra komplexu bola detailne analyzovaná pomocou kvantovochemických výpočtov na úrovni teórie funkcionálu hustoty, ktoré zároveň odhalili viacero typov magnetických interakcií medzi centrami Dy(III) a Cu(II). Väčšina z nich má antiferomagnetický charakter, čo vedie k nelineárnemu magnetickému správaniu a nerovnomernému rozloženiu magnetických energetických hladín. Napriek tomu sa komplex vyznačuje základným stavom s celkovým spinovým momentom $J = 25/2$. Experimentálne magnetické merania potvrdili jeho správanie ako jednomolekulového magnetu, pričom tento jav bol pozorovaný aj bez prítomnosti externého magnetického poľa, čo poukazuje na výraznú vnútornú magnetickú anizotropiu. Analýza dynamiky magnetizácie odhalila existenciu viacerých relaxačných mechanizmov; efektívna energetická bariéra relaxácie bola určená $U_{eff}/k_B = 24,9$ K a charakteristický čas relaxácie $\tau_0 = 1,1 \times 10^{-7}$ s [8].

Autori Mondal K. Ch. a kolektív syntetizovali štyri heterometalické komplexy typu $[\text{Ni}_2\text{Ln}_2(\text{L})_4(\text{NO}_3)_2(\text{solvent})_2]$, kde Ln predstavuje Dy alebo Tb a ligandom je Schiffova báza H_2L pripravená kondenzáciou *o*-vanilínu a 2-aminofenolu [9]. Tieto komplexy s jadrom $\{\text{M}_2\text{Ln}_2\}$ majú defektnú dikubánovú štruktúru, v ktorej dva atómy Ni(II) zaujímajú centrálnu pozíciu, zatiaľ čo 4f ióny lantanoidov (Dy(III)/Tb(III)) tvoria „krídla“ štruktúry. Komplexy kryštalizujú v monoklinickej sústave s priestorovými grupami $P2_1/n$ a $P2_1/c$. Zistilo sa, že komplexy s centrálnym atómom Dy(III) vykazujú správanie typické pre jednoiónové molekule magnety, s energetickými bariérami magnetickej relaxácie v rozmedzí 18–28 K. Naopak, analógy s Tb(III) nepreukázali výraznú hysteréziu pri teplotách nad 1,8 K, čo naznačuje slabší efekt magnetickej anizotropie Tb(III) v porovnaní s Dy(III) [9].

1 Materiály a metódy

1.1 Chemikálie

Na prípravu organického imínového ligandu a nových heterometalických Ni(II)-4f(III) komplexov boli využité komerčne dostupné chemikálie, ktorých ďalšia purifikácia nebola potrebná.

Na stavbu imínovej štruktúry, konkrétne Schiffovej bázy (L^1) bol použitý 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (97 %, Thermo Fisher Scientific) a 2-amino-*p*-cresol (97

%, Thermo Fisher Scientific). Zdroj centrálného atómu v syntetizovaných komplexoch predstavovali anorganické soli, konkrétne $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98 %, Centralchem), $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99,9 %, Sigma Aldrich) a $\text{Er}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99,9 %, Thermo Fisher Scientific). Pri syntézach boli ako rozpúšťadlá použité etanol (96 %, Centralchem), dimetylformamid (99,5 %, Mikrochem), zatiaľ čo trietylamín (99 %, Mikrochem) slúžil ako zásada.

1.2 Prístroje

Morfológia a kvalita kryštálov boli najskôr hodnotené optickým mikroskopom Zeiss Stemi 305. Kryštálová štruktúra pripravených komplexov bola následne určená na prístroji Bruker ApexII-Ultra CCD s Mo- $\text{K}\alpha$ žiarením pri 100 K.

Teploty topenia pripravených látok boli stanovené termooptickou metódou na Koflerovom bloku Biobase (Melting Point Apparatus).

Merania nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) sa realizovali na spektrometri Varian (Agilent) VNMR vybavenom supravodivým magnetom s indukciou 14,1 T. Pracovná frekvencia prístroja bola 600 MHz pre ^1H NMR a 151 MHz pre ^{13}C NMR. Vzorky boli pripravené v dimetylsulfoxide a merania prebiehali pri laboratórnej teplote.

Percentuálne zastúpenie prvkov C, H a N bolo stanovené prvkovou analýzou na prístroji Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific). Vzorka bola uzavretá v cínovej kapsule a po jej spálení v prúde kyslíka došlo k chromatografickému rozdeleniu jednotlivých zložiek, ktoré boli detegované pomocou TCD detektora.

Vibračné spektrá ligandov a komplexov boli zaznamenané spektrofotometrom Shimadzu IRAffinity-1 ($450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) metódou ATR, umožňujúcou priame meranie kryštalických vzoriek bez úpravy.

Elektrónové spektrá komplexov boli zaznamenané v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (200 – 1000 nm) pomocou spektrofotometra Varian Cary 50 Bio. Merania boli uskutočnené v acetonitrile.

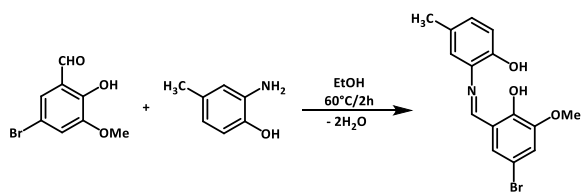
Vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria s elektrosprejovou ionizáciou (HR-ESI MS) bola realizovaná na prístroji s ionizačným zdrojom typu lockspray, on-line prepojenom s kvapalinovým chromatografom Acquity UPLC (Waters). Vzorka bola rozpustená v acetonitrile ($\approx 1\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) a následne zriedená v pomere 1 : 100. Na analýzu sa injektovalo 5 μL roztoku pri prietoku mobilnej fázy $400\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ionizácia prebiehala v režime ESI pri kapilárnom napätí 3 kV; vzniknutý aerosól bol sušený prúdom dusíka (650

L·h⁻¹, 350 °C) a analyzovaný preletovým hmotnostným analyzátorom.

Prášková röntgenová difraktometria (PXRD) bola realizovaná na difraktometri StadiP s detektorom MYTHEN (STOE) pri použití Cu-K α žiarenia ($\lambda = 1,5406$ Å, 40 kV, 30 mA) s Ge(111) monochromátorom. Difrakčné záznamy boli získané v rozsahu 2–50° [2 θ] s rozlíšením 0,015° a rýchlosťou skenu 20 s/step. Namerané dáta boli spracované v softvéri WinXPow s korekciou pozadia

1.3 Syntéza ligandu L¹

Do banky s guľatým dnom bol vložený 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (1 mmol), ktorý sa za miešania rozpustil v etanole (15 ml). Po úplnom rozpustení bol pridaný 2-amino-*p*-cresol (1 mmol), a reakčná zmes sa miešala pri teplote 60 °C pod spätným chladičom počas 2 hodín (Schéma 1). Po ukončení zahrievania bola zmes odsatá cez fritu za zníženého tlaku a nadbytočná vlhkosť bola odstránená vákuovou pumpou. Ligand L¹ bol izolovaný ako oranžový prášok s výťažkom 81 %. $T_f = 162$ °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,64 (bs, 1H/2H); 8,94 (s, 1H); 7,39 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,21 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,95 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H); 6,86 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 3,82 (s, 3H); 2,25 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,87; 160,65; 151,13; 145,85; 142,04; 133,94; 132,64; 120,58; 119,39; 119,15; 116,81; 115,06; 110,76 ppm. Elementárna analýza teor./exp. (%) pre C₁₅H₁₄BrNO₃, $M_r = 336,19$: C 53,59; H 4,20; N 4,17 / C 53,31; H 4,00; C 3,88. IČ (cm⁻¹): 3093 (O-H); 2972 (C-H sp²), 2937 (C-H sp³), 1612 (C=N), 561 (C-Br). m/z (ESI-TOF) exp./teor.: 336,0241 ([M]⁺)/336,0235.



Obr. 1 Príprava imínového ligandu L¹.

1.5 Syntéza [Ni₂Dy₂(L¹)(NO₃)₂(DMF)₂] (1)

Komplex **1** bol pripravený rozpustením ligandu L¹ (0,2 mmol) v dimetylformamide (10 cm³). Po rozpustení bol pridaný trietylamin (0,2 mmol). Za stáleho miešania sa vložil Ni(NO₃)₂·6H₂O (0,1 mmol) a po jeho rozpustení bol pridaný Dy(NO₃)₃·H₂O (0,1 mmol). Výsledná zmes bola miešaná 10 minút pri izbovej teplote. Hnedý roztok bol ponechaný na kryštalizáciu pri izbovej teplote. Po dvoch týždňoch boli získané žlté kryštály

vhodné na monokryštalovú röntgenovú difraktometriu. Výťažok: 35 %. $\theta > 118$ °C. Elementárna analýza teor./exp. (%) pre C₃₉H₄₅Br₂DyN₆NiO₁₂, $M_r = 1170,84$: C 40,01; H 3,87; N 7,18 / C 40,55; H 3,51; N 7,12. IČ (cm⁻¹): 2918 (C-H sp²), 2914 (C-H sp³), 1651 (C=N), 522 (C-Br). UV-VIS (ACN) $\nu_{\max}/10^3$ cm⁻¹ ($c = 1,08 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³): 23,984 (0,1453; $\epsilon = 13453,70$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 26,390 (0,1503; $\epsilon = 13916,67$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 32,054 (0,1984; $\epsilon = 18370,37$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 40,823 (0,4251; $\epsilon = 39361,11$ mol·dm⁻³·cm⁻¹).

1.6 Syntéza [Ni₂Er₂(L¹)(NO₃)₂(DMF)₂] (2)

Komplex **2** bol pripravený rovnakou metódou ako komplex **1**. Bol použitý ligand L¹ a soli Ni(NO₃)₂·6H₂O (0,1 mmol) a Er(NO₃)₃·5H₂O (0,1 mmol). Oranžový roztok bol ponechaný na kryštalizáciu pri izbovej teplote. Po dvoch týždňoch sa získali žlté kryštály vhodné na monokryštalovú röntgenovú difraktometriu. Výťažok: 39 %. $\theta > 124$ °C. Elementárna analýza teor./exp. (%) pre C₃₉H₄₅Br₂ErN₆NiO₁₂, $M_r = 1175,6$: C 39,85; H 3,86; N 7,15 / C 40,00; H 3,79; N 7,08. IČ (cm⁻¹): 2987 (C-H sp²), 2926 (C-H sp³), 1652 (C=N), 524 (C-Br). UV-VIS (ACN) $\nu_{\max}/10^3$ cm⁻¹ ($c = 1,13 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³): 23,922 (0,1334; $\epsilon = 11805,31$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 26,390 (0,1378; $\epsilon = 12274,34$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 32,151 (0,1778; $\epsilon = 15734,51$ mol·dm⁻³·cm⁻¹); 41,6762 (0,3743; $\epsilon = 33123,89$ mol·dm⁻³·cm⁻¹).

2 Výsledky a diskusia

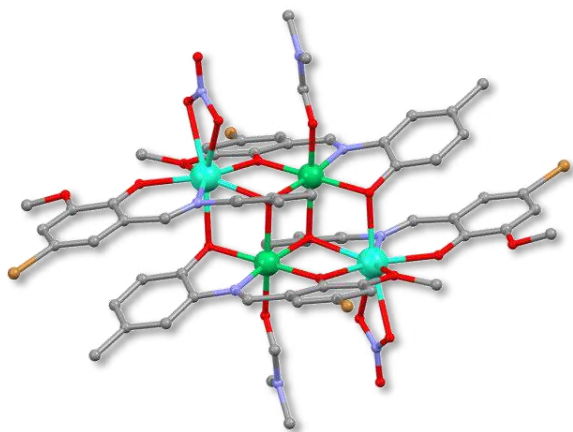
2.1. Monokryštalová röntgenová difraktometria komplexov

Komplex **1**, [Ni₂Dy₂(L¹)(NO₃)₂(DMF)₂], kryštalizuje v triklinickej kryštalografickej sústave s priestorovou grupou *P*₁. Komplex s jadrom {Ni₂Dy₂} vykazuje defektú dikubánovú štruktúru. Štruktúra komplexu **1** pozostáva z dvoch symetrických, štruktúrne ekvivalentných častí, charakterizovaných identickými dĺžkami väzieb a hodnotami väzbových uhlov medzi koordinujúcimi atómami. Centrálne atómy Ni(II) sú hexakoordinované, ich koordinačné prostredie tvorí päť atómov kyslíka a jeden atóm dusíka. Atómy Dy(III) sú oktakoordinované siedmimi atómami kyslíka a jedným atómom dusíka. Na centrálnych atómoch dysporózia sú koordinované dusičnanové anióny, zatiaľ čo na atómoch niklu sú koordinované molekuly dimetylformamidu.

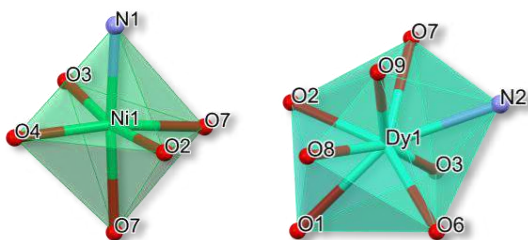
Priemerná vzdialenosť medzi centrálnym atómom dysporózia a kyslíka je $d_{av}(\text{Dy-O}) = 2,370$ Å, vzdialenosť

medzi atómom dysporózia a dusíka je $d(\text{Dy-N}) = 2,459$ Å. V prípade niklu je priemerná vzdialenosť medzi centrálnym atómom a kyslíkom $d_{\text{av}}(\text{Ni-O}) = 2,076$ Å, vzdialenosť medzi atómom niklu a dusíka je $d(\text{Ni-N}) = 1,996$ Å.

Výpočtom geometrického indexu CShM v programe SHAPE [10] nadobúda usporiadanie donorových atómov komplexu **1** okolo centrálného atómu Ni(II) geometriu blízku oktaedru (OC-6 – 1,232; 1,231) a koordinačné okolie Dy(III) zodpovedá geometrii trojuholníkového dodekaédra (TDD-8 – 2,760; 2,765).



Obr. 2 Štruktúra komplexu **1**. Vodíky a molekula rozpúšťadla sú pre prehľadnosť odstránené.



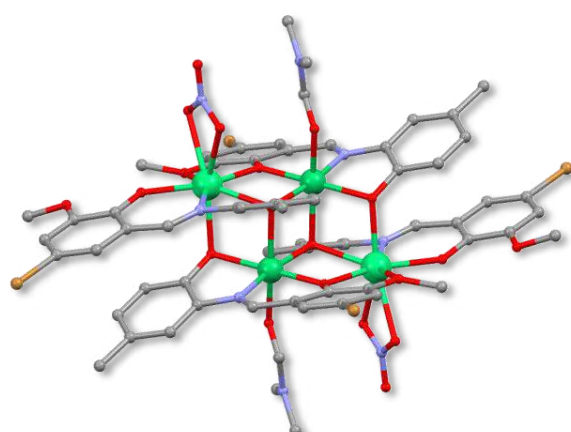
Obr. 3 Koordinačné polyédre komplexu **1**.

Analogicky, komplex **2**, $[\text{Ni}_2\text{Er}_2(\text{L}^1)(\text{NO}_3)_2(\text{DMF})_2]$, kryštalizuje v triklinickej kryštalografickej sústave s priestorovou grupou P_1 . Molekulová štruktúra obsahuje jadro $\{\text{Ni}_2\text{Er}_2\}$ s defektnou dikubánovou štruktúrou s dvoma symetrickými, štruktúrne ekvivalentnými časťami. Koordinačné prostredie centrálnych atómov je zachované – atómy Ni(II) sú hexakoordinované, zatiaľ čo atómy Er(III) sú oktakoordinované.

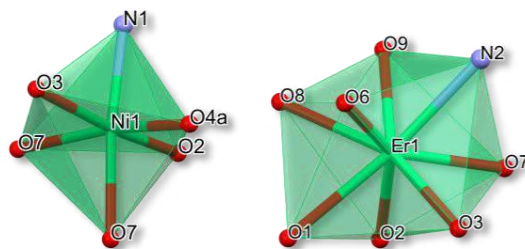
Priemerná vzdialenosť medzi atómom erbia a kyslíka je $d_{\text{av}}(\text{Er-O}) = 2,348$ Å, vzdialenosť medzi

atómom erbia a dusíka je $d(\text{Er-N}) = 2,443$ Å. V prípade niklu zostávajú priemerné väzbové vzdialenosti v porovnaní s komplexom **1** nezmenené, $d_{\text{av}}(\text{Ni-O}) = 2,076$ Å a $d(\text{Ni-N}) = 1,996$

Výpočet geometrického indexu CShM v programe SHAPE [10] preukázal v koordinačnom prostredí atómov Ni(II) takmer ideálnu oktaédrickú geometriu (OC-6 – 1,289; 1,290), zatiaľ čo usporiadanie donorových atómov okolo centra Er(III) zodpovedá geometrii trojuholníkového dodekaédra (TDD-8; 2,645; 2,646).



Obr. 4 Štruktúra komplexu **2**. Vodíky a molekula rozpúšťadla sú pre prehľadnosť odstránené.

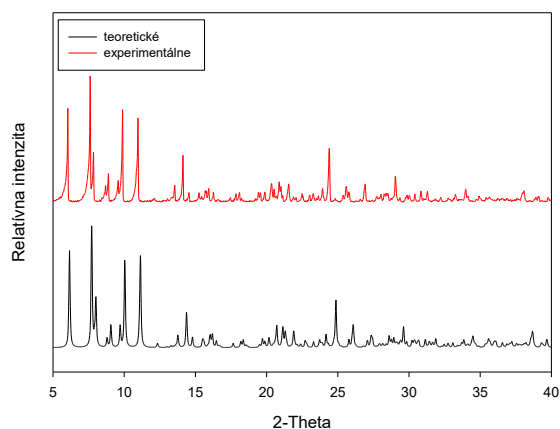


Obr. 5 Koordinačné polyédre komplexu **2**.

Kryštalografické údaje komplexov **1** a **2** sú uvedené v Tab. 1.

2.1 Prášková röntgenová difraktometria komplexu **1**

PXRD meranie bolo vykonané pre komplex **1**. Porovnanie experimentálne získaných dát s teoretickým difrakčným záznamom, generovaným z CIF súboru analyzovaného monokryštálu pomocou programu Mercury [11], preukazuje dobrú vzájomnú zhodu (Obr. 6) [12, 13].



Obr. 6 Difrakčný záznam komplexu **1**. Dole – teoretické dáta získané z CIF súboru, hore – experimentálne dáta.

2.2 Hirshfeldova povrchová analýza

Hirshfeldova povrchová analýza (HS) predstavuje účinný nástroj na detailné hodnotenie a vizualizáciu medzimolekulových interakcií v kryštálových štruktúrach, a umožňuje kvantitatívne aj kvalitatívne posúdenie kontaktov medzi molekulami v kryštálovej mriežke. Analýza Hirshfeldových povrchov bola realizovaná pre komplexy **1** a **2** s využitím softvéru CrystalExplorer [14]. Zodpovedajúce bunkové parametre Hirshfeldovho povrchu sú uvedené v Tab. 2.

Hodnoty objemu pre komplex **1** a **2** sú takmer identické, čo naznačuje veľmi podobnú veľkosť molekúl a porovnateľný spôsob ich usporiadania v kryštálovej mriežke. Rovnako aj obsah povrchu dosahuje podobné hodnoty, čo poukazuje na obdobný rozsah intermolekulových kontaktov a podobnú mieru interakcie molekúl s okolím. Parameter globularity s takmer rovnakou hodnotou pre oba komplexy indikuje pomerne kompaktný tvar. Nízke hodnoty asfericity zároveň svedčia o malej anizotropii povrchu.

Tab. 2 Bunkové parametre Hirshfeldovho povrchu.

	Komplex 1	Komplex 2
Objem [Å³]	1684,45	1683,05
Obsah [Å²]	1020,31	1020,74
Globularita	0,671	0,670
Asfericita	0,061	0,061

Hirshfeldova povrchová analýza bola realizovaná s využitím mapovania parametra d_{norm} , d_i , d_e , shape index, curvnedness a fragment patch. Parameter d_i vyjadruje vzdialenosť medzi daným bodom na

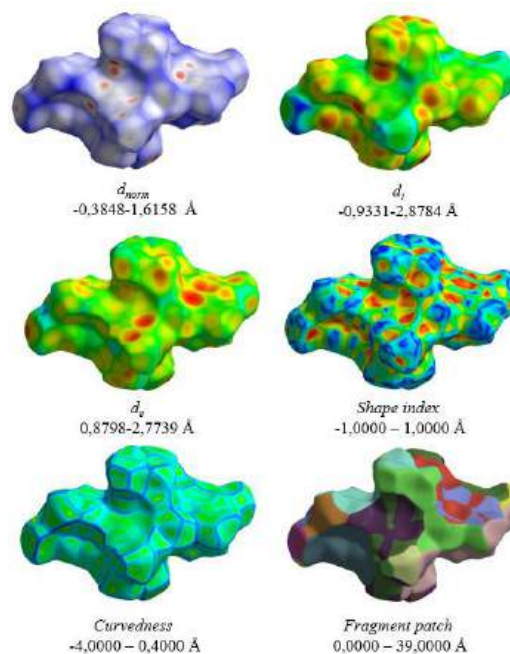
Hirshfeldovej ploche a najbližším atómom nachádzajúcim sa vo vnútri, zatiaľ čo parameter d_e predstavuje vzdialenosť od toho istého bodu smerom von k najbližšiemu atómu susednej molekuly. Červené až žlté oblasti predstavujú menšie vzdialenosti, zelená farba stredné hodnoty a modrá väčšie vzdialenosti.

Normalizovaný parameter d_{norm} je definovaný ako kombinácia hodnôt d_i a d_e . Červené oblasti predstavujú veľmi krátke kontakty a silné interakcie, biela farba zodpovedá vzdialenostiam približne na úrovni van der Waalových kontaktov a modrá farba znázorňuje veľmi krátke alebo žiadne kontakty.

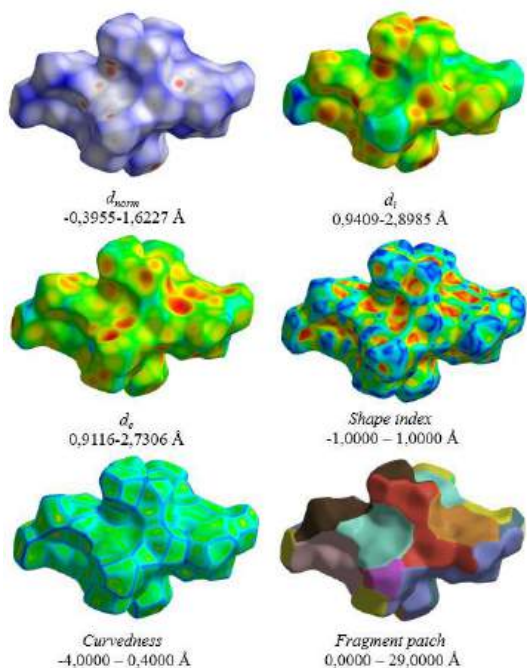
Parameter shape index predstavuje bezrozmerný geometrický ukazovateľ opisujúci lokálnu topológiu Hirshfeldovej plochy, kde červené odtiene označujú konvexné časti, modré konkávne oblasti a zelená predstavuje prechod medzi nimi.

Parameter curvnedness charakterizuje mieru zakrivenia povrchu v danom bode, kde modré oblasti zodpovedajú relatívne plochým častiam, zatiaľ čo žlté až červené oblasti indikujú silne zakrivené miesta a ostré hrany.

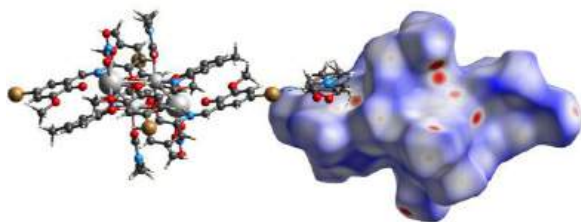
Posledný parameter, fragment patch, rozdeľuje Hirshfeldov povrch na samostatné oblasti prislúchajúce jednotlivým susedným molekulám s podobnými vlastnosťami alebo typom medzimolekulových kontaktov [15].



Obr. 7 Trojrozmerný Hirshfeldov povrch komplexu **1** zobrazený s mapovaním parametrov d_{norm} , d_i , d_e , shape index, curvnedness a fragment patch.

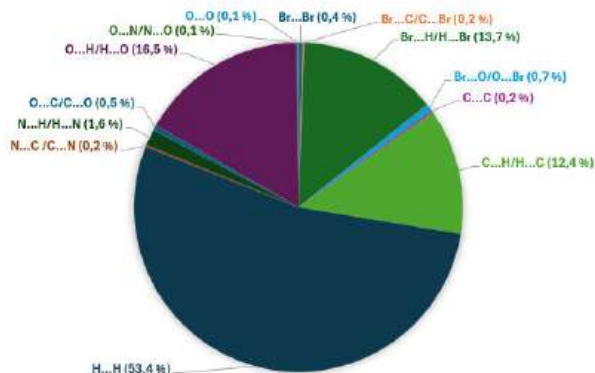


Obr. 8 Trojrozmerný Hirshfeldov povrch komplexu **2** zobrazený s mapovaním parametrov d_{norm} , d_i , d_e , shape index, curvedness a fragment patch.

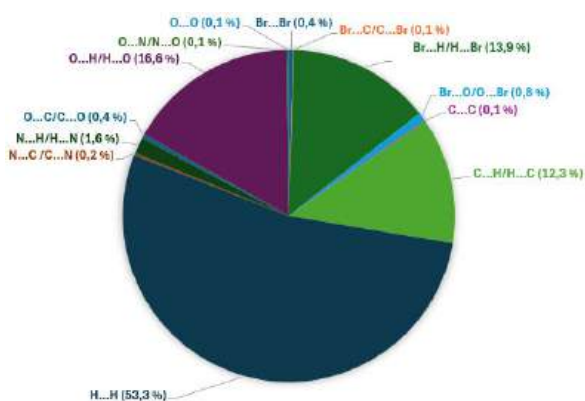


Obr. 9 Zobrazenie medzimolekulových kontaktov v komplexe **2**.

Na základe 2D fingerprint grafov boli vytvorené koláčové grafy, ktoré vizuálne znázorňujú podiel jednotlivých typov interakcií. V oboch komplexoch sa nachádzajú rovnaké typy interakcií s takmer identickým percentuálnym podielom. Najvýraznejšie sú H...H interakcie, tvoriace 53,4 % (**1**) a 53,3 % (**2**). Významné zastúpenie majú aj Br...H/H...Br a C...H/H...C interakcie, ktoré spolu s ostatnými prispievajú k stabilizácii kryštálovej štruktúry (Obr. 10 a 11).



Obr.10 Koláčový graf percentuálneho zastúpenia intermolekulových interakcií v komplexe **1**.



Obr. 11 Koláčový graf percentuálneho zastúpenia intermolekulových interakcií v komplexe **2**.

Záver

Pripravené boli dva nové štvorjadrové heterometalické Ni(II)-4f(III) komplexy, ktoré boli izolované vo vhodnej kvalite, čo umožnilo charakterizáciu využitím monokryštálovej röntgenovej difraktometrie. Komplexy **1** a **2** boli analyzované z hľadiska štruktúrnych vlastností. Na stanovenie dĺžok väzieb a uhlov bol použitý kryštalografický program Mercury [11]. Geometria koordinačných polyédrov bola vyhodnotená výpočtom geometrického indexu CShM v programe SHAPE [6]. Charakteristické vibrácie boli určené FTIR-ATR spektroskopiou, elektrónové prechody pomocou UV-Vis spektroskopie a obsah prvkov C, H, N prvkovou analýzou. Zmeraná bola aj teplota topenia všetkých komplexov.

Kvantitatívne štúdium zhodnotenia medzimolekulových interakcií v komplexoch **1** a **2** sa realizovalo pomocou Hirshfeldovej povrchovej analýzy v programe CrystalExplorer [10]. Analýza umožnila identifikovať typ a podiel jednotlivých kontaktov, podieľajúcich sa na celkovej stabilizácii štruktúry.

V súčasnosti prebieha analýza magnetických vlastností s predbežnou klasifikáciou vzorky ako prirodzeného molekulového magnetu.

PodĎakovanie



Príspevok vznikol s podporou VEGA 1/0191/22, VEGA 1/0086/21, DAAD (*Magnetoactive and photoactive compounds based on 3d-4f complexes*) a univerzitnému projektu FPPV-06-2026.

PodĎakovanie patrí aj Mgr. Branislavovi Horváthovi, PhD., za meranie NMR spektier a vedeckému tímu z Leibniz University v Hannoveri za merania práškovej röntgenovej difraktometrie a hmotnostnej spektrometrie.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] You, Z.; Prsa K.; Mutschler J.; Herringer S. N.; Wang J.; Luo Y.; Zheng B.; Decurtins S.; Krämer K. W.; Waldmann O., Liu S.-X. (2020). Formation of Defect-Dicubane-Type $Ni^{II}_2Ln^{III}_2$ (Ln=Tb,Er) Cluster. *American Chemical Society Omega*, vol.6, p. 483-491. ISSN 2470-1343.
- [2] Dolai, M.; Ali, M.; Rajnák, C.; Titiš, J.; Boča (2019). Slow magnetic relaxation in Cu(II)–Eu(III) and Cu(II)–La(III) complexes. *New Journal of Chemistry*, vol. 43, p. 12698-12701. ISSN 1369-9261.
- [3] Mičová, R.; Bičková, Z.; Rajnák, C.; Titiš, J.; Moncol, J.; Bieňko, A.; Boča, R. (2024). Magnetic properties of a europium(III) complex possible multiplet crossover, *Dalton Transactions*, vol. 53, p. 1492-1496. ISSN 1477-9226.
- [4] Polyzou Ch. D; Efthymiou, C. G.; Escuer A.; Cunha-Silva L.; Papatriantafyllopoulou C.; Perles S. P. (2013). In search of 3d/4f-metal single-molecule magnets: Nickel(II)/lanthanide(III) coordination clusters, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 82, no. 2, p. 315-327. ISSN 0033-4545.
- [5] Mukherjee. S.; Joarder B.; Xue S.; Tang J.; Ghosh S. K. (2014). Slow Magnetic Relaxation in an Asymmetrically Coupled Heptanuclear Dysprosium(III)–Nickel(II) Architecture, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, vol. 84, p. 151-156. ISSN 2250-1762.
- [6] Griffiths K.; Kumar P.; Mattock J. D., Abdul-Sada A.; Pitak M. B.; Coles S. J.; Navarro O.; Vargas A.; Kostakis G. E. (2016). Efficient $Ni^{II}_2Ln^{III}_2$ Electrocyclization Catalysts for the Synthesis of trans-4,5-Diaminocyclopent-2-enones from 2-Furaldehyde and Primary or Secondary Amines. In *Inorganics Chemistry*, vol. 55, p. 6988-6994. ISSN 1520-510X.
- [7] Sen R.; Roy M.; Kole A.; Dolui A.; Brandão P., Lin Z. (2026). A novel 3d-4f two dimensional molecular assembly: synthesis, structure, magnetic, thermal and Hirshfeld surface studies. In *Inorganica Chimica Acta*, vol. 589. ISSN 0020-1693.
- [8] Mičová R.; Rajnák C.; Titiš J.; Moncol J.; Nováčiková J.; Bieňko A.; Boča R. (2024). A heptanuclear $\{Dy_2Cu_3\}$ complex as a single molecule magnet, *Dalton Transactions*, vol. 53, p. 5147-5151. ISSN 1477-9226.
- [9] Mondal, K.Ch.; Kostakis G. E.; Lan Y.; Wernsdorfer W.; Anson Ch. E.; Powell A. K. (2011). Defect-Dicubane Ni_2Ln_2 (Ln = Dy, Tb) Single Molecule Magnets, *Inorganic Chemistry*, vol. 50, pp. 11604–11611. ISSN 2202-2951.
- [10] Llunell, M. (2013). Program SHAPE, Ver. 2.1. University of Barcelona. Note: the program assumes a spherical distribution of the ligands in ideal reference polygons or polyhedra.
- [11] Macrae, C.F.; Bruno I. J.; Christolm J. A.; Edgington P. R. (2008). Mercury CSD 2.0 - New Features for Visualization and Investigation of Crystal Structures, *Journal of Applied Crystallography*, vol. 41, pp. 466–470. ISSN 1600-5767.
- [12] Yang, Z.; Cui J.; Yang L.; Lu X. (2025). Powder X-ray diffraction patterns based deep learning for the prediction of adsorption in metal-organic frameworks, *Separation and Purification Technology*, vol. 372. ISSN 1383-5866.
- [13] Ermrich, M.; Opper, D. (2011). X-ray powder diffraction: XRD for the analyst. Getting acquainted with the principles, Almelo: PANalytical B.V., 95 pp. ISBN 978-90-809086-0-4.
- [14] Turner, M.J.; Mckinnon J. J.; Grimwood D. J.; Spackman P. R.; Jayatilaka D.; Spackman M. A. (2021). CrystalExplorer, verzia 21, University of Western Australia, Perth.
- [15] Spackman, M.A.; Jayatilaka D. (2009). Hirshfeld surface analysis, *Crystal Engineering Communications*, vol. 11, pp. 19–32. ISSN 1466-8033.

Tab.1 Kryštalografické údaje komplexov 1 a 2.

	Komplex 1	Komplex 2
Empirický vzorec	C ₃₉ H ₄₅ Br ₂ DyN ₆ NiO ₁₂	C ₃₉ H ₄₅ Br ₂ ErN ₆ NiO ₁₂
M/g.mol⁻¹	1170,84	1175,6
Kryštalografická sústava	triklinická	triklinická
Priestorová grupa	<i>P</i> ₁	<i>P</i> ₁
Teplota/K	100	100
Veľkosť kryštálu/mm	0,56x0,07x0,06	0,11x0,04x0,04
a/Å	13,0579 (2)	13,0417 (3)
b/Å	13,1008 (2)	13,1022 (3)
c/Å	14,8204 (3)	14,7979 (3)
α/°	75,3553 (17)	75,309 (2)
β/°	84,6626 (15)	84,5784 (17)
γ/°	61,2576 (18)	61,355 (2)
V/Å³	2149,50 (8)	2145,47 (9)
ρ_{calc}/g.cm⁻³	1,809	1,820
Farba	zelenohnedá	žltá
Tvar kryštálu		

Aplikácia kolorimetrickej metódy stanovenia kyseliny fytovej mikrotitračnými platničkami v kontexte rôznych typov rastlinných experimentov

Application of Colorimetric Method for Determination of Phytic Acid by Microplates in Various Plant Experiments

Viktória Košíková – Peter Nemeček

Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, Fakulta prírodných vied,
Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
kosikova2@ucm.sk, peter.nemecek@ucm.sk

Abstrakt

Kyselina fytová (IP6) je hlavnou zásobnou formou fosforu v semenách rastlín a významne ovplyvňuje biologickú dostupnosť esenciálnych iónov kovov a nutričnú kvalitu plodín. Práca aplikuje rýchlu a cenovo dostupnú mikropatničkovú kolorimetrickú metódu na stanovenie IP6 v rastlinných matriciach a demonštruje ju na posudzovaní vplyvov genetických, environmentálnych a agrotechnických faktorov na jej obsah. IP6 bola stanovená v rôznych plodinách, pri medziročnom porovnaní, rozdielnych technológiách obrábania pôdy a v experimentoch biofortifikácie pšenice zinkom s ohľadom na prítomnosť mykorhíznych húb. Výsledky boli štatisticky spracované analýzou rozptylu.

Metóda preukázala dobrú reprodukovateľnosť a citlivosť. Obsah IP6 sa významne líšil medzi plodinami, s najvyššími hodnotami v bôbe a najnižšími v kukurici. Environmentálne podmienky aj technológia obrábania pôdy obsah IP6 významne ovplyvnili. Pri biofortifikácii sa potvrdila genotypovo špecifická odpoveď.

Obsah IP6 je determinovaný kombináciou genetických, environmentálnych a technologických faktorov. Navrhovaná metóda je vhodná pre skríningové a biofortifikačné štúdie.
Kľúčové slová: kyselina fytová, biofortifikácia, kolorimetria

Abstract

Phytic acid (IP6) is the main storage form of phosphorus in plant seeds and significantly affects the bioavailability of essential metal ions and the nutritional quality of crops. This study applies a rapid and cost-effective microplate-based colorimetric method for the determination of IP6 in plant matrices

and demonstrates its suitability for assessing the influence of genetic, environmental, and agronomic factors on its content. IP6 was determined in various crops, including interannual comparisons, different tillage technologies, and zinc biofortification experiments in wheat considering the presence of mycorrhizal fungi. The results were statistically evaluated using analysis of variance.

The method demonstrated good reproducibility and sufficient sensitivity. IP6 content differed significantly among crops, with the highest levels observed in faba bean and the lowest in maize. Environmental conditions as well as tillage technology significantly influenced IP6 content. In biofortification experiments, a genotype-specific response was confirmed.

Overall, IP6 content is determined by a combination of genetic, environmental, and technological factors. The proposed method is suitable for screening and biofortification studies.

Key Words: phytic acid, biofortification, colorimetry

Úvod

Jedným z významných metabolitov rastlín je kyselina fytová (IP6; myo-inozitol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát). Predstavuje hlavnú zásobnú formu fosforu, najmä v semenách rastlín, kde tvorí viac ako 85 % celkového obsahu fosforu, pričom sa vyskytuje aj vo všetkých častiach rastlín. Jej obsah v sušine cereálií sa pohybuje v rozmedzí 0,5–5 %. Okrem zásobnej funkcie sa spolu so svojimi prekurzormi a derivátmi podieľa na regulácii bunkovej signalizácie a viacerých fyziologických procesoch, vrátane reakcií na rôzne formy biotického a abiotického stresu, transportu auxínu a udržiavania homeostázy fosforu [1,2,3].

Molekula IP6 obsahuje šesť väzbových miest schopných interagovať s kationmi kovov. Pri jej nadbytku vznikajú prevažne vo vode rozpustné komplexy, zatiaľ čo nadbytku iónov kovov vedie k tvorbe jej nerozpustných solí - fytátov [4,5,6]. Fytát predstavuje deprotonizovanú formu IP6 [7,8,9,10].

Z nutričného hľadiska je IP6 považovaná za antinutričnú látku. Jej prirodzená schopnosť tvorby nerozpustných komplexov s kationmi kovov vrátane esenciálnych, znižuje ich biologickú dostupnosť. Stabilita a rozpustnosť komplexov IP6–kov závisí najmä od typu kationu, pH prostredia a molárneho pomeru IP6 a kovu. Afinita IP6 k polyvalentným kationom rastie v poradí: $\text{Ca}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$. Fytátové soli s Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} sú rozpustnejšie pri pH nižšom ako 4–5, zatiaľ čo fytát s Mg^{2+} je dobre rozpustný v kyslých až mierne zásaditých podmienkach (pH približne 7,5). Naopak, fytát železitý je nerozpustný v rozmedzí pH 1–3,5, pričom jeho rozpustnosť sa zvyšuje pri pH vyššom ako 4 [11]. Z tohto dôvodu sa pri rôznych biofortifikačných experimentoch zameraných na zvýšenie dostupnosti esenciálnych prvkov sleduje aj obsah IP6. [12,13,14]

Monitorovanie obsahu IP6 v rastlinných vzorkách je žiaduce aj z pohľadu jej pozitívnych účinkov. Patrí medzi ne znižovanie toxicity nadbytku iónov kovov, inhibícia oxidácie lipidov, zlepšenie rozpustnosti fytátom viazaných bielkovín a využitie pri remediačných technológiách zameraných na kontaminované vody a pôdy, ktoré sú založené na viazaní ťažkých kovov (napr. Hg^{2+}) do fytátov [15,16,17].

Bez ohľadu na požiadavku (typ experimentu) stanovenia IP6 a povahu analyzovaných vzoriek, je v prvom kroku nevyhnutná jej extrakcia do vodného roztoku. Najčastejšie sa extrahuje pomocou s využitím vodných roztokov s kyslým pH, ktoré podporuje jej uvoľnenie (protonizáciu) z fytátov a aj čiastočnú hydrolýzu proteínov a ďalších biomolekúl. Na extrakciu sa používajú roztoky kyselín: CCl_3COOH , HCl , H_2SO_4 , prípadne ich zmesi. Výťažnosť extrakcie IP6 výrazne ovplyvňujú aj faktory, ako sú: pomer objemu extrakčnej zmesi k hmotnosti extrahovanej vzorky, koncentrácia a typ kyseliny, ako aj čas a typ použitej extrakčnej techniky [18,19].

Na kvantifikáciu kyseliny fytovej sa využívajú rôzne analytické metódy, klasické (potenciometrická titrácia, gravimetria), separačné (kvapalinová chromatografia a elektromigračné metódy) a spektrálne metódy (fluorimetria, UV-VIS) [8,20]. Prvá titračná metóda bola opísaná Heubnerom a Stadlerom (1914) [21] a bola založená na titracii vodného extraktu IP6 roztokom FeCl_3 s použitím NH_4SCN ako indikátora.

Neskôr bola publikovaná metóda spätnej titrácie, pri ktorej sa fytáty nasýtia známym množstvom Fe^{3+} iónov a ich prebytok sa titruje pomocou kyseliny sulfosalicylovej, ktorá selektívne reaguje s voľnými Fe^{3+} iónmi za vzniku farebného komplexu s jasne definovaným koncovým bodom titrácie [8,20,22].

V súčasnosti sú na stanovenie IP6 najviac preferované chromatografické metódy, najmä vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Prvé stanovenie IP6 pomocou HPLC uskutočnili Burbano a kol. (1995) [23] s použitím refraktometrického detektora. Chemická štruktúra IP6 neobsahuje chromofór ani fluorofór, a preto je jej detekcia a kvantifikácia bežnými spôsobmi výrazne limitovaná. Z toho dôvodu pri jej stanovení väčšina používaných metód využíva nepriamy typ stanovenia založený na stechiometrickej výmene iónu kovu z farebného komplexu [18,24,25]. Príkladom takého nepriameho stanovenia IP6 a jej derivátov na HPLC sú práce autorov Dost a Tokul [26] a Dost a Karaca [27], kde autori po separácii analytov na chromatografickej kolóne typu C18-CN využili UV-detekciu (460 nm) a signál IP6 vyhodnocovali po reakcii s roztokom $\text{Fe}(\text{SCN})_3$.

Najčastejšie využívané spektrálne metódy sú kolorimetria, fluorimetria a NMR [8,20]. Kolorimetrická metóda s využitím „Wadeovho činidla“ patrí medzi rýchle a často používané postupy stanovenia IP6. Je založená na vysokej afinite IP6 k Fe^{3+} iónom, pričom farebná intenzita ružového komplexu Fe^{3+} –sulfosalicylát klesá úmerne s koncentráciou IP6 vo vzorke. Tento pokles je možné kvantifikovať spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 500 nm [18,28].

Vzhľadom na významný vplyv kyseliny fytovej na biologickú dostupnosť esenciálnych iónov kovov je presné stanovenie jej obsahu nevyhnutné pre hodnotenie nutričnej kvality rastlinných potravín a účinnosti biofortifikačných stratégií. Bežne používané analytické metódy, ako je HPLC, poskytujú vysokú presnosť a citlivosť, avšak ich časová, technická a finančná náročnosť obmedzuje ich využitie pri rozsiahlych skriningových štúdiách. Z tohto dôvodu je cieľom tejto práce využitie nami navrhutej rýchlej, cenovo dostupnej a spoľahlivej kolorimetrickej metódy na stanovenie kyseliny fytovej v rôznych typoch vzoriek rastlinného materiálu. Navrhnutá metóda na mikrotitračných platničkách umožňuje pomerne rýchle spracovanie veľkého počtu vzoriek, a predstavuje praktický nástroj na hodnotenie nutričnej kvality plodín a monitorovanie pre biofortifikačné a ďalšie typy experimentov.

1 Materiál a metódy

Použité chemikálie: destilovaná voda, kyselina fytová (50% vodný roztok Sigma-Aldrich), kyselina chlorovodíková 35 % p.a. (centralchem), chlorid sodný p.a. (mikroCHEM), chlorid železitý bezvodý čistý (mikroCHEM), kyselina 5-sulfosalicylová dihydrát ($\geq 98.0\%$ Sigama-Aldrich) a hydroxid sodný p.a. (mikroCHEM).

Prístrojové vybavenie: TissueLyser II (QIAGEN), trepačka (environmental shaker-incubator ES-20), centrifúga (HERMLE Z 326 K) a reader mikrotitračných platničiek (BioTek Synergy H1 Multimode Reader).

1.1 Príprava roztokov

Na prípravu všetkých roztokov bola použitá destilovaná voda.

Ako extrakčné činidlo bol použitý vodný roztok HCl ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) s prídavkom NaCl ($c = 0,1 \text{ mol/l}$).

Wadeovo činidlo bolo pripravované denne zmiešaním FeCl_3 (bezvodý; $w = 0,018 \%$) s kyselinou 5-sulfosalicylovou ($w = 0,3 \%$) v destilovanej vode v objeme 100 ml. Roztok činidla bol upravený vodným roztokom NaOH na $\text{pH} \sim 3,05$ a uskladnený v tmavej fľaši v chladničke.

Kalibračná závislosť bola pripravená v rozsahu koncentrácií 40 – 120 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 1). Zásobný roztok kyseliny fytovej sa pripravil s $c = 500 \mu\text{g/ml}$ zo štandardu IP6 (50 % vodný roztok) rozpustením v 10x zriedenom extrakčnom činidle. Tento roztok sa zriedil na $c = 200 \mu\text{g/ml}$ a sériou riedení sme získali kalibračné roztoky s požadovanou koncentráciou. Kalibračné roztoky sa ďalej zmiešali s Wadeovým činidlom.

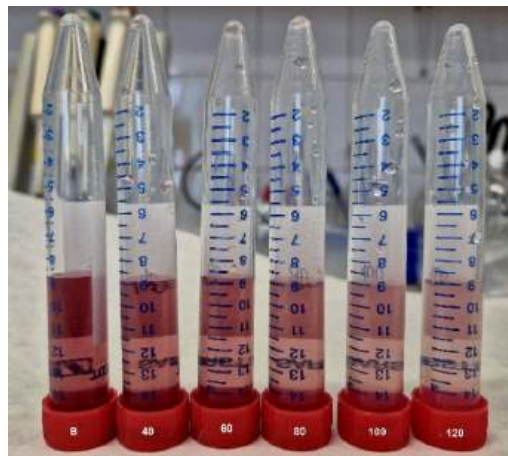
1.2 Vzorky a ich spracovanie

Vzorky rastlinného materiálu (pšenica, kukurica, jačmeň, bôb) boli získané z NPPC Piešťany a sú sumarizované v Tab.1.

Tab.1 Opis vzoriek použitého rastlinného materiálu.

rastlinný druh	rok pestovania	experiment
pšenica letná	2025	poľný
kukurica siata	2024 a 2025	poľný
jačmeň siaty	2025	poľný
bôb obyčajný	2025	poľný
pšenica	2022	fenotypovací

Každá vzorka bola pomletá pomocou homogenizátora TissueLyser II s frekvenciou drvenia 30 Hz/s po dobu 2 min. Vzorky boli uskladnené v suchých vzorkovníkoch pri laboratórnej teplote.



Obr.1 Ukážka kalibračných roztokov zmiešaných s Wadeovým činidlom. (B) je slepý pokus, a ďalej rastie koncentrácia IP6 zľava doprava, od 40 do 120 $\mu\text{g/ml}$.

1.3 Extrakcia kyseliny fytovej

Z každej vzorky bolo 3x navážených po 50 mg do eppendorfky, do každej bolo pridaných 1,25 ml extrakčného činidla a na magnetickej miešačke za stáleho miešania (500 rpm) sa extrahovala IP6 po dobu 1h, pri teplote $\sim 25^\circ\text{C}$. Ďalej boli vzorky centrifugované (5 min, 25°C , 4000 rpm) a odoberatý supernatant bol 10x zriedený destilovanou vodou. Zriedené extrakty sa ďalej zmiešali s Wadeovým činidlom. (Obr.2).

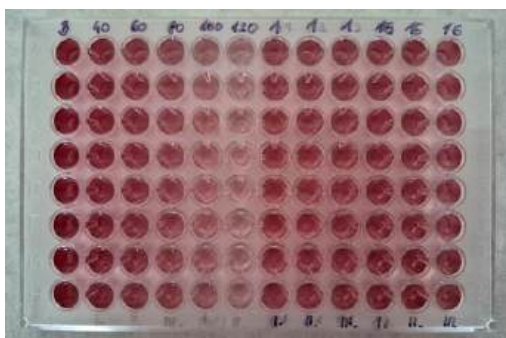


Obr. 2 Ukážka pomletých vzoriek zľava pšenice, jačmeňa, kukurice a bôbu, ich centrifugovaných extraktov v eppendorfkách a zmiešaných extraktov s Wadeovým činidlom v skúmavkách.

1.4 Stanovenie IP6

Stanovenie prebiehalo v 96 jamkovej mikrotitračnej platničke, kde sa do jamiek napipetovalo po 350 μl z pripravených kalibračných roztokov, resp. extraktov vzoriek. Každý roztok bol pipetovaný v ôsmich opakovaniach (Obr.3). Návrh a parametre stanovenia vychádzajú z prác autorov Jaldhani a kol. [29],

Dragičević a kol. [30], Shitre a kol. [31], Alsamman a Soubh [32] a Williams a kol. [33]. V ovládom softvéri readera mikrotitračných platničiek bola každá platnička meraná pri vlnovej dĺžke 505 nm.



Obr.3 Ukážka mikrotitračnej platničky s kalibračnými roztokmi (40-120 µg/ml) a slepým pokusom (B) na ľavej strane a analyzovanými extraktmi napravo.

1.5 Spracovanie experimentálnych údajov

Výsledky analýz boli spracované v MS Excel 365 a štatistické spracovanie v programoch IBM SPSS STATISTICS 22 a JMP 11.

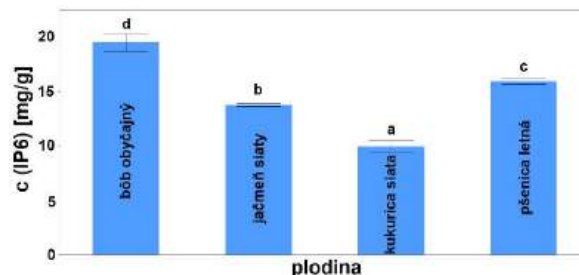
2 Výsledky a diskusia

Výsledky v tejto časti predstavujú možnosti aplikácie stanovenia IP6 s využitím navrhovanej mikroplatničkového metódy. Vzhľadom na prebiehajúci proces publikovania týchto výsledkov, všetky detaily experimentov nie sú popísané a ani interpretácie týchto čiastkových výsledkov nie sú konečné.

Hlavným cieľom prezentovaných výsledkov je sledovanie meniaceho sa obsahu kyseliny fytovej z hľadiska použitého experimentálneho prístupu (biofortifikácia a technológia obrábania pôdy). Hodnotili sme obsah IP6 v rôznych typoch plodín s chemicky rôznorodým zložením matrice. Z každého z 3 návažkov (N = 3) vzorky bolo uskutočnených 8 opakovaných meraní. Takéto nastavenie poskytovalo dostatok hodnôt na štatistické spracovanie, posúdenie prítomnosti odľahlých hodnôt a variability vplyvom rôznych experimentálnych faktorov (typ plodiny, podmienky experimentu, a i.).

Nižšie uvedené výsledky boli štatisticky hodnotené analýzou rozptylu ANOVA s *post hoc* testom (Duncan), pričom písmená v grafoch označujú štatisticky významné rozdiely na úrovni $p < 0,05$.

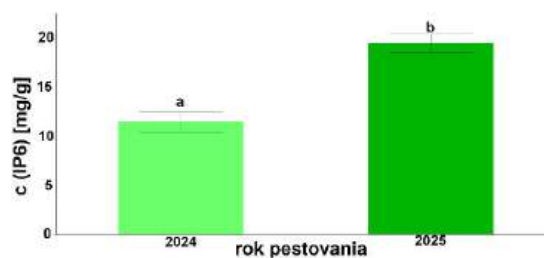
Prvá ukážka demonštruje stanovenie obsahu IP6 v 4 rôznych plodinách: pšenici letnej, jačmeni siatom, kukurici siatej a bôbe obyčajnom, pestovaných v roku 2025 s využitím konvenčnej technológie orby (Obr.4).



Obr.4 Porovnanie obsahu IP6 (mg/g) pre hodnotené plodiny vyjadrený ako aritmetický priemer, chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky (N = 3).

Na obrázku je vidieť variabilitu obsahu IP6 v závislosti od analyzovanej plodiny, pričom najvyšší zistený obsah bol v bôbe obyčajnom a najnižší v kukurici siatej. Na základe chybových úsečiek možno hodnotiť aj variabilitu výsledkov z pohľadu matrice, kde najvyššie zistené boli pri bôbe obyčajnom.

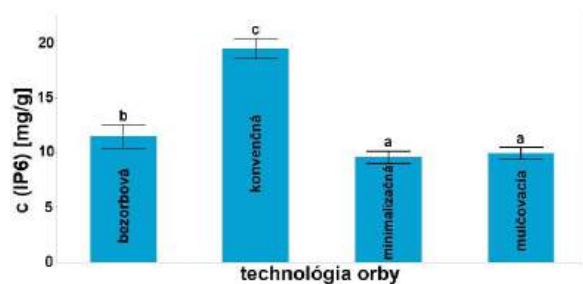
Ďalším príkladom využitia monitorovania obsahu IP6 je porovnanie plodín z pohľadu roku pestovania. Na príklade sú ukázané zistené obsahy IP6 v kukurici siatej pestovanej v roku 2024 a v roku 2025 s využitím konvenčnej technológie orby (Obr.5).



Obr.5 Porovnanie obsahu IP6 (mg/g) v kukurici siatej v závislosti od roku pestovania (2024 a 2025) vyjadrený ako aritmetický priemer, chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky (N = 3).

Výsledky demonštrujú, že obsah IP6 v plodine je významným spôsobom ovplyvnený environmentálnymi faktormi (počasie, dostupnosť živín a vody, a i.).

Tretí príklad (Obr. 6) ukazuje dopad agrárnych faktorov na nutričnú hodnotu plodín z pohľadu IP6. Na vzorkách kukurice pestovanej v roku 2025 sme stanovovali a porovnávali obsah IP6 v kontexte použitej technológie orby pred výsevom. Hodnotili sa 4 technológie orby: konvenčná, bezorbová, minimalizačná a mulčovací.

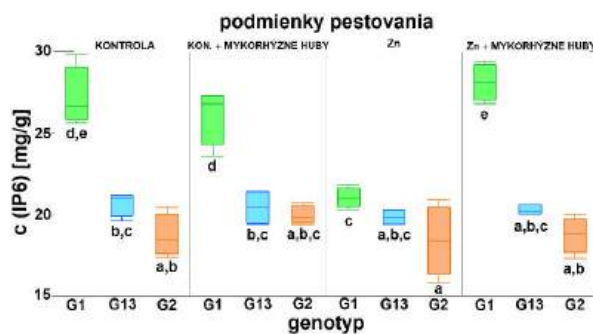


Obr. 6 Porovnanie obsahu IP6 (mg/g) v kukurici satej v závislosti od typu použitej technológie orby vyjadrený ako aritmetický priemer, chybové úsečky predstavujú smerodajné odchýlky (N = 3).

Výsledky tohto porovnania stanovených obsahov IP6 naznačujú možnosti zníženia obsahu IP6 použitím vhodnej technológie orby v prospech zlepšenia nutričných vlastností plodiny. Použitie minimalizačnej a mulčovacej technológie orby viedlo k štatisticky významne nižším obsahom IP6, v porovnaní s bezorbovou, resp. konvenčnou technológiou. Treba však zdôrazniť, že aj medzi týmito technológiami sa potvrdil štatisticky významný rozdiel v obsahu IP6.

Posledný typ experimentu rieši biofortifikáciu pšenice zinkom, kde bol sledovaný obsah IP6 z dôvodu vyhodnotenia vplyvu biofortifikácie spolu s efektom prítomnosti, resp. absencie mykorrhíznych húb. Porovnávanie obsahu IP6 sme realizovali na vzorkách troch rôznych genotypov kódovo označených G1, G2 a G13 a podmienkach pestovania zohľadňujúcich prídavok Zn a prítomnosť mykorrhíznych húb (Obr.7).

Genotyp G1 má najvyšší obsah IP6 pri všetkých testovaných podmienkach, zatiaľ čo genotyp G2 má najnižší obsah. Pri genotypoch G13 boli veľmi podobné obsahy IP6 bez ohľadu na podmienky pestovania. Úspešnosť biofortifikácie bola hodnotená ako zmena obsahu IP6 voči kontrolným podmienkam pre jednotlivé genotypy. Biofortifikácia zinkom viedla vo všetkých genotypoch k zníženiu obsahu IP6, pričom genotyp G1 reagoval najvýraznejším poklesom. Vplyv kombinácie mykorrhíznych húb a Zn na obsah IP6 nebol jednostranný, ako pri dopovaní Zn, ale potvrdila sa geneticky špecifická reakcia. Zatiaľ čo G13 nezaznamenal štatisticky významnú zmenu v obsahu IP6, tak G2 reagoval miernym a G1 rapídny nárastom obsahu IP6.



Obr.7 Vizualizácia porovnania obsahu IP6 mg/g v troch genotypoch pšenice (G1, G2 a G13) pestovaných v bežných podmienkach (kontrola), s prídavkom mykorrhíznych húb (kon.+ mykorrhízne huby), a prídavkom Zn (Zn) a aj v kombinácii s mykorrhíznyimi hubami (Zn+ mykorrhízne huby).

Záver

Výsledky potvrdzujú široké aplikačné možnosti mikroplatničkovej metódy stanovenia IP6 v rastlinných maticiach s rozdielnym chemickým zložením. Metóda preukázala dostatočnú reprodukovateľnosť a citlivosť na identifikáciu rozdielov podmienených genetickými, environmentálnymi a agrotechnickými faktormi.

Obsah IP6 sa štatisticky významne líšil medzi analyzovanými plodinami, s najvyššími hodnotami v bôbe obyčajnom a najnižšími v kukurici satej. Medziročné porovnanie vzoriek kukurice potvrdilo významný vplyv environmentálnych faktorov pri pestovaní. Technológia obrábania pôdy predstavovala ďalší významný vplyv z pohľadu obsahu IP6, pričom minimalizačná a mulčovací technológia viedli k štatisticky významne nižším obsahom IP6 v porovnaní s konvenčnou a bezorbovou technológiou.

Pri biofortifikácii pšenice zinkom sa preukázala okrem podmienok pestovania aj výrazná genotypovo podmienená odpoveď – zmeny v obsahu IP6. Genotyp G2 vykazoval vo všeobecnosti najnižšie obsahy IP6. Najvýraznejší pokles po aplikácii zinku vykazoval genotyp G1, ale v porovnaní s genotypmi G2 a G13 dosahoval najvyššie hodnoty bez ohľadu na experimentálne podmienky pestovania. Aj vplyv mykorrhíznych húb na obsah IP6 bol genotypovo podmienený, a to dokonca v oboch smeroch.

Na obsah IP6 najviac vplývajú environmentálne a technologické faktory, avšak výrazný vplyv majú aj genetické faktory. Navrhovaná mikroplatničková metóda predstavuje vhodný nástroj na ich rýchle a komplexné hodnotenie v kontexte širokého spektra experimentov.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí môjmu školiteľovi, doc. Mgr. Petrovi Nemečkovi, PhD. za jeho pomoc pri písaní príspevku, štatistickom spracovaní výsledkov a najmä za trpezlivosť a ústretovosť.

Ďalej podĎakovanie patrí NPPC Piešťany za poskytnutie vzoriek.

Práca vznikla s podporou riešeného projektu APVV-21-0504: Rôznorodosť pšeníc v schopnosti akumulovať ióny esenciálnych kovov a jej využitie pre ekologické hospodárstvo.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] COMINELLI, E. *et al.* 2020. Phytic Acid and Transporters: What Can We Learn from *low phytic acid* Mutants? In: *Plants*, vol. 9, pp. 94-113. ISSN 2223-7747.
- [2] MOHANRAJ, R. 2020. Phytochemicals in Cereals and their Potential Health Benefits-A Review. In: *Medical & Clinical Research*, vol. 5, pp. 157-163. ISSN 2577 – 8005.
- [3] WANG, P. *et al.* 2025. Extraction, isolation, purification, and detection techniques for phytic acid and their applications in various fields: A systematic review. In: *Food Chemistry*, vol. 486, pp. 1-13. ISSN 0308-8146.
- [4] KUMAR, A. *et al.* 2021 Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition. In: *Food Research International*, vol. 142, pp. 1-11. ISSN 0963-9969.
- [5] BOHN, L. *et al.* 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. In: *Journal of Zhejiang University Science B*, vol. 9, pp. 165-191. ISSN 1862-1783.
- [6] ZHANG, Y.Y. *et al.* 2020. Revisiting phytate-element interactions: implications for iron, zinc and calcium bioavailability, with emphasis on legumes. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, pp. 1696-1712. ISSN 1549-7852.
- [7] BROUNS, F. 2022. Phytic Acid and Whole Grains for Health Controversy. In: *Nutrients*, vol. 14, pp. 1-8. ISSN 2072-6643.
- [8] MARLOT, G., KOLAR, M. 2020. Analytical Methods for Determination of Phytic Acid and Other Inositol Phosphates: A Review. In: *Molecules*, vol. 26, pp. 1-28. ISSN 1420-3049.
- [9] VEIGA, N. *et al.* 2014. Coordination, microprotonation equilibria and conformational changes of myo-inositol hexakisphosphate with pertinence to its biological function. In: *Dalton Transactions*, vol. 43, pp. 16238-16251. ISSN 1477-9234.
- [10] CHATREE, S. *et al.* 2020. Role of Inositols and Inositol Phosphates in Energy Metabolism. In: *Molecules*, vol. 25, pp. 1-18. ISSN 1420-3049.
- [11] MELINI, V., MELINI, F. 2021. Phytic acid and phytase. In: MUSHTAQ, M., ANWAR, F., eds. *A Centrum of Valuable Plant Bioactives*. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, s. 681-706. ISBN 978-0-12-822924-8.
- [12] PALMGREN, M. G. *et al.* 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. In: *Trends in Plant Science*, vol. 13, pp. 464-473. ISSN 1360-1385.
- [13] LIU, D. *et al.* 2017. Agronomic Approach of Zinc Biofortification Can Increase Zinc Bioavailability in Wheat Flour and thereby Reduce Zinc Deficiency in Humans. In: *Nutrients*, vol. 9, pp. 1-14. ISSN 2072-6643.
- [14] STANGOULIS, J. C. R., KNEZ, M. 2022. Biofortification of major crop plants with iron and zinc – achievements and future directions. In: *Plant and Soil*, vol. 474, pp. 57-76. ISSN 1573-5036.
- [15] WANG, R., GUO, S. 2021. Phytic acid and its interactions: Contributions to protein functionality, food processing, and safety. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 20, pp. 2081-2105. ISSN 1541-4337.
- [16] CREA, F. *et al.* 2008. Formation and stability of phytate complexes in solution. In: *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 252, pp. 1108-1120. ISSN 0010-8545.
- [17] DE STEFANO, C. *et al.* 2006. Speciation of Phytate Ion in Aqueous Solution. Sequestering Ability toward Mercury(II) Cation in NaCl_{aq} at Different Ionic Strengths. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp. 1459-1466. ISSN 1520-5118.
- [18] SIVAKUMARAN, K., KOTHALAWALA, S. 2018. An overview of the analytical methods for food phytates. In: *International Journal of Chemical Studies*, vol. 6, pp. 2016-2020. ISSN 2321-4902.
- [19] BLOOT, A. P. M. *et al.* 2021. A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications. In: *Food Reviews International*, vol. 39, pp. 73-92. ISSN 1525-6103.
- [20] SHARMA, S. *et al.* 2022. An insight into phytic acid biosynthesis and its reduction strategies to improve mineral bioavailability. In: *Nucleus*, vol. 65, pp. 255-267. ISSN 0029-568X.
- [21] HEUBNER, W., STADLER, H. 1914. Determination of phytin by titration. In: *Biochem. Z.*, vol. 64, pp. 422. ISSN 0366-0753.
- [22] GARCIA-VILLANOVA, R. *et al.* 1982. Determination of Phytic Acid by Complexometric

- Titration of Excess of Iron (III). In: *Analyst*, vol. 107, pp. 1503-1056. ISSN 1364-5528.
- [23] BURBANO, C. *et al.* 1995. Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. In: *Food Chemistry*, vol. 52, pp. 321-325. ISSN 0308-8146.
- [24] OATWAY, L. *et al.* 2001. PHYTIC ACID. In: *Food Reviews International*, vol. 17, pp. 419-431. ISSN 1525-6103.
- [25] WIECZOREK, D. *et al.* 2022. Determination of phosphorus compounds in plant tissues: from colourimetry to advanced instrumental analytical chemistry. In: *Plant Methods*, vol. 18, pp. 1-17. ISSN 1746-4811.
- [26] DOST, K., TOKUL O. 2006. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. In: *Analytica Chimica Acta*, vol. 558, pp. 22-27. ISSN 0003-2670.
- [27] DOST, K., KARACA, G. 2016. Evaluation of Phytic Acid Content of Some Tea and Nut Products by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography /Visible Detector. In: *Food Anal. Methods*, vol. 9, pp. 1391-1397. ISSN 1936-976X.
- [28] WARSAME, A. O. 2025. An optimized high-throughput colorimetric assay for phytic acid quantification. In: *Crop Science*, vol. 65, pp. 1-10. ISSN 1435-0653.
- [29] JALDHANI, V. *et al.* 2023. Insights of Colorimetric Estimation of Phytic Acid in Rice Grain. In: *Journal of Rice Research*, vol. 16, pp. 87-94. ISSN 2319-3670.
- [30] DRAGIČEVIĆ, V. D. *et al.* 2011. Validation study of a rapid colorimetric method for the determination of phytic acid and inorganic phosphorus from seeds. In: *Acta periodica technologica*, vol. 42, pp. 11-21. ISSN 1450-7188.
- [31] SHITRE, A. S. *et al.* 2015. Genotypic variation for phytic acid, inorganic phosphate and mineral contents in advanced breeding lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Electronic Journal of Plant Breeding*, vol. 6, pp. 395-402. ISSN 0975-928X.
- [32] ALSAMMAN, S., SOUBH, L. 2019. Effect of Processing Methods on Phytic Acid Content of Peanut and Wheat. In: *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 12, pp. 2973-2976. ISSN 0974-360X.
- [33] WILLIAMS, L. B. *et al.* 2024. Comparing the nutritional composition and antioxidant properties of an Australian native grain variety with commonly consumed wheat. In: *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 59, pp. 4939-4948. ISSN 1365-2621.

Pôdne baktérie izolované z gudrónových odkalísk ako potenciálny nástroj bioremediácie

Cultivable soil bacteria from acidic tars with potential for bioremediation

Vladimíra Krempaská¹ – Viktória Chlpeková² – Elena Kupcová² – Michaela Murgašová¹ – Matej Vesteg¹

¹Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica

²Katedra chémie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica

¹vladimira.krempaska@umb.sk, ¹matej.vesteg@umb.sk

Abstrakt

Guadrónové odkaliská obsahujú vysoké koncentrácie perzistentných organických polutantov, najmä polyaromatických uhľovodíkov (PAU), ktoré sa vyznačujú vysokou stabilitou. Cieľom práce bola izolácia a charakterizácia kultivovateľných baktérií z okolia gudrónových odkalísk pri obci Predajná s cieľom posúdiť ich potenciál pre biodegradáciu ropných kontaminantov. Izolované bakteriálne kmene boli identifikované pomocou metódy MALDI-TOF MS. Detegované baktérie vo vzorkách zahŕňajú najmä rod *Pseudomonas*, zástupcov Actinobacteria a spórujúce baktérie rodu *Bacillus*. Bakteriálne zastúpenie naznačuje existenciu potenciálnych degradačných konzorcií a poukazuje na adaptáciu mikrobiálnej komunity na dlhodobý chemický stres. Výsledky potvrdzujú, že gudrónové sedimenty predstavujú zdroj mikroorganizmov s potenciálom využitia v procesoch environmentálnej bioremediácie.

Kľúčové slová: Bakteriálna bioremediácia, polyaromatické uhľovodíky, gudrónové odkaliská, MALDI-TOF MS

Abstract

Acidic tars contain high concentrations of persistent organic pollutants, particularly polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are characterized by high stability. The aim of this study was to isolate and characterize cultivable bacteria from the vicinity of acidic tars near the village of Predajná in order to assess their potential for the biodegradation of petroleum contaminants. Isolated bacterial strains were identified by MALDI-TOF MS analysis. The detected bacteria in the samples include mainly genus *Pseudomonas*, members of the taxon Actinobacteria

and spore-forming bacteria of the genus *Bacillus*. The bacterial composition suggests the presence of potential degradative consortia and reflects microbial adaptation to long-term chemical stress. The results confirm that tar-contaminated sediments represent a source of microorganisms with potential applications in environmental bioremediation processes.

Key Words: Bacterial bioremediation, polyaromatic hydrocarbons, acidic tars, MALDI TOF-MS

Úvod

Kontaminácia životného prostredia organickými polutantmi predstavuje dlhodobý a závažný environmentálny problém, najmä v prípade perzistentných organických zlúčenín, ktoré sa vyznačujú vysokou stabilitou, hydrofóbnosťou a schopnosťou akumulácie v živých organizmoch. Medzi významných zástupcov tejto skupiny patria polyaromatické uhľovodíky (PAU), vznikajúce predovšetkým pri neúplnom spaľovaní organického materiálu, priemyselných procesoch a manipulácii s ropnými produktmi [1]. V dôsledku svojej chemickej stability a nízkej rozpustnosti vo vode sa PAU akumulujú najmä v pôdach a sedimentoch, kde môžu pretrvávať dlhé časové obdobia a predstavovať riziko pre ekosystémy aj ľudské zdravie [2]. Významným zdrojom takéhoto znečistenia sú staré environmentálne záťaže, ako napr. gudrónové odkaliská, ktoré obsahujú komplexné zmesi ropných derivátov, aromatických zlúčenín, ako aj sulfónových a sírnych kyselín. Tieto odkaliská vznikali najmä pri spracovávaní ropy a v dôsledku nedostatočnej sanácie petrochemického odpadu [3]. Tradičné fyzikálno-chemické sanačné metódy sú často finančne a technologicky náročné a nemusia viesť k úplnej

mineralizácii kontaminantov. Z tohto dôvodu sa v posledných rokoch zvyšuje pozornosť venovaná biologickým metódam sanácie, predovšetkým bioremediácie pomocou baktérií, mikromycét či iných mikroorganizmov. Tieto bioremedičné postupy využívajú metabolický potenciál mikroorganizmov degradovať toxické organické zlúčeniny [4]. Mikroorganizmy prirodzene sa vyskytujúce v dlhodobu kontaminovaných lokalitách sú vystavené selekčnému tlaku, ktorý podporuje vznik a udržiavanie katabolických dráh umožňujúcich využívanie kontaminantov ako zdroja uhlíka a energie [5]. Izolácia a charakterizácia takýchto autochtónnych bakteriálnych kmeňov z prostredia gudrónových odkalísk preto predstavuje perspektívny prístup k identifikácii efektívnych mikroorganizmov využiteľných v degradačných procesoch environmentálnej bioremediácie.

1 Materiál a metodika

Bakteriálne izoláty boli získané z pôdnych vzoriek odobratých v okolí gudrónových odkalísk nachádzajúcich sa medzi obcami Predajná a Lopej. Odber pôdy sa realizoval približne 10 cm od brehu odkalísk Predajná 1 (48°49'15"N, 19°28'45"E) a Predajná 2 (48°49'16"N, 19°28'41"E). Vzorky boli odobierané do sterilných odberových plastových vreciek.

1.1 Izolácia bakteriálnych vzoriek

Čerstvo odobraté vzorky pôdy boli desiatkovo zriedené v sterilnej destilovanej vode a naočkované na Petriho misky s agarom. Na porovnanie a zachytenie väčšieho spektra baktérií boli použité nasledujúce médiá – nutrient agar, tryptic soya agar, R2A agar a Lauria-Bertani agar, všetky médiá boli zakúpené od firmy VWR International (Belgicko). Na porovnanie bol taktiež pripravený aj agar z pôdneho extraktu (24 h 1:2 pôdny výluh s prídavkom 15 % agaru a prídavku daného média na obohatenie). Vzorky boli inkubované 2-5 dní pri 25 °C, separátne kolónie boli odpichnuté a naočkované do nových Petriho misiek s tuhými médiami a následne boli vzorky identifikované pomocou metódy MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics).

1.2 Identifikácia pomocou MALDI TOF-MS

Bakteriálne izoláty boli analyzované pomocou metódy MALDI-TOF MS (hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou/ionizáciou za asistencie matrice s meraním času letu). Na prípravu vzoriek bola použitá metóda extrakcie proteínov odporúčaná výrobcom (Bruker Daltonics). Malé množstvo bakteriálnej kultúry bolo resuspendované v 300 µl sterilnej destilovanej

vody. Následne sa pridalo 900 µl absolútneho etanolu (Sigma-Aldrich, Nemecko) a každá vzorka bola intenzívne premiešaná na vortexe. Vzorky boli centrifugované pri maximálnych otáčkach (14 000 RPM) počas 2 minút a supernatant bol odstránený. Centrifugácia sa zopakovala a zvyškový etanol bol odstránený. Získané pelety sa nechali vysušiť na vzduchu. Ku každému peletu bolo pridané 30 µl 70 % kyseliny mravčej (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Nemecko) a 30 µl 100 % acetonitrilu (OTIMA® LC/MS GRADE, Fisher Scientific, Spojené kráľovstvo). Vzorky sa dôkladne premiešali a centrifugovali pri maximálnych otáčkach počas 2 minút. Následne bol 1 µl supernatantu nanosený na oceľovú MALDI doštičku (Bruker Daltonics, Brémy, Nemecko) a vysušený pri izbovej teplote. Po vysušení boli vzorky prekryté 1 µl MALDI matrice (IVD Matrix HCCA-portioned, Bruker Daltonics, Nemecko; α-kyano-4-hydroxyškoricová kyselina resuspendovaná v roztoku 47,5 % vody, 50 % acetonitrilu a 2,5 % kyseliny trifluóroctovej) a opäť vysušené pri laboratórnej teplote. Vysušené vzorky boli okamžite analyzované hmotnostným spektrometrom Microflex LT (Bruker Daltonics, Brémy, Nemecko) s použitím softvéru flexControl, verzia 3.4 (Bruker Daltonics). Podľa odporúčaní výrobcu hodnoty skóre v rozmedzí 2,00 – 3,00 indikujú vysoko spoľahlivú identifikáciu, 1,70 – 1,99 nízko spoľahlivú identifikáciu a 0,00 – 1,69 znamenajú, že identifikácia organizmu nie je možná.

1.3 Screening biodegradácie PAU

Screening biodegradácie polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU) prebiehal v 12-jamkových kultivačných doštičkách (VWR International, Belgicko). Experiment bol realizovaný ako dvojstupňová kultivácia pozostávajúca z rastovej a produkčnej fázy.

V rastovej fáze boli vybrané bakteriálne izoláty rozmnožené v inokulačnom Lauria-Bertani (LB) médiu (VWR International, Belgicko). Na prípravu inokula boli použité tri varianty LB média: čisté LB médium, LB médium obohatené o 25 mg/l naftalénu a LB médium obohatené o 25 mg/l fenantrénu. Cieľom bolo sledovať, či predchádzajúce vystavenie PAU podporí adaptáciu buniek na následnú produkčnú fázu kultivácie. Kultivácia inokula prebiehala 24 hodín pri 25 °C a 85 RPM (IKA-WERKE GmbH & Co. KG, Nemecko). Po prvotnej kultivácii bolo v ďalšom kroku 10 % inokula preočkovaných do minerálneho produkčného média (MSM), v ktorom jednotlivé PAU alebo ich metabolity biodegradácie predstavovali jediný zdroj uhlíka. Testované zlúčeniny boli fenantrén (VWR International, Belgicko), naftalén (Lachema, Česko), 1-naftol (Lachema, Česko), kyselina salicylová (Lachema,

Česko) a katechol (Lachema, Česko) v koncentráciách 50 a 100 mg/l. Použité MSM malo pH 7.2–7.4 a kompozíciu (l^{-1}): 5 ml fosfatového pufru (KH_2PO_4 , 8,5 g/l; $K_2HPO_4 \cdot H_2O$, 21,75 g/l; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 33.4 g/l; NH_4Cl , 5,0 g/l); 3 ml roztoku $MgSO_4$ (22,5 g/l); 1 ml roztoku $FeCl_3$ (0,25 g/l); 1,0 ml roztoku $CaCl_2$ (36,4 g/l) a nakoniec 1 ml roztoku stopových prvkov ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 39.9 mg/l; $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 42.8 mg/l; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 34.7 mg/l) [6]. Všetky chemikálie použité na prípravu MSM média boli zakúpené od firmy Centralchem, Slovensko.

Na experiment bolo vybraných 10 náhodných bakteriálnych izolátov. Ako negatívna kontrola bolo použité nezaočkované médium, zatiaľ čo na pozitívnu kontrolu slúžil zbierkový kmeň *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117). Kultúry boli v produkčnom médiu kultivované 72 hodín pri 25 °C a 85 RPM. Každých 24 hodín boli sledované fyziologické prejavy rastu, najmä zákal média, tvorba biomasy a biofilmu a tieto parametre boli porovnávané s kontrolnými vzorkami. Experiment bol realizovaný v dvoch nezávislých opakovaníach.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Izolácia a identifikácia baktérií z pôdnej frakcie v okolí gudrónov

Z pôdných vzoriek z okolia gudrónových odkalísk v oblasti obce Predajná bolo celkovo izolovaných približne 100 baktérií, pričom nie všetky sa podarilo identifikovať pomocou MALDI-TOF MS. Ober vzoriek prebiehal na dvoch lokalitách – Predajná 1 (P1) a Predajná 2 (P2), ktoré v minulosti slúžili ako úložiská nebezpečného odpadu z kyslej rafinácie produkované spoločnosťou Petrochema Dubová [7]. Staršia skládka P1 (roky pôsobenia 1964 – 1974) obsahuje primárne petrochemický odpad, zatiaľ čo skládka P2 (1974 – 1984) bola využívaná aj na odpady z čistiarne odpadových vôd (ČOV), ktoré sa nachádzali v areáli podniku Petrochema Dubová [8]. Na oboch lokalitách bolo zaznamenané silne kyslé pH (≈ 2), čo predstavuje významný selekčný faktor mikrobiálnej komunity.

V lokalite P1 (Tabuľka 1) dominovali najmä fakultatívne anaeróbne G⁻-baktérie typické pre silne kontaminované prostredia. Identifikované rody ako *Raoultella*, *Aeromonas* [9] a *Rahnella* [10] sú známe schopnosťou využívať aromatické zlúčeniny ako zdroj uhlíka. Prítomnosť druhov *Micrococcus luteus* [11] a *Shewanella putrefaciens* naznačuje potenciál biodegradácie jednoduchších arómatov a redoxne aktívnych prvkov (napr. Fe^{3+} a Mn^{4+}) [12].

Tabuľka 1: Identifikované izoláty z lokality P1

Izolát	Lokalita	Organism (best match)	Score value
1	pôda, P1	<i>Shewanella profunda</i>	1,75
2	pôda, P1	<i>Raoultella planticola</i> (MHNC_SB2787 ERL)	2,42
3	pôda, P1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,15
4	pôda, P1	<i>Aeromonas bestiarum</i>	2,30
5	pôda, P1	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1,95
6	pôda, P1	<i>Raoultella planticola</i> (MHNC_28_1 ERL)	2,46
7	pôda, P1	<i>Micrococcus luteus</i>	2,11
8	pôda, P1	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (CCUG 52805 CCUG)	2,46
9	pôda, P1	<i>Rahnella aquatilis</i> (CIP 105589 CIP)	2,36
10	pôda, P1	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (MB_18887 CHB)	2,39
11	pôda, P1	<i>Raoultella planticola</i> (MHNC_SB2787 ERL)	2,43

Lokalita P2 (Tabuľka 2) zahŕňala širšie spektrum mikrohabitátov (pôda, piesok na brehu, spálený gudrón a rizosféra machu), čo sa odrazilo aj vo vyššej diverzite izolátov. Výrazne dominovali metabolicky flexibilné G⁻ baktérie, predovšetkým z rodu *Pseudomonas*, ktoré sú známe širokým katabolickým potenciálom a schopnosťou degradovať alifatické aj aromatické uhľovodíky [13]. Ich schopnosť produkovať biosurfaktanty, vytvárať biofilmy a adaptovať sa na redoxne premenlivé podmienky im poskytuje konkurenčnú výhodu v hydrofóbnom a chemicky stresujúcom prostredí gudrónových sedimentov.

Prítomnosť aktinobaktérií (najmä *Corynebacterium glutamicum*) je zaujímavá, nakoľko tento druh nie je spájaný s degradáciou PAU, ale skôr s produkciou rôznych organických zlúčenín [14]. Sporujúce baktérie rodu *Bacillus* pravdepodobne predstavujú stabilnú zložku komunit schopných prežívania v extrémnych podmienkach [15].

Výskyt zástupcov čeľade Enterobacteriaceae (hlavne rody *Enterobacter*) naznačuje možnú existenciu degradačných konzorcií, v ktorých jednotlivé taxóny zohrávajú komplementárne úlohy.

Tabuľka 2: Identifikované izoláty z lokality P2

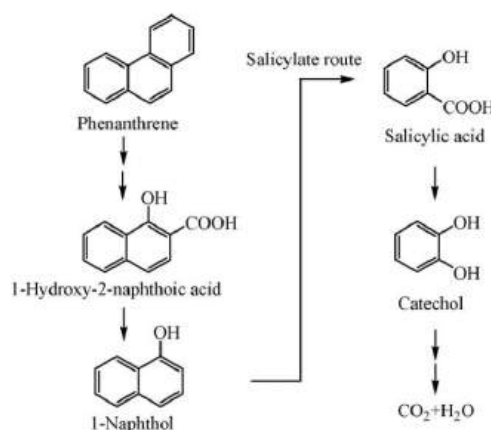
Izolát	Lokalita	Organism (best match)	Score value
12	piesok,	<i>Empedobacter</i>	1,75

	P2	<i>tilapiae</i>	
13	piesok, P2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,25
14	piesok, P2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (DSM 20301 DSM_2)	2,52
15	piesok, P2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (8029 CNCTC)	2,35
16	piesok, P2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2,20
17	piesok, P2	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2,26
18	piesok, P2	<i>Aeromonas bestiarum</i>	1,93
19	piesok, P2	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i> (7866 CNCTC)	2,38
20	piesok, P2	<i>Raoultella planticola</i>	2,30
21	piesok, P2	<i>Citrobacter freundii</i> (22054_1 CHB)	2,43
22	piesok, P2	<i>Bacillus cereus</i>	1,87
23	piesok, P2	<i>Lelliottia amnigena</i>	2,24
24	piesok, P2	<i>Pseudomonas graminis</i>	1,81
25	piesok, P2	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	1,90
26	piesok, P2	<i>Glutamicibacter mysorens</i>	2,30
27	gudrón, P2	<i>Pseudomonas putida</i>	2,24
28	gudrón, P2	<i>Enterobacter ludwigii</i>	2,19
29	gudrón, P2	<i>Klebsiella oxytoca</i> (VA31877_09 ERL)	2,37
30	gudrón, P2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853 THL)	2,37
31	gudrón, P2	<i>Serratia nematodiphila</i>	2,16
32	gudrón, P2	<i>Serratia marcescens</i>	1,98
33	gudrón, P2	<i>Pseudomonas putida</i> (B223 UFL)	2,34
34	gudrón, P2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,30
35	gudrón, P2	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2,19
36	gudrón, P2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,23
37	pôda, P2	<i>Kocuria salsicia</i>	2,36

38	pôda, P2	<i>Bacillus cereus</i>	2,01
39	pôda, P2	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,10
40	pôda, P2	<i>Siminovitchia fordii</i>	2,16
41	pôda, P2	<i>Paenibacillus lautus</i>	2,24
42	mach, P2	<i>Bacillus infantis</i>	2,29
43	mach, P2	<i>Priestia megaterium</i>	2,06
44	mach, P2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,00
45	mach, P2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2,27

2.2 Screening bioremediačného potenciálu

Bakteriálna degradácia polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU) ako sú naftalén alebo fenantrén prebieha najčastejšie dvoma hlavnými metabolickými dráhami – salicylátovou a ftalátovou [6]. V tomto screeningovom experimente boli sledované fyziologické odpovede vybraných izolátov na prítomnosť modelových PAU (naftalén, fenantrén) a medziproduktov salicylátovej dráhy (1-naftol, kyselina salicylová, katechol) v koncentráciách 50 a 100 mg/l. Súčasťou experimentu bolo aj overenie, či predbežná adaptácia kultúr na PAU (obohatenie inokula o 25 mg/l naftalénu alebo fenantrénu) ovplyvní ich následnú schopnosť rastu po preočkovaní do minerálneho média, kde jednotlivé PAU alebo ich medziprodukty predstavovali jediný zdroj uhlíka. Na nasledujúcom Obrázku 1 je znázornená salicylátová metabolická dráha.



Obrázok 1: Salicylátová metabolická dráha [6]

Do experimentu bolo zaradených desať izolátov: *Corynebacterium glutamicum*, *Kocuria salsicia*,

Siminovitchia fordii, *Bacillus infantis*, *Pseudomonas chlororaphis* a štyri ďalšie neidentifikované izoláty. Neidentifikované kmene boli vybrané na základe výrazne odlišných morfológických znakov kolónií – prvý vytváral výrazne mukoidné kolónie, druhý oranžovo pigmentované kolónie, tretí fialovo sfarbené kokovité kolónie a štvrtý mliečne sfarbené.

Vo všetkých testovaných prípadoch sa potvrdilo, že predchádzajúca expozícia PAU zlepšila adaptačnú odpoveď izolátov po preočkovaní, čo sa prejavilo schopnosťou využívať testované zlúčeniny ako jediný zdroj uhlíka. Rast bol hodnotený na základe semikvantitatívnych fyziologických parametrov: tvorba zákalu média, produkcia biofilmu a vločkovanie kultúr, ako aj zvýšenie produkcie biomasy. Kultivácia prebiehala 72 hodín s hodnotením v 24-hodinových intervaloch.

U všetkých izolátov bol zaznamenaný zákal média, čo naznačuje rast a adaptáciu na všetky testované substráty. V experimentoch sa taktiež potvrdilo, že obohatenie inokula o 25 mg/l PAU výrazne napomohlo v následnej produkčnej fáze kultivácie. Najvýraznejší nárast biomasy bol pozorovaný u izolátov z lokality P2 a to konkrétne *Corynebacterium glutamicum* a *Kocuria salsicia*, ktoré vykazovali vyššiu metabolickú aktivitu v porovnaní s ostatnými kmeňmi. Zaujímavým izolátom bol aj neidentifikovaný druh tvoriaci mukoidné kolónie, u ktorého bola zaznamenaná zvýšená tvorba biofilmu, čo môže predstavovať adaptačný mechanizmus na stresujúce podmienky. U kontrolného kmeňa *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117) nebol v daných podmienkach pozorovaný výrazný rast.

Záver

Porovnanie pôdnej biodiverzity v oblasti gudrónových jám v obci Predajná poskytuje veľmi zaujímavé poznatky z hľadiska bakteriálnej adaptácie na kontaminované prostredie. Je však potrebné zdôrazniť, že nami použitý kultivačný prístup selektuje predovšetkým rýchlorastúce a laboratórne adaptabilné mikroorganizmy, a preto výsledky reprezentujú iba časť skutočnej mikrobiálnej diverzity prítomnej v prostredí. Napriek tomu identifikované a testované taxóny poukazujú na výrazný potenciál prirodzenej degradácie kontaminantov a poskytujú základ pre ďalšie štúdie zamerané na funkčnú charakterizáciu katabolických dráh, detekcie génov a príslušných proteínov zodpovedných za degradáciu aromatických zlúčenín a interakcií v rámci mikrobiálnych konzorcií. V budúcich experimentoch bude vo väčšej miere skúmaný metabolizmus izolátov z lokality P2 *Corynebacterium glutamicum*, *Kocuria*

salsicia a neidentifikovaný mukoidný izolát, ktoré v screeningových testoch preukázali potenciál na bioremediačné aplikácie.

PodĎakovanie

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00009.

Zoznam bibliografických odkazov

- L. Montano *et al.*, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Environment: Occupational Exposure, Health Risks and Fertility Implications," *Toxics*, vol. 13, no. 3, p. 151, Feb. 2025, doi: 10.3390/toxics13030151.
- T. Kariyawasam, G. S. Doran, J. A. Howitt, and P. D. Prenzler, "Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in soils and sediments: Sustainable approaches for extraction and remediation," *Chemosphere*, vol. 291, p. 132981, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132981.
- J. B. Batchamen Mougno, F. Waanders, E. Fosso-Kankeu, and A. R. Al Ailli, "Leaching of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the Coal Tar in Sewage Wastewater, Acidic and Alkaline Mine Drainage," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 19, no. 8, p. 4791, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijerph19084791.
- A. B. Patel, S. Shaikh, K. R. Jain, C. Desai, and D. Madamwar, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches," *Front. Microbiol.*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.562813.
- C. E. D. Oro, B. M. Saorin Puton, L. D. Venquiaruto, R. M. Dallago, and M. V. Tres, "Effective Microbial Strategies to Remediate Contaminated Agricultural Soils and Conserve Functions," *Agronomy*, vol. 14, no. 11, p. 2637, Nov. 2024, doi: 10.3390/agronomy14112637.
- X.-Q. Tao, G.-N. Lu, Z. Dang, C. Yang, and X.-Y. Yi, "A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 3, pp. 401–408, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.procbio.2006.09.018.
- K. Palúchová and A. Brucháneková, "Environmentálne záťaž," vol. 2, no. ISSN 1335-1877, pp. 10–11, 2009.
- M. Maloveský, J. Schwarz, and P. Tupý, "Projekt technického riešenia likvidácie, sanácie a rekultivácie skládky nebezpečných odpadov Predajná I a Predajná II," 1999
- O. O. Alegbeleye, B. O. Opeolu, and V. Jackson, "Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South

Africa," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 48, no. 2, pp. 314–325, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.bjm.2016.07.027.

- [10] W. Smutek, Z. Cybulski, U. Guzik, T. Jesionowski, and E. Kaczorek, "Three chlorotoluene-degrading bacterial strains: Differences in biodegradation potential and cell surface properties," *Chemosphere*, vol. 237, p. 124452, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124452.
- [11] T. O. Olowomofe, J. O. Oluyeye, B. I. Aderiye, and O. A. Oluwole, "Degradation of poly aromatic fractions of crude oil and detection of catabolic genes in hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Agbabu bitumen sediments in Ondo State," *AIMS Microbiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 308–323, 2019, doi: 10.3934/microbiol.2019.4.308.
- [12] C.-H. Li, Y.-S. Wong, and N. F.-Y. Tam, "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 21, pp. 8083–8092, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.005.
- [13] J. Nogales, J. L. García, and E. Díaz, "Degradation of Aromatic Compounds in Pseudomonas: A Systems Biology View," in *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–49. doi: 10.1007/978-3-319-39782-5_32-1.
- [14] N. Junker, S.-S. Poethe, and V. F. Wendisch, "Aromatic compound production by *Corynebacterium glutamicum*: unified strategies at the core and diversity by extension," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 96, p. 103372, Dec. 2025, doi: 10.1016/j.copbio.2025.103372.
- [15] P. Mandree, W. Masika, J. Naicker, G. Moonsamy, S. Ramchuran, and R. Laloo, "Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Industry Contaminated Soil Using Indigenous *Bacillus* spp.," *Processes*, vol. 9, no. 9, p. 1606, Sep. 2021, doi: 10.3390/pr9091606.

Vplyv kadmiového stresu na profil izoforiem β -1,3-glukanáz u dvoch odrôd *Glycine max*

Effect of Cadmium Stress on the Isoform Profile of β -1,3-Glucanases in Two Cultivars of *Glycine max*

Daniela Motičáková - Patrik Mészáros

Katedra botaniky a genetiky, FPVal UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 949 01 Nitra,
daniela.moticakova@ukf.sk, pmeszaros@ukf.sk

Abstrakt

Štúdia prezentuje komparatívnu analýzu zmien v aktivite izoforiem β -1,3-glukanáz u dvoch genotypov sóje fazuľovej (*Glycine max* L. Merr.) s odlišnou mierou tolerancie voči kadmiumu. Výskum monitoruje dynamiku enzymatickej odpovede v závislosti od fyziologického veku listov a dĺžky expozície stresoru. Pomocou SDS-PAGE a natívnej PAGE bol identifikovaný profil enzymatických aktivít v listoch rastlín vystavených kadmiumu v koncentráciách 10 a 100 mg·kg⁻¹ Cd²⁺. Výsledky potvrdili, že tolerantná odroda Adesa udržiava stabilitu obranných mechanizmov včasnou a kontinuálnou indukciou kľúčových izoforiem. Naproti tomu u citlivej odrody Albenga bola zaznamenaná nekonzistentná odozva, ktorá pri chronickom strese vyústila do vyčerpania obranných kapacít. Zistené rozdiely v enzymatických profiloch poskytujú potenciálne biomarkery využiteľné pri selekcii metalotolerantných kultivarov sóje pre poľnohospodársku prax v environmentálne zaťažených oblastiach.

Kľúčové slová: kadmium, abiotický stres, sója fazuľová, β -1,3-glukanázy

Abstract

This study presents a comparative analysis of β -1,3-glucanase isoform activity changes in two soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypes with different cadmium tolerance levels. The research monitors the dynamics of the enzymatic response concerning leaf physiological age and stress exposure duration. Using SDS-PAGE and native PAGE, enzymatic activity profiles were identified in leaves of plants exposed to cadmium in concentrations 10 and 100 mg·kg⁻¹ Cd²⁺. The results confirmed that the tolerant cultivar Adesa maintains stable defense mechanisms through early and continuous induction of key isoforms. In contrast, the sensitive cultivar Albenga showed an inconsistent response, leading to the depletion of defense

capacities under chronic stress. The identified differences in enzymatic profiles provide potential biomarkers applicable in the selection of metal-tolerant soybean cultivars for agricultural practice in environmentally burdened areas.

Key Words: cadmium, abiotic stress, soybean, β -1,3-glucanases

Úvod

Kontaminácia pôd ťažkými kovmi predstavuje rastúcu hrozbu pre poľnohospodárstvo, pretože ohrozuje úrodnosť pôdy, produktivitu plodín a bezpečnosť potravín. Medzi neesenciálne a vysoko toxické kovy patrí kadmium (Cd), ktoré je mobilné v pôdach a ľahko sa akumuluje v rastlinách. Hlavné zdroje Cd zahŕňajú priemyselné emisie, dopravu, ťažbu a používanie fosforečných hnojív. Expozícia kadmiumu môže viesť k oxidačnému poškodeniu buniek, narušeniu metabolizmu a inhibícii rastu, čo negatívne ovplyvňuje kvalitu a výnos plodín [1, 2, 3].

Rastliny reagujú na abiotický stres, vrátane toxických kovov, aktiváciou komplexných obranných mechanizmov. Kľúčovú úlohu pri tejto odpovedi zohrávajú patogénom indukované proteíny (PR-proteíny), ktoré zahŕňajú rôzne hydrolytické enzýmy schopné modifikovať bunkovú stenu a degradovať polysacharidy, zachovávať integritu pletív a regulovať signalizáciu spojenú so stresom [4, 5]. Medzi najdôležitejšie patrí skupina β -1,3-glukanáz (EC 3.2.1.39), ktoré štiepia β -1,3-glykozidické väzby v β -glukanoch bunkovej steny. Tieto enzýmy sa podieľajú na rastových a vývinových procesoch, diferenciácii buniek, degradácii kalózy a modulácii plazmolekulového transportu, pričom ich aktivita odráža schopnosť rastliny adaptovať sa na nepriaznivé podmienky [6, 7, 8].

Sója fazuľová (*Glycine max* L. Merr.) patrí medzi ekonomicky významné plodiny a je citlivá na kontamináciu kadmiumom. Genotypová variabilita v akumulácii a translokácii Cd robí zo sóje vhodný model

na skúmanie molekulárnych mechanizmov stresových odpovedí. Vysoká redundancia génov a rozmanitosť izoformiem umožňuje detailné hodnotenie účinkov kadmia na špecifické proteíny, vrátane β -1,3-glukanáz, čo je dôležité pre pochopenie adaptácie rastlín na ťažké kovy a zlepšenie odolnosti hospodársky významných kultivarov [9, 10].

Cieľom tejto štúdie je preto skúmať vplyv kadmiového stresu na profil izoformiem β -1,3-glukanáz u dvoch odrôd *Glycine max*, čím sa prispeje k pochopeniu molekulárnych mechanizmov adaptácie rastlín na abiotický stres.

1 Materiál a metodika

1.1 Rastlinný materiál a rastové podmienky

Na základe predbežného skríningu [11] tolerance voči Cd sme do hlavného experimentu vybrali dve odrody s odlišnou citlivosťou: Albenga (citlivá) a Adesa C1 (tolerantná). Semená nám dodala spoločnosť SAATBAU Slovensko, s.r.o.

Nepoškodené semená sme následne povrchovo sterilizovali v 1 % (w/v) chlórnanu sodného po dobu 20 minút a trikrát prepláchli sterilnou destilovanou vodou. Predklíčenie prebiehalo v plastových nádobách vystlaných tromi vrstvami navlhčenej buničitej vaty pri 24 °C v tme počas 24 hodín. Po kontrole prerastených radikúl sme zdravé klíčence vysadili do plastových kvetináčov (objem 5 l, 1100 g substrátu Durpeta Profi 2A), po 15 klíčencov na kvetináč. Experiment sme realizovali v troch nezávislých biologických opakovaniach.

Rastliny sme pestovali v rastovej komore Fitotron HGC-1514 pri fotoperióde 16 h deň/8 h tma, teplote 26/18 °C, relatívnej vlhkosti 60%/50% a intenzite svetla 18 000 lx. Kadmium sme aplikovali v deň výsevu vo forme $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ prostredníctvom zálievky pri koncentráciách 10 a 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$. Kontrolné rastliny sme zalievali iba vodou.

Vzorky listov sme odoberali v troch časových intervaloch: 16., 21. a 27. deň po aplikácii Cd, čo zodpovedalo fenologickým fázam BBCH 12–14 (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie scale). Listové vzorky sme kategorizovali podľa ich poradia na rastline (smerom od bázy k vrcholu) ako L1 (fyziologicky najstarší, prvý trojpočetný list), L2 (druhý trojpočetný list) a L3 (vývinovo najmladší, tretí trojpočetný list). Týmto značením sme zabezpečili prehľadnosť o gradiente starnutia pletív. Značenie vzoriek v práci kombinuje pozíciu listu a poradie odberu. Napríklad vzorka L1-1

predstavovala prvý vyvinutý trojpočetný list odobratý pri prvom termíne (16. deň), zatiaľ čo L1-3 predstavovala ten istý fyziologicky starší list odobratý pri treťom termíne (27. deň), kedy už boli na rastline prítomné aj vývinovo mladšie listy L2 a L3. Čerstvé pletivá určené na proteínové analýzy sme okamžite zmrazili v kvapalnom dusíku a skladovali pri -75 °C.

1.2 Extrakcia proteínov a stanovenie ich koncentrácie

Zmrazené listové pletivá (~200 mg) sme homogenizovali v mikroskúmavkách s tekutým dusíkom a zmiešali s 320 μl ľadovo chladeného extrakčného pufru (0,1 M octan sodný, pH 5,0; 1 mM PMSF). Homogenát sme centrifugovali trikrát (15, 10 a 10 min) pri $14\,000 \times g$ a 4 °C. Supernatant sme rozdelili na alikvoty a skladovali pri -75 °C.

Koncentráciu proteínov sme stanovili Bradfordovou metódou s Coomassie Brilliant Blue G-250, absorbanciu sme merali pri 595 nm spektrofotometrom Rayleigh UV 2601 a koncentráciu sme vypočítali podľa kalibračnej krivky BSA.

1.3 SDS-PAGE

Aktivitu celkových β -1,3-glukanáz sme analyzovali pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) [12]. Separáčny gél (12,5 %) sme pripravili s 0,25 % laminarínu ako substrátom pre enzymatickú aktivitu glukanáz. Separovali sme 20 μg proteínov a elektroforézu sme realizovali pri 18 mA (štartovací gél) a 24 mA (separačný gél) pri 7 °C. Gély sme po elektroforéze inkubovali 1 hodinu v 0,5 M octane sodnom (pH 5,2) pri 37 °C a fixovali sme 7 % (v/v) kyselinou octovou v 20 % (v/v) metanole po dobu 5 minút. Farbenie gélov sme vykonali v 0,1 % (w/v) roztoku trifenyltetrazólium chloridu pri 90 °C, až kým sa nevytvorili červené pásy indukujúce enzymatické aktivity.

1.4 Natívna PAGE

Izoformy β -1,3-glukanáz sme separovali na 11 % natívnych géloch [12]. Kyslé/neutrálne izoformy sme separovali anodickou elektroforézou a zásadité/neutrálne katódovou elektroforézou. Detekciu sme vykonali rovnakým spôsobom ako pri SDS-PAGE, bez vymývania SDS.

1.5 Analýza obrazu a štatistická analýza

Gély sme naskenovali skenerom Epson Perfection V-600 a analyzovali softvérom Scion Image 4. Aktivitu

izoforiem sme kvantifikovali ako priemernú hustotu pixelov s korekciou na pozadie. V prípadoch, keď sme nezískali dostatočné množstvo biologického materiálu (najmä u odrody Albenga pri koncentrácii 100 mg·kg⁻¹) alebo došlo k technickému znehodnoteniu gélu, sme tieto hodnoty označili ako N.A. (not analyzed).

Experiment sme realizovali v troch biologických opakovaníach, pričom každé meranie malo dva technické replikáty. Hodnoty uvedené v tabuľkách predstavovali priemer všetkých 6 meraní. Rozdiely medzi kontrolou a ošetrovanými variantmi (10 a 100 mg·kg⁻¹ Cd) sme hodnotili dvojvýberovým Welchovým t-testom v MS Excel, pričom sme považovali za štatisticky významné hodnoty p ≤ 0,05.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Analýza celkových β-1,3-glukanáz

Komparatívnou analýzou oboch genotypov sme odhalili rozdielnu dynamiku enzymatickej odpovede, pričom kľúčovým diferenciálnym znakom bola aktivita 4. frakcie celkových glukanáz.

Tab. 1. Aktivita celkových β-1,3-glukanáz - Albenga

		Frakcia:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
CELKOVÉ GLUKANÁZY ALBENGA	L1-1	K		10,05		7,88			
		10		10,12		7,78			
		100		10,11		11,11			
	L1-2	K		7,04	4,61	21,93	N.A.	5,57	
		10		6,50	5,10	44,30*	59,01	10,24	
		100		N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
	L1-3	K		3,25	16,73	13,57	31,50	N.A.	4,59
		10		7,25*	15,33	20,06	33,21	26,67	18,58*
		100		9,63**	16,25	52,32**	17,10	31,52	23,66**
	L2-1	K		8,40	4,33	7,48			4,01
		10		9,85	5,18	7,14			4,22
		100		N.A.	N.A.	N.A.			N.A.
	L2-2	K		5,75	15,24	16,96	38,79	47,94	16,60
		10		4,45	12,07	6,20**	14,77**	N.A.	5,23*
		100		5,46	16,27	18,65	59,47	45,83	14,20
	L3-1	K		13,13		8,88			5,82
		10		11,65		15,51			6,70
		100		11,71*		18,52			5,44

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd (mg·kg⁻¹); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne

bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery (n=6), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

U odrody Albenga sme zaznamenali v štádiu L1-3 pri koncentrácii 100 mg·kg⁻¹ Cd výrazný pokles aktivity 4. frakcie o 45,7 % (z 31,50 na 17,10). Tento stav mohol pri chronickom strese predstavovať zníženú stabilitu sledovaného proteínu, čo naznačovalo jeho postupnú destabilizáciu (Tab. 1). Diferenciáciu adaptačného potenciálu sme pozorovali aj v štádiu L3-1 pri krátkej expozícii, kde sme u odrody Albenga zaznamenali signifikantný pokles 2. frakcie o 10,8 % (p ≤ 0,05). Trendy neboli však uniformné; u odrody Albenga sme v štádiu L3-1 zaznamenali aj nesignifikantný nárast 4. frakcie o 108,5 %. Tieto parciálne posuny naznačovali, že určité rozdiely v enzymatickom profile medzi genotypmi sa začali prejavovať už v ranej fáze pôsobenia stresora, hoci v tomto štádiu ešte nedosahovali úroveň štatistickej signifikancie.

Tab. 2. Aktivita celkových β-1,3-glukanáz – Adesa

		Frakcia:	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
CELKOVÉ GLUKANÁZY ADESA	L1-1	K							
		10						N.A.	
		100							N.A.
	L1-2	K		4,44		9,78			
		10		3,15		13,60			
		100		4,97		29,61**			
	L1-3	K		9,03		8,94		N.A.	
		10		8,16		14,47**		N.A.	
		100		8,64		25,78**		24,74	
	L2-1	K		8,17		6,51			
		10		8,01		8,17			
		100		8,90		10,33			
	L2-2	K		9,47		12,97			
		10		8,94		17,31			
		100		9,02		26,85*			
	L3-1	K		8,29		10,82			
		10		7,34		9,48			
		100		7,73		16,10*			

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd (mg·kg⁻¹); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery (n=6), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie

indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

U odrody Adesa sme v 4. frakcii pri koncentrácii 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd zaznamenali štatisticky signifikantnú indukciu takmer vo všetkých sledovaných vývinových štádiách (Tab. 2). Najvýraznejšia odozva bola pozorovaná v štádiu L1-2, kde aktivita vzrástla viac ako 3-násobne (o 202,8 %; $p \leq 0,01$). Stabilne vysoká indukcia pretrvávala aj pri dlhodobej expozícii v štádiu L1-3 (nárast o 188,4 %; $p \leq 0,01$) a v štádiu L2-2 (nárast o 107 %; $p \leq 0,05$). Signifikantné zvýšenie aktivity sme zaznamenali aj vo vývinovo najmladších pletivách L3-1 (o 48,8 %; $p \leq 0,05$). Jedinou výnimkou bolo štádium L2-1, kde nárast aktivity (o 58,7 %) nedosiahol hladinu signifikancie. Skutočnosť, že k preukaznému nárastu došlo v listoch s najdlhšou expozíciou (L1-3), ako aj v najmladších pletivách (L3-1), naznačovala vysokú stabilitu obranného mechanizmu. Zdalo sa, že u tolerantného genotypu dĺžka pôsobenia Cd nebola limitujúcim faktorom pre aktiváciu enzymatickej obrany.

2.2 Analýza kyslých/neutrálnych izoforiem β -1,3-glukanáz

Tab. 3. Aktivita kyslých/neutrálnych β -1,3-glukanáz – Albenga

Frakcia:		1.	2.	3.	4.	
KYSLÉ/NEUTRÁLNE GLUKANÁZY ALBENGA	L1-1	K	5,79			
		10	4,15			
		100	5,05			
	L1-2	K	6,74	3,58	24,15	N.A.
		10	9,37	5,30	60,14*	22,62
		100	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	L1-3	K	5,10	4,86	64,35	13,46
		10	5,53	19,40*	52,11*	29,53
		100	8,27	29,48**	36,36**	41,39**
	L2-1	K	7,37	2,59	3,48	
		10	16,22*	3,98**	4,50	
		100	N.A.	N.A.	N.A.	
L2-2	K	10,98	9,65	45,19	23,72	
	10	13,05	N.A.	13,30**	N.A.	
	100	16,22	6,80	68,77**	11,53	
L3-1	K	12,65	3,12	11,26	3,67	
	10	10,25	3,03	21,82	4,75	
	100	14,94	3,78	32,73	5,17	

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery ($n=6$), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

U odrody Albenga sme v 3. frakcii pozorovali nekonzistentnú odpoveď (Tab. 3). Po počiatkovej aktivácii v štádiu L1-2, kedy pri koncentrácii 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd aktivita vzrástla o 149 % ($p \leq 0,05$), sme pri predĺženej expozícii v L1-3 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd) zaznamenali prudký pokles o 43,5 % ($p \leq 0,01$). Albenga sa snažila kompenzovať indukciu iných frakcií – najmä 2. frakcie v L1-3 (6-násobný nárast voči kontrole; $p \leq 0,05$) a 3. frakcie v L2-2 (nárast o 52,2 %; $p \leq 0,05$) – tento nestabilný profil však naznačoval obmedzenú konzistenciu enzymatickej odpovede pri dlhodobej expozícii kadmiumu. Logika L1–L3 teda ukázala počiatkovú mobilizáciu, následný pokles a čiastočnú kompenzáciu inými frakciami.

Tab. 4. Aktivita kyslých/neutrálnych β -1,3-glukanáz – Adesa

Frakcia:		1.	2.	3.	4.	
KYSLÉ/NEUTRÁLNE GLUKANÁZY ADESA	L1-1	K	3,90	2,70	2,56	2,17
		10	6,61	3,47	2,53	1,88
		100	8,22*	3,38	9,81	N.A.
	L1-2	K	3,00	2,80	8,70	4,07
		10	3,20	3,26	15,69*	4,70
		100	4,60*	3,77*	51,40**	8,76*
	L1-3	K	4,22	3,22	16,37	3,88
		10	2,96*	2,91	30,54*	6,13**
		100	11,20**	6,90**	79,95**	22,13**
	L2-1	K	4,33	2,94	2,93	2,26
		10	4,82	2,44	5,53	3,40**
		100	7,81*	3,65	9,62	3,17
	L2-2	K	3,95	2,97	8,47	3,60
		10	4,11	3,25	15,85**	4,77*
		100	13,36	4,06	34,58	6,86
	L3-1	K	3,94	2,93	2,47	2,23
		10	3,80	2,72	4,37*	3,44
		100	19,95**	9,75**	15,98*	6,62

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne

bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery (n=6), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

U odrody Adesa sme pozorovali progresívny a stabilnejší trend zvyšovania enzymatickej aktivity (Tab. 4). Významným indikátorom adaptability bola indukcia 3. frakcie v pletivách L1-3 pri 100 mg·kg⁻¹ Cd, kde aktivita dosiahla takmer 5-násobok kontrolnej hodnoty (nárast o 388,4 %; p ≤ 0,01). Stabilitu tohto trendu sme potvrdili aj v štádiu L1-2, kde aktivita vzrástla o 490,8 % (p ≤ 0,01). Tolerantný genotyp preukázal včasnú aktiváciu enzymatickej odpovede už v najmladších pletivách L3-1, s indukciou 1. frakcie (5-násobný nárast; p ≤ 0,01) a 2. frakcie (3,3-násobný nárast; p ≤ 0,01). Logika L1–L3 ukázala včasnú, kontinuálnu a koordinovanú aktiváciu β-1,3-glukanáz, ktorá mohla efektívne chrániť bunkovú stenu pred penetráciou kadmia.

2.3 Analýza zásaditých/neutrálnych izoforiem β-1,3-glukanáz

Tab. 5. Aktivita zásaditých/neutrálnych β-1,3-glukanáz – Albenga

		Frakcia:	1.	2.	3.	4.	5.	6.
ZÁSADITÉ/NEUTRÁLNE GLUKANÁZY ALBENGA	L1-1	K	3,21		2,11			
		10	5,25		3,26			
		100	6,75		9,36			
	L1-2	K	7,39		8,79		N.A.	
		10	16,20		19,23		7,32	
		100	N.A.		N.A.		N.A.	
	L1-3	K	26,50	N.A.	20,79	N.A.	5,42	N.A.
		10	22,15	31,13	30,47*	33,16	30,59*	N.A.
		100	16,90	20,42	24,84	37,69	27,99**	26,85
	L2-1	K	2,70	3,40	4,46			
		10	7,68*	5,42	7,19			
		100	N.A.	N.A.	N.A.			
	L2-2	K	40,85		42,89		17,85	
		10	10,06**		15,21**		N.A.	
		100	45,94		61,90*		18,86	
	L3-1	K	19,49		17,31			
		10	12,33		16,11			
		100	23,57		23,89			

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd (mg·kg⁻¹); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie

odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery (n=6), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

Kontrast v adaptačnom potenciáli oboch genotypov sme potvrdili aj pri analýze zásaditých a neutrálnych izoforiem. Albenga vykazovala výraznú variabilitu, naznačujúcu alteráciu metabolizmu (Tab. 5). V štádiu L1-3 pri koncentrácii 100 mg·kg⁻¹ Cd sme zaznamenali nesignifikantný pokles aktivity 1. frakcie o 36,2 % (z 26,50 na 16,90), zatiaľ čo 5. frakcia vykazovala viac ako 5-násobnú signifikantnú indukciu (o 416,4 %; p ≤ 0,01). Výraznú nekonzistentnosť odpovede sme pozorovali aj v štádiu L2-2, kde pri Cd10 nastal prudký signifikantný pokles 1. frakcie o 75,4 % (p ≤ 0,01), avšak pri 100 mg·kg⁻¹ Cd sme pozorovali nárast 3. frakcie o 44,3 % (p ≤ 0,05). Tento nestabilný profil poukázal na nerovnomernú mobilizáciu enzymatickej obrany v pletivách odrody Albenga.

Tab. 6. Aktivita zásaditých/neutrálnych β-1,3-glukanáz – Adesa

		Frakcia:	1.	2.	3.	4.	5.	6.
ZÁSADITÉ/NEUTRÁLNE GLUKANÁZY ADESA	L1-1	K	N.A.					
		10	N.A.					
		100	N.A.					
	L1-2	K	5,32		17,79			
		10	4,63		18,30			
		100	18,57		40,25**			
	L1-3	K	23,14		40,53		N.A.	
		10	25,17		39,09		N.A.	
		100	41,11*		55,76		15,67	
	L2-1	K	N.A.					
		10	N.A.					
		100	N.A.					
	L2-2	K	17,15		35,52			
		10	19,35		40,57			
		100	22,86		20,79**			
	L3-1	K	4,15		3,36			
		10	6,64		7,91*			
		100	33,92**		19,56**			

K – kontrola; 10/100 – koncentrácia Cd (mg·kg⁻¹); označenie vzoriek – poradie listu (L1–L3) + poradie odberu (1–3); N.A. – neanalyzované vzorky. Prázdne bunky – frakcia nezaznamenaná. Hodnoty – priemery

(n=6), udávané ako hustota pixelov. Podfarbenie indikuje zmenu aktivity voči kontrole: zelená – nárast, červená – pokles. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Na rozdiel od kolísavého profilu odrody Albenga si Adesa v štádiu L1-3 udržala stabilnú aktivitu 1. frakcie so signifikantným nárastom o 77,7 % ($p \leq 0,05$) (Tab. 6). Kľúčovým diferenciálnym momentom bola odozva vo vývinovo najmladších pletivách L3-1, kde Adesa pri $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}$ vykazovala výraznú signifikantnú indukciu 1. frakcie o 717,3 % (viac ako 8-násobok kontroly; $p \leq 0,01$) a 3. frakcie o 482,1 % ($p \leq 0,01$). Schopnosť systémovej aktivácie zásaditých a neutrálnych β -1,3-glukanáz už v mladých listoch naznačovala včasnú prípravu pletív na prítomnosť kadmia, čo pravdepodobne prispelo k celkovo vyššej metalotolerancii genotypu. Včasná a systémová aktivácia izoforiem β -1,3-glukanáz, ktorú sme pozorovali u tolerantnej odrody Adesa už v raných štádiách vývinu (L3-1), je v súlade s poznatkami, že zvýšená akumulácia PR-proteínov signifikantne koreluje s vyššou toleranciou rastlín voči environmentálnym stresorom [13]. Táto včasná odozva zároveň korešponduje s predpokladom, že sledované enzýmy plnia primárne obrannú funkciu – napríklad prostredníctvom obmedzenia permeability bunkovej steny cez kalózové zátky – skôr než funkciu priamej sekvestrácie kovu v pletivách [14].

Záver

Predložená štúdia preukázala, že dynamika izoforiem β -1,3-glukanáz v listoch *Glycine max* je úzko spätá s mierou genotypovej tolerancie voči kadmium. Najdôležitejším zistením je existencia vysokej stability enzymatickej odpovede u odrody Adesa, ktorá si na rozdiel od citlivej odrody Albenga dokáže udržať progresívnu indukciu kľúčových izoforiem bez ohľadu na dĺžku expozície kovu. U tolerantného genotypu sme identifikovali signifikantnú indukciu dosahujúcu až 8-násobok kontrolnej hodnoty ($p \leq 0,01$), zatiaľ čo u citlivého genotypu odrody Albenga bola potvrdená fragmentovaná a nekonzistentná reakcia, vedúca v pokročilých štádiách stresu k poklesu aktivity o viac ako 45 %, čo môže indikovať zníženú stabilitu obranného mechanizmu.

Tieto výsledky poukazujú na dôležitosť včasnej a systémovej aktivácie kyslých, neutrálnych a zásaditých izoforiem glukanáz už vo vývinovo najmladších štádiách listov, čo sa javí ako kľúčový diferenciálny mechanizmus. Schopnosť tolerantnej odrody včasne a

stabilne mobilizovať tento enzymatický aparát predstavuje efektívny nástroj ochrany buniek pred fytotoxickým pôsobením kadmia. Využitie týchto poznatkov v praxi spočíva v možnosti uplatnenia špecifických enzymatických profilov ako biomarkerov pri skríningu metalotolerancie sóje. Identifikácia stabilných izoforiem poskytuje perspektívny nástroj pre šľachtiteľské programy zamerané na selekciu odrôd vhodných pre pestovanie v environmentálne zaťažených oblastiach.

Podakovanie

Táto práca bola riešená za finančnej podpory projektu VEGA 1/0215/25.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] SHAARI, Nur Ezzati Mohammad; TAJUDIN, Mohd Termizi Mohd; KHANDAKER, Mohammad Moneruzzaman; MAJRASHI, Ahmed; ALENAZI, Mohammad Misfer; ABDULLAHI, Umar Aliyu and MOHD, Khairil Shazimin, (2024). Cadmium toxicity symptoms and uptake mechanism in plants: a review. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 84, e252143. ISSN 1519-6984.
- [2] VITELLI, Valentina; GIAMBORINO, Agnese; BERTOLINI, Andrea; SABA, Alessandro and ANDREUCCI, Andrea, (2024). Cadmium Stress Signaling Pathways in Plants: Molecular Responses and Mechanisms. *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 46, no. 6, pp. 6052-6068. ISSN 1467-3045.
- [3] KAPOOR, Dhriti; SINGH, Simranjeet; RAMAMURTHY, Praveen C.; JAN, Sadaf; BHARDWAJ, Savita; GILL, Sarvajeet Singh; PRASAD, Ram and SINGH, Joginder, (2021). Molecular consequences of cadmium toxicity and its regulatory networks in plants. *Plant Gene*, vol. 28, p. 100342. ISSN 2352-4073.
- [4] BALASUBRAMANIAN, Vaiyapuri; VASHISHT, Divya; CLETUS, Jean and SAKTHIVEL, Natarajan, (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, vol. 34, no. 11, pp. 1983-1990. ISSN 0141-5492.
- [5] CASEIRO, Catarina; DIAS, Joana Nunes Ribeiro; DE ANDRADE FONTES, Carlos Mendes Godinho and BULE, Pedro, (2022). From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of β -Glucans and β -1, 3-Glucanases.

- International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 6, p. 3156. ISSN 1422-0067.
- [6] HONG, Jeum Kyu and HWANG, Byung Kook, (2005). Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Pathology Journal*, vol. 21, no. 3, pp. 195-206. ISSN 1598-2254.
- [7] YU, Yunfei; WANG, Shengyuan; XU, Chaoran; XIANG, Ling; HUANG, Wenting; ZHANG, Xiao; TIAN, Baihui; MAO, Chong; LI, Tianzhong and WANG, Shengnan, (2023). The β -1,3-Glucanase Degrades Callose at Plasmodesmata to Facilitate the Transport of the Ribonucleoprotein Complex in *Pyrus betulaefolia*. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 9, p. 8051. ISSN 1422-0067.
- [8] ZHANG, Hui; SHI, Wu Liang; YOU, Jiang Feng; BIAN, Ming Di; QIN, Xiao Mei; YU, Hui; LIU, Qing; RYAN, Peter R. and YANG, Zhen Ming, (2015). Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a β -1,3-glucanase from sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) show reduced callose deposition and increased tolerance to aluminium toxicity. *Plant, Cell & Environment*, vol. 38, no. 6, pp. 1178-1188. ISSN 0140-7791.
- [9] ARAO, Tomohito; AE, Noriharu; SUGIYAMA, Masumi and TAKAHASHI, Maiko, (2003). Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant and Soil*, vol. 251, no. 2, pp. 247-254. ISSN 0032-079X.
- [10] XU, Hu; GUO, Yong; QIU, Lijuan and RAN, Yidong, (2022). Progress in Soybean Genetic Transformation Over the Last Decade. *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, p. 900318. ISSN 1664-462X.
- [11] KISLÉGHYOVÁ, Silvia; STRÁNSKA, Karin; KUNA, Roman; BOLEČEK, Peter a MÉSZÁROS, Patrik, (2025). Oxidačný stres v listoch sóje vo svetle odrodových a pletivových rozdielov pri dvoch dávkach kadmia. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2025. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze; Zvolen: Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied, v.v.i., pp. 151-157. ISBN 978-80-89408-39-9.
- [12] GREGUSOVÁ, Veronika; KAŇUKOVÁ, Šarlota; HUDCOVICOVÁ, Martina et al., (2022). The Cell-Wall β -d-Glucan in Leaves of Oat (*Avena sativa* L.) Affected by Fungal Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. avenae. *Polymers*, vol. 14, no. 16, art. 3416. ISSN 2073-4360.
- [13] ROSZIVAL, Jakub et al., (2022). Variation of defense responses in soybean (*Glycine max* L.) against cadmium stress. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 12, no. 1, e5614. ISSN 1338-5178
- [14] BARDÁČOVÁ, Monika et al., (2016). The activity of cell-wall modifying β -1,3-glucanases in soybean grown in presence of heavy metals. *Nova Biotechnologica et Chimica*, vol. 15, no. 2, pp. 115-121. ISSN 1338-6751.

Potenciál baktérií izolovaných z kompostov produkovať kyselinu indol-3-octovú

Potential of bacteria isolated from composts to produce indole-3-acetic acid

Michaela Murgašová – Vladimíra Krempaská – Matej Vesteg
Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB v Banskej Bystrici,
Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica
michaela.murgasova@umb.sk, vladimira.krempaska@umb.sk, matej.vesteg@umb.sk

Abstrakt

Široké spektrum pôdných baktérií podporuje svoju produkciu rôznych metabolitov rast rastlín. Existuje viacero biochemických testov, prostredníctvom ktorých sa dá produkcia týchto zlúčenín kvantifikovať. Jednou z takýchto látok je aj kyselina indol-3-octová (IAA), ktorá je fytohormónom patriacim do skupiny auxínov. U rastlín stimuluje širokú škálu procesov od iniciácie vývinu koreňovej sústavy až po dozrievanie plodov. Pre produkciu tejto zlúčeniny je hlavným prekursorom aminokyselina L-tryptofán. V tejto štúdií sme otestovali celkovo 10 izolátov baktérií z troch typov kompostov (vermikompost, domáci kompost a priemyselný kompost). Izoláty boli úspešne identifikované pomocou metódy MALDI-TOF MS. Biochemické testy potvrdili, že k producentom IAA patria bakteriálne druhy *Pseudomonas putida*, *Chryseobacterium indologenes*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Solibacillus silvestris*.

Kľúčové slová: pôdne baktérie, komposty, kyselina indol-3-octová, L-tryptofán

Abstract

A wide range of soil bacteria supports plant growth through the production of various metabolites. There are several biochemical tests through which the production of these compounds can be quantified. One such compound is indole-3-acetic acid (IAA), which is a phytohormone belonging to the auxin group. In plants, it stimulates a wide range of processes from the initiation of root system development to fruit ripening. The main precursor for the production of this compound is the amino acid L-tryptophan. In this study, we tested 10 bacterial isolates from three types of compost (vermicompost, home compost, and industrial compost). The isolates were successfully identified using the MALDI-TOF MS method.

Biochemical tests confirmed that the bacterial species *Pseudomonas putida*, *Chryseobacterium indologenes*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Solibacillus silvestris* are among IAA producers.

Key Words: soil microorganisms, composts, indole-3-acetic acid, L-tryptophan

Úvod

Počas kompostovacieho procesu biologického odpadu sa komplexné organické zlúčeniny rozpadajú na jednoduchšie organické molekuly pôsobením rôznych biotických a abiotických faktorov. Kompostovanie prebieha v niekoľkých fázach, počas ktorých sa menia environmentálne podmienky a trofické vzťahy medzi organizmami rozkladajúcimi organický materiál. [1,2]. Väčšina literárnych zdrojov sa zhoduje, že správny pomer uhlíka a dusíka v materiáli určenom na kompostovanie by mal byť 25 – 30 (C): 1 (N). Na základe tohto pomeru sa potom rozoznáva zelený a hnedý odpad.

Zelený odpad obsahuje zložky, v ktorých sa nachádza relatívne vysoký obsah dusíka, potrebného na tvorbu mikrobiálnych enzýmov uľahčujúcich rozklad organického odpadu. Patria sem zvyšky ovocia a zeleniny, pokosená tráva, kávová usadenina a odpad zo záhrad či parkov. Hnedý odpad je na druhej strane veľmi bohatý na uhlík. Pozostáva z papiera, lepenky, suchého lístia, konárikov, sena a živočíšneho hnoja. [3,4].

Vermikompostovanie je biotechnologický proces, v rámci ktorého sa využívajú špecializované dážďovky, najčastejšie dážďovky hnojné (*Eisenia foetida*). Tieto dážďovky znášajú väčšie teploty, skonsumujú až polovicu svojej hmotnosti denne a majú rýchly reprodukčný cyklus, pričom juvenilny zvyknú dospievať od 4 – 8 týždňov [5]. Vermikompost predstavuje hmotu hnedočiernej farby s vysokou poróznosťou a retenčnou

kapacitou. Vermikompost je vysoko bohatý na živiny a obsahuje pôdne mikroorganizmy prospešné pre rast rastlín [6].

Pri priemyselnom kompostovaní sa veľké množstvá bioodpadu zväzujú z určitej zvozovej oblasti do priestorov centrálnej kompostárne, ktorá býva zvyčajne prevádzkovaná komerčnou firmou. V rámci produkcie priemyselného kompostu sa pomocou špecializovaných zariadení prísne reguluje teplota, vlhkosť, pH a hlavne aerácia (prívod kyslíka). Teplota musí na začiatku dosiahnuť aspoň 70 °C, aby sa zabezpečila hygienizácia a eliminovali sa patogény či semená burín [7,8].

Priemyselné kompostovanie prebieha vo veľkom meradle a je dôležitou súčasťou cirkulárnej ekonomiky a moderného odpadového hospodárstva. Na druhej strane domáce kompostovanie prebieha vo veľmi malej škále viazanej na individuálne domácnosti. Prebieha pri oveľa nižšej teplote a domáci kompost sa produkuje dlhšie [9].

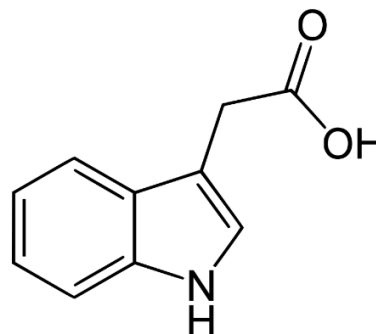
Baktérie podporujúce rast rastlín (PGPB – Plant Growth Promoting Bacteria) zahŕňajú rôzne skupiny, a to voľne žijúce formy alebo endofytické formy, ktoré disponujú symbiotickými vzťahmi s rastlinami. Ich pozitívny účinok je založený na produkcii metabolitov, stimulujúcich rast. Medzi PGPB patria napr. baktérie schopné fixácie dusíka, produkcie fytohormónov či rozpúšťania fosfátov [10].

Kyselina indol-3-octová (IAA) je jedným z najdôležitejších auxínov. Ide o produkt metabolizmu L-tryptofánu, ktorý je produkovaný viacerými mikroorganizmami, vrátane baktérií viazaných na rastlinné korene (rizobaktérie). Mikroorganizmy dokážu produkovať IAA ako sekundárny metabolit po izolácii z rizosféry rôznych plodín. V prípade rôznych druhov mikroorganizmov môže byť prítomných aj viac ako len jedna metabolická dráha pre syntézu IAA. Niektoré dráhy môžu byť stimulované prídavkom L-tryptofánu, iné nie. [11,12].

Kyselina indol-3-octová výrazne pozitívne vplýva na bunkový rast a iniciáciu vývinu primárnych aj bočných koreňov a koreňových vláskov. Tok IAA v stonkách a púčikoch vplýva na reguláciu apikálnej dominance a vývoj cievnych väzok. Hladiny IAA, ale aj ostatných auxínov bývajú najvyššie počas kvitnutia a zrenia plodov [13,14].

Najčastejšími bakteriálnymi rodmi, ktoré IAA produkujú, sú *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium* a *Azospirillum*. Baktérie produkujú IAA primárne cez dráhy závislé na L-tryptofáne,

prekurzormi však môže byť aj kyselina indol-3-pyrohroznová či indol-3-acetamid [15,16].



Obr. 1 Štruktúra kyseliny indol-3-octovej (IAA) [17]

1 Materiál a metódy

1.1 Typy vzoriek kompostov a kultivačné médiá

Celkovo boli analyzované vzorky z troch typov kompostov: priemyselný kompost, domáci kompost a vermikompost. Na inkubáciu vzoriek odobratých z kompostov boli použité 4 rôzne typy tekutých kultivačných médií: Luria Bertani Broth (LB), Tryptic Soya Broth, Nutrient Broth a Mineral Salt Medium (MSM) s prídavkom 1 % glukózy ako zdroja uhlíka a 0,5 % peptónu. Sterilizácia glukózy prebiehala nezávisle od sterilizácie MSM média. Pre účel následnej kultivácie boli použité tuhé živné médiá Tryptic Soy Agar a Nutrient Agar. Pre LB a MSM sa použil prídavok bakteriálneho agaru.

1.2 Izolácia, inkubácia a kultivácia vzoriek v živných médiach

V dvoch Erlenmeyerových bankách bolo vysterylizovaných 95 ml tekutého média a následne sa pridalo 5 g kompostovej vzorky. Vzorky sa inkubovali 24-48 hodín v trepačke; otáčky: 80 rpm (rotations per minute). Pre účely očkovania vzoriek do Petriho misiek obsahujúcich tuhé médiá uvedené vyššie sa ukázali byť najvhodnejšie riedenia 10^{-4} – 10^{-7} .

Všetky očkovania boli realizované v duplikátoch. Následne boli vzorky umiestnené do termostatu a kultivované pri 23 °C a 39 °C počas 24-48 hodín. Po náraste kolónií boli stanovené CFU a pozorované makroskopické znaky. Izoláty boli potom preočkované do nových sterilných misiek s médiami a kultivované pri tých istých teplotách.

1.3 Extrakcia proteínov a MALDI-TOF MS analýza

Na identifikáciu mikroorganizmov pomocou MALDI-TOF MS bola použitá extrakcia proteínov prostredníctvom kyseliny mravčej. Do Eppendorfovej skúmavky bolo napipetovaných 300 µl PCR vody. Následne boli pridané sterilne odpichnuté kolónie baktérií a materiál bol zhomogenizovaný pomocou vortexu. Bolo pridaných 900 µl etanolu a suspenzia sa premiešala. Vzorky boli scentrifugované pri maximálnych otáčkach za 2 min a supernatant bol odstránený.

Pelet sa nechal schnúť pri laboratórnej teplote. Podľa množstva usadeného peletu bolo pridávaných 10 – 40 µl 70 % kyseliny mravčej a zmes bola dôkladne premiešaná. Následne bolo pridané rovnaké množstvo acetonitrilu, zmes bola scentrifugovaná pri maximálnych otáčkach za 2 min. Na konci bol na MALDI doštičku aplikovaný 1 µl supernatantu, ktorý bol prekrytý 1 µl roztoku MALDI matrice (kyselina α-kyano-4-hydroxyškoricová).

1.4 Očkovanie vybraných izolátov pred testovaním prítomnosti IAA a príprava Salkowského činidla

Vybrané izoláty identifikované ako *Chryseobacterium indologenes*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Pseudomonas putida*, *Exiguobacterium artemiae* a *Stenotrophomonas rhizophila* (viď Výsledky a diskusia) boli naočkované do sterilných Petriho misiek a pred testovaním produkcie IAA kultivované cez noc pri 28 °C v sterilných tekutých médiách Luria Bertani Broth (LB) bez ajs prídavkom 0,1 % roztoku L-tryptofánu. Sterilizácia roztoku L-tryptofánu prebiehala cez sterilný filter (Whatman® PURADISC, 0.2 µm) pomocou striekačky. Sterilné médiá bez L-tryptofánu aj s ním boli preliate do sterilných Falkónových skúmaviek do objemu 40 ml a následne boli do nich naočkované bakteriálne kultúry.

Všetky experimenty prebiehali paralelne v dvoch duplikátoch. Vzorky boli umiestnené do trepačky inkubované pri 28 °C pri 100 rpm a produkcia IAA testovaná po 24 a 48 h. Čisté médium aj médium s L-tryptofánom slúžili ako kontrola. Pre stanovenie produkcie IAA bola využitá Salkowského metóda [18]. Salkowského činidlo sa používa na detekciu farebnej reakcie s IAA, pričom ak je táto látka prítomná, vzniká ružové až červené sfarbenie. 100 ml tohto činidla sa pripravuje zmiešaním 2 ml 0.5 M FeCl₃ (1,35 g FeCl₃ +

10 ml destilovanej vody), 49 ml destilovanej vody a 49 ml 70 % kyseliny chloristej (HClO₄).

1.5 Príprava štandardov roztokov s rôznou koncentráciou IAA pre kalibračnú krivku a meranie koncentrácie IAA

Na začiatku bol pripravený zásobný roztok (1000 µg/ml IAA). 10 mg IAA sa zmiešalo s 10 ml acetónu. Celkovo bolo pripravených 5 štandardov s koncentraciami 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml IAA v dvoch opakovaníach s prídavkom čistého LB média a LB média s prídavkom 0,1 % L-tryptofánu. Ako kontrola slúžilo LB médium bez prídania IAA. Tab. 1 zobrazuje postup prípravy štandardov.

Tab. 1 Príprava štandardov roztokov IAA pre kalibračnú krivku s prídavkom a bez prídavku 0,1 % roztoku L-tryptofánu (Trp)

Štandard	Koncentrácia	Postupnosť série
Zásobný roztok	1000 µg/ml	10 mg IAA + 10 ml acetónu
1. štandard	100 µg/ml	1 ml zás. roztoku + 9 ml čistého LB média
2. štandard	50 µg/ml	5 ml 1. štandardu + 5 ml čistého LB média
3. štandard	20 µg/ml	2 ml 1. štandardu + 8 ml čistého LB média
4. štandard	10 µg/ml	1 ml 1. štandardu + 9 ml čistého LB média
5. štandard	5 µg/ml	1 ml 2. štandardu + 9 ml čistého LB média
Kontrola	0 µg/ml	10 ml čistého LB média

Štandard	Koncentrácia	Postupnosť série
Zásobný roztok	1000 µg/ml	10 mg IAA + 10 ml acetónu
1. štandard	100 µg/ml	1 ml zás. roztoku + 9 ml čistého LB média (+Trp)
2. štandard	50 µg/ml	5 ml 1. štandardu + 5 ml čistého LB média (+Trp)
3. štandard	20 µg/ml	2 ml 1. štandardu + 8 ml čistého LB média (+Trp)
4. štandard	10 µg/ml	1 ml 1. štandardu + 9 ml čistého LB média (+Trp)
5. štandard	5 µg/ml	1 ml 2. štandardu + 9 ml čistého LB média (+Trp)
Kontrola	0 µg/ml	10 ml čistého LB média (+Trp)

Každý štandard bol pripravený dvakrát. Do malých, sklenených skúmaviek boli pridané 2 ml Salkowského činidla a 1 ml príslušného štandardu. Skúmavky boli zvrchu prekryté alobalom, pretože IAA je citlivá na svetlo a vzorky boli inkubované na 30 min v tme. Po tomto čase bola pozorovaná výrazná farebná reakcia (červená až ružová farba), pričom intenzita sfarbenia klesala s klesajúcou koncentráciou IAA.

Jednotlivým štandardom bola pre účely vytvorenia dvoch kalibračných kriviek (médium bez tryptofánu aj s ním) meraná absorbanca na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 530 nm. Kontroly slúžili ako blank. Kalibračné krivky boli vždy využité na odhad koncentrácie IAA produkovanej bakteriálnymi izolátmi. 1 ml kultúry sa vždy po skončení inkubácie v dvoch nezávislých opakovaníach pridal k 2 ml Salkowského činidla a vzorky sa nechali inkubovať v tme počas doby

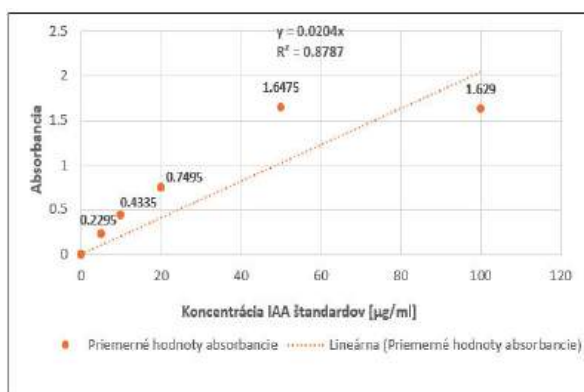
30 min. Meranie absorbancie prebiehalo pri vlnovej dĺžke 530 nm.

2 Výsledky a diskusia

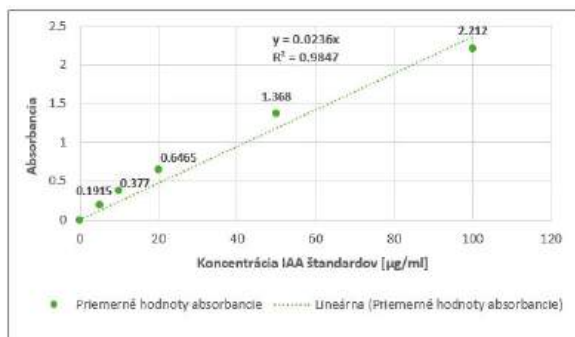
Po získaní výsledkov z MALDI-TOF MS analýz boli vybrané zaujímavé environmentálne izoláty, ktoré by podľa dostupnej literatúry mohli produkovať kyselinu-indol-3-oxotová.

Z priemyselného kompostu boli izolované *Exiguobacterium artemiae* so skóre zhody 1.98; *Lysinibacillus xylanilyticus*, skóre zhody – 2.15; *Solibacillus silvestris*, skóre zhody – 1.70; *Stenotrophomonas rhizophila*, skóre zhody – 1.99. *Lysinibacillus composti* skóre zhody – 2.18; *Peribacillus asahii* skóre zhody – 1.99. Z domáceho kompostu to boli izoláty *Stenotrophomonas maltophilia* skóre zhody – 2.24; *Chryseobacterium indologenes* skóre zhody – 1.77. Z vermikompostu pochádzali tieto izoláty: *Pseudomonas putida* skóre zhody – 2.32 a *Pseudomonas citronellois* skóre zhody – 2.38.

Grafy 1 a 2 prezentujú dve kalibračné krivky pre čisté LB médium a LB médium s tryptofánom.



Graf 1: Kalibračná krivka pre čisté LB médium s priemernými hodnotami absorbancie pre štandardy s koncentráciou IAA 0, 5, 10, 20, 50 a 100 µg/ml.



Graf 2: Kalibračná krivka pre LB médium obsahujúcom 0,1% L-tryptofánu s priemernými hodnotami absorbancie pre štandardy s koncentráciou 0, 5, 10, 20, 50 a 100 µg/ml.

V prípade prvej kalibračnej krivky (Graf 1) rovnica na výpočet koncentrácie IAA produkovanej vybranými izolátmi bola: $y=0.0204x$, v prípade druhej kalibračnej krivky (Graf 2) $y = 0.0236x$. Koncentrácia bola potom vypočítaná ako podiel hodnôt absorbancie a 0.0204, resp. 0.0236. Tab. 2 a Tab. 3 znázorňujú hodnoty koncentrácie IAA, produkovanej desiatimi baktériami počas 24 h a 48 h (čisté LB médium). Tab. 4 a Tab. 5 znázorňujú hodnoty koncentrácie IAA, produkovanej desiatimi baktériami počas 24 h a 48 h (LB médium + tryptofán).

Tab. 2 Koncentrácie IAA produkovanej testovanými izolátmi. Izoláty boli kultivované v čistom LB médiu počas 24 h

Produkcia IAA vybranými izolátmi po 24 h; Blank: čisté médium LB				
Vzorka	A1 [-]	A2 [-]	priemer A [-]	IAA [µg/ml]
<i>Pseudomonas putida</i>	0.018	0.018	0.018	0.88
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0.049	0.049	0.049	2.40
<i>Solibacillus silvestris</i>	0.052	0.053	0.0525	2.57
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	0.047	0.047	0.047	2.30
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.007	0.009	0.008	0.39
<i>Lysinibacillus composti</i>	0.005	0.006	0.0055	0.27
<i>Peribacillus asahii</i>	0.006	0.006	0.006	0.29
<i>Exiguobacterium artemiae</i>	0.091	0.092	0.0915	4.49
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.058	0.058	0.058	2.84
<i>Pseudomonas citronellois</i>	0.055	0.056	0.0555	2.72

Tab. 3 Koncentrácie IAA produkovanej testovanými izolátmi. Izoláty boli kultivované v čistom LB médiu počas 48 h

Produkcia IAA vybranými izolátmi po 48 h; Blank: čisté médium LB				
Vzorka	A1 [-]	A2 [-]	priemer A [-]	IAA [µg/ml]
<i>Pseudomonas putida</i>	0.043	0.038	0.041	1.99
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0.116	0.115	0.116	5.66
<i>Solibacillus silvestris</i>	0.041	0.038	0.040	1.94
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	0.095	0.098	0.097	4.73
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.020	0.020	0.020	0.98
<i>Lysinibacillus composti</i>	0.013	0.013	0.013	0.64
<i>Peribacillus asahii</i>	0.051	0.051	0.051	2.50
<i>Exiguobacterium artemiae</i>	0.034	0.034	0.034	1.67
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.051	0.052	0.052	2.52
<i>Pseudomonas citronellois</i>	0.054	0.056	0.055	2.70

Tab. 4 Koncentrácie IAA produkované testovanými izolátmi. Izoláty boli kultivované v obohatenom LB médiu po dobu 24 h

Produkcja IAA vybranými izolátmi po 24 h; Blank: LB médium + L-Tryptofán				
Vzorka	A1 [-]	A2 [-]	priemer A [-]	IAA [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Pseudomonas putida</i>	0.036	0.036	0.036	1.53
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Solibacillus silvestris</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Lysinibacillus composti</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Peribacillus asahii</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Exiguobacterium artemiae</i>	0.006	0.007	0.0065	0.28
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.051	0.052	0.0515	2.18
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	0.032	0.032	0.032	1.36

Tab. 5 Koncentrácie IAA produkované testovanými izolátmi. Izoláty boli kultivované v obohatenom LB médiu po dobu 48 h

Produkcja IAA vybranými izolátmi po 48 h; Blank: LB médium + L-Tryptofán				
Vzorka	A1 [-]	A2 [-]	priemer A [-]	IAA [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Pseudomonas putida</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Solibacillus silvestris</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.000	0.000	0.000	0.00
<i>Lysinibacillus composti</i>	0.030	0.030	0.030	1.27
<i>Peribacillus asahii</i>	0.022	0.022	0.022	0.93
<i>Exiguobacterium artemiae</i>	0.026	0.027	0.027	1.12
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.029	0.030	0.030	1.25
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	0.046	0.046	0.046	1.95

Spomedzi všetkých našich experimentov mali najvyššiu produkciu IAA po 48 h v čistom LB médiu *Chryseobacterium indologenes*, *Pseudomonas putida*, *Solibacillus silvestris*, *Lysinibacillus xylanilyticus*. *Stenotrophomonas maltophilia*. V našich experimentoch prídavok L-tryptofánu produkciu nestimuluje, ale naopak inhibuje. Vysvetlenie tohto faktu si bude vyžadovať ďalšie dôkladnejšie analýzy.

Jedna štúdia uvádza pre *Solibacillus silvestris* produkciu IAA až 268.33 $\mu\text{g/ml}$ v priebehu siedmich dní. Ako sa inkubačná doba predlžovala, klesala aj produkcia IAA [19]. *Chryseobacterium indologenes* bola v inej štúdií jediná zo siedmich testovaných izolátov, ktorá produkovala IAA. Navyše zástupcovia z tohto rodu dokážu produkovať až 149.24 mg/L IAA [20,21]. *Pseudomonas putida* podľa Bhuruha et al. [22] dosahovala hodnoty produkcie IAA od 26.4 – 591.8 $\mu\text{g/ml}$ počas 96 hodín.

Štúdia autorov Hanh a Mongkoltharuk [10] ukázala, že niekoľko izolátov *Lysinibacillus fusiformis*

dokázalo produkovať IAA, pričom najväčšia hladina 38.68 $\mu\text{g/ml}$ sa dosiahla pri prídavku 5mg/ml L-tryptofánu po 36 hodinách inkubácie. Po zmenšení koncentrácie na 4 mg/ml L-tryptofánu už klesla produkcia na 24.83 $\mu\text{g/ml}$. Táto baktéria bola schopná produkcie IAA aj bez prídavku L-tryptofánu, dosiahla 4.29 $\mu\text{g/ml}$ po 72 hodinách.

Stenotrophomonas maltophilia je taktiež schopná produkovať IAA vo vyšších koncentráciách. Podľa Zhang et al [23] tento druh dosiahol v médiu bez prídavku L-tryptofánu hodnotu koncentrácie IAA 38.85 $\mu\text{g/ml}$ a s prídavkom 0,1 % tryptofánu 39.72 $\mu\text{g/ml}$.

Napriek uvedeným poznatkom sa v našich experimentoch nepodarilo zachytiť až také vysoké koncentrácie IAA vybranými izolátmi v médiu obohatenom o L-tryptofán ani po 24, ani po 48 h. Dôvodov môže byť niekoľko: veľa baktérií síce má dráhy závislé od koncentrácie L-tryptofánu, avšak významná časť z nich nemá tieto dráhy kompletne alebo nedisponuje génmi a korešpondujúcimi proteínmi schopnými premeniť L-tryptofán na IAA [24]. L-tryptofán, okrem toho, že ide o esenciálnu aminokyselinu, má viacero iných dôležitých funkcií.

U niektorých baktérií sa bez dodania L-tryptofánu syntetizujú len nízke koncentrácie IAA. Vtedy sa intracelulárne produkovaný L-tryptofán využíva prednostne na transláciu alebo pre iné metabolické alebo rastové potreby konkrétnej baktérie na úkor produkcie IAA [25]. Niektoré bakteriálne kmene aj v rámci jedného druhu môžu produkovať IAA iba prostredníctvom dráh, ktoré sú nezávislé od L-tryptofánu. V konečnom dôsledku jednoduché prídanie L-tryptofánu do média ešte nemusí zaručiť, že sa zužitkuje v biosyntéze IAA [26].

Je pozoruhodné, že v našich experimentoch prídanie L-tryptofánu syntézu IAA inhibuje. Overenie tohto faktu si bude vyžadovať ďalšie experimenty a jeho vysvetlenie širšie štúdium a analýzu dostupnej literatúry.

Záver

V rámci tejto štúdie sa podarilo izolovať široké spektrum mikroorganizmov z troch typov kompostov – vermikompostu, domáceho kompostu a priemyselného kompostu. Prítomných bolo aj viacero potenciálne patogénnych druhov, ktoré však boli z analýzy vylúčené. Bolo vybraných 10 environmentálnych izolátov, ktoré sú podľa literatúry schopné produkovať IAA, ktorá je významným rastlinným hormónom zodpovedným za mnohé fyziologické a ontologické prejavy rastlín. Zvolený

protokol sa pre detekciu produkcie IAA testovanými izolátmi ukázal ako vhodný. Každý izolát vyprodukoval určité množstvo IAA po 24 a 48 h kultivácie v LB médiu bez prídavku L-tryptofánu, avšak v LB médiu obohatenom o L-tryptofán, ktorý slúži ako prekursor syntézy IAA sa po 24 a 48h nevyprodukovalo takmer žiadne množstvo IAA. Uvedená skutočnosť je prekvapujúca, keďže podľa dostupnej literatúry mali testované baktérie práve väčšiu produkciu IAA v médiu s prídavkom tryptofánu.

Jedným z vysvetlení je, že tryptofán bol baktériami využitý na iné metabolické procesy. Druhá možnosť môže súvisieť s tým, že testované izoláty využívajú na produkciu IAA skôr dráhy nezávislé na L-tryptofáne, keďže v čistom LB médiu sme pri všetkých izolátoch pozorovali produkciu IAA. Vysvetlením taktiež môže byť to, že experiment trval iba dva dni. Niektoré baktérie potrebujú dlhší čas na to, aby IAA vôbec začali produkovať.

Do budúcnosti by bolo taktiež v bioinformatických databázach (UniProt apod.) dobré overiť, či dané bakteriálne druhy disponujú enzýmami, ktoré dokážu premieňať L-tryptofán na IAA, prípadne či majú prítomné enzymatické dráhy pre syntézu IAA nezávislé od koncentrácie tryptofánu.

PodĎakovanie

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00009.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BREMER, Jaime R. Alvarad (2022). Aerobic & Anaerobic Biodegradation. *Journal of Ecosystem and Ecography*, vol. 12, no. 4. ISSN 2157-7625.
- [2] SUNDBERG, C.; JÖNSSON H. (2008). Higher pH and faster decomposition in biowaste composting by increased aeration. *Waste Management*, vol. 28, pp. 518–526. ISSN 1879-2456.
- [3] SCHWART, Mary and BONHOTAL Jean. (2011). Composting at Home – The Green and Brown Alternative. *Cornell Waste Management Institute*. Available from: <https://www.growables.org/information/documents/compostingathome.pdf> [Accessed 2026-02-19].
- [4] BROLIS, Linda Bilsens and PLATT, Brenda. (2019). Community composting done right – A guide to Best Management Practises. *Institute for Local Self Reliance*. Available from: <https://ilsr.org/wp-content/uploads/2019/03/Compost-BMP-v1.pdf> [Accessed 2026-02-19].
- [5] FUDZAGBO, Joshua; ABDULRAHEEM, Mukhtar Iderawumi. (2020). Vermicompost Technology: Impact on the Environment and Food Security. *Agriculture and Environment*, vol. 1, no.1 pp. 87-93. ISSN 0304-1131.
- [6] DOHAISH, El Jawaher A. Bin. (2020). Vermicomposting of Organic Waste with *Eisenia foetida* Increases the Content of Exchangeable Nutrients in Soil. *Pakistan Journal of Biological Studies*, vol. 23, no. 4, pp. 501-506. ISSN 1028-8880.
- [7] KONKOL, M., (2011). *Kompost v ekologickom poľnohospodárstve*. Bakalárska práca. Nitra: SPU v Nitre, 44 s.
- [8] Domáci kompost vs. priemyselný kompost. *Plasticfree.sk*, 2026. Available from: <https://eshop.plasticfree.sk/domaci-versus-priemyselny-kompost>. [Accessed 2026-02-19].
- [9] KUMARI, Anita. (2025). How Commercial composting transforms waste management and reduces environmental impact. *Madewithregen.com* Available from: <https://madewith-regen.ca/blog/commercial-composting/> [Accessed 2026-02-19].
- [10] HANH, Huynh Thi Thuy; MONGKOLTHANARUK, Wiyada. (2017). Correlation of growth and IAA production of *Lysinibacillus Fusiformis* UD 270. *Journal of Applied and Physical Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 98-106. ISSN 2414-3103.
- [11] MOHITE, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of plant science and plant nutrition*.vol. 13 no.3, ISSN 0718-9516.
- [12] FENG, Yanhui; TIAN, Baoyu; XIONG, Juan et al. (2024). Exploring IAA biosynthesis and plant growth promotion mechanism for tomato root endophytes with incomplete IAA synthesis pathways. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, vol. 11, no. 187. ISSN 2196-5641.

- [13] FU, Shih-Feng; WEI, Juyan-Yu; CHEN, Hung-Wei et al. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling and Behaviour*, vol. 10, no. 8. ISSN 1559-2324.
- [14] ZHANG, Ruo-Xi; LIU, Yudi; XIAO, Wen et al. (2025). Diverse actions of auxin on fruit development and ripening. *Horticulture advances*, vol. 3. no. 29. No of article: 29. ISSN 2948-1104
- [15] BESSAI, Sylia Ait; BENSIDHOUM, Leila; NABTIM, El-hafid. (2022). Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 41. ISSN 1878-8181.
- [16] TANG, Jintian; LI, Yukang; ZHANG, Leilei et al. (2023). Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms. *Microorganisms*, vol. 12, no. 8, ISSN 2076-2607.
- [17] Kyselina indol-3-octová / 87-51-4. Hangzhou Long shine Bio-Tech, 2026. [Accessed 2026-2-24].
- [18] GORDON, D.A.; WEBER, R.P. (1951). Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid. *Plant physiology*, vol. 26. pp. 192-195. ISSN 0032-0889.
- [19] RADHAKRISHNAN, Naveena; KRISHNASANY, Chitra. Isolation and characterization of salt-stress-tolerant rhizosphere soil bacteria and their effects on plant growth-promoting properties. *Scientific reports*, vol. 14, no. 1. ISSN 2045-2322.
- [20] YE, Liujian; HAN, Jialin; WEI, Shengbo et. al (2025). Identification, growth characteristics, and genomic potential analysis of indole-3-acetic acid producing strain D1 in the rhizosphere of ancient tea forests. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 118; no. 5. No. of article: 71. ISSN 1572-9699.
- [21] TIMIONDI, Tari Tessa; AJUZIEOGU, Chinyere Augusta. (2025). Exploring the Plant Growth Promoting Potentials of Bacteria Recovered from a Coal Mine Soil for Bioremediation Purpose. *Asian Soil Research Journal*, vol.9, no.4. pp. 92-108. ISSN 2582-3973.
- [22] BHARUCHA, Umang; PATEL, Kamlesh; TRIVEDI, Ujjval, B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, vol. 2, no. 3, ISSN 2249-7218.
- [23] AMBAWADE, M.S; PATHADE, G.R (2013). Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Stenotrophomonas Maltophilia* BE25 Isolated from Roots of Banana (*Musa spp.*) *International Journal of Science and Research*, vol. 4, no. 1, pp. 2644–2650. ISSN 2319-7064.
- [24] ZHANG, Pengfan; JIN, Tao; SAHU, Sunil Kumar et al. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules*, vol. 24, no. 7, pp. 100-116. ISSN 1420-3049.
- [25] NAVEED, Muhammad; QURESHI, M. Amjad; ZAHIR, A. Zahir et al. (2015). L-Tryptophan-dependent biosynthesis indole-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmas* PsJN. *Annals of Microbiology*, vol. 25, no. 3, pp. 1381-1389. ISSN 1869-2044.
- [26] AHMAD, Ees; SHARMA, Sushil K; SHARMA, Pawal K. (2020). Deciphering operation of tryptophan-independent pathway in high indole-3-acetic acid (IAA) producing *Micrococcus aloeverae* DCB-20. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 367, no. 4, ISSN 1574-6968.

Literárny prehľad metód stanovenia N-nitrozamínov vo vode.

Literature review of methods for the determination of N-nitrosamines in water.

Matúš Pitoňák - Andrea Purdešová

Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01
Trnava.

pitonak3@ucm.sk, andrea.purdesova@ucm.sk

Abstrakt

N-nitrozamíny sú organické zlúčeniny obsahujúce nitrozoskupinu na dialkylsubstituovanej amínovej skupine. Sú klasifikované ako nečistoty triedy 1 a „mutagénne karcinogény“. Tieto toxické a karcinogénne látky zvyšujú riziko rakoviny a nádorov aj pri nízkych koncentráciách (ng/L), čo zdôrazňuje potrebu analytických metód s nízkymi medzami detekcie s cieľom ich monitoringu vo vode. V súčasnosti sa kladie dôraz na monitorovanie potenciálne mutagénnych a karcinogénnych N-nitrozamínov pri nízkych, stopových a ultrastopových koncentráciách. Plynová chromatografia (GC) a kvapalinová chromatografia (HPLC), v kombinácii s vhodnou predúpravou vzorky, sú najčastejšie používané separačné metódy na identifikáciu a kvantifikáciu N-nitrozamínov v rôznych matriciach. Literárny prehľad sumarizuje techniky predúpravy a analytické metódy (GC, HPLC) v spojení s rôznymi detekčnými systémami (MS, MS/MS, DAD, UV a pod.).
Kľúčové slová: N-nitrozamíny, úprava vzorky, vzorky vôd, GC-MS, HPLC-MS

Abstract

N-nitrosamines are organic compounds, containing a nitroso group, bound to a dialkyl-substituted amine group. They are classified as Class 1 impurities and “mutagenic carcinogens.” These toxic and carcinogenic substances increase the risk of cancer and tumor development even at very low concentrations (ng/L). This fact highlights the need for analytical methods with low limits of detection to enable their monitoring in water. Currently, significant emphasis is placed on the monitoring of potentially mutagenic and carcinogenic

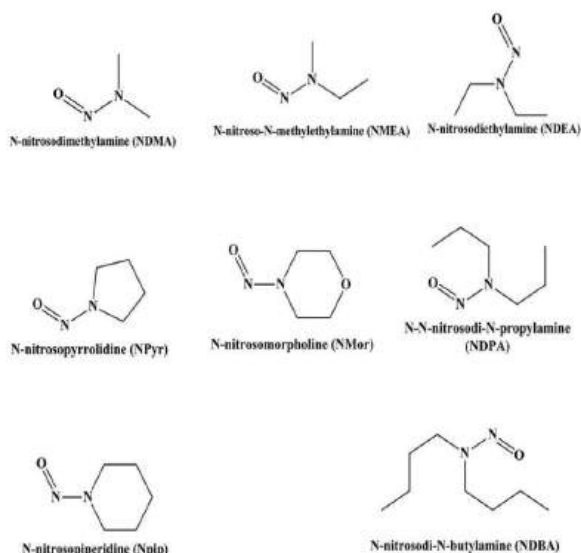
N-nitrosamines at low, trace, and ultra-trace concentration levels. Gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC), combined with appropriate sample preparation techniques, are the most commonly used separation methods for the identification and quantification of N-nitrosamines in various matrices. This literature review summarizes sample preparation techniques and analytical methods (GC, HPLC) coupled with different detection systems (MS, MS/MS, DAD, UV, etc.).

Key Words: N-nitrosamines, sample pretreatment, water samples, GC-MS, HPLC-MS

Úvod

N-nitrozamíny sú chemické zlúčeniny so štruktúrou $R_1N(-R_2)-N=O$ [1]. Môžu sa vyskytovať tak v upravenej vode, vrátane pitnej vody, v odpadových vodách, ako aj vo vodách z bazénov [2]. N-nitrozamíny v odpadových vodách pochádzajú z rôznych priemyselných činností, vrátane spracovania potravín a kozmetiky, výroby farbív a gumy, spracovania kože a metalurgického priemyslu. Tieto zlúčeniny môžu vznikať aj ako vedľajšie produkty dezinfekcie vody (chlorinácia, ozonácia) pri reakciách dezinfekčných činidiel s organickými prekurzormi obsahujúcimi amínové skupiny. Vystavenie sa aj nízkym koncentráciám N-nitrozamínov (ng/L) môže poškodiť DNA a zvýšiť riziko vzniku rakoviny [3]. N-nitrozodimetylamín (NDMA), zatiaľ najtoxickjší známy N-nitrozamín, bol okrem vôd detekovaný aj v mnohých potravinách (mäso a mäsové výrobky), alkoholických nápojoch (pivo, whiskey), ale aj v cigaretovom dyme, rôznych gumových výrobkoch a podobne. Medzi ďalšie, toxikologicky významné N-nitrozamíny (viď. Obr. 1) možno zaradiť N-

nitrozopyrolidín (NPYR), N-nitrozopiperidín (NPIP), N-nitrozodietylamín (NDEA), N-nitrozomorfolín (NMOR), N-metyletanolamín (NMEA), N-nitrozodibutylamín (NDBA) a N-nitrozodi-n-propylamín (NDPA).



Obr. 1 Toxikologicky významné N-nitrozamíny
Zdroj: [4]

Vzhľadom na vysokú toxicitu N-nitrozamínov je nevyhnutné zabezpečiť pravidelný monitoring ich koncentrácií v environmentálnych vodách, predovšetkým vo vodách slúžiacich ako zdroje pitnej vody. Nemenej dôležitý je aj monitoring odpadových vôd, keďže práve tie predstavujú významný zdroj prekursorov aj samotných N-nitrozamínov vstupujúcich do recipientov a následne potenciálne aj do zdrojov pitnej vody. Priemyselné odpadové vody (napr. z chemického, farmaceutického, gumárskeho či textilného priemyslu) často obsahujú sekundárne a terciárne amíny, ktoré môžu počas čistenia alebo následnej dezinfekcie podliehať nitrozácii a viesť k tvorbe rôznych N-nitrozamínov, napríklad NDMA [5]. Porovnanie koncentrácií N-nitrozamínov na vstupe a výstupe z čistiarnie odpadových vôd zároveň umožňuje zhodnotenie účinnosti technologického procesu čistenia.

Plynová chromatografia a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia patria v súčasnosti medzi najspoľahlivejšie a najcitlivejšie analytické metódy, vhodné na stanovenie N-nitrozamínov vo vodných vzorkách. Vzhľadom na to, že N-nitrozamíny sa vo vodnom prostredí vyskytujú spravidla v stopových koncentráciách (rádovo v ng/L), je nevyhnutná kombinácia účinnej predúpravy vzorky (napr. extrakcia tuhou fázou – SPE) a vysoko selektívnej detekcie.

Plynová chromatografia, najmä v spojení s hmotnostnou spektrometriou, je mimoriadne vhodná pre prchavé a tepelne stabilné N-nitrozamíny [6], ako je NDMA, pričom poskytuje vysokú citlivosť, selektivitu a nízke medze detekcie. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, často v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS/MS), je vhodná pre menej prchavé alebo termolabilné zlúčeniny, pričom umožňuje súčasnú analýzu širšieho spektra N-nitrozamínov bez potreby derivatizácie. Obe techniky tak predstavujú kľúčové nástroje environmentálnej analytickej chémie pri monitoringu kvality vôd a hodnotení rizík spojených s prítomnosťou N-nitrozamínov.

Cieľom literárnej rešerše je spracovanie dostupnej literatúry pre uvedenú problematiku, so zameraním na používané chromatografické metódy, detekčné systémy, ako aj predúpravu vzoriek.

1 Metódy predúpravy vzorky

Kľúčovým krokom pred realizáciou samotnej analýzy je vhodne zvolená predúprava vzorky, ktorá zásadne ovplyvňuje presnosť, správnosť a reprodukovateľnosť výsledkov analýzy. Význam predúpravy spočíva v odstránení interferujúcich zložiek matrice a zakonzentrování stanovovaných analytov na požadovanej koncentračnej úrovni. Zároveň dochádza k úprave vzorky do formy kompatibilnej s použitou analytickou technikou. Pri stanovení stopových množstiev organických mikropolutantov, ako sú N-nitrozamíny vo vodných vzorkách, je význam predúpravy ešte výraznejší, pretože sa vyskytujú v koncentráciách rádovo v ng/L. Medzi najčastejšie využívané metódy predúpravy vzoriek vôd s obsahom N-nitrozamínov možno zaradiť extrakciu tuhou fázou (SPE), mikroextrakciu tuhou fázou (SPME), sorbčnú extrakciu na miešadielkach (SBSE) a iné. Nasledujúce podkapitoly sú venované jednotlivým metódam predúpravy vzoriek vôd s obsahom N-nitrozamínov.

1.1 Extrakcia tuhou fázou (SPE)

Extrakcia tuhou fázou (SPE) je metóda prípravy vzorky, ktorá sa využíva v mnohých oblastiach vďaka svojim početným výhodám. Princíp extrakcie na tuhej fáze spočíva v distribúcii analytov medzi pevnou sorpčnou fázou, spravidla umiestnenou v SPE kolónke a kvapalnou fázou predstavujúcou vzorku alebo eluujúce rozpúšťadlo [7]. Výsledkom rozdelenia molekúl prostredníctvom adsorpcie alebo prenikania na povrch pevnej fázy je ustálenie rovnováhy, pričom analyt sa viaže na pevný povrch v súlade s rozdeľovacím koeficientom. Po naviazaní analytu na sorbent dochádza v ďalšom kroku k jeho desorpcii

použitím vhodného rozpúšťadla. Najčastejšie používané rozpúšťadlá sú dichlórmetán (DCM) a acetonitril (ACN) [8].

Výber vhodného sorbentu má priamy vplyv na účinnosť extrakcie, selektivitu a čistotu analyzovanej vzorky. Správne zvolený sorbent dokáže efektívne zachytiť cieľové analyty a zároveň odstrániť interferujúce zložky matrice. Na základe literárnej rešerše možno konštatovať, že väčšina autorov používala náplne SPE kolóniek z uhlíkových materiálov na extrakciu a zakonzentrovanie analytov z vodných vzoriek pred ich následnou chromatografickou analýzou [9], [10], [11], etc. Produkty z dreveného uhlia môžu mať pôvod v rôznych zdrojoch biomasy, napríklad v poľnohospodárskych produktoch drevnateho pôvodu, v biogénnych frakciách komunálneho odpadu a podobne [12]. V súčasnom kontexte zelenej chémie a udržateľného využívania obnoviteľných zdrojov má využitie prírodných odpadových materiálov veľký význam z hľadiska ochrany životného prostredia. Takéto prístupy umožňujú znížovať environmentálnu záťaž na skládky a emisie spojené s výrobou konvenčných sorbentov a zároveň podporujú cirkulárnu ekonomiku. S ohľadom na rastúci dôraz na ekologické a udržateľné technológie možno predpokladať, že tento trend bude v budúcnosti pokračovať a jeho využitie sa ešte rozšíri. Za najčastejšie používané v SPE možno označiť drevené uhlie, pôvodom zo škrupín kokosových orechov [13]. Ďalším rozšíreným typom sorbentu je Ambersorb 572. Tento syntetický uhlíkový sorbent je produktom procesu pyrolýzy. Vďaka jeho uhlíkovému pôvodu a hydrofóbnej povahe si zachováva vysokú adsorpčnú kapacitu vo vodnom prostredí, ako aj pri vysokej vlhkosti. Uvedené vlastnosti materiálu umožňujú jeho účinné využitie pri analýze vodných vzoriek, najmä pri extrakcii N-nitrozamínov [14].

Niektoré sorbenty určené pre SPE sú vyrobené z polymérových materiálov. Strata X je vhodným polymérom sorbentom na extrakciu N-nitrozamínov z rôznych vodných vzoriek [15]. Strata-X je polymerový SPE sorbent, vyvinutý na báze funkčného polyméru (napr. styrén-divinylbenzén). Vysoká sorpčná kapacita a stabilita uvedeného sorbentu zabezpečuje efektívnu predúpravu vzoriek, vrátane eliminácie matricových interferencií pred samotným chromatografickým stanovením analytov.

1.2 Mikroextrakcia tuhou fázou

Mikroextrakcia tuhou fázou (SPME) je univerzálna metóda úpravy vzoriek, ktorá je vhodná pre jednoduchú a účinnú analýzu širokého spektra zlúčenín. Jednou z hlavných výhod tejto metódy je jej bezrozpúšťadlový charakter, čo je výhodné v kontexte

zelenej chémie, ktorá odporúča minimalizovanie, prípadne nulové použitie organických rozpúšťadiel. Pri tejto metóde sa využíva kremenné vlákno potiahnuté stacionárnou fázou na adsorpciu zložiek z kvapalných, pevných alebo plyných vzoriek. Desorpcia prebieha tepelnou desorpciou alebo desorpciou pomocou rozpúšťadla, v závislosti od toho, či je proces riadený teplotou alebo rozpustnosťou analytu [16]. Medzi najčastejšie používané sorbenty možno zaradiť karboxén/polydimetylsiloxán (CAR/PDMS), prípadne divinylbenzén (DVB)/CAR/PDMS. Ako variant tejto metódy možno uviesť Headspace mikroextrakciu tuhou fázou (HS-SPME). Metóda spočíva v umiestnení vlákna (napr. DVB/PDMS/DVB) [17] do priestoru nad vzorkou (kvapalnou alebo tuhú). Uvoľnenie analytov z vlákna možno vykonať opäť tepelnou desorpciou, prípadne použitím vhodného rozpúšťadla.

1.3 Iné techniky predúpravy vzorky

Medzi menej používané metódy predúpravy vzorky možno zaradiť aj ďalšie techniky, napríklad extrakciu tuhú fázou, využívajúcou molekulovo imprintovaný polymér (MIP-SPE) [18], sorpčnú extrakciu na miešadielkach (SBSE) [19], prípadne miniaturizovanú extrakciu tuhú fázou (mikro-SPE) [20]. V kontexte súčasných trendov zelenej chémie je vysoko pravdepodobné, že tieto metódy predúpravy vzoriek budú v budúcnosti ďalej rozvíjané a čoraz častejšie využívané v analytickej praxi.

2 Chromatografické techniky používané na stanovenie N-nitrozamínov

V tejto časti uvádzame prehľad najpoužívanejších chromatografických techník, používaných na analýzu environmentálnych vzoriek vôd s cieľom identifikácie a kvantifikácie N-nitrozamínov. Najpoužívanejšími technikami sú plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou.

2.1 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je separačná analytická metóda používaná na analýzu plyných zmesí alebo látok, ktoré je možné pri teplotách do 450 °C premeniť na plynú fázu [21]. Plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou alebo plynová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou je analytická metóda, ktorá kombinuje chromatografickú separáciu analytov s hmotnostnou spektrometriou. GC-MS/MS poskytuje nižšiu medzu detekcie, vyššiu selektivitu, redukciu matricových efektov a zároveň spoľahlivejšiu identifikáciu analytov. N-nitrozamíny patria medzi organické zlúčeniny s nízkou až strednou polaritou. Z tohto dôvodu je potrebné pre ich účinnú separáciu využívať

stacionárne fázy podobnej polarity. Medzi najčastejšie používané stacionárne fázy možno zaradiť také, ktoré sú zložené z polymérov difenyly a dimetylpolysiloxánu v rôznych pomeroch [22]. Ďalším pomerne často využívaným polymérom je trifluórpropyl-metylpolysiloxán [23], ktorý vykazuje mierne polárne vlastnosti vďaka prítomnosti trifluórpropylovej skupiny obsahujúcej fluór.

2.2 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou a jej tandemová varianta predstavuje analytickú metódu, ktorá spája separáciu analytov kvapalinovou chromatografiou s ich následnou detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie. HPLC-MS/MS poskytuje nižšiu medzu detekcie (ng/L), vyššiu selektivitu, redukciu maticových efektov a spoľahlivejšiu identifikáciu analytov. Pri detekcii N-nitrozamínov vo vodných vzorkách sa využíva chromatografia na reverzných fázach, pri ktorej je stacionárna fáza nepolárna a mobilná fáza polárna. Toto usporiadanie fáz sa využíva vzhľadom na skutočnosť, že N-nitrozamíny sú väčšinou slabo až mierne polárne zlúčeniny.

V prípade N-nitrozamínov sa pomerne často využívajú stacionárne fázy s obsahom oktadecylsilánu (C18), prípadne oktylsilánu (C8) [24]. C18 kolóny obsahujú dlhý 18-uhlíkový reťazec, ktorý vytvára silné hydrofóbne interakcie s analytmi. Naopak, C8 kolóny majú kratší 8-uhlíkový reťazec, čo vedie k miernejším hydrofóbnym interakciám a kratšej retencii analytov. Pri HPLC analýze N-nitrozamínov vo vodných vzorkách sa najčastejšie využívajú polárne mobilné fázy. Mobilná fáza zvyčajne pozostáva z vody, často upravenej pufrom (napr. fosfátovým alebo octanovým) pre stabilizáciu pH, a z organického modifikátora, najčastejšie metanolu (MeOH) alebo acetonitrilu, ktorý upravuje jej polaritu a elučnú silu.

Medzi ďalšie chromatografické techniky, ktorými možno vykonať detekciu N-nitrozamínov vo vodných vzorkách možno zaradiť vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu v spojení s detektorom diódového poľa (HPLC-DAD). Detektor s diódovým poľom využíva viacero polí fotodiód na simultánne meranie absorbancie v celom UV-VIS spektre [25] na rozdiel od klasického UV detektora, ktorý meria iba jednu vlnovú dĺžku. V porovnaní s MS detektorom dosahujú DAD detektory spravidla vyššie hodnoty medze detekcie, keďže ich princíp je založený na absorpcii UV-VIS žiarenia. Metóda je preto limitovaná absorpčnými vlastnosťami analyzovanej zlúčeniny.

Stacionárne fázy a mobilné fázy sa v prípade uvedených metód využívajú podobne ako v prípade HPLC-MS (viď. kap. 1.2.).

Záver

N-nitrozamíny predstavujú významnú skupinu environmentálnych kontaminantov s preukázaným mutagénnym a karcinogénnym potenciálom, pričom ich výskyt vo vodnom prostredí sa zaznamenáva už na úrovni stopových až ultrastopových koncentrácií (ng/L). Z uvedeného dôvodu je kľúčové využívať analytické postupy s vysokou citlivosťou, selektivitou a spoľahlivosťou, ktoré umožňujú ich presnú identifikáciu a kvantifikáciu aj v komplexných vodných maticiach.

Kľúčovým krokom, ktorý predchádza samotnému stanoveniu N-nitrozamínov vo vzorke je vhodne zvolená predúprava vzorky. Metódy ako extrakcia tuhou fázou (SPE), mikroextrakcia tuhou fázou (SPME), sorpčná extrakcia na miešadielkach (SBSE) či molekulo vo imprintované polyméry (MIP-SPE) významne prispievajú k zakoncentrovaniu analytov a eliminácii interferencií matrice. Výber vhodného sorbentu spolu s optimalizáciou extrakčných podmienok zásadne ovplyvňuje účinnosť extrakcie, čistotu analyzovanej vzorky a reprodukovateľnosť analytických výsledkov.

V oblasti chromatografických techník dominujú najmä spojenia plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS, GC-MS/MS) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS, HPLC-MS/MS). Tieto techniky poskytujú nízke medze detekcie, vysokú selektivitu a spoľahlivú identifikáciu analytov. Detekcia pomocou MS/MS navyše umožňuje redukciu maticových efektov a dosiahnutie ešte nižších detekčných limitov. Detekčné systémy, ako HPLC-DAD alebo HPLC-UV/VIS nachádzajú uplatnenie najmä pri vyšších koncentráciách analytov, avšak sú limitované absorpčnými vlastnosťami zlúčenín a nižšou selektivitou.

Na základe uvedených skutočností možno konštatovať, že kombinácia účinnej predúpravy vzorky a vysoko selektívnej chromatografickej analýzy predstavuje nevyhnutný predpoklad pre spoľahlivý monitoring N-nitrozamínov vo vodnom prostredí. S rastajúcimi nárokmi s cieľom zabezpečenia verejného zdravia a kvality pitnej vody sa očakáva kontinuálny rozvoj vysoko citlivých, selektívnych a environmentálne optimalizovaných analytických metód, ktoré implementujú princípy zelenej chémie a minimalizujú negatívny vplyv analytických procesov na životné prostredie.

Poďakovanie

Práca vznikla s finančnou podporou projektov KEGA KEGA 009UCM-4/2024 a KEGA 009UCM-4/2026.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] Gyung-A Kim et al (2012). Nitrosamine occurrence at Korean surface water using an analytical method based on GC/LRMS. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, Vol. 185, No. 2, pp. 1657-1669. ISSN 1573-2959.
- [2] Park et al (2025). Distribution and human health risk of N-nitrosamines in tap water in the central region of South Korea. *Environmental Analysis Health and Toxicology*, 2025. Vol. 40, No. 1, pp. 2-16. ISSN 2233-6567.
- [3] Huang et al (2024). N-nitrosamines in electroplating and printing/dyeing industrial wastewater treatment plants: Removal efficiency, environmental emission, and the influence on drinking water. *Water Research*, 2024. Vol. 225, No. 121537. ISSN 1879-2448.
- [4] Wu et al (2015). Determination of secondary and tertiary amines as N-nitrosamine precursors in drinking water system using ultra-fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2015. Vol. 131. pp. 736-741. ISSN 1873-3573.*
- [5] Chen W-H, Wang C-Y, Huang T-H (2016) Formation and fates of nitrosamines and their formation potentials from a surface water source to drinking water treatment plants in Southern Taiwan. *Chemosphere*, 2016. Vol. 161. pp. 546-554. ISSN 1879-1298.
- [6] Sieira et al (2020) Determination of N-Nitrosamines by Gas Chromatography Coupled to Quadrupole–Time-of Flight Mass Spectrometry in Water Samples, *Separations*, 2020. Vol. 7, No. 1. pp. 3. ISSN 2297-8739.
- [7] Badawy et al (2022) A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, 2022. Vol. 38, No. 12. pp. 1457–1487. ISSN 1880-2818.
- [8] Qian et al (2015) Determination of 14 Nitrosamines at Nanogram per Liter Levels in Drinking Water. *Analytical chemistry*, 2015. Vol. 87, No. 2. pp. 1330–1336. ISSN 1520-6882.
- [9] A. V. Matos et al (2025) Monitoring N-nitrosamines in cosmetic thermal waters: Analytical method development, validation, and market analysis in Brazil. *J Braz Chem Soc*, 2025. Vol. 36, No. 10. pp. 1–14. ISSN 0103-5053.
- [10] Vizioli et al (2021) Drinking water nitrosamines in a large metropolitan region in Brazil, *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. Vol. 28, No. 25. pp. 32823–32830. ISSN 1614-7499.
- [11] Sieira et al (2020) Determination of N-Nitrosamines by Gas Chromatography Coupled to Quadrupole–Time-of Flight Mass Spectrometry in Water Samples, *Separations*, 2020. Vol. 7, No. 1. pp. 3. ISSN 2297-8739.
- [12] Demirbas et al (2016). Sustainable charcoal production from biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2016. Vol. 38, No. 13. pp. 1882-1889. ISSN 1556-7230.
- [13] Chen W-H, Wang C-Y, Huang T-H (2016) Formation and fates of nitrosamines and their formation potentials from a surface water source to drinking water treatment plants in Southern Taiwan. *Chemosphere*, 2016. Vol. 161. pp. 546-554. ISSN 1879-1298.
- [14] Hinz J, Wickneswaran K, Telgheder U, Wirtz M (2025). Development, optimisation, and pre-validation of a gas chromatography–ion mobility spectrometry method with preliminary twofold enrichment for the sensitive detection of N-Nitrosamines in drinking water. *Journal of Chromatography Open*, 2025. Vol. 7, No. 100220. pp. 1–11. ISSN 2772-3917.
- [15] Reyes-Contreras C, Domínguez C, Bayona JM (2012) Determination of nitrosamines and caffeine metabolites in wastewaters using gas chromatography mass spectrometry and ionic liquid stationary phases. *J Chromatogr A*, 2012. Vol. 1261. pp. 164–170. ISSN 1873-3778.
- [16] Risticvic S, Lord H, Górecki T, et al (2010) Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols*, 2010. Vol. 5, No. 1. pp. 122–139. ISSN 1750-2799.
- [17] Llop A, Borrull F, Pocurull E (2010) Fully automated determination of N-nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS. *Journal of Separation Science*, 2010. Vol. 33, No. 23–24. pp. 3692–3700. ISSN 1615-9314.
- [18] Li et al (2019) A novel molecularly imprinted polymer-solid phase extraction method coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nitrosamines in water and beverage samples. *Food Chemistry*, 2019. Vol. 292. pp. 267–274. ISSN 1873-7072.
- [19] Talebpour et al (2015) Evaluation of a method for the simultaneous quantification of N-nitrosamines in water samples based on stir bar sorptive extraction combined with high-performance liquid chromatography and diode array detection. *Journal of Separation Science*,

2015. Vol. 38, No. 9. pp. 1601 – 1609. ISSN 1615-9314.
- [20] Bakdash et al (2020) Synthesis and Characterization of Fluorocarbon from Rice Husk and its Application as an Efficient Sorbent for Micro-Solid-Phase Extraction of N-Nitrosamines in Desalinated Water Samples. *Chromatographia*, 2019. Vol. 83, No.1. pp. 95–105. ISSN 1612-1116.
- [21] Chen W-H, Wang C-Y, Huang T-H (2016) Formation and fates of nitrosamines and their formation potentials from a surface water source to drinking water treatment plants in Southern Taiwan. *Chemosphere*, 2016. Vol. 161. pp. 546-554. ISSN 1879-1298.
- [22] LABUDA, Š., et al., (2014). *Analytická chémia. Bratislava: STU*, 624 s. ISBN 978-80-227-4242-9.
- [23] Wysocki J, Dong M (2019) Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*, 2019. Vol.37, No.10, pp. 750–759. ISSN 1939-1889.
- [24] Li et al (2019) A novel molecularly imprinted polymer-solid phase extraction method coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nitrosamines in water and beverage samples. *Food Chemistry*, 2019. Vol. 292. pp. 267–274. ISSN 1873-7072.
- [25] Wysocki J, Dong M (2019) Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*, 2019. Vol.37, No.10, pp. 750–759. ISSN 1939-1889.

Analýza štruktúrnych a magnetických vlastností pentakoordinovaných komplexov medi

Analysis of Structural and Magnetic properties of Pentacoordinated Copper complexes

Ráchel Rusová¹ – Miriama Malček Šimunková² – Ján Moncol³ – Franz Renz⁴ – Cyril Rajnák⁵
^{1,2,5}Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01

Trnava,

^{2,3}Inštitút anorganickej chémie, technológií a materiálov, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

⁴Institut für Koordinationschemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 1, 301 67 Hannover

¹rusova4@ucm.sk

Abstrakt

Pentakoordinované Cu(II) komplexy predstavujú významnú triedu koordinačných zlúčenín s geometrickou variabilitou ovplyvňujúcou ich magnetické a štruktúrne vlastnosti.

Pripravené boli dva mednaté komplexy $[\text{Cu}(\text{L}^1)_4\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) a $[\text{Cu}(\text{L}^2)_4\text{Br}]\text{Br}$ (**2**), kde $\text{L}^1 = 4\text{-amino-5-metyltiazol}$ a $\text{L}^2 = 4\text{-fenoxyipyridín}$. Štruktúra komplexov bola identifikovaná monokryštálovou röntgenovou difrakometriou (SC-XRD), pričom opísané boli geometrické indexy na určenie miery distorzie koordinačného polyédra. Meraním infračervenej spektroskopie na ATR nástavci (FTIR-ATR) boli identifikované vibrácie charakteristických skupín. Vplyv štruktúry na elektrónové prechody a magnetické vlastnosti bol skúmaný výpočtom hraničných molekulových orbitálov (HOMO/LUMO). Teoretické závery z výpočtov boli porovnané nameraním UV-VIS a EPR spektier. Využitím softvéru *CrystalExplorer* bola skúmaná kryštálová štruktúra oboch komplexov.

Kľúčové slová: štruktúra, Cu(II) komplexy, Hirshfeldova povrchová analýza, spektrálna analýza

Abstract

Pentacoordinated Cu(II) complexes represent an important class of coordination compounds with geometric variability that influences their magnetic and structural properties.

Two copper complexes, $[\text{Cu}(\text{L}^1)_4\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) and $[\text{Cu}(\text{L}^2)_4\text{Br}]\text{Br}$ (**2**), where $\text{L}^1 = 4\text{-amino-5-methylthiazol}$ and $\text{L}^2 = 4\text{-phenoxypyridine}$, were synthesized. The structures of the complexes were determined by single-crystal X-ray diffraction (SC-XRD), and geometric

indices were used to quantify the degree of distortion of the coordination polyhedron. Infrared spectra recorded on an ATR accessory (FTIR-ATR) allowed the identification of characteristic vibrational modes. The influence of the structure on electronic transitions and magnetic properties was investigated via frontier molecular orbital (HOMO/LUMO) calculations. Theoretical results from the calculations were compared with experimental UV-VIS and EPR spectra. Crystal structures of both complexes were further analyzed using *CrystalExplorer* software.

Key Words: structure, Cu(II) complexes, Hirshfeld surface analysis, spectral analysis

Úvod

Komplexy prechodných kovov si získali pozornosť vedcov vďaka svojej kľúčovej úlohe v koordinačnej chémii, čo je dôsledkom ich jednoduchej syntézy a štruktúrnej rozmanitosti [1].

Komplexy medi sú jedinečné nielen z hľadiska koordinačnej chémie, ale aj z hľadiska ich biologického významu. Niektoré vlastnosti, ako stereochemická a oxidačná variabilita či hraničný kyslý charakter pridávajú plusové body využitiu medi ako centrálného iónu v komplexoch s rozmanitou škálou ligandov, štruktúr a vlastností [2].

Mononukleárne mednaté komplexy preukázali antimikrobiálnu aktivitu, optické vlastnosti a luminiscenčné vlastnosti. Sú dobre preskúmané z hľadiska ich kinetiky a termodynamiky, tepelného a magnetického správania a reakcií prenosu náboja [3].

Dizajn ligandov zohráva kľúčovú úlohu pri formovaní dimenzionality a magnetických vlastností týchto komplexov. Zdokonalenie teoretickej

metodológie na aproximáciu a predikciu magnetických vlastností týchto komplexov umožní cielene zameraný experimentálny výskum [4,5].

V rámci štúdie boli pripravené 2 jednojadrové pentakoordinované komplexy medi v oxidačnom stupni 2+ s donormi dusíka, ktorých supramolekulová štruktúra bola skúmaná využitím Hirshfeldovej povrchovej analýzy. Hlavným predmetom výskumu je odhaliť poznatky o základných magneto-štruktúrnych vzťahoch. Skúmanie hraničných molekulových orbitálov umožnilo predikciu elektrónových a magnetických vlastností pripravených komplexov – teda ich správanie v UV-VIS svetle a magnetickom poli (EPR).

1 Materiály a metódy

1.1 Materiály

Ligandy: 2-amino-5-metyltiazol (Sigma-Aldrich, 98 %), 4-fenoxypyridín (TCI, 95+ %)

Soli: CuCl₂·2H₂O (Lachema N. P. Brno); CuBr₂ (ThermoScientific, 99%)

Rozpúšťadlá: acetonitril (Mikrochem, 99,5 %)

Všetky chemikálie boli komerčne zakúpené a ďalšie čistenie nebolo potrebné.

1.2 Metódy

Tvar a kvalita kryštálov boli študované optickým mikroskopom *Zeiss Stemi 235*. Infračervené spektrá boli namerané na prístroji *IRAffinity-1 Shimadzu* s ATR („Attenuated total reflectance“, ATR) nástavcom v rozsahu 400-4000 cm⁻¹. Na štúdium štruktúrnych vlastností bol využitý difraktometer *SuperNova* s využitím CCD detektora *Atlas S2* so zrkadlovou kolimovaným CuK α žiarením ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$). Štruktúry boli riešené pomocou programu *Superflipprogram* a korigované metódou najmenších vzorcov. UV-VIS spektrá boli merané na prístroji *Varian Cary 50 Bio* v rozsahu 200-800 nm a elektrónová paramagnetická rezonancia na prístroji *MagnetTech MS-5000*.

1.3 Syntéza

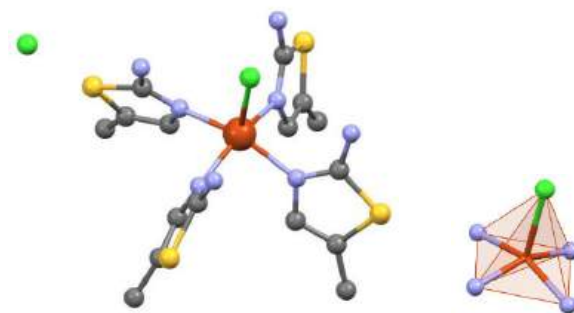
Komplex **1** bol pripravený reakciou chloridu meďnatého (37,5 mg, 0,22 mmol) s 2-amino-5-metyltiazolom (124,91 mg, 0,88 mmol), ktoré boli rozpustené v 15 ml H₂O. Zmes sa miešala 3 h pri teplote 100 °C, následne sa prefiltrovala. Matečný lúh kryštalizoval voľne pri laboratórnej teplote. Na druhý deň boli izolované čierne platničky. *výťažok 15 %*; $t_f = 185 - 187 \text{ °C}$.

Na syntézu komplexu **2** sa využil bromid meďnatý (49,14 mg, 0,22 mmol) a 4-fenoxypyridín (150,65 mg, 0,88 mmol). Reaktanty boli rozpustené v 15 ml acetonitrilu. Zmes sa v kadičke prikrytej hodinovým sklíčkom miešala 2 h pri teplote 85 °C a následne kryštalizovala pri laboratórnej teplote. Modré platničky boli izolované po 3 dňoch. *výťažok = 22 %*; $t_f = 122 - 124 \text{ °C}$.

2 Výsledky a diskusia

2.1 Štruktúra komplexov

Komplex **1** je tvorený štyrmi tiazolovými ligandmi a chloridovým aniónom, ktorý sa nachádza vo vrchole tetragonálnej pyramídy (Obr. 1). Chloridový anión stabilizovaný vodíkovými väzbami vyvažuje náboj komplexu.



Obr. 1 Štruktúra a koordinačný polyéder komplexu **1**. Vodíky nie sú zobrazené pre lepšiu prehľadnosť.

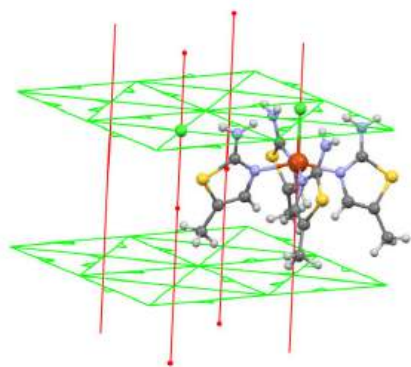
Koordinačný polyéder podlieha miernej distorzii vplyvom efektu a pseudoefektu Jahna-Tellera, čo bolo potvrdené výpočtom geometrických indexov [6-8]. Na analýzu pravidelnosti koordinačného polyédra bol využitý program CSM-SHAPE, ktorý na základe súradníc jednotlivých atómov udáva mieru distorzie od dokonalého geometrického tvaru, s výsledkom 0,534. Ďalším geometrickým indexom bol Addisonov geometrický index vypočítaný podľa vzorca 1:

$$\tau_5 = \frac{\beta - \alpha}{60^\circ} \quad (1)$$

kde α a β sú najväčšie uhly v koordinačnom polyédri. Výsledok môže nadobúdať hodnoty 0-1, pričom ak $\tau_5 = 0$, jedná sa o tetragonálnu pyramídu a v prípade $\tau_5 = 1$ ide o trigonálnu bipyramídu [9]. Výpočtom Addisonovho indexu pre komplex **1** bolo potvrdené, že sa jedná o tetragonálnu pyramídu (0,00). Napriek výslednej hodnote 0,00 podmienenej symetriou komplexu sa v tomto prípade nejedná o dokonalú

tetragonálnu pyramídu, čomu nasvedčuje aj hodnota CSM-SHAPE geometrického indexu [10-12]. Spomínaný efekt Jahn-Tellera sa v prípade komplexu **1** prejaví axiálnym predĺžením Cu–Cl väzby, zatiaľ čo pseudoefekt Jahn-Tellera môžeme pozorovať pri zakrivení ekvatoriálnych väzieb N–Cu–N, ktoré majú výraznú odchýlku od 180°.

Komplex **1** kryštalizuje v tetragonálnej kryštálovej sústave a priestorovej grupe $-P 4a 2ac$ vyznačujúcou sa vysokou symetriou. Na obr. 2 sú zobrazené niektoré prvky symetrie – dvojnásobná a štvornásobná os otočenia, ktorá prechádza centrálnym Cu(II) atómom a atómom Cl. Dvojnásobná os otočenia sa tiahne v smere kryštalografickej osi *b*.



Obr. 2 Prvky symetrie v komplexe **1**. Zelená – dvojnásobná os otočenia, červená – štvornásobná os otočenia.

Kryštalová štruktúra komplexu je stabilizovaná viacerými typmi medzimolekulových interakcií. Prítomné sú veľmi slabé intra- aj intermolekulové N–H...Cl vodíkové väzby s H...Cl vzdialenosťami 2,460 a 2,489 Å (Obr. 3). Evidujeme aj slabé laterálne π – π interakcie so vzdialenosťou centroidov 4,411 Å a interplanárnou vzdialenosťou 3,418 Å. Na základe týchto hodnôt bola aplikovaním Pytagorovej vety vypočítaná hodnota laterálneho posunu $\approx 2,8$ Å:

$$d_{centroid}^2 = d_{interplanárna}^2 + d_{posun}^2 \quad (2)$$

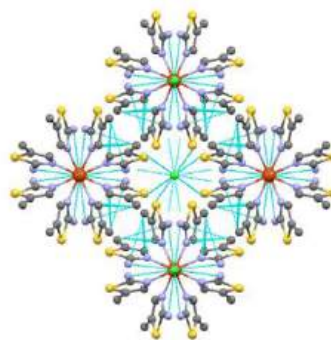
$$d_{posun} = \sqrt{d_{centroid}^2 - d_{interplanárna}^2} \quad (3)$$

Na obr. 3 je znázornená supramolekulová štruktúra komplexu **1** podľa osi *c* so zobrazením intermolekulových interakcií (svetlomodré čiary).

Komplex **2** bol pripravený reakciou 4-fenoxypyridínu a bromidu meďnatého. Výsledkom reakcie je pentakoordinovaná jednotka zobrazená na

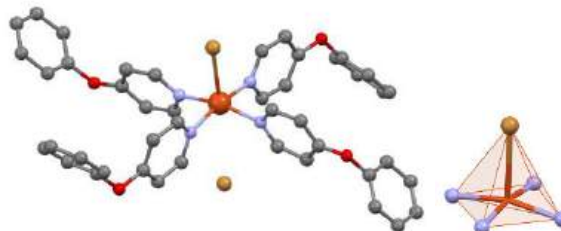
obr. 4. Štyri N-donory v ekvatoriálnej polohe vytvárajú podstavu tetragonálnej pyramídy. V axiálnej polohe je naviazaný atóm Br a náboj vyvažuje semikoordinovaný Br umiestnený pod ekvatoriálnou rovinou.

Koordináčny polyéder je o niečo viac distordovaný ako v prípade komplexu **1** s Addisonovým geometrickým indexom $\tau_5 = 0,064$ a CSM-SHAPE indexom 0,902.



Obr. 3 Namnožená štruktúra komplexu **1** zobrazená podľa osi *c*. Svetlomodré čiary – medzimolekulové interakcie.

Nižšej symetrii v porovnaní s komplexom **1** nasvedčuje monoklinická kryštalová sústava ($P 1 21 1$) s odchýlkami v dĺžkach ekvatoriálnych väzieb 0,027 - 0,010 Å. Axiálna Cu–Br väzba je výrazne predĺžená (JTE) a to až o 0,72 Å. Rovnako aj väzbové uhly v podstave koordináčneho polyédra variujú od 87,19 - 91,74°.



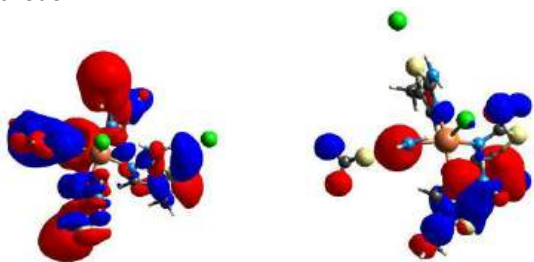
Obr. 4 Štruktúra a koordináčny polyéder komplexu **2**. Vodíky nie sú zobrazené pre lepšiu prehľadnosť.

2.2 Charakterizácia HOMO/LUMO orbitálov

Na grafické znázornenie HOMO a LUMO oboch komplexov poslúžil program *CrystalExplorer* [13]. Na výpočty bola využitá metóda B3LYP s bázou 6-311G(d,p).

Vizualizácia hraničných molekulových orbitálov komplexu **1** (Obr. 5 – vľavo) ukazuje, že HOMO má dominantný charakter $d_{x^2-y^2}$ orbitálu centra Cu(II), avšak s výraznou delokalizáciou na donorové atómy ligandu. Táto distribúcia naznačuje zvýšenú mieru kovalentnosti väzieb Cu–N [14]. Laloky orbitálu sú orientované v

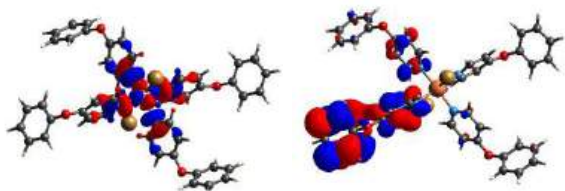
ekvatoriálnej roviny a vykazujú σ -protiväzbový charakter voči väzbám Cu–N. Takto definovaný základný stav je konzistentný s očakávaným typom EPR spektra. Pre $d_{x^2-y^2}$ základný stav je predpokladaná axiálna anizotropia so vzťahom $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ a výraznou hyperjemnou štruktúrou v oblasti g_{\parallel} , charakteristickou pre Cu(II) systémy. Na druhej strane LUMO vykazuje prevažne ligandovo-centrovaný charakter a je rozložený na π -systéme aromatických fragmentov ligandu, pričom príspevok kovového centra je minimálny (Obr. 5 – vpravo). Ide teda o akceptorový π^* orbitál lokalizovaný na ligande. Na základe tejto distribúcie možno predpokladať, že excitačné procesy budú zahŕňať prechody typu prenosu náboja z kovového d-orbitálu do ligandového π^* orbitálu (MLCT). V UV-Vis spektre sa preto okrem slabého d–d prechodu očakáva intenzívnejší pás vo vyššej energetickej oblasti, ktorý možno priradiť d \rightarrow π^* MLCT prechodom.



Obr. 5 Zobrazenie HOMO (vľavo) a LUMO (vpravo) komplexu **1**.

V prípade komplexu **2** (Obr. 6) je HOMO lokalizovaný prevažne na centrálnom atóme s dominantným charakterom orbitálu $d_{x^2-y^2}$, ktorý zodpovedá pentakoordinácii Cu(II) (d^9 elektrónovej konfigurácii). Výraznejší rozdiel vidíme pri LUMO lokalizovanom prevažne na jednom ramene ligandu.

V EPR sa rovnako očakáva axiálny signál so vzťahom $g_{\parallel} > g_{\perp}$ typický pre $d_{x^2-y^2}$ základný stav. V UV-Vis spektre sa predpokladá slabý pás d-d prechodov a pri vyšších vlnôch výraznejšie MLCT alebo ligandové π – π^* prechody.



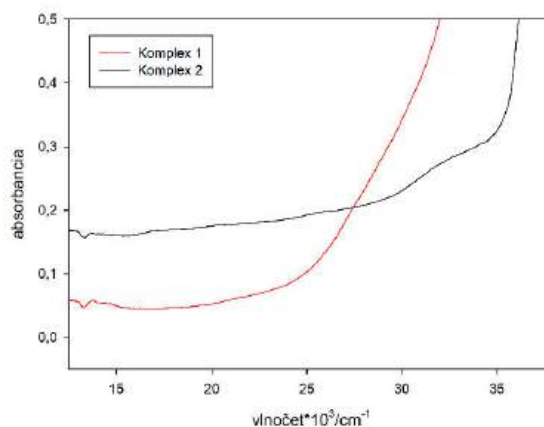
Obr. 6 Zobrazenie HOMO (vľavo) a LUMO (vpravo) komplexu **2**.

2.5 Spektrálna charakterizácia

UV-VIS spektrum oboch komplexov bolo merané v rozsahu 200–800 nm ($50\,000 - 12\,500\text{ cm}^{-1}$) tak, že kryštalická vzorka bola rozpustená v etanole na objem 25 a 50 ml. Koncentrácia výsledných roztokov komplexov **1** a **2** bola 0,4737 a 0,1211 mol/dm³.

Aplikáciou Lambertovho-Beerovho zákona (vzorec 4) boli vypočítané molárne absorpčné koeficienty ϵ , ktorých hodnoty sú spolu s lokalizáciou pásov uvedené v Tabuľke 1.

$$\epsilon = \frac{A}{d c} \quad (4)$$



Obr. 7 UV-VIS spektrum komplexov **1** (červená) a **2** (čierna).

V spektrách oboch komplexov v oblasti okolo $12\,800\text{ cm}^{-1}$ zaznamenávame dva zakázané d-d Jahn-Tellerovské prechody [15] s nízkou intenzitou typické pre Cu(II) komplexy. Ďalej evidujeme v spektre komplexu **2** očakávaný výraznejší elektrónový prechod prenosu náboja („Charge Transfer“, CT) v oblasti $32\,310\text{ cm}^{-1}$. Napriek očakávanému výsledku na základe výpočtov HOMO/LUMO, v spektre komplexu **1** nebol identifikovaný CT pás.

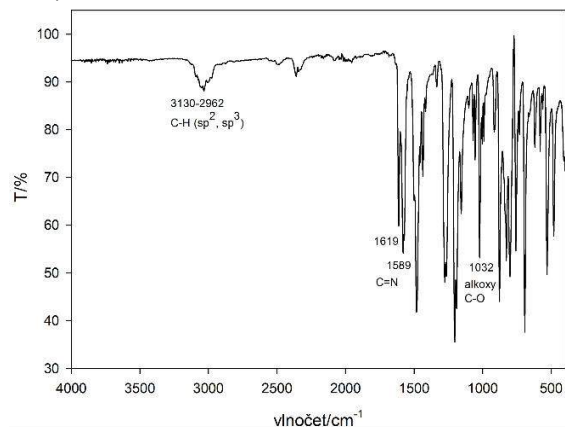
Tab. 1 Lokalizácia pásov elektrónových prechodov a vypočítané molárne absorpčné koeficienty ϵ .

komplex	x/cm^{-1}	y	$\epsilon/\text{mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$	typ
1	12 816	0,057	0,120	d-d
	13 681	0,057	0,120	d-d
2	12 816	0,168	1,387	d-d
	13 681	0,163	1,346	d-d
	16 837	0,168	1,387	d-d
	32 310	0,278	2,296	CT

FTIR spektrum potvrdilo štruktúru oboch komplexov. Pre komplex **1** boli identifikované vibrácie

NH₂ (3444 – 3185 cm⁻¹), C-H skupín (2950 – 2850 cm⁻¹), zliate vibrácie C=N + C=C skupín (1517, 1432 a 1372 cm⁻¹) a vibrácie tiažových C-S skupín pri 830 cm⁻¹.

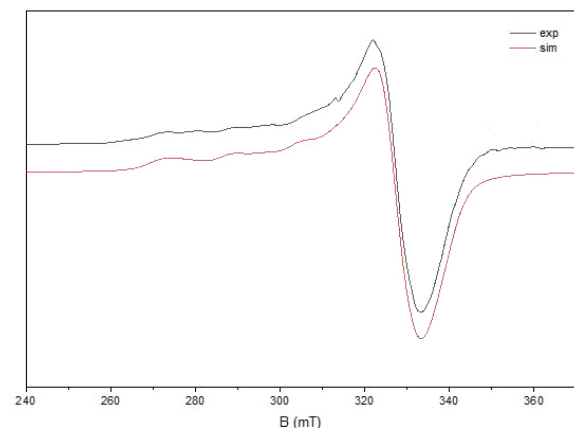
V spektre komplexu **2** boli detegované vibrácie C-H (3130 – 2962 cm⁻¹), C=N (1619, 1589 cm⁻¹) a C-O (1032 cm⁻¹)



Obr. 8 FTIR spektrum komplexu **2**.

2.6 Magnetické vlastnosti

Na Obr. 9 je zobrazené EPR spektrum komplexu **1** namerané v tuhej fáze ako polykryštalický prášok. Na výpočtovú simuláciu bol využitý program *Easypin* [16]. Spektrum vykazuje typický axiálny charakter s pravdepodobnou distorziou v smere z-osi podmienený efektom Jahn-Tellera, avšak so slabou rozlíšením hyperjemným štiepením a veľkou šírkou čiar. Ako bolo očakávané z výpočtov HOMO/LUMO, v spektre pozorujeme vzťah $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ (voľný elektrón), čo naznačuje, že nespárovaný elektrón sa nachádza v protiväzbovom molekulovom orbitáli Ψ_{b1g} , v súlade so základným elektronovým stavom typu $d_{x^2-y^2}$.



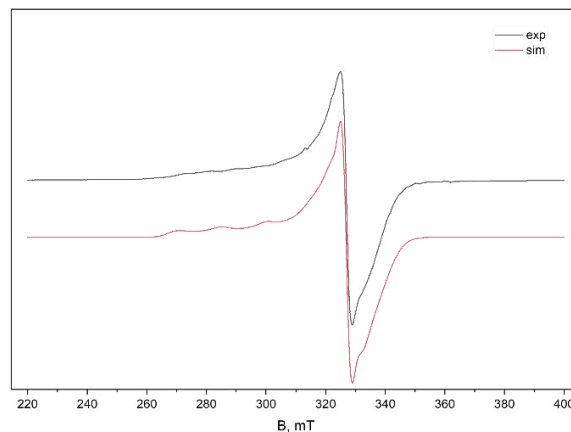
Obr. 9 EPR spektrum komplexu **1**.

Spektrum naznačuje dve odlišné axiálne prostredia medi, čo je dôsledkom prítomnosti dvoch neekvivalentných centier Cu(II) najpravdepodobnejšie v pomere 1:3 – stanovené na základe váhového faktora počítačovej simulácie. Parametre spinového Hamiltoniánu sú uvedené v Tabuľke 2.

Tab. 2 Parametre spinového Hamiltoniánu získané počítačovou simuláciou EPR spektra komplexu **1**.

	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel} / mT
Okolie (specie) 1	2,215	2,065	18,3
Okolie (specie) 2	2,275	2,054	19,2

Simulácia EPR spektra (Obr. 10) bola realizovaná použitím troch príspevkov. Dva hlavné komponenty zodpovedajú Cu(II) centrárom s axiálnou anizotropiou g -tenzora, charakterizovanou vzťahom $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$. Pre prvý komponent boli získané hodnoty $g_{\perp} = 2,069$, $g_{\parallel} = 2,308$ a hyperjemná väzbová konštanta $A_{\parallel} \approx 17,1$ mT pri šírke čiary 5,7 mT (Tab. 2). Druhý komponent vykazuje parametre $g_{\perp} = 2,050$, $g_{\parallel} = 2,245$ a $A_{\parallel} \approx 16,9$ mT so širšou čiarou. Uvedené hodnoty sú typické pre Cu²⁺ ióny (d^9) v tetragonálnom ligandovom poli s typu $d_{x^2-y^2}$ s predĺženou symetriou v smere osi z.



Obr. 10 EPR spektrum komplexu **2**.

Okrem týchto dvoch dominantných Cu(II) príspevkov bol do simulácie zahrnutý aj tretí minoritný izotropný komponent s $g = 2,065$ a úzkou šírkou línie ($lwpp \approx 3,1$ mT), ktorý pravdepodobne zodpovedá malému radikálovému alebo defektovému príspevku v systéme alebo nedostatočne rozdrvena vzroka. Celkovo simulácia naznačuje prítomnosť dvoch rôznych typov Cu²⁺ koordinačných prostredí, čo môže byť spôsobené prítomnosťou častíc sekundárneho

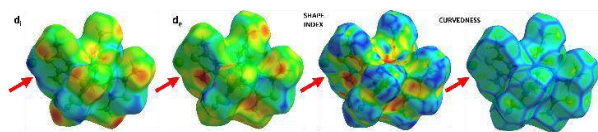
komplexu syntézy v kryštalickej vzorke alebo degradáciou vzorky.

Tab. 2 Parametre spinového Hamiltoniánu získané počítačovou simuláciou EPR spektra komplexu **2**.

	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel}/mT
Okolie (specie) 1	2,308	2,069	17,2
Okolie (specie) 2	2,245	2,050	16,9
Okolie (specie) 3		2,065	

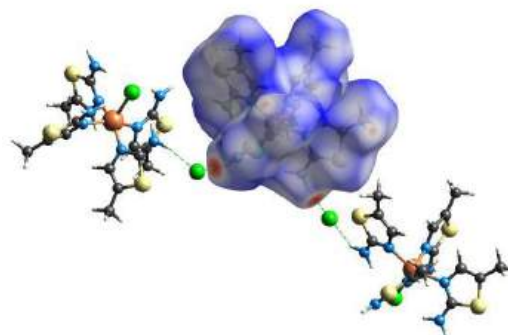
2.7 Analýza intermolekulových interakcií

Vykonaná bola Hirshfeldova povrchová analýza taktiež pomocou programu *CrystalExplorer*. Na Obrázku 11 sú vizualizované povrchy komplexu **1** fitované podľa d_i , d_e , shape index a curvedness. Modré a červené miesta na povrchoch d_i a d_e znázorňujú blízkosť atómov na vonkajšej strane povrchu a vnútornej strane povrchu [17]. Tieto miesta nasvedčujú prítomnosti intermolekulových interakcií. Na spomínanom obrázku nachádzame π - π interakcie v oblasti smerovania červených šípok. Na mape shape index vidíme v danej oblasti priehlbnu slabého prekrytia molekulových orbitálov znázornenú červenou a zelenou a na curvedness mape výraznú zelenú plochu bez zakrivenia, ktorá je taktiež symbolom π - π interakcie.



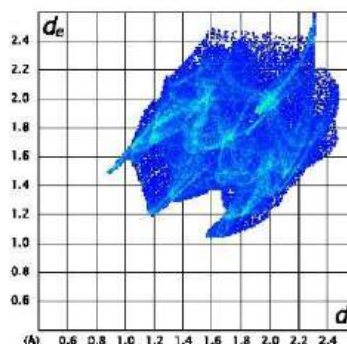
Obr. 11 Lokalizácia π - π interakcií molekúl komplexu **1** na HS s mapovaním d_i , d_e , shape index a curvedness.

Štruktúra komplexu **1** je stabilizovaná aj slabými vodíkovými väzbami (Obr. 12). Do interakcie sa zapájajú chloridové anióny a NH_2 skupina pochádzajúca z tiazolového ligandu. Pomerne dlhé vzdialenosti $H\cdots Cl$ 2,460 a 2,489 Å indikujú, že sa môže jednať o vodíkovú interakciu skôr na strane kontaktov van der Waalsovo charakteru.



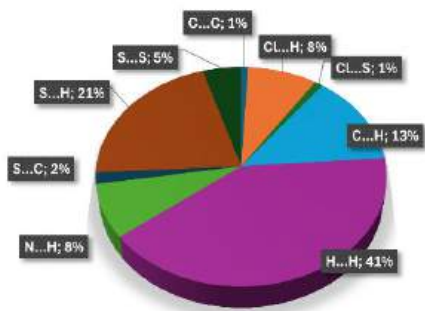
Obr. 12 Zobrazenie vodíkových $N-H\cdots Cl$ väzieb mapované pomocou d_{norm} povrchu komplexu **1** v rozsahu -0,3384 - 1,0959.

Závislosť d_e od d_i bola skúmaná pomocou 2D fingerprint mapovania (Obr. 13), kde modré plochy znázorňujú medzimolekulové interakcie [18]. Svetlomodré miesta prislúchajú najsilnejším interakciám.



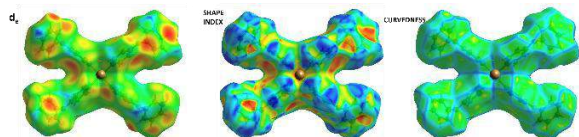
Obr. 13 2D Fingerprint mapovanie všetkých intermolekulových kontaktov pre komplex **1** podľa závislosti d_i a d_e vzdialeností.

Percentuálne zastúpenie jednotlivých typov interakcií pre oba komplexy bolo vykreslené aj pomocou koláčových grafov, z ktorých je zrejmé, že najväčšie zastúpenie v štruktúre komplexu **1** (Obr. 14) majú $H\cdots H$ (41 %) a $S\cdots H$ (21 %) interakcie. Pomerne početné sú aj $C\cdots H$ (13 %) kontakty a už spomínané $Cl\cdots H$ (8 %) a $N\cdots H$ (8 %) interakcie.



Obr. 14 Percentuálne zastúpenie jednotlivých kontaktov v komplexe 1.

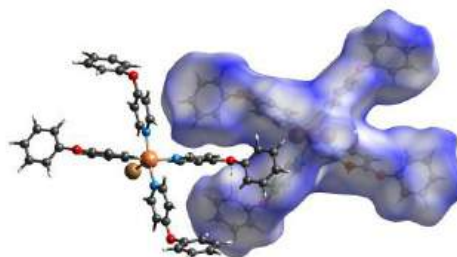
Mapovania d_e , shape index a curvedness komplexu 2 (Obr. 15) zobrazujú slabé vodíkové a elektrostatické interakcie so semikoordinovaným bromidovým iónom. Na d_e mape sa nachádzajú výrazné červenožlté a modré škvrny prínáležiace atómom susednej molekuly vo veľmi krátkej vzdialenosti. Evidujeme tu aromatické kruhy ligandu, ktorých π orbitály interagujú s π orbitálmi molekuly vo vnútri povrchu. Meraná bola C–H... π vzdialenosť, pričom H... π leží vo vzdialenosti 2,860 Å. Interplanárny uhol medzi rovinami kruhov je 39,31°. Pomerne veľká odchýlka od uhlu typického pre T-shape π – π interakcie oslabuje silu intermolekulových väzieb daného typu.



Obr. 15 Zobrazenie intermolekulových interakcií v komplexe 2 pomocou HS mapované podľa d_e , shape index a curvedness.

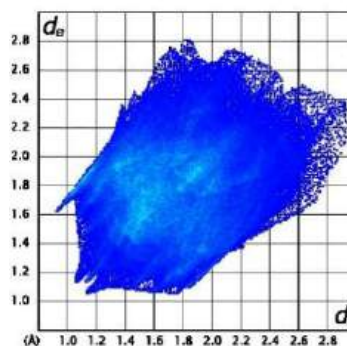
Na curvedness povrchu sú viditeľné žlté fľaky prislúchajúce slabým vodíkovým mostíkom alkoxy fragmentu fenoxypyridínového ligandu. Interakcia je znázornená aj pomocou d_{norm} mapovania na Obrázku 16. Nevalentné C–H...O interakcie majú lineárny charakter, avšak pomerne veľkú vzdialenosť H...O – 2,674 Å.

Fingerprint mapa komplexu 2 (Obr. 17) zobrazuje mierne nesymetrické zastúpenie interakcií. Väčšinu bodov tvoria ako aj v prípade komplexu 1 H...H (51 %) interakcie (Obr. 18). O niečo menšie percento sa vyskytuje pri C...H (25 %). Zvyšné kontakty sú zastúpené do 10 %.

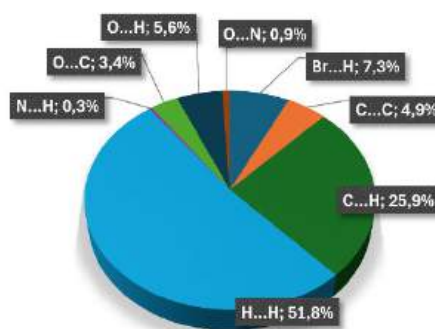


Obr. 16 Vizualizácia vodíkových C–H...O väzieb v komplexe 2 mapovaná pomocou d_{norm} povrchu v rozsahu -0,2661 - 1,4478.

Kontakty s menšou hustotou bodov na hornom okraji mapy môžu prislúchať van der Waalsovým interakciám.



Obr. 17 2D translated fingerprint mapovanie všetkých intermolekulových kontaktov pre komplex 2 podľa závislosti d_i a d_e vzdialeností.



Obr. 18 Percentuálne zastúpenie jednotlivých kontaktov v komplexe 2.

Záver

Pripravené boli dva pentakoordinované komplex Cu(II) za využitia N-donorových ligandov. Štruktúra oboch komplexov bola nameraná a identifikovaná monokryštálovou röntgenovou difraktometriou (SC-XRD). Komplexy boli charakterizované metódami

molekulovej spektroskopie, ako sú UV-VIS, FTIR-ATR a EPR spojené s grafickými výpočtovými technikami hraničných molekulových orbitálov HOMO/LUMO v programe *CrystalExplorer*, na základe ktorých bolo možné predpovedať správanie látok pri rôznych vlnových dĺžkach elektromagnetického poľa a zároveň hlbšie porozumieť molekulovej štruktúre komplexov. Softvér *CrystalExplorer* bol využitý hlavne na analýzu intermolekulových interakcií modelovaním Hirshfeldových povrchov a 2D fingerprint máp.

Podakovanie

Projektu VEGA 1/0191/22 a DAAD projektu *Magnetoactive and photoactive compounds based on 3d-4f complexes* za financovanie výskumu.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] PISK, Jana, et al. (2025). Electrical Properties of Cu-Based Coordination Complexes: Insights from In Situ Impedance Spectroscopy. *Molecules*, vol. 30, no. 1, pp. 82. ISSN 1420-3049.
- [2] ROSTAS, Arpad Mihai, et al. (2020) Copper(II) Complexes with Mixed Heterocycle Ligands as Promising Antibacterial and Antitumor Species. *Molecules*, vol. 25, no. 17, pp. 3777. ISSN 1420-3049.
- [3] ABBAS, G., et al. (2015) A New Pentacoordinate Polymeric Copper(II) Complex with 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol: Structural Investigations Using XRD and DFT. *Journal of Structural Chemistry*, vol. 56, no. 1, pp. 92-101. ISSN 0022-4766.
- [4] ZHAO, Bing, et al. (2026) Magneto-structural relationships in paddle-wheel dinuclear copper(II) complexes with tunable dimensionality (0D→1D→2D). *Journal of Molecular Structure*, vol. 1352, no. 2, pp. 144561. ISSN 1872-8014.
- [5] GOSWAMI, Debpryo, et al. (2023) Magneto-Structural Analysis of Hydroxido-Bridged CuII2 Complexes: Density Functional Theory and Other Treatments. *Magnetochemistry*, vol. 9, no. 6, pp. 154. ISSN 2312-7481.
- [6] CONRADIE, Jeanet, et al. (2025) Geometric distortions and Jahn-Teller effects in Bis(terpyridine) metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, vol. 1321, pp. 139840. ISSN 1872-8014
- [7] HENKE, W., et al. (1983) Copper(2+) in five-coordination: a case of a pseudo-Jahn-Teller effect. 1. Structure and spectroscopy of the compounds Cu(terpy)X₂.nH₂O. *Inorganic Chemistry*, vol. 22, no. 20, pp. 2858–2863. ISSN 0020-1669.
- [8] GUCHHAIT, Tapas, et al. (2024) Geometry indices for four- and five-coordinate metal complexes: a concise review. *Journal of Coordination Chemistry*, vol. 77, no. 1-2, pp. 49-68. ISSN 1029-0389.
- [9] ADDISON, Anthony 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]copper(II) perchlorate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, vol. 1984, no. 7, pp. 1349-1356. ISSN 0300-9246.
- [10] PINSKY, M.; AVNIR, D. (1998) Continuous shape measures algorithm. *Inorganic Chemistry*, vol. 37, pp. 5575. ISSN 0020-1669.
- [11] CASANOVA, D., et al. (2004) Minimal distortion paths. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, pp. 1755-1763. ISSN 1520-5126.
- [12] CIRERA, J., et al. (2006) Generalized interconversion coordinates. *Chemical European Journal*, vol. 12, pp. 3126. ISSN 1521-3765.
- [13] SPACKMAN, Peter R., et al. (2021) CrystalExplorer: a program for Hirshfeld surface analysis, visualization and quantitative analysis of molecular crystals. *Journal of Applied Crystallography*, vol. 54, no. 3, pp. 1006-1011. ISSN 1600-5767.
- [14] ALBUQUERQUE, Eudenilson L. (2024) 3 - Computational approach. In: Albuquerque, Eudenilson L. *Quantum Chemistry Methods for Oncological Drugs*. Amsterdam: Elsevier, pp. 53-75. ISBN 978-0-443-15530-7.
- [15] BOČA, Roman. (2009) *Chémia koordinačných a organokovových zlúčenín*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 297 s. ISBN 9788022730822.
- [16] STOLL, Stefan; SCHWEIGER, Arthur. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 178, no. 1, pp. 42-55. ISSN 1096-0856.
- [17] FEDDAOUI, I. et al. (2019) Synthesis, crystal structure, vibrational spectroscopy, DFT, optical study and thermal analysis of a new stannate(IV) complex based on 2-ethyl-6-methylanilinium (C₉H₁₄N)₂[SnCl₆]. *Journal of Molecular Structure*, vol. 1186, pp. 31-38. ISSN 1872-8014.
- [18] AL-BALUSHI, Rayya A., et al. (2025) Synthesis, Characterization, and Structural Studies of Some Homo- and Heteroleptic Cu(I) Complexes Bearing 6,6'-Bis(phenylethynyl)-2,2'-Bipyridine Ligand. *Inorganics*, vol. 13, no. 4, pp. 104. ISSN 2304-6740.

The impact of tobacco consumption on exhaled volatile organic compounds

Vplyv konzumácie tabaku na výdychové prchavé organické zlúčeniny

Daniil Vainberg¹, Dominika Vešelényiová²

^{1,2} Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2
917 01 Trnava

¹ vainberg3@ucm.sk, ² dominika.veselenyiova@ucm.sk

Abstrakt

The present study investigates the impact of tobacco consumption on exhaled volatile organic compounds (VOCs) in young adults. Twenty volunteers, aged between 18 and 26 years, were recruited for the study and divided into two groups: smokers and non-smokers. Alveolar air was collected using a two-bag system in order to minimize contamination from the upper airways. For subsequent qualitative and quantitative analysis using gas chromatography with mass spectrometry, VOCs were captured on sorption filters. Questionnaire data pertaining to age, sex, respiratory health, and smoking frequency were obtained to interpret of VOC profiles; the majority of smokers reported a daily consumption of approximately 10 cigarettes. The aim of the study was to characterize the smoking-related "breath fingerprint" and to quantify specific VOCs that are markers of nicotine product use.

Key words: VOCs, GC-MS, nicotine influence, lung health

Abstrakt

Táto štúdia skúma vplyv konzumácie tabaku na výdychové prchavé organické zlúčeniny (POZ) u mladých dospelých. Do štúdie bolo zaradených dvadsať dobrovoľníkov vo veku od 18 do 26 rokov, ktorí boli rozdelení do dvoch skupín: fajčiari a nefajčiari. Alveolárny vzduch bol odobratý pomocou systému dvoch sáčkov, aby sa minimalizovala kontaminácia z horných dýchacích ciest. Pre následnú kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu pomocou plynového chromatografu s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) boli POZ zachytené na sorpčných filtroch. Na interpretácie profilov POZ boli získané údaje z dotazníka týkajúce sa veku, pohlavia, zdravia dýchacích ciest a frekvencie fajčenia; väčšina fajčiarov uviedla dennú spotrebu približne 10 cigariet. Cieľom štúdie bolo charakterizovať „odtlačok dychu“ súvisiaci s fajčením a kvantifikovať špecifické POZY, ktoré sú markermi používania nikotínových výrobkov.

Kľúčové slová: POZY, GC-MS, účinky nikotínu, zdravie pľúc

Introduction

Tobacco smoke is the primary risk factor for severe respiratory pathologies, including lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[1, 2]. It acts as a potent source of over 2,000 compounds, including free radicals and reactive oxygen and nitrogen species [2]. Upon inhalation, these agents induce high levels of oxidative stress, causing irreversible structural and functional cellular damage, such as lipid peroxidation, protein modification, and DNA damage. This oxidative burden triggers a cycle of chronic inflammation that often persists in lung tissues even after smoking cessation [3].

Volatile organic compounds (VOCs) are diverse carbon-based molecules with low boiling points and high vapor pressures at room temperature [4, 5]. In clinical settings, VOCs serve as non-invasive indicators of altered cellular metabolism and pathophysiological states [6]. Biomarkers resulting from lipid peroxidation, such as alkanes (ethane, pentane) and aldehydes (hexanal, nonanal), are frequently used to monitor oxidative stress in smoking-related inflammatory diseases like asthma and COPD [6, 7, 8].

Active smokers exhibit a distinct "breath-print" containing more than 80 smoking-related compounds [9]. The largest group consists of unsaturated hydrocarbons, including 26 alkenes, 3 alkynes, and 29 dienes [9]. Aromatic hydrocarbons, particularly the BTEX group (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes), are significantly elevated in smokers [8, 10]. Furthermore, nitrogen-containing compounds like acetonitrile and furans such as 2,5-dimethylfuran are recognized as highly specific markers for tobacco combustion [11].

Linking specific VOCs exclusively to active smoking remains challenging due to several confounding factors. Many "smoker markers," such as benzene and toluene, are also ubiquitous exogenous pollutants originating from traffic and industrial emissions [9, 10]. Additionally, the short biological half-life of inhaled VOCs ensures they only represent the most recent exposure rather than long-term habits [8, 12]. Technical artifacts also complicate interpretation; for example, thermal desorption materials like Tenax® TA can generate decomposition products such as benzaldehyde and nonanal, which may be falsely

identified as metabolic biomarkers [13]. Finally, individual variations in age, body mass index, and diet further mask the specific effects of tobacco use [8]. The aim of this study is to assess the impact of smoking (electronic or conventional cigarettes) on exhaled VOCs. It also aims to identify and qualitatively/quantitatively determine specific VOCs associated with the consumption of nicotine products.

Materials and methods

Twenty volunteers aged between 18 and 26 were selected to participate in this study. Samples of alveolar air were collected from this group using non-invasive methods for further research.

The volunteers were divided into two groups of 10 people: smokers and non-smokers. Prior to the sampling, participants were required to fast for a period of three hours, abstaining from smoking and consuming food and liquids. Prior to the collection of samples, the participants were requested to complete a questionnaire, in which they indicated the presence of any respiratory diseases, symptoms, smoking frequency, and frequency of oral hygiene practices. Also the signed informed consent was collected from each participant.



Fig. 1 Device for the collection of alveolar air samples.

Samples were collected using a special device (Fig. 1), where a blue bag (QuinTron Collection Bag, QuinTron Instrument Company, Inc., Wisconsin, USA) served to protect the lung air sample from contamination by the air in the oral cavity and larynx. Consequently, clean alveolar air enters the white bag (2L Tedlar PLV Gas Sampling Bag w/Thermogreen LB-2 Septa, Supelco, Pennsylvania, USA) at a maximum volume of 2 liters.



Fig. 2 Device for collecting VOCs.

Following the collection of air in a designated receptacle, a specialized filter was affixed to the apparatus, through which air was directed at a rate of 250 ml/min using a syringe (Large Glass Syringe 250 ml with Ruhr Lock(s) Caliber) to capture the VOCs of interest (Fig. 2). In order to capture a sufficient amount of VOCs, 500 ml of alveolar air were passed through the filter. Post-sampling, air samples were collected from the room to establish a control sample for the purpose of levelling exogenous VOCs. Subsequent to this procedure, the trap containing the specialized filter was hermetically sealed and dispatched for storage at a temperature of -20°C .

The subsequent stage of the study of exhaled VOCs will be gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the qualitative and quantitative determination of potential VOCs.

Results and discussion

Following the collection of all 20 air samples from the participants, an analysis was conducted on the age and sex distribution of the participants. The demographic information presented below (age, sex, and smoking frequency) was obtained from the questionnaires provided. This information is of paramount importance for the subsequent interpretation of the results that will be obtained in future research stages.

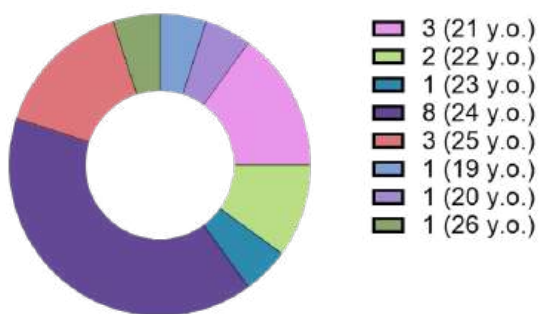


Fig. 3 Age distribution of study participants (The first number is the amount of participants in the group, the second is the age category of the group, "y.o." - years old).

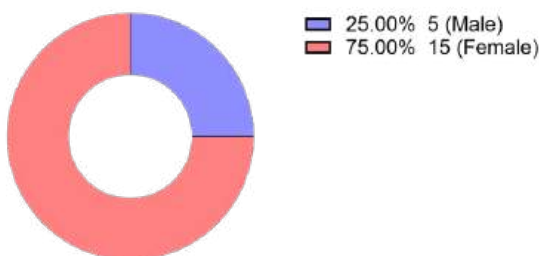


Fig. 4 Sex distribution of study participants.

The analysis revealed that the predominant age group of participants was 24 years old (Fig. 3). There were also 5 men and 15 women (25% and 75% respectively) among the participants (Fig. 4). Furthermore, none of the participants had any serious respiratory diseases (asthma, chronic bronchitis, emphysema, pneumonia, tuberculosis, etc.) that were inquired about in the questionnaire.

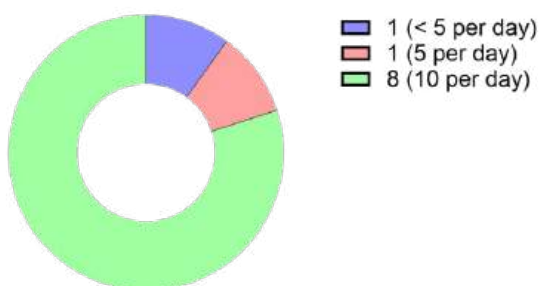


Fig. 5 Distribution of subjects by smoking frequency (The first number is the amount of participants in the group, the second is the frequency of smoking cigarettes per day).

Furthermore, upon completion of the questionnaires by all subjects, it was ascertained that the predominant smoking frequency among the cohort of smokers was 10 cigarettes per day (Fig. 5).

Subsequent phases of this study (GC-MS) will yield quantitative and qualitative data on the detected

VOCs. However, analogous studies have been documented, the objective of which was to analyze exhaled VOCs and the impact of this detrimental habit on the overall background of endogenous VOCs.

The study by Filipiak and colleagues involved a group of 115 people, divided into 68 non-smokers and 47 active smokers. The team collected exhaled air using Tedlar® bags, which was then pre-concentrated on multi-layer sorption tubes and analyzed using GC-MS. The objective of the present study was to create a comprehensive profile of VOCs associated with smoking, with a view to avoiding erroneous correlations when monitoring diseases. The analysis identified 86 organic compounds with a significant association with smoking, with unsaturated hydrocarbons constituting the largest chemical group, namely 29 dienes, 27 alkenes, and 3 alkynes. The key statistically significant markers were acetonitrile, which was found in much higher concentrations in both the breath and urine samples of smokers, as well as various furans (e.g., 2-methylfuran, 2,5-dimethylfuran), whose concentration in smokers was more than five times higher than in non-smokers. The group concluded that smoking exerts a significant influence on the composition of exhaled air, and that these compounds must be carefully excluded when searching for biomarkers of pathologies such as lung cancer [9].

In addition to this broad screening, Gaida and colleagues recruited 222 participants, divided into healthy non-smokers, healthy smokers, former smokers with COPD, and current smokers with COPD. Participants inhaled purified room air through a charcoal filter and then exhaled it into a flow-controlled stainless steel reservoir, from which samples were collected on Tenax® TA adsorption tubes for TD-GC-MS analysis. The study targeted a broad range of 134 VOCs to identify markers associated with COPD while controlling for smoking. The findings indicated that active smokers could be distinctly identified by elevated levels of smoking-related combustion products and VOCs, which exhibited a strong correlation with exhaled carbon monoxide levels. In particular, BTX aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, xylene) and furans were found to be elevated to a significant degree. The team concluded that smoking exerts a "profound effect" on the composition of breath, necessitating strict control of smoking status in respiratory studies. They also noted that there are unexplained differences specific to particular locations in multicentre trials [14].

In Spain, Jareño-Esteban and colleagues concentrated on the persistence of smoking-related damage. In their study, the researchers analyzed 89 healthy volunteers, who were divided into three groups: non-smokers, former smokers, and active

smokers. Breath samples were collected using Bio-VOC® devices and transferred to desorption tubes for GC-MS analysis. The target analysis undertaken focused on linear aldehydes and carboxylic acids. The researchers found that nonanal was the only compound that showed statistically significant differences between all groups, including former smokers [2]. A subsequent study in 2017 corroborated the initial findings, demonstrating that nonanal can differentiate between smokers and former smokers and non-smokers, irrespective of the presence of COPD. The team concluded that nonanal is a byproduct of cell membrane destruction caused by tobacco-induced oxidative stress and that its presence indicates cell damage that remains even after smoking cessation [15].

Furthermore, Gordon and colleagues investigated the immediate pharmacokinetics of smoking. A small controlled group of five pairs of smokers and non-smokers was used to measure the absorption and decay of specific carcinogens in real time. Utilizing a real-time breath analyzer equipped with a glow discharge ionization source and an ion trap mass spectrometer, the researchers observed smokers following each cigarette puff. The target markers selected for analysis were benzene, 1,3-butadiene, and 2,5-dimethylfuran. The study provided the first measurements of 1,3-butadiene in breath, finding peak levels of 360 µg/m³ in smokers, while benzene peaked at an average of 522 µg/m³. It was concluded that these compounds have an extremely brief residence time in the body, with initial decay constants of less than one minute. This indicates that breath measurements are highly sensitive to the time elapsed since the last puff [16].

Conclusion

The studies described above emphasize that smoking creates a distinct “breath print” dominated by acetonitrile, furans, and unsaturated hydrocarbons. While some markers, such as benzene and toluene, are also environmental pollutants, others, such as 2,5-dimethylfuran, are highly specific to tobacco combustion. The persistence of nonanal suggests that smoking leaves a long-term metabolic trace in the lungs. These findings may lead us to conclude that there is a need to determine qualitatively and quantitatively certain VOCs that are strictly associated with the use of nicotine products.

Acknowledgements

This work was supported by project FPPV-27-2026.

References

- [1] V. CUKIC; V. LOVRE; D. DRAGISIC a A. USTAMUJIC, (2012). Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) – differences and similarities. *Materia Socio-Medica*, vol. 24, no. 2, pp. 100–105. DOI 10.5455/msm.2012.24.100-105.
- [2] J. J. JAREÑO-ESTEBAN; M. Á. MUÑOZ-LUCAS; B. CARRILLO-ARANDA; J. Á. MALDONADO-SANZ; I. DE GRANDA-ORIVE; A. AGUILAR-ROS et al., (2013). Volatile organic compounds in exhaled breath in a healthy population: effect of tobacco smoking. *Archivos de Bronconeumología*, vol. 49, no. 11, pp. 457–461. DOI 10.1016/j.arbres.2013.04.004.
- [3] F. S. BEZERRA; et al., (2023). Oxidative stress and inflammation in acute and chronic lung injuries. *Antioxidants (Basel)*, vol. 12, no. 3, p. 548. DOI 10.3390/antiox12030548.
- [4] D. HASHOUL a H. HAICK, (2019). Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath. *European Respiratory Review*, vol. 28, no. 152, pp. 1–13. DOI 10.1183/16000617.0011-2019.
- [5] M. LEEMANS; P. BAUËR; V. CUZUEL; E. AUDUREAU a I. FROMANTIN, (2022). Volatile organic compounds analysis as a potential novel screening tool for breast cancer: a systematic review. *Biomarker Insights*, vol. 17, p. 11772719221100709. DOI 10.1177/11772719221100709
- [6] S. DAS; S. PAL a M. MITRA, (2016). Significance of exhaled breath test in clinical diagnosis: a special focus on the detection of diabetes mellitus. *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 36, no. 5, pp. 605–624. DOI 10.1007/s40846-016-0164-6.
- [7] A. S. OYERINDE; V. SELVARAJU; J. R. BABU a T. GEETHA, (2023). Potential role of oxidative stress in the production of volatile organic compounds in obesity. *Antioxidants (Basel)*, vol. 12, no. 1, p. 129. DOI 10.3390/antiox12010129.
- [8] Q. SHEN; Y. LIU; G. LI a T. AN, (2024). A review of disrupted biological response associated with volatile organic compound exposure: insight into identification of biomarkers. *Science of the Total Environment*, vol. 948, p. 174924. DOI 10.1016/j.scitotenv.2024.174924
- [9] W. FILIPIAK; et al., (2012). Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants. *Journal of Breath Research*, vol. 6, no. 3, p. 036008. DOI 10.1088/1752-7155/6/3/036008.
- [10] M. KOUREAS; P. KIRGOU; G. AMOUTZIAS; C. HADJICHRISTODOULOU; K. GOURGOULIANIS a A. TSAKALOF, (2020). Target analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer discrimination from other pulmonary diseases and healthy persons. *Metabolites*, vol. 10, no. 8, p. 317. DOI 10.3390/metabo10080317.
- [11] M. BAJO-FERNÁNDEZ; É. A. SOUZA-SILVA; C. BARBAS; M. F. REY-STOLLE a A. GARCÍA, (2023). GC-

MS-based metabolomics of volatile organic compounds in exhaled breath: applications in health and disease. A review. *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 10, p. 1295955. DOI 10.3389/fmolb.2023.1295955.

[12] I. BELLUOMO; et al., (2021). Selected ion flow tube mass spectrometry for targeted analysis of volatile organic compounds in human breath. *Nature Protocols*, vol. 16, no. 7, pp. 3419–3438. DOI 10.1038/s41596-021-00542-0.

[13] I. A. RATIU; T. LIGOR; V. BOCOS-BINTINTAN; C. A. MAYHEW a B. BUSZEWSKI, (2021). Volatile organic compounds in exhaled breath as fingerprints of lung cancer, asthma and COPD. *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, no. 1, p. 32. DOI 10.3390/jcm10010032.

[14] A. GAIDA; et al., (2016). A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD. *Journal of Breath Research*, vol. 10, no. 2, p. 026006. DOI 10.1088/1752-7155/10/2/026006.

[15] J. J. JAREÑO-ESTEBAN; et al., (2017). Study of 5 volatile organic compounds in exhaled breath in chronic obstructive pulmonary disease. *Archivos de Bronconeumología*, vol. 53, no. 5, pp. 251–256. DOI 10.1016/j.arbres.2016.09.003.

[16] S. M. GORDON; L. A. WALLACE; M. C. BRINKMAN; P. J. CALLAHAN a D. V. KENNY, (2002). Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking. *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no. 7, pp. 689–698. DOI 10.1289/ehp.02110689.

Optimalizácia produkcie kalusu hybridnej levandule prostredníctvom strojového učenia

Optimizing hybrid lavender callus production through machine learning

Lea Veničáková^{1*} – Seyid Amjad Ali² – Šarlota Kaňuková^{1,3}

¹Oddelenie biotechnológií, ÚBB, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

² Oddelenie informačných systémov a technológií, Bilkent University, Ankara, Turecko

³Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Odbor rastlinnej výroby, Bratislavská
122, 912 68 Piešťany

*venicakova1@ucm.sk

Abstrakt

In vitro kultivácia predstavuje vhodný prístup na získavanie sekundárnych metabolitov prítomných v rastlinách rodu *Lavandula*. V posledných rokoch sa na zlepšenie riadenia *in vitro* systémov uplatňujú metódy strojového učenia, ktoré umožňujú modelovať vzťahy medzi kultivačnými faktormi a predikovať ich optimálne kombinácie. Cieľom práce bola indukcia kalusového pletiva zo stonkových a koreňových explantátov na médiách s rôznymi kombináciami a koncentraciami rastových regulátorov a následné sledovanie nárastu kalusovej biomasy počas kultivácie. Získané experimentálne údaje boli analyzované pomocou modelov strojového učenia, ktoré identifikovali rozhodujúce vzťahy medzi typom explantátu, dĺžkou kultivácie a použitými rastovými regulátormi. Najvyššiu predikčnú presnosť dosiahli modely XGBoost a SVR, ktoré boli následne využité vo viaccielovej optimalizácii NSGA-II na návrh podmienok maximalizujúcich tvorbu kalusovej biomasy.

Kľúčové slová: *Lavandula x intermedia*, kalusová kultúra, strojové učenie, rastlinné rastové regulátory

Abstract

In vitro cultivation represents an effective approach for obtaining secondary metabolites naturally present in plants of the genus *Lavandula*. In recent years, machine learning methods have been increasingly applied to improve the management of *in vitro* systems by modelling the relationships among cultivation factors and predicting their optimal combinations. The aim of this study was to induce callus tissue from stem and root explants on media containing different combinations and concentrations of plant growth regulators, followed by monitoring the accumulation of callus biomass throughout the cultivation period. The experimental data were analysed using machine

learning models, which identified key relationships among explant type, cultivation duration, and the applied plant growth regulators. The highest predictive accuracy was achieved by the XGBoost and SVR models, which were subsequently employed in multi-objective optimization using NSGA-II to propose conditions that maximize callus biomass production.

Key Words: *Lavandula x intermedia*, callus culture, machine learning, plant growth regulators

Úvod

Rod *Lavandula* patrí do čeľade *Lamiaceae* a zahŕňa viacero druhov, ktoré sú významné z hľadiska poľnohospodárstva, farmácie aj potravinárstva [1]. Mimoriadne dôležité postavenie má *Lavandula intermedia* Emeric ex Loisel., hybrid vzniknutý krížením *L. angustifolia* a *L. latifolia*, ktorý sa pre svoje agronomické vlastnosti a stabilnú produkciu silíc považuje za jeden z najrozšírejších pestovaných taxónov [2, 3]. Hlavným predmetom jeho využitia je esenciálny olej, charakteristický výraznými antioxidačnými, biocídnymi a potenciálnymi terapeutickými účinkami [4]. Okrem toho však rastlina syntetizuje široké spektrum sekundárnych metabolitov vrátane polyfenolov, kumarínov, triterpénov, sterolov a trieslovín, ktoré významne prispievajú k jej bioaktívnemu profilu [3].

Možnosti produkcie týchto bioaktívnych zlúčenín sú výrazne rozšírené vďaka využívaniu *in vitro* kultivačných techník, medzi ktorými zohráva dôležitú úlohu indukcia kalusového pletiva. *In vitro* systémy umožňujú vo všeobecnosti dosahovať vyššie koncentrácie sekundárnych metabolitov v porovnaní s konvenčne pestovanými rastlinami, a to vďaka kontrolovateľným podmienkam rastu, eliminácii environmentálnych stresov a jednoduchšiemu získavaniu biomasy [5]. Kalusové pletivo predstavuje

nediferencovanú masu buniek vznikajúcu v dôsledku hormonálnej stimulácie alebo mechanického poškodenia, pričom tieto bunky si zachovávajú vysokú proliferatívnu aktivitu a schopnosť syntetizovať široké spektrum metabolitov [6]. Kalogenéza je preto považovaná za jeden z najefektívnejších nástrojov pre *in vitro* produkciu sekundárnych metabolitov [7], hoci jej úspešnosť závisí od viacerých faktorov, ako sú typ a koncentrácia rastových regulátorov, typ explantátu, kultivačné podmienky a interakcie medzi jednotlivými zložkami média [8, 9].

Optimalizácia týchto faktorov predstavuje významnú výzvu. Tradičné experimentálne postupy, ktoré využívajú postupné testovanie jednotlivých premenných a konvenčné štatistické modely, sú síce funkčné, no zároveň časovo, materiálovo aj finančne náročné [10]. Ich limitáciou je aj to, že nedokážu adekvátne vystihnúť komplexné a nelineárne interakcie biologických systémov, ktoré môžu výrazne ovplyvňovať výslednú morfogenetickú aj metabolickú odpoveď kultúr. V posledných rokoch preto rastie potreba efektívnejších, dynamických prístupov, ktoré umožňujú simultánnu analýzu viacerých premenných a presnejšie modelovanie reakcií pletiva [7, 8].

Medzi takéto moderné prístupy patrí aj strojové učenie, rýchlo sa rozvíjajúca oblasť umelej inteligencie. Strojové učenie poskytuje nástroje schopné identifikovať komplexné vzorce v biologických údajoch, pracovať s vysokou mierou variability typickou pre rastlinné tkanivové kultúry a predpovedať optimálne kombinácie kultivačných faktorov pre dosiahnutie požadovaných výsledkov [7, 11]. Rôzne algoritmy strojového učenia, vrátane modelov založených na umelej inteligencii a optimalizačných metód, boli úspešne aplikované pri modelovaní a predpovedaní *in vitro* kultivačných systémov u mnohých druhov, ako sú paradajka [12], lieska [13], cícer [14] a ďalšie, pri ktorých preukázali vysokú presnosť a robustnosť.

Na základe vyššie uvedených skutočností sa predkladaná práca zameriava na testovanie rôznych kombinácií a koncentrácií rastových regulátorov a na hodnotenie ich vplyvu na percento tvorby kalusu a hmotnosť kalusovej biomasy počas 3, 6, 9, 12 a 15 týždňov kultivácie. Získané experimentálne údaje následne slúžili ako podklad na vytvorenie predikčných modelov pomocou algoritmov strojového učenia, ktorých cieľom bolo určiť optimálne kultivačné podmienky pre maximalizáciu tvorby kalusovej biomasy.

1 Materiál a metódy

1.1 Indukcia tvorby kalusu

Z rastlín hybridnej levandule, odrody Budrovka, boli za aseptických podmienok odobrané stonkové a koreňové segmenty. Dĺžka explantátu stonky a koreňa bola približne 5 mm. Segmenty boli kultivované na MS médiu [15] s agarom a prídavkom rôznych kombinácií a koncentrácií rastových regulátorov (Tabuľka 1). Kultivácia prebiehala po dobu 15 týždňov v tme a pri teplote 23 ± 2 °C. Prenos kalusov bol realizovaný každé 3 týždne na čerstvé MS médium s rovnakými rastovými regulátormi.

Tabuľka 1: Rastové regulátory v MS médiu na indukciu kalusu.

Označenie média	Typy a koncentrácie rastových regulátorov (mg/L)				
	2,4-D	IAA	KIN	BAP	GA3
1	2	-	2	-	-
2	2	-	1	-	-
3	2	-	0,5	-	-
4	2	-	-	2	-
5	2	-	-	1	-
6	2	-	-	0,5	-
7	2	-	-	-	2
8	2	-	-	-	1
9	2	-	-	-	0,5
10	1	-	2	-	-
11	1	-	1	-	-
12	1	-	0,5	-	-
13	1	-	-	2	-
14	1	-	-	1	-
15	1	-	-	0,5	-
16	1	-	-	-	2
17	1	-	-	-	1
18	1	-	-	-	0,5
19	0,5	-	2	-	-
20	0,5	-	1	-	-
21	0,5	-	0,5	-	-
22	0,5	-	-	2	-
23	0,5	-	-	1	-
24	0,5	-	-	0,5	-
25	0,5	-	-	-	2
26	0,5	-	-	-	1
27	0,5	-	-	-	0,5
28	2	-	-	-	-
29	1	-	-	-	-
30	0,5	-	-	-	-
31	-	2	2	-	-
32	-	2	1	-	-
33	-	2	0,5	-	-
34	-	2	-	2	-
35	-	2	-	1	-
36	-	2	-	0,5	-
37	-	2	-	-	2
38	-	2	-	-	1
39	-	2	-	-	0,5

Pokračovanie Tabuľky 1:

Označenie média	Typy a koncentrácie rastových regulátorov (mg/L)				
	2,4-D	IAA	KIN	BAP	GA3
40	-	1	2	-	-
41	-	1	1	-	-
42	-	1	0,5	-	-
43	-	1	-	2	-
44	-	1	-	1	-
45	-	1	-	0,5	-
46	-	1	-	-	2
47	-	1	-	-	1
48	-	1	-	-	0,5
49	-	0,5	2	-	-
50	-	0,5	1	-	-
51	-	0,5	0,5	-	-
52	-	0,5	-	2	-
53	-	0,5	-	1	-
54	-	0,5	-	0,5	-
55	-	0,5	-	-	2
56	-	0,5	-	-	1
57	-	0,5	-	-	0,5

1.2 Hodnotenie parametrov kalusu a faktorov ovplyvňujúcich jeho rast

Paralelne s pasážovaním kalusov po 3, 6, 9 a 12 týždňoch a pri ukončení experimentu 15-ty týždeň boli zaznamenané údaje o čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy, percento tvorby kalusu, vzhľad a zafarbenie kalusov. Percento tvorby kalusu na jednotlivých explantátoch bolo vypočítané nasledovne:

$$\% \text{ tvorby kalusu} = \frac{\text{počet explantátov s kalusom}}{\text{celkový počet explantátov}} \times 100$$

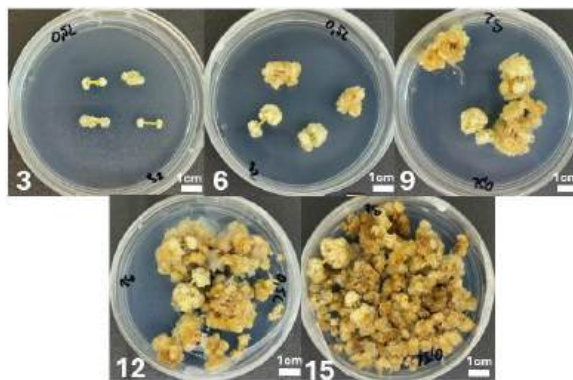
1.3 Strojové učenie

Údaje získané z experimentu boli využité na tvorbu predikčných modelov pomocou viacerých prístupov strojového učenia s cieľom predikovať percento kalusovej indukcie a hmotnosť kalusovej biomasy z dostupných vstupných premenných. Presnosť modelov bola hodnotená pomocou štandardných regresných metrík (R^2 , RMSE a MAE) a modely s najvyššou predikčnou presnosťou boli následne použité ako cieľové funkcie pri optimalizácii NSGA-II, ktorá umožnila identifikovať kombinácie podmienok spájané s najvyššími hodnotami sledovaných parametrov.

2 Výsledky a diskusia

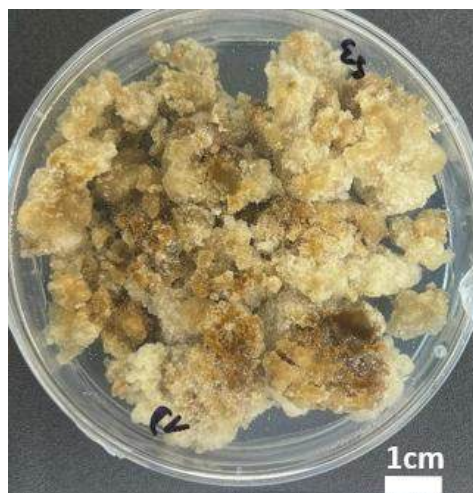
Vybrané kombinácie a koncentrácie rastových regulátorov použité na indukciu kalusu vychádzali z nami vykonaného predskríningu, ktorého cieľom bolo identifikovať najvhodnejšie hormonálne zloženie podporujúce iniciáciu a rast kalusového pletiva. Nárast kalusovej biomasy (Obr. 1) bol v priebehu kultivácie

pravidelne zaznamenaný po 3, 6, 9, 12 a 15 týždni kultivácie.



Obr. 1 Vplyv dĺžky kultivácie na tvorbu a rast kalusu zo stonkového explantátu pestovaného na MS médiu s obsahom 2 mg/L IAA a 0,5 mg/L BAP v časových bodoch 3, 6, 9, 12 a 15 týždňov. Mierka: 1 cm (vpravo dole). Zdroj: Autori

Okrem zaznamenávania hmotnosti sme počas kultivácie pozorovali aj morfológické znaky kalusu, t. j. farbu a štruktúru. Prevažujúcou farbou v kaluse indukovanom z levandule odrody Budrovka bola krémová farba (Obr. 2). Zároveň sme zaznamenali prítomnosť hnedého a bieleho kalusu. Farba kalusu zväčša súvisela s jeho štruktúrou, pričom kalus krémovej farby bol prevažne rozpadavej štruktúry a biely kalus vykazoval kompaktniejšiu štruktúru.



Obr. 2 Krémový kalus na MS médiu s obsahom 0,5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L GA3

Zdroj: Autori

Keykha a kol. (2014) vo svojej štúdií sledovali farbu aj štruktúru kalusu a zistili, že kalus indukovaný na médiu s 2,4-D mal krémovú farbu, zatiaľčo kalus indukovaný na médiu s IAA mal hnedú farbu. Lim a kol. (2009) pri pozorovaní tvorby kalusov u rastliny *Ocimum sanctum* L. uviedli, že najvýznamnejším faktorom ovplyvňujúcim farbu indukovaných kalusov bol typ použitého auxínu. Rovnaký záver priniesla aj štúdia Alwash a kol. (2020) pri rastline *L. angustifolia* (L.).

Predikčné modelovanie kultivácie kalusov levandule var. Budrovka preukázalo rozdiely v závislosti od použitých algoritmov strojového učenia a zároveň poskytlo konzistentný obraz o faktoroch, ktoré najvýraznejšie ovplyvňujú reakciu pletiva v *in vitro* podmienkach. Pri hmotnosti kalusu dosiahol najvyššiu presnosť model XGBoost ($R^2 = 0.9373$; RMSE = 1.7610), pričom veľmi dobré výsledky dosiahol aj model SVR ($R^2 = 0.8828$). Oba modely zachytili nelineárne interakcie medzi explantátom, trvaním kultivácie a hormonálnym zložením média, čo sa prejavilo nízkym rozptylom predikcií naprieč celým rozsahom dát. Menej presné výsledky regresných modelov potvrdili, že vzťahy medzi sledovanými faktormi sú výrazne nelineárne a vyžadujú algoritmy schopné zachytiť komplexné interakcie.

Tento trend sa potvrdil aj pri analýze druhého sledovaného parametra, percenta kalusovej indukcie. Najvyššiu presnosť opäť dosiahol model XGBoost, ktorý dosiahol R^2 0.8305 a RMSE 12.0026, pričom jeho predikcie vykazovali vysokú zhodu so skutočnými hodnotami. Model SVR reprodukoval podobné správanie a zachytil hlavné vzorce reakcie, zatiaľ čo ostatné modely vykazovali odchýlky najmä pri extrémnych hodnotách indukcie. Tieto výsledky naznačujú, že rast kalusu aj indukcia sú riadené podobným súborom rozhodujúcich faktorov a že účinné modelovanie vyžaduje algoritmy schopné spracovávať viacnásobné nelineárne interakcie.

Analýza dôležitosti premenných potvrdila, že typ explantátu, doba kultivácie a rastlinné regulátory mali dominujúci vplyv na oba sledované výstupy. Konzistentnosť týchto výsledkov naprieč modelmi poukazuje na to, že reakcia levandule v *in vitro* podmienkach je determinovaná pomerne malým počtom kľúčových faktorov, ktoré majú stabilný účinok pri rôznych predikčných prístupoch. Tento poznatok je významný, pretože doterajšie štúdie uplatňujúce metódy strojového učenia v rastlinných biotechnológiách sa zameriavali prevažne na iné druhy rastlín [16, 11, 17]. V prípade levandule ide o prvé

systematické využitie predikčných aj optimalizačných postupov, pričom identifikované faktory boli následne implementované do optimalizačného modulu s cieľom maximalizovať sledované výstupy.

Výsledky viaccieľovej optimalizácie pomocou NSGA-II poskytli jasné dôkazy o tom, že systém disponuje dobre definovaným multifaktorovým optimom.

Najčastejšie sa medzi optimálnymi riešeniami vyskytovali kombinácie s rovnakým typom explantátu a s dĺžkou kultivácie 15 týždňov. Predikované hodnoty hmotnosti kalusu presahovali hodnotu 32 pri modeli XGBoost a hodnotu 33 pri modeli GAM. Opakované objavovanie sa rovnakých kombinácií v rôznych algoritmoch potvrdzuje, že identifikované optima sú stabilné a nie sú výsledkom náhodného správania modelov. Z praktického hľadiska je mimoriadne dôležité, že optimalizačný proces dokázal identifikovať aj vhodné kombinácie rastových regulátorov, ktoré patria medzi najnáročnejšie parametre pri návrhu *in vitro* protokolov vzhľadom na ich zložité interakcie.

Stabilita modelov sa prejavila aj pri hodnotení ich robustnosti. Modely XGBoost a SVR vykazovali konzistentné predikcie v celom rozsahu hodnôt, vrátane oblastí mimo centrálnej distribúcie údajov. Takáto schopnosť je zásadná najmä pri levanduli, kde biologická variabilita explantátov môže byť výrazná a predstavuje obmedzujúci faktor pri praktickej implementácii kultivačných protokolov. Robustné modely tak zvyšujú pravdepodobnosť úspešného prenesenia optimalizačných výsledkov do reálnych experimentálnych podmienok.

Súhrnne možno konštatovať, že kombinácia predikčných modelov a viaccieľovej optimalizácie vytvára spoľahlivý metodologický základ pre racionálny návrh kultivačných podmienok levandule. Identifikácia rozhodujúcich faktorov, modelovanie reakcie pletiva a následný návrh optimálnych kombinácií podmienok predstavujú integrovaný prístup, ktorý dokáže významne znížiť počet experimentov potrebných na vývoj efektívneho a reprodukovateľného protokolu. Tento prístup zároveň rozširuje existujúce aplikácie strojového učenia v rastlinných biotechnológiách [18, 22, 23] o nový modelový systém, ktorý doposiaľ nebol predmetom systematickej predikcie ani optimalizácie.

Záver

Experimentálna analýza potvrdila, že rozdielne koncentrácie a kombinácie rastových regulátorov významne ovplyvňujú percento tvorby kalusu ako aj samotnú hmotnosť kalusovej biomasy počas rôznej doby kultivácie. Dátový súbor získaný z týchto meraní

umožnil vytvoriť predikčné modely strojového učenia, pričom najvyššiu presnosť dosiahli algoritmy XGBoost a SVR. Na základe získaných výstupov z týchto algoritmov boli identifikované kultivačné podmienky súvisiace s najvyššou úrovňou rastu aj indukcie kalusu.

PodĎakovanie

Práca vznikla s podporou Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra a FPPV-31-2026 projektu podporeného Fakultou prírodných vied, Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] BLAŽEKOVIC, B.; YANG, W.; WANG, Y.; LI, C. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant of essential oils of *Lavandula x intermedia* „Budrovka“ and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. *Industrial Crops & Products* 123, pp. 173-182. ISSN 0926-6690.
- [2] WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. (2002). Biological Activities of Lavender Essential Oil. *Phytotherapy research*, vol. 2, pp. 301-308. ISSN 1099-1573.
- [3] DOBROS, N.; ZAWADA, K.; PARADOWSKA, K. (2022). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia* Cultivars Extracted with Different Methods. *Antioxidants*, vol. 17, no. 711, pp. 1-16. ISSN 2076-3921.
- [4] POKAJEWICZ, K. et al. (2023). *Lavandula x intermedia* – A Bastard Lavender or a Plant of Many Values? Part II. Biological Activities and Applications of Lavadin. *Molecules*, vol. 8, no. 2986, pp.1-29. ISSN 1420-3049.
- [5] MCDONALD, K. A.; JACKMAN, A. P.; THORUP, J.E.; DANDEKAR, A. M. (1995). Plant callus as a source of biochemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 54, no. 1, pp. 93,108. ISSN 1559-0291.
- [6] MORUŚ, M.; BARAN, M.; ROST-ROSZKOWSKA, M.; SKOTNICKA-GRACA, U. (2014). Plant stem cells as innovation in cosmetics. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, vol. 71, no. 5, pp. 701-707. ISSN 0001-6837.
- [7] JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H. (2024). Machine learning-mediated *Passiflora caerulea* callogenesis optimisation. *PLoS ONE*, vol. 19, no. 1. ISSN 1932-6203.
- [8] HESAMI, M.; JONES, A. M. P. (2020). Application of artificial intelligence models and optimization algorithms in plant cell and tissue culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, no. 22, pp. 9449-9485. ISSN 0175-7598.
- [9] ROSA, Y. B. C. J.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. (2016). *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*, vol. 52, no. 1, pp. 64-71. ISSN 1475-2689.
- [10] PEPE, M.; HESAMI, M.; SMALL, F.; JONES, A. M. P. (2021). Comparative Analysis of Machine Learning and Evolutionary Optimization Algorithms for Precision Micropropagation of *Cannabis sativa*: Prediction and Validation of *in vitro* Shoot Growth and Development Based on the Optimization of Light and Carbohydrate Sources. *Frontiers in Plant Science*, vol. 12, pp. 1-27. ISSN 1664-462X.
- [11] NIAZIAN, M.; NIEDBALA, G. (2020). Machine Learning for Plant Breeding and Biotechnology. *Agriculture*, vol. 10, no. 436, pp. 1-23. ISSN 2077-0472.
- [12] NIAZIAN, M.; SHARIATPANAHI, M. E.; ABDIPOUR, M.; OROOJLOO, M. (2019). Modeling callus induction and regeneration in an anther culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) using image processing and artificial neural network method. *Protoplasma*, vol. 256, no. 5, pp. 1317-1332. ISSN 1615-6102.
- [13] SALEHI, M. et al. (2021). A hybrid model based on general regression neural network and fruit fly optimization algorithm for forecasting and optimizing paclitaxel biosynthesis in *Corylus avellana* cell culture. *Plant Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 1-13. ISSN 1746-4811.
- [14] KRITIS, A.; AASIM, M.; KATIRCI, R. (2022). Application of artificial neural network and machine learning algorithms for modeling the *in vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 150, no. 1, pp. 141-152. ISSN 1573-5044.
- [15] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497. ISSN 1399-3054.
- [16] SILVA, J.C.F. et al. (2019). Machine learning approaches and their current application in plant molecular biology: a systematic review. *Plant Science*, vol. 284, pp. 34-47. ISSN 0168-9452.
- [17] HESAMI, M. et al. (2021). Synergizing off-target predictions for *in silico* insights of CENH3 knockout

- in cannabis through CRISPR/Cas. *Molecules*, vol. 26, no. 7, pp. 1-13. ISSN 1420-3049.
- [18] HESAMI, M. et al. (2019). Modeling and optimizing in vitro sterilization of Chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, vol. 10. ISSN 1664-462X.
- [19] KEYKHA, F. et al. (2014). Optimization of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Callus Culture. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, vol. 24, no. 2, pp. 279-285. ISSN 1818-8745.
- [20] LIM, Z. X.; LING, A.P.K.; HUSSEIN, S. (2009). Callus induction of *Ocimum sanctum* and estimation of its total flavonoids content. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 1, pp. 55-61. ISSN 2041-3890
- [21] ALWASH, B. M.; SALMAN, Z. O.; HAMAD, S. F. (2020). Qualitative and Quantitative Evaluation of Active Constituents in Callus of *Lavandula angustifolia* plant in Vitro. *Baghdad Science Journal*, vol. 17, pp. 591-598. ISSN 2411-7986.
- [22] FARHADI, S. et al. (2020). Modeling of paclitaxel biosynthesis elicitation in *Corylus avellana* cell culture using adaptive neuro-fuzzy interference system-genetic algorithm (ANFIS-GA) and multiple regression methods. *PLoS One*, vol. 15, no. 8, ISSN 1932-6203.
- [23] HESAMI, M. et al. (2021). Modeling and optimizing in vitro seed germination of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, vol. 170. ISSN 1872-633X.

SEKCIA

PHD. III



Porovnanie výkonnosti lokálne nasadených MQTT sprostredkovateľov

Performance comparison of locally deployed MQTT brokers

Nicolas Búčik¹ – Marek Šimon²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 577/2,
917 01 Trnava

¹ bucik1@ucm.sk, ² marek.simon@ucm.sk

Abstrakt

Príspevok sa zameriava na porovnanie štyroch lokálne nasadených MQTT sprostredkovateľov: Eclipse Mosquitto, EMQX, HiveMQ Community Edition a RabbitMQ s MQTT rozšírením. Experimenty a merania boli vykonané vo virtualizovanom prostredí s oddelenými rolami pre jednotlivé virtuálne stroje, kde broker (sprostredkovateľ) uzol, publisher (vydavateľ) uzol, subscriber (odoberateľ) uzol a riadiaci uzol boli jednotlivo spustené ako samostatné virtuálne stroje. Hodnotené boli scenáre základnej latencie, škálovania vydavateľov správ, vplyvu rôznych úrovní QoS (Quality of Service) režimov a hromadného opätovného pripájania klientov (reconnect storm).

Výsledky ukázali, že vo väčšine prípadov dosahoval EMQX najvyrovnanejšie správanie v rámci testovacích scenárov, Mosquitto dominoval v časti priepustnosti vydávania správ, HiveMQ CE poskytoval stabilné stredné výsledky a RabbitMQ bol v testovanej konfigurácii najslabší, najmä pri QoS móde 2 a scenároch hromadného opätovného pripájania klientov.

Počas testovania pre každý dátový bod bolo vykonané jedno zahrievacie (warm-up) spustenie a päť meraných spustení.

Kľúčové slová: mqtt, sprostredkovateľ, qos, kvalita služby, benchmark

Abstract

The paper focuses on comparing four locally deployed MQTT brokers: Eclipse Mosquitto, EMQX, HiveMQ Community Edition, and RabbitMQ with the MQTT plugin. The experiments and measurements were performed in a virtualized environment with separate roles for individual virtual machines, where the broker node, publisher node, subscriber node, and control node were individually run as separate virtual machines. The scenarios evaluated were basic latency, message publisher scaling, the impact of different QoS (Quality of Service) modes, and reconnect storms.

The results showed that in most cases, EMQX achieved the most balanced behavior in the test scenarios, Mosquitto dominated in terms of message publishing throughput, HiveMQ CE provided stable average results, and RabbitMQ was the weakest in the

tested configurations, especially in QoS mode 2 and reconnect scenarios.

During testing, one warm-up run and five measured runs were performed for each data point.

Key Words: mqtt, broker, qos, quality of service, benchmark

Úvod

MQTT v súčasnosti patrí medzi najrozšírenejšie publikačno-odberové protokoly slúžiace na komunikáciu zariadení Internetu vecí. Primárny význam spočíva v malej réžii protokolu, jednoduchšej topológii a možnosti voľby kvality doručenia samotnej správy, a to pomocou troch úrovní QoS (Quality of Service – Kvalita služby) [1]. Viaceré prehľadové práce spomínajú MQTT ako hlavnú voľbu pre IoT systémy, v ktorých prioritou je jednoduchý publikačno-odberový model doručovania (publish/subscribe) a dobrá podpora klientov [2, 3]. V prostredí skutočných IoT zariadení je však takisto dôležitá aj samotná implementácia sprostredkovateľa (broker), keďže práve táto implementácia rozhoduje o tom, akú priepustnosť, latenciu a stabilitu dokáže systém dosiahnuť pri rastúcej záťaži.

V tejto práci sú porovnané štyri prakticky dostupné riešenia: Eclipse Mosquitto [4], EMQX [5], HiveMQ Community Edition (CE) [6] a RabbitMQ s MQTT rozšírením [7]. Podobné porovnanie ukazujú, že výsledky sprostredkovateľov sa môžu pri odlišných scenároch značne líšiť, a že nie je vhodné rozhodovať sa len na základe parametrov uvádzaných v marketingových materiáloch produktu [8,9,10]. Praktické testovanie je preto nevyhnutné najmä vtedy, ak sa má sprostredkovateľ nasadiť v prostredí s vyšším počtom klientov alebo striktnějšími požiadavkami na odozvu. Relevanciu takéhoto pohľadu zvyšujú aj ďalšie experimenty, ktoré potvrdzujú, že QoS a topológia záťaže majú priamy vplyv na latenciu [11, 12].

Cieľom článku bolo vyhodnotiť pomocou experimentov, ako sa testovaní sprostredkovatelia správajú pri rôznych druhoch záťaže, a ktorý z nich poskytuje najvhodnejší kompromis medzi priepustnosťou, latenciou a stabilitou.

1 Metodika

Merania boli realizované na štyroch virtuálnych strojoch spustených vo virtualizačnom softvéri Proxmox. Na fyzickom hostiteľovi bol k dispozícii procesor AMD EPYC 7402 s 24 jadrami a 126 GiB operačnej pamäte. Všetky virtuálne stroje používali typ nastavenia procesora „Host“. Riadiaci uzol mal k dispozícii dva virtuálne procesory a 4 GiB operačnej pamäte, uzol pre sprostredkovateľa mal osem virtuálnych procesorov a 16 GiB operačnej pamäte, uzol pre vydavateľa a uzol pre odoberateľa mali k dispozícii štyri virtuálne procesory a 8 GiB operačnej pamäte. Takéto rozdelenie minimalizovalo vzájomné ovplyvňovanie pri generovaní záťaže a samotného spracovania správ sprostredkovateľom.

Použité merania boli implementované v jazyku C# (.NET) a komunikácia prebiehala medzi virtuálnymi strojmi pomocou SSH (Secure Shell) protokolu. Testy prebiehali nad MQTT verziou 3.1.1 cez transportný protokol TCP bez použitia TLS šifrovania. Každý dátový bod obsahoval jeden zahrievací beh a päť meraných behov, pričom do agregovaných výsledkov vstupovali iba merané behy. Základnými meranými metrikami boli medián priepustnosti a medián P99 (99. percentil) oneskorenia. V scenároch S1, S2 a S4 sa latencia merala pomocou Echo RTT (odoberateľ posielal po prijatí echo odpoveď, čo nám umožňuje merať „end-to-end“ latenciu), zatiaľ čo v scenároch S3 a S5 sa vyhodnocovala latencia na strane odoberateľa.

Okrem testovacieho scenára S5, boli ostatné testy spúšťané v módoch QoS 0 („at most once“ – nie je nutné potvrdenie doručenia správy), QoS 1 („at least once“, posielala sa potvrdenie o doručení správy, ale nekontroluje sa, či správa bola doručená viackrát duplicitne) a QoS 2 („exactly once“ okrem vlastností QoS 1 zabezpečuje aj kontrolu duplicit správ). Testy využívajú aj metriku počtu správ za sekundu (msg/s).

Riadiaci uzol kontroloval samotné testovanie, vždy najskôr spustil na diaľku správneho sprostredkovateľa, následne pomocou vytvoreného testovacieho softvéru vygeneroval plány testovania, ktoré spustil pomocou SSH na jednotlivých virtuálnych strojoch vydavateľov a odoberateľov, ktorí merali a zapisovali jednotlivé metriky lokálne. Po vykonaní posledného testu tieto metriky riadiaci uzol zozbieral a agregoval do súboru výsledkov.

Scenár	Topológia a zmysel testu	Parametre
S1	Základná latencia jeden vydavateľ→jeden odoberateľ	QoS 0/1/2, 256B a 1024B, 1000 msg/s, 60 sekúnd.
S2	Škálovanie vydavateľov	10/50/100 vydavateľov→jeden odoberateľ,

QoS 0/1/2, 256B a 1024B, 100 msg/s na vydavateľa, 60 sekúnd.

S3	fan-out doručovanie	Jeden vydavateľ→10/50/100 odoberateľov, QoS 0/1/2, 256B a 1024B, 1000 msg/s, 60 sekúnd.
S4	Porovnanie záťaže QoS	50 vydavateľov→50 odoberateľov, 256B, QoS 0/1/2, 50 msg/s na vydavateľa, 60 sekúnd.
S5	Hromadné opätovné pripájanie klientov	100/100 a 500/500 vydavateľov a odoberateľov, QoS 1, 20 msg/s na vydavateľa, 60 sekúnd, 20% klientov sa odpája a pripája každých 10 sekúnd.

Tabuľka 1 Prehľad scenárov meraní

Podobný dôraz na opakovateľné testovanie nachádzame aj v literatúre. Mishra a kol. poukazujú na to, že správanie sprostredkovateľov sa mení, a to nie len s rastúcim počtom klientov, ale aj so zvolenou kvalitou doručovania [8]. Pazos porovnával sprostredkovateľov nasadených v cloudovom prostredí a rovnako poukázal na to, že poradie riešení sa mení podľa charakteru záťaže [10]. Silva a kol. pri porovnaní MQTT pripomínajú, že aj samotné sieťové prostredie môže meniť rozloženie latencií a čas dokončenia testu. Z tohto dôvodu boli v tomto príspevku sprostredkovateľa testovaní za totožných podmienok [12].

Z pohľadu metodiky je dôležité aj to, že testovanie nebolo vykonávané pomocou kontajnerov, ale pomocou lokálne nainštalovaných sprostredkovateľov a samostatných virtuálnych strojov, vďaka čomu sa znížil vplyv kontajnerovej vrstvy na výsledky a zároveň bolo možné jednoznačne oddeliť rolu sprostredkovateľa od rolí klientov. Riadiaci uzol generoval konfiguračné plány cez protokol SSH a spúšťal jednotlivé procesy vydavateľov a odoberateľov na vzdialených uzloch. Tento prístup zodpovedá experimentálnemu nastaveniu, ktoré by bolo bežne v praxi používané, kde je orchestrácia oddelená od samotného meraného procesu.

1.1 Vzťah k súvisiacej literatúre

Súvisiaca literatúra ukazuje, že meranie MQTT sprostredkovateľov má zmysel iba vtedy, ak zahŕňa viaceré typy záťaže. Jednoduché 1:1 meranie latencie síce poskytuje rýchly prehľad na základnú odozvu, no neodhaľuje správanie pri „fan-out“ rozosielení správ (správy, ktoré smerujú viacerým odoberateľom súčasne) alebo veľkom počte súbežných vydavateľov [8, 9]. Preto boli v tomto príspevku kombinované scenáre s distribúciou do viacerých odoberateľov, ako aj test hromadného opätovného pripájania klientov.

Mishra a kol. upozorňujú na to, že pri QoS 1 a QoS 2 môžu niektoré implementácie dosahovať prijateľnú priepustnosť vydávania správ, ale zároveň vykazovať zhoršené doručovanie alebo latenciu [8]. Toto tvrdenie sa potvrdilo aj v našich meraniach, kde sa priepustnosť a p99 latencia nie vždy pohybovali rovnakým smerom.

1.2 Spracovanie a interpretácia metrik

Pre každý dátový bod boli zozbierané metriky osobitne za rolu vydavateľa a odoberateľa. Pri úlohe vydavateľa bola rozhodujúca odoslaná priepustnosť a p99 echo RTT. Pri roli odoberateľa sa sledovala doručená priepustnosť a p99 latencia na strane príjmu. Tento dvojitý pohľad je dôležitý, pretože sprostredkovateľ môže vykazovať dobré parametre vydávania správ, ale doručovanie už môže byť limitované. Presne tento jav bol pozorovaný najmä pri Mosquitto a RabbitMQ.

Agregované CSV súbory obsahovali medián priepustnosti a medián p99 oneskorenia nad piatimi opakovaniami. Takýto prístup bol zvolený preto, že medián je odolnejší voči extrémnym výchyľkám ako jednoduchý aritmetický priemer. Zároveň bol zachovaný pohľad na p99, aby bolo možné rozpoznať problémy v zhoršení latencií v krajných prípadoch, ktoré sú pri MQTT systémoch obzvlášť dôležité.

V následnom porovnávacom súbore bol pre každú kombináciu scenár – dátový bod – rola dopočítané aj hodnotenia sprostredkovateľov. Toto hodnotenie bolo určené výlučne podľa hodnoty mediánu priepustnosti, teda najvyššia priepustnosť dostala poradie 1, druhá poradie 2 a podobne. Latencia do hodnotenia nevstupovala. Poradie preto nemožno interpretovať ako komplexné hodnotenie kvality brokera, ale iba ako hodnotenie podľa mediánu priepustnosti.

2 Výsledky a diskusia

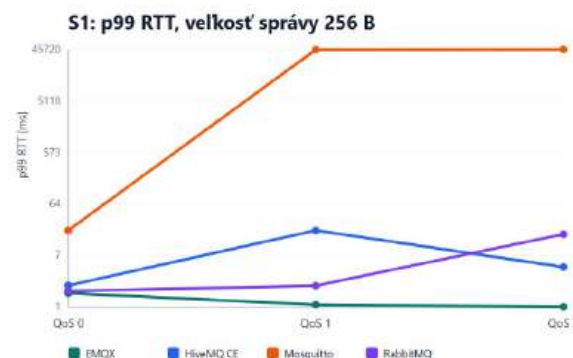
Agregované porovnanie ukázalo, že výsledky nie sú symetrické medzi rolou vydavateľa a odoberateľa. Mosquitto dosiahol najviac prvých miest v priepustnosti vydávania správ, EMQX dominoval v výsledkoch odoberania a pri scenároch hromadného opätovného pripájania klientov. RabbitMQ sa vo väčšine scenárov umiestnil na posledných miestach a HiveMQ CE dosahoval stabilné, no menej výrazné výsledky. Tento prehľad sumarizuje tabuľka 2.

Je potrebné zdôrazniť, že v tabuľke 3 ide o poradie odvodené iba z priepustnosti. Sprostredkovateľ s hodnotením prvý preto nemusí súčasne dosahovať najlepšiu latenciu. V niektorých scenároch bol tento rozpor veľmi výrazný, najmä pri Mosquitto a RabbitMQ, kde priepustnosť vydávania nebola vždy sprevádzaná priaznivou hodnotou p99 RTT.

Rola	Sprostredkovateľ	Počet 1. miest	Priemerné hodnotenie
vydavateľ	Mosquitto	29	1,55
vydavateľ	EMQX	14	1,98
vydavateľ	RabbitMQ	3	3,17
vydavateľ	HiveMQ CE	0	3,30
odoberateľ	EMQX	25	1,77
odoberateľ	HiveMQ CE	11	2,38
odoberateľ	Mosquitto	6	2,70
odoberateľ	RabbitMQ	5	3,15

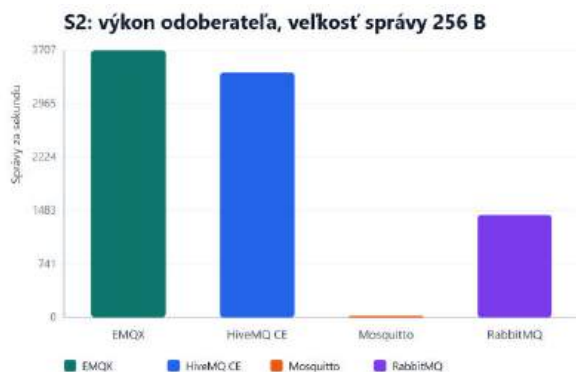
Tabuľka 2 Celkové poradie sprostredkovateľov podľa víťazstiev a priemerného hodnotenia

Z tabuľky 3 vyplýva, že priepustnosť vydávania nie je postačujúcim ukazovateľom kvality sprostredkovateľa. V niektorých scenároch Mosquitto odosielať správy veľmi rýchlo, ale na strane odoberateľa alebo v p99 latencii vykazoval citelné problémy. EMQX bol naopak najvyrovnannejší sprostredkovateľ naprieč celou tabuľkou.



Graf 1 p99 RTT v scenári S1 pre 256 B veľkosť správy

Graf 1 ukazuje, že pri základnom teste S1 boli v QoS 0 rozdiely medzi sprostredkovateľmi pomerne malé. Po prechode na QoS 1 a QoS 2 sa však prejavili výrazné rozdiely implementácií. EMQX si vo všetkých troch úrovniach QoS udržal p99 RTT pod 2 ms. HiveMQ CE ostal použiteľný, hoci pri QoS 1 narástlo p99 približne na 20,8 ms. Mosquitto v rovnakom scenári vykazoval p99 RTT nad 45 s pri QoS 1 aj QoS 2, čo je z pohľadu citlivých aplikácií neakceptovateľné. RabbitMQ pri QoS 2 mierne zhoršil v porovnaní s HiveMQ CE.



Graf 2 Prípustnosť odoberateľa v scenári S2 pre 100 vydavateľov, QoS 1, 256 B veľkosť správy

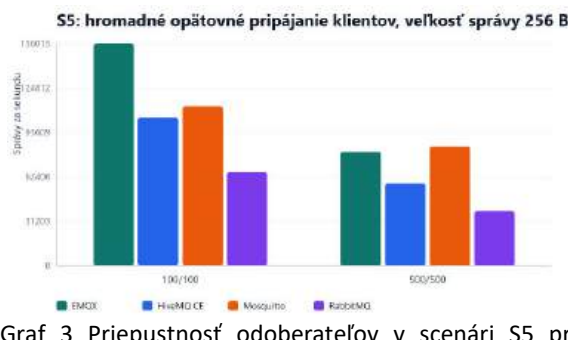
V scenári S2 sa potvrdilo, že rast počtu vydavateľov zvyšuje rozdiely medzi sprostredkovateľmi oveľa viac ako jednoduchý test S1. Pri počte 100 vydavateľov o veľkosti dát 256 B s módom QoS 1 dosiahol EMQX odoberateľ príjmu 3706,68 msg/s a HiveMQ CE 3395,62 msg/s. RabbitMQ klesol na 1424,20 msg/s a Mosquitto iba na 22,47 msg/s.

To znamená, že pri väčšom množstve vydavateľov a spoľahlivejšej kvalite doručenia sa jednotlivé implementácie rozchádzajú omnoho výraznejšie ako pri základnom teste.

QoS	Sprostredkovateľ	Prípustnosť [msg/s]	p99 RTT [ms]
0	Mosquitto	2414,18	3837,40
0	EMQX	2413,27	138,82
0	HiveMQ CE	2412,11	1877,14
0	RabbitMQ	2414,09	59715,39
1	Mosquitto	2414,27	45570,36
1	EMQX	2413,78	483,94
1	HiveMQ CE	1741,26	6592,32
1	RabbitMQ	2413,45	59036,67
2	Mosquitto	2413,34	45533,93
2	EMQX	2412,68	539,32
2	HiveMQ CE	2411,34	12544,11
2	RabbitMQ	0,00	27,27

Tabuľka 3 Scenár S4: Prípustnosť vydávania správ a p99 RTT

Scenár S4 bol navrhnutý tak, aby pri fixnej topológii izoloval iba vplyv úrovne QoS. Tabuľka 3 ukazuje, že príjmu vydávania ostala pri EMQX a Mosquitto v QoS 0 a QoS 1 podobná, avšak latencia sa zmenila dramaticky. EMQX si udržal p99 RTT pod 540 ms, HiveMQ CE sa pri QoS 2 dostal nad 12 s a Mosquitto pri QoS 1 aj QoS 2 prekročoval 45 s. RabbitMQ pri QoS 2 navyše klesol na nulovú príjmu vydávania. Tieto výsledky potvrdzujú, že rovnaká príjmu vydávania nemusí znamenať rovnakú kvalitu služby.



Graf 3 Prípustnosť odoberateľov v scenári S5 pri hromadnom opätovnom pripájaní klientov

Hromadného opätovného pripájania klientov v scenári S5 patrila medzi najnáročnejšie časti testovania. Pri 100 vydavateľoch a 100 odoberateľoch dosiahol EMQX príjmu na strane odoberateľa 156 015,47 msg/s, Mosquitto 112 131,23 msg/s, HiveMQ CE 104 309,18 msg/s a RabbitMQ 65 474,65 msg/s. Pri rozsahu 500/500 klientov ostal EMQX prvý s hodnotou 80 098,75 msg/s, za ním nasledovalo Mosquitto s 83 773,77 msg/s na strane vydavateľa a 10 986,31 ms p99 latencie na strane odoberateľa, čo naznačuje zhoršenú stabilitu pri doručovaní. RabbitMQ dosahoval v scenári hromadného opätovného pripájania klientov nielen najnižšiu príjmu, ale aj najvyššie latencie.

Z celej sady meraní vyplývajú tri hlavné zistenia. Po prvé, EMQX bol v testovanom prostredí najvyrovnannejší sprostredkovateľ a dosahoval najlepšie výsledky na strane odoberateľa. Po druhé, Mosquitto bol veľmi konkurencieschopný v časti príjmu na strane vydavateľa, ale pri časti scenárov s QoS 1 a QoS 2 vykazoval extrémne hodnoty p99 RTT, ktoré znižujú jeho vhodnosť pre časovo citlivé aplikácie. Po tretie, RabbitMQ s MQTT pluginom sa v testovanej konfigurácii ukázal ako najmenej vhodné riešenie pre náročnejšie MQTT scenáre.

2.1 Anomálne správanie vybraných sprostredkovateľov

Pri analýze výsledkov boli identifikované dve skupiny anomálií, ktoré si vyžadujú opatrnú interpretáciu. Prvou skupinou sú extrémne hodnoty p99 RTT pri Mosquitto v scenároch S1, S2 a S4 pre QoS 1 a QoS 2. Prípustnosť na strane vydavateľa v týchto scenároch pritom ostala blízko očakávaných hodnôt. Takéto správanie naznačuje, že problém sa prejavil predovšetkým v zhoršení latencie v krajných prípadoch, teda v oneskorení potvrdení alebo spracovaní malej časti správ, nie v celkovej schopnosti odosielať tok správ.

Druhú skupinu predstavuje RabbitMQ s MQTT pluginom, ktorý pri časti scenárov QoS 2 klesol na nulovú alebo takmer nulovú príjmu na strane vydavateľa. Tento výsledok je konzistentný s tým, že RabbitMQ v prvom rade nie je natívny MQTT

sprostredkovateľ, ale všeobecný sprostredkovateľ rozšírený o MQTT vrstvu [7]. V porovnaní so sprostredkovateľmi navrhnutými primárne pre MQTT je preto rozumné očakávať vyššiu réžiu najmä pri náročnejších scenároch QoS.

Tieto pozorovania sú pre interpretáciu dôležité. Ak by sa hodnotila iba priepustnosť na strane vydavateľa, Mosquitto by v mnohých scenároch vyzeral ako dominantné riešenie. Po započítaní metrik na strane odoberateľa a p99 latencie je však zrejmé, že kvalitnejšie vyhodnotenie musí vždy kombinovať viac metrik naraz. Práve preto bol v tejto práci použitý viacrozmerný pohľad na hodnotenie výkonu.

Záver

Cieľom práce bolo porovnať štyroch sprostredkovateľov MQTT v lokálnom virtualizovanom nasadení s dôrazom na priepustnosť, latenciu a stabilitu. Na základe vykonaných meraní možno konštatovať, že EMQX predstavoval najvyrovnanějšíe riešenie a dosahoval najlepšie výsledky najmä na strane odoberateľa a v scenári hromadného opätovného pripájania klientov. Mosquitto bol silný pri jednoduchej záťaži na strane vydavateľa, ale pri vyššej kvalite doručenia sa prejavili významné problémy s latenciou. HiveMQ CE poskytol použiteľné stredné výsledky a RabbitMQ vykazoval v niektorých kritických scenároch najnižší výkon.

V ďalšej práci by bolo vhodné rozšíriť experiment o TLS šifrovanie, meranie využitia procesora a operačnej pamäte, a pridať dlhodobé testy.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore z grantu KEGA 011UCM-4/2024 Výučba a tréning bezpečnosti IoT s využitím moderných technológií.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] OASIS STANDARD, (2014). *MQTT Version 3.1.1*. Dostupné na: <https://docs.oasis-open.org/mqtt/mqtt/v3.1.1/os/mqtt-v3.1.1-os.html> [prístup 2026-02-19].
- [2] LAAROUSSI, Z. a NOVO, O., (2021). *A performance analysis of the security communication in CoAP and MQTT*. In: IEEE 18th Annual Consumer Communications & Networking Conference. Piscataway: IEEE, s. neuvedené. DOI: 10.1109/CCNC49032.2021.9369565.
- [3] BHOWMIK, R. a RIAZ, M. H., (2023). *An extended review of the application layer messaging protocol of the internet of things*. Bulletin of Electrical Engineering and Informatics, roč. 12, č. 5. ISSN 2302-9285. DOI: 10.11591/eei.v12i5.5236.
- [4] ECLIPSE FOUNDATION, (2026). *Eclipse Mosquitto*. Softvér. Dostupné na: <https://mosquitto.org/> [prístup 2026-02-19].

- [5] EMQ TECHNOLOGIES CO., LTD., (2026). *EMQX*. Softvér. Dostupné na: <https://github.com/emqx/emqx> [prístup 2026-02-20].
- [6] HIVEMQ GMBH, (2026). *HiveMQ Community Edition*. Softvér. Dostupné na: <https://github.com/hivemq/hivemq-community-edition> [prístup 2026-02-20].
- [7] BROADCOM, (2026). *RabbitMQ MQTT Plugin*. Softvér. Dostupné na: <https://www.rabbitmq.com/docs/mqtt> [prístup 2026-02-20].
- [8] MISHRA, B.; MISHRA, B. a KERTESZ, A., (2021). *Stress-Testing MQTT Brokers: A Comparative Analysis of Performance Measurements*. Energies, roč. 14, č. 18, s. 5817. ISSN 1996-1073. DOI: 10.3390/en14185817.
- [9] PAZOS-REVILLA, M.; CARREIRA, J. a SIMÃO, P., (2023). *Performance Evaluation of Open-Source MQTT Brokers in Edge and Cloud Scenarios*. Future Internet, roč. 15, č. 5, s. 167. ISSN 1999-5903. DOI: 10.3390/fi15050167.
- [10] PAZOS, F. A., (2023). *Performance Evaluation of MQTT Broker Servers Deployed in the Cloud*. JAIIO – Jornadas Argentinas de Informática, roč. 9, č. 3. Dostupné na: <https://revistas.unlp.edu.ar/JAIIO/article/view/18223> [prístup 2026-02-20].
- [11] KRUPYCH, A. a ELSTS, E., (2025). *MQTT Latency Evaluation in Cloud-Based Spectrometer Control*. ACPS, roč. 10, č. 2, s. 151–157. DOI: 10.23939/acps2025.02.151.
- [12] SILVA, D. M. A.; CARVALHO, L. I.; SOARES, J. a SOFIA, R. C., (2021). *A Performance Analysis of Internet of Things Networking Protocols: Evaluating MQTT, CoAP, OPC UA*. Applied Sciences, roč. 11, č. 11, s. 4879. ISSN 2076-3417. DOI: 10.3390/app11114879.

Hodnotenie zložitosti zdrojového textu pomocou veľkých jazykových modelov

Evaluating Source Text Complexity Using Large Language Models

Martin Chotár¹ - Matúš Kleštinec² - Dáša Munková³

^{1,2,3}Katedra informatiky, FPVaI UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹martin.chotar@ukf.sk, ²matus.klestinec@ukf.sk, ³dmunkova@ukf.sk

Abstrakt

Rozsiahle jazykové modely (LLM) sa čoraz častejšie využívajú ako automatizovaní hodnotitelia v rámci spracovania prirodzeného jazyka. Táto štúdia skúma schopnosť 23 rôznych konfigurácií LLM predikovať lingvistickú komplexnosť anglických zdrojových textov určených na preklad do slovenčiny. Porovnávame výkonnosť štandardných autoregresívnych modelov s modelmi využívajúcimi uvažovanie v čase inferencie („thinking“). Pomocou štandardizovaného promptu a 5-bodovej škály komplexnosti sme vykonali analýzu rozptylu a následný Tukeyho HSD test. Výsledky odhalili štatisticky významný trend: v rámci špecifických rodín modelov (napr. Grok, DeepSeek, Qwen) hodnotia „uvažujúce“ modely komplexnosť zdrojového textu systematicky nižšie a preukazujú vyššiu vzájomnú konzistenciu (menší rozptyl) ako ich štandardné protažsky. Zistenia naznačujú, že vnútorná dekompozícia problému prostredníctvom reťazca myšlienok robí zložitú syntaktickú štruktúru pre modely ľahšie spracovateľnými.

Kľúčové slová: rozsiahle jazykové modely, komplexnosť textu, uvažujúce modely, Tukey HSD, automatické hodnotenie

Abstract

Large Language Models (LLMs) are increasingly utilized as automated evaluators for Natural Language Processing tasks. This study investigates

the capability of 23 different LLM configurations to predict the linguistic complexity of English source texts. We specifically contrast the performance of standard autoregressive models ("non-thinking") with inference-time reasoning models ("thinking"). Using a standardized evaluation prompt and a 5-point complexity scale, we performed an Analysis of Variance followed by a Tukey HSD post-hoc test. Our findings reveal a statistically significant trend: within specific model families (e.g., Grok, DeepSeek, Qwen), "thinking" models consistently rate source text complexity lower and demonstrate higher consistency (lower variance) than their "non-thinking" counterparts. We hypothesize that the chain-of-thought decomposition inherent in reasoning models makes complex syntactic structures appear more tractable.

Key words: large language models, text complexity, reasoning models, Tukey HSD, automated evaluation

Úvod

V poslednom období rýchly vývoj technológií založených na hlbokom učení a veľkých jazykových modeloch (LLMs) ako napríklad Bert alebo GPT dosiahli pozoruhodné výsledky v úlohách spracovania prirodzeného jazyka. Jednou z týchto úloh je aj strojový preklad, ktorý zaznamenáva značný pokrok v kvalite prekladu. Napriek tomuto pokroku v procese a

kvalite produktu strojového prekladu, strojový preklad stále čelí mnohým nevyriešeným otázkam. Dokonca, výkonnosť a aplikovateľnosť LLM modelov podnietili výskum v oblasti moderného spracovania prirodzeného jazyka [1]. Jednou z týchto oblastí výskumu je aj hodnotenie zložitosti východiskových, resp. zdrojových textov, ktoré vstupujú do systémov strojového prekladu alebo do LLM modelov za účelom automatického prekladu do cieľového jazyka. Nedávne štúdie ukázali [2, 3, 4], že v niektorých úlohách, ktoré boli donedávna výlučne realizované človekom, LLM modely dokážu vhodným promptom napodobniť ľudské manuálne hodnotenie. Tieto výsledky podnietili hľadať nové, generatívne prístupy k hodnoteniu pomocou LLM ako hodnotiteľa [5]. Historicky sa tieto prístupy spoliehali predovšetkým na prácu ľudských hodnotiteľov (expertov), čo so sebou prinášalo značné limitácie nielen z pohľadu časovej, finančnej a manuálnej náročnosti, ale hlavne z vysokej miery subjektivity a nereplikovateľnosti procesu hodnotenia. S bezprecedentným nástupom pokročilých LLM modelov sa do popredia akademického i komerčného záujmu dostáva prístup známy ako „LLM-as-a-Judge“ (LLM ako posudzovateľ). Tento prístup poskytuje škálovateľnú, exaktne replikovateľnú a nákladovo efektívnu alternatívu pre vyhodnocovanie komplexných sémantických a lingvistických štruktúr, pričom pri viacerých klasifikačných a hodnotiacich úlohách dosahuje porovnateľnú zhodu, ba niekedy aj prevyšuje ľudskú paritu [6].

Tieto zistenia nás motivovali skúmať a porovnať ľudské manuálne hodnotenie zložitosti anglických textov na preklad do slovenčiny s automatickým hodnotením pomocou rôznych LLM modelov rôznej generácie.

1 Teoretické východiská

Súčasný vývoj však rozdelil ekosystém veľkých jazykových modelov na dve hlavné, fundamentálne odlišné skupiny. Prvou skupinou sú štandardné modely generujúce text autoregresívne bez prestávky (tzv. „non-thinking“ modely). Tieto systémy fungujú primárne na princípe masívneho učenia sa bez dozoru (unsupervised multitask learning), kedy okamžite a s

minimálnou latenciou predikujú nasledujúci token na základe naučených štatistických vzorcov [7]. Ich doménou je rýchlosť (tzv. System 1 thinking, koncept pôvodne zavedený Kahnemanom [8]), no pri komplexných analytických úlohách môžu zlyhávať kvôli absencii hlbšej kontextovej analýzy a schopnosti dlhodobého plánovania, čo zodpovedá absencii tzv. System 2 thinking [9, 10].

Druhú, podstatne novšiu a modernejšiu skupinu, tvoria uvažujúce („thinking“ alebo reasoning) modely. Architektúra týchto modelov bola inovatívne upravená tak, aby cielene využívali dodatočný výpočtový čas priamo počas inferencie (test-time compute). V praxi to znamená, že pred vygenerovaním finálnej odpovede model najprv vytvorí latentný, používateľovi často skrytý, reťazec myšlienok (chain-of-thought). Počas tejto fázy si model problém štruktúrne rozloží, otestuje viaceré hypotézy, aplikuje vnútornú sebareflexiu a iteratívne overuje svoje medzikroky [11]. Aj keď uvažujúce modely v súčasnosti preukázateľne excelujú v tvrdej logickej dedukcii, programovaní a matematike, ich kognitívne správanie pri posudzovaní čistých, subjektívnych lingvistických úloh zostáva v odbornej literatúre hlbšie nepreskúmané [12]. Z tohto dôvodu sa zameriavame na rôzne typy architektúr a skúmame ako oni vnímajú syntaktickú a lexikálnu náročnosť vstupného textu. Cieľom našej štúdie je nájsť odpovede na nasledovné výskumné otázky:

RQ1: Vykazujú uvažujúce (T) a štandardné (NT) LLM modely systematické a štatisticky významné rozdiely pri hodnotení zložitosti anglických zdrojových textov na preklad do slovenčiny?

RQ2: Ako sa zhlukujú (klastujú) jednotlivé moderné LLM architektúry z hľadiska ich zhody hodnotenia?

Taktiež je nevyhnutné poukázať na rastúci problém netransparentnosti v oblasti umelej inteligencie. Ako jednoznačne dokazuje Foundation Model Transparency Index 2025 vydaný Stanfordovou univerzitou, vývojári hraničných modelov sú čoraz viac netransparentní v otázkach povahy a objemu svojich tréningových dát [13]. Napriek tomuto utajovaniu je vo vedeckej obci preukázané, že absolútna väčšina týchto systémov je tréňovaná na masívnom web scrapingu, predovšetkým na datasetoch ako Common Crawl [14]. Toto extenzívne získavanie materiálov v súčasnosti

naráža na hardvérové limity a zároveň čelí bezprecedentným regulačným zásahom a žalobám pre porušovanie autorských práv [15].

Z lingvistického hľadiska má táto dominancia anglického "crawlu"(ktorý tvorí jadro internetu) zásadný dopad: modely dokážu s extrémnou presnosťou analyzovať anglickú syntax, idiomatičnosť a zložitost'. Zaujímavým fenoménom je, že hoci sú datasety anglo-centricke, modely dokážu prenášať tieto analytické poznatky na iné jazyky pomocou "zero-shot cross-lingual"transféru a implicitného učenia [16]. A to dokonca aj vtedy, keď mnohé svetové jazyky s miliónmi hovorcov zostávajú v tréningovom datasete paradoxne úplne neviditeľné a marginalizované [17].

2 Metodológia

V rámci nášho empirického výskumu sme využili celkovo 23 odlišných konfigurácií LLM od popredných svetových vývojárov, ktoré v experimente vystupovali v úlohe nezávislých profesionálnych posudzovateľov. Každý model dostal za úlohu analyzovať anglický zdrojový text pomocou exaktne definovanej a nemeňiacej sa inštrukcie: „You are a professional evaluator of Slovak translations. Evaluate the following translation from English to Slovak in four dimensions... 4. Complexity — how difficult the source text is to translate (Complexity features reflect how difficult it is to translate the source text). Choose one of: [very simple, simple, moderate, complex, very complex].“

Rovnakú úlohu s rovnakou inštrukciou sme sa zadali siedmym náhodne vybraným profesionálnym prekladateľom v jazykovom páre angličtina-slovenčina, kde na škále od 1 - veľmi jednoduché na preklad až do 5 - veľmi zložitá na preklad hodnotili zložitost' anglického zdrojového textu.

2.1 Dataset

Analýzovaný dataset predstavuje anglicky písaný publicistický text s výrazným literárnym a biografickým charakterom. Ide o plynulý rozhovor, v ktorom írsky básnik Seamus Heaney reflektuje svoje rurálne detstvo a jeho vplyv na vlastnú tvorbu, čím text prirodzene osciluje medzi konkrétnymi, senzo-

rickými opismi fyzického sveta a abstraktnými úvahami. Z hľadiska korpusovej štatistiky text obsahuje celkovo 2 124 tokenov, čo predstavuje 1 825 alfanumerických slov. Lexikálna bohatost' je zastúpená 645 unikátnymi slovami a vysokým podielom (526) viacvýznamových slov, identifikovaných prostredníctvom databázy WordNet. Syntaktická štruktúra je rozložená do 101 viet, pričom dynamika textu je takmer rovnomerne vyvážená medzi krátko vetami do 15 slov (53) a dlhšie výpovede (48). Zložitost' tohto publicisticko-literárneho štýlu indikuje aj dominancia súvetí (73) nad jednoduchými vetami (28).

2.2 Skúmané architektúry

Výber 23 skúmaných modelov je podmienený snahou o komplexné pokrytie súčasného stavu v oblasti veľkých jazykových modelov. Vzorka bola zámerné zostavená tak, aby umožňovala priamu komparáciu otvorených a uzavretých architektúr rôznych veľkostí. Kľúčovým kritériom výberu bolo zaradenie párových modelov s dedikovaným „thinking“ (uvažujúcim) režimom a bez neho (NT – non-thinking / NR – non-reasoning), čo zaisťuje možnosť exaktne merať vplyv skrytého uvažovacieho reťazca na posudzovanie subjektívnych lingvistických úloh.

Prehľad testovaných modelov:

- **Rodina OpenAI (architektúra GPT):** GPT-5, GPT-5.1, GPT-5.2
- **Rodina Anthropic (architektúra Claude):** Claude Haiku 4.5, Claude Sonnet 4.5, Claude Opus 4.1, Claude Opus 4.5
- **Rodina Google (architektúra Gemini):** Gemini 2.5 Flash Lite, Gemini 2.5 Flash, Gemini 2.5 Pro, Gemini 3
- **Rodina DeepSeek:** DeepSeek V3.2-nonThinking, DeepSeek V3.2-ExpThinking
- **Rodina Qwen (Alibaba):** Qwen Turbo NT, Qwen Plus NT, Qwen Plus T, Qwen 3 Max NT
- **Rodina Mistral:** Mistral Small 2506, Mistral Medium 2508, Mistral Large 2512

- **Rodina xAI (architektúra Grok):** Grok 4.1 Fast NR, Grok 4.1 Fast R
- **Rodina Moonshot AI:** Kimi K2 Turbo Preview

3 Výsledky a diskusia

Stredná miera zhody pri ľudskom hodnotení (Kendallov koeficient zhody = 0,2272) nám potvrdila nekonzistenciu medzi ľudskými anotátormi a podnietila skúmať vzájomnú mieru zhody medzi LLM modelmi, tak aj medzi generatívnymi prístupmi a ľudskými hodnotiteľmi.

Výsledky Mauchlyho testu sféricity ($W = 0,000000$, $\chi^2 = 1965,132$, $df = 405$, $p = 0,0001$) poukázali na porušenie predpokladu sféricity ($p < 0,001$), preto sme použili upravené testy pre opakované merania.

Na základe výsledkov testu pre opakované merania (G-G epsilon = 0,165721, G-G upravené $df_1 = 4,640188$, G-G upravené $df_2 = 459,3786$, G-G upravené $p = 0,0001$) sme zamietli nulovú hypotézu, ktorá tvrdí že skóre hodnotenia zložitosti textu je nezávislé od hodnotiteľa (ľudský hodnotiteľ alebo LLM) ($p < 0,001$). Tento výsledok naznačuje, že existujú štatisticky významné rozdiely medzi hodnotiteľmi.

Na identifikáciu štatisticky významných rozdielov medzi modelmi bola aplikovaná jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), konkrétne sme použili na identifikáciu konkrétnych rozdielov medzi hodnotiteľmi Tukeyho HSD test pre viacnásobné porovnanie.

Na základe výsledkov viacnásobného porovnania sme identifikovali 11 homogénnych skupín ($p < 0,05$). Pre potreby našej analýzy sme evaluované systémy rigorózne kategorizovali na Neuvažujúce (NT - Non-Thinking alebo NR - Non Reasoning na grafe červenou) a Uvažujúce (T - Thinking alebo R - Reasoning na grafe zelenou).

Výsledky Tukeyho HSD testu odhalili pomerne veľký a štatisticky signifikantný rozptyl v tom, ako rôzne druhy a rodiny LLM vnímajú celkovú zložitost' rovnakých testovacích viet. Priemerné hodnoty (Mean) skóre zložitosti sa pohybovali od najnižšej

hodnoty 1,92 pri modeli Gemini 2.5 Flash Lite, až po najvyššiu hodnotu 2,75 pri modeli Qwen 3 Max NT. Z výsledkov testu viacnásobného porovnania sme z 23 modelov získali celkovo 11 rozlíšiteľných (prekrývajúcich sa) homogénnych skupín. Tento vysoký počet skupín indikuje, že vnímanie zložitosti textu na preklad nepredstavuje prudkú, binárnu zmenu, ale skôr plynulé a jemne odstupňované kontinuum.

3.1 Celková distribúcia a zhlukovanie (RQ2)

Pri analýze odpovede na druhú výskumnú otázku sme sa zamerali na celkový rozptyl udelených priemerných hodnôt. Zistili sme pozoruhodný paradox. Ľahšie, menšie a vysoko optimalizované modely (ako Gemini 2.5 Flash Lite, Qwen Turbo NT, GPT-5.1) sa zhlukovali v najnižších skupinách (skupiny 1 až 4 s priemermi 1,92 až 2,39). Tieto modely vo všeobecnosti hodnotia akýkoľvek text ako "jednoduchší". Domnievame sa, že je to spôsobené ich obmedzenou sémantickou hĺbkou – nedokážu plne detegovať lexikálne pasce, vzácne idiómy alebo skrytú polysemiu, a preto im text pripadá rutinný.

Naopak, najväčšie hraničné (frontier) modely s obrovskou neurónovou sieťou, akými sú Claude Opus (4.5 a 4.1), GPT-5 varianty a Qwen 3 Max (priemery 2,53 až 2,75), sa koncentrujú v najvyšších hodnotiacich skupinách (skupiny 8 až 11). Ich zvýšená citlivosť a obrovský natrénovaný korpus im umožňujú vidieť všetky záludnosti a gramatické komplikácie, preto hodnotia zdrojový text ako objektívne ťažší na preklad.

Pri pohľade na rozptyl v rámci dvoch hlavných kategórií sa ukázalo, že reasoning (T/R) modely vykazujú výrazne vyššiu vzájomnú konzistenciu. Ich priemerné hodnoty sa pohybujú v tesnom pásme od 2,12 (Gemini 2.5 Flash) po 2,71 (Claude Opus 4.1), čo predstavuje rozptyl len 0,59. Naopak, neuvažujúce (NT) modely pokrývajú omnoho širšie a chaotickejšie spektrum od 1,92 až po 2,75 s rozptylom 0,83. Tento rozdiel naznačuje, že zapojenie "thinking" fázy stabilizuje a zjednocuje metriku hodnotenia naprieč inak diametrálne odlišnými architektúrami od konkurenčných vývojárov.

Obr. 1: Výsledky Tukeyho HSD testu pre hodnotenie zložitosti anglického zdrojového textu na preklad hodnotiteľmi, Poznámka: **** - $p > 0,05$

Tukey HSD test												
C	Priemer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
complexity_Gemini2.5flash_lite	1.92	****	****									
complexity_GwenTurboNT	2.10		****	****								
complexity_Gemini2.5flash	2.12		****	****	****							
complexity_GPT5.1	2.21		****	****	****	****						
complexity_Grok4.1FastR	2.32			****	****	****	****	****				
complexity_MistralMedium250B	2.39			****	****	****	****	****	****			
complexity_KimiK2TurboPreview	2.40				****	****	****	****	****	****		
complexity_Gemini2.5pro	2.48					****	****	****	****	****	****	
complexity_Grok4.1FastNR	2.48					****	****	****	****	****	****	****
complexity_Gemini3	2.49					****	****	****	****	****	****	****
complexity_CluadeSonnet4.5	2.49					****	****	****	****	****	****	****
complexity_MistralLarge2512	2.50					****	****	****	****	****	****	****
complexity_GPT5.2	2.51					****	****	****	****	****	****	****
complexity_CluadeHaiku4.5	2.53					****	****	****	****	****	****	****
complexity_GwenPlus1	2.59							****	****	****	****	****
complexity_DeepSeekV3.2-ExpThinking	2.59							****	****	****	****	****
complexity_CluadeOpus4.5	2.60							****	****	****	****	****
complexity_GPT5	2.67							****	****	****	****	****
complexity_GwenPlusNT	2.69									****	****	****
complexity_CluadeOpus4.1	2.71										****	****
complexity_DeepSeekV3.2-nonThinking	2.72											****
complexity_MistralSmall250B	2.74											****
complexity_Gwen3MaxNT	2.75											****

3.2 Efekt uvažovania na vnímanie zložitosti (RQ1)

Najzásadnejším a z hľadiska výpočtovej lingvistiky najhodnotnejším objavom nášho merania je však prísne empirické A/B porovnanie T a NT variantov v rámci jedného a toho istého modelu. Tento postup nám poskytol dokonalé, sterilné prostredie na testovanie hypotéz, keďže váhy neurónovej siete, parametre aj tréningové dáta sú pri oboch variantoch absolútne identické; jedinou izolovanou premennou bolo zapnutie alebo vypnutie uvažovacieho módu v čase inferencie.

Dáta nekompromisne a opakovane preukazujú, že nasadenie uvažujúceho módu spôsobuje signifikantne zhoršenie posudzovania textu:

Pri rodine Grok 4.1 Fast vyhodnotil uvažujúci variant (R) text s priemerným skóre len 2,32, zatiaľ čo jeho identický ne-uvažujúci náprotivok (NR) ho vyhodnotil omnoho prísnejšie (2,48). Rovnaký jav nastal pri DeepSeek: verzia V3.2-ExpThinking ohodnotila zložitost' textu na 2,59, kým verzia V3.2-nonThinking udelila vyššie skóre 2,72. Podobne model Qwen Plus v T režime dosiahol zmiernené skóre 2,59 v priamom porovnaní s hodnotou 2,69 vo verzii

NT.

Tento preukázaný fenomén vysvetľujeme odlišným procesom kognitívneho generovania výstupu vo vnútri LLM. Kým štandardné NT systémy musia celú komplexnú sémantiku textu a jeho prekladovú náročnosť „vyriešiť“ v jednom neprerušenom a plynulom priechode sietí (forward pass), pre uvažujúce modely je alokovaný dodatočný procesný čas. Thinking model si pomocou skrytých tokenov vetu štruktúrne analyzuje. Rozloží ju na vetné členy, identifikuje problematické idiomatické spojenia, priradí im význam a až po jej úplnom dešifrovaní pristúpi k vydaniu záverečného hodnotenia. Tým, že model zložitost' textu vlastne už spracoval a "rozlúskol" v skrytých iteratívnych krokoch, samotná prekladová úloha sa mu vo finále javí ako menej komplikovaná. Kognitívna bariéra padla počas uvažovania, čo priamo vedie k udeleniu nižšieho skóre celkovej komplexnosti.

Záver

Predkladaný výskum priniesol priame, štatisticky podložené empirické dôkazy o tom, že alokácia dodatočného výpočtového času (test-time compute) počas

inferencie fundamentálne mení spôsob, akým umelá inteligencia vnútorne posudzuje náročnosť textu. Absolútnym potvrdením tohto javu bolo izolované A/B testovanie totožných modelov (Grok 4.1 Fast, DeepSeek V3.2, Qwen Plus). Keďže parametre modelov zostali statické a zmenil sa výlučne procesný postup, výsledky jasne dokazujú, že dekompozícia textu prostredníctvom skrytého reťazca myšlienok funguje ako efektívny kognitívny zjednodušovač. Tento mechanizmus systematicky znižuje prisudzovanú zložitosť zdrojových viet.

Okrem iného, uvažujúce modely preukázali celkovo významne vyššiu konzistenciu hodnotení s medzimodelovým rozptylom iba 0,59 v porovnaní s rozptylom 0,83 u bežných autoregresívnych modelov. Tieto zistenia sú kritické pre budúcnosť dizajnovania NLP systémov využívajúcich metódu LLM-as-a-judge. Dôrazne upozorňujú výskumníkov a inžinierov na fakt, že samotný výber inferenčnej metódy (Thinking vs. Non-thinking) má priamy a merateľný vplyv nielen na samotnú kvalitu, ale predovšetkým na prísnosť a rozptyl automatizovaného jazykového hodnotenia.

Podakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-23-0554.

Literatúra

- [1] HUANG, Yan a LIU, Wei, (2024). Evaluating the Translation Performance of Large Language Models Based on Euas-20. arXiv preprint, arXiv:2408.03119.
- [2] ZHENG, Lianmin et al., (2023). Judging LLM-as-a-judge with MT-Bench and Chatbot Arena. arXiv preprint, arXiv:2306.05685.
- [3] LIU, Yang et al., (2023). GPTEval: NLG evaluation using GPT-4 with better human alignment. arXiv preprint, arXiv:2303.16634.
- [4] LI, Xuechen et al., (2023). AlpacaEval: An automatic evaluator of instruction following models.
- [5] ZHENG, Lianmin et al., (2023). Judging LLM-as-a-judge with MT Bench and Chatbot Arena. arXiv preprint, arXiv:2306.05685.
- [6] GU, Jiawei a kol., (2024). A Survey on LLM-as-a-Judge. arXiv preprint, arXiv:2411.15594.
- [7] RADFORD, Alec a kol., (2019). Language Models are Unsupervised Multitask Learners. OpenAI blog, roč. 1, č. 8, s. 9.
- [8] KAHNEMAN, D., (2011). Thinking, fast and slow. New York: Farrar, Straus and Giroux, 499 s. ISBN 978-0-374-27563-1.
- [9] YAO, S. et al., (2023). Tree of thoughts: Deliberate problem solving with large language models. Advances in Neural Information Processing Systems, vol. 36, pp. 11809-11822.
- [10] LI, Z. Z. et al., (2025). From System 1 to System 2: A Survey of Reasoning Large Language Models. arXiv preprint, arXiv:2502.17419.
- [11] SNELL, Charlie; LEE, Jaehoon; XU, Kelvin a KUMAR, Aviral, (2025). Scaling Test-Time Compute Optimally Can be More Effective than Scaling LLM Parameters. In: International Conference on Learning Representations.
- [12] WANG, Xiaolong et al., (2024). Reasoning in Conversation: Solving Subjective Tasks through Dialogue Simulation for Large Language Models. In: Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics. Stroudsburg: Association for Computational Linguistics, pp. 844-859.
- [13] WAN, Alexander a kol., (2025). The 2025 Foundation Model Transparency Index. arXiv preprint, arXiv:2512.10169.
- [14] VILLALOBOS, Pablo a kol., (2022). Will we run out of data? An analysis of the projected dataset size in machine learning. arXiv preprint, arXiv:2211.04325.
- [15] US COPYRIGHT OFFICE, (2024). Copyright and Artificial Intelligence: Part 3 - Generative AI Training. Report Pre-Publication Version.

- [16] CHIRKOVA, Nadezhda a NIKOULINA, Vassilina, (2024). Zero-shot cross-lingual transfer in instruction tuning of large language models. arXiv preprint, arXiv:2402.14778.
- [17] KHANNA, Saurabh a LI, Xinxu, (2025). Invisible Languages of the LLM Universe. arXiv preprint, arXiv:2510.11557.

Fyzicko-geografické determinanty lokalizácie historických vodných nádrží – klauz na Slovensku (Západné Karpaty): priestorová analýza pomocou GIS

Physical-geographical determinants of the location of historical water reservoirs – splash dams in Slovakia (the Western Carpathians): spatial analysis using GIS

Jakub Cimbala¹ – Pavel Hronček²

¹Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

²Katedra geografie a geológie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ jakub.cimbala@ukf.sk, ² pavel.hroncek@umb.sk

Abstrakt

Klauzy predstavujú historické vodné nádrže budované na účely splavovania dreva v horských oblastiach. Ich výstavba bola podmienená nielen hospodárskymi potrebami, ale aj prírodným charakterom prostredia. Štúdiá sa zameriava na analýzu fyzicko-geografických faktorov podmieňujúcich lokalizáciu historických klauz v prostredí Západných Karpát. Výskum vychádza zo skúmania 32 objektov, pri ktorých boli analyzované nadmorská výška, morfológicko-morfometrické typy reliéfu, geologické podložie a veľkosť akumulčných oblastí nad klauzou.

Výsledky dokumentovali koncentráciu klauz v stredných horských polohách (medián 825 m n. m.) a dominanciu vyšších hornatín a vrchovín v prostredí stredne strmých svahov s mediánovou hodnotou 17,82°. Geologické podložie je zastúpené prevažne sedimentárnymi horninami (43,75 %) a magmatitmi (40,63 %), bez výraznej litologickej preferencie. Hydrologická analýza poukázala na viazanosť väčšiny objektov na malé až stredne veľké horské povodia (medián ~8,29 km²), pričom rozdelenie vykazuje pravostrannú asymetriu spôsobenú ojedinelými rozsiahlejšími catchmentmi.

Komplexná syntéza potvrdzuje, že lokalizácia klauz bola determinovaná najmä kombináciou morfometrickej energie reliéfu, nadmorskej výšky a hydrologického režimu horských tokov. Štúdiá poukazuje na environmentálnu podmienenosť historického systému splavovania dreva a jeho adaptáciu na špecifické podmienky horskej krajiny.

Kľúčové slová: klauza, historické vodné nádrže, priestorová analýza, Západné Karpaty

Abstract

Splash dams are historical water reservoirs built for the purpose of floating timber in mountainous areas. Their construction was conditioned not only by economic needs, but also by the natural character of the environment. The study focuses on the analysis of

physical-geographical factors conditioning the location of historical splash dams in the Western Carpathians. The research is based on the examination of 32 objects, for which the altitude, morphological and morphometric types of relief, geological substrate, and size of the accumulation areas above the dam were analyzed.

The results documented a concentration of splash dams in medium mountain locations (median 825 m above sea level) and the dominance of higher mountains and highlands in the environment of moderately steep slopes with a median value of 17.82°. The geological substrate is represented mainly by sedimentary rocks (43.75%) and magmatic rocks (40.63%), without any significant lithological preference. Hydrological analysis showed that most objects are linked to small to medium-sized mountain catchments (median ~8.29 km²), with the distribution showing right-sided asymmetry caused by isolated larger catchments.

A comprehensive synthesis confirms that the location of the splash dams was determined mainly by a combination of the morphometric energy of the relief, altitude, and hydrological regime of mountain streams. The study points to the environmental conditioning of the historical system of timber floating and its adaptation to the specific conditions of the mountain landscape.

Key Words: splash dam, historical water reservoirs, spatial analysis, the Western Carpathians

Úvod

Klauzy predstavujú špecifický typ historických vodných nádrží budovaných v horských oblastiach na účely splavovania dreva. Ich funkcia spočívala v akumulácii vody a jej následnom riadenom vypúšťaní, ktoré umožňovalo transport drevnej hmoty po vodných tokoch [1, 2]. Tento spôsob dopravy bol v minulosti významnou súčasťou lesného hospodárstva v karpatskom priestore.

Doterajší výskum sa zameriaval najmä na identifikáciu klauz v teréne, ich kartografickú lokalizáciu, popis historického vývoja a na modelovanie ich plošných a objemových parametrov [2]. Menej pozornosti bolo venované systematickému hodnoteniu ich vzťahu k prírodným podmienkam prostredia. Otázka, do akej miery boli klauzy lokalizované v závislosti od fyzicko-geografických faktorov, zostáva nedostatočne spracovaná.

Cieľom príspevku je analyzovať priestorové rozmiestnenie historických klauz v Západných Karpatoch a vyhodnotiť ich vzťah k vybraným fyzicko-geografickým faktorom, konkrétne k nadmorskej výške, sklonu reliéfu, geologickému podložiu, veľkosti povodia nad klauzou a príslušnosti ku geomorfologickým jednotkám.

Na základe predpokladu, že lokalizácia klauz bola determinovaná prírodnými limitmi horskej krajiny, boli formulované nasledujúce výskumné hypotézy:

H1: Lokalizácia klauz je podmienená nadmorskou výškou a morfometrickými vlastnosťami reliéfu.

H2: Geologické podložie predstavuje významný faktor ovplyvňujúci výber miesta prehradenia.

H3: Klauzy sú budované na malých horských povodiach s obmedzenou plochou akumuláčnej oblasti.

H4: Lokalizácia klauz je výsledkom synergického pôsobenia reliéfu, geologického podložia a hydrologickej konfigurácie horných častí povodí.

1 Metodika a materiál

Výskum bol koncipovaný ako trojfázový proces pozostávajúci z identifikačnej, analytickej a syntetickej etapy (obr. 1). Metodický postup bol navrhnutý tak, aby umožnil systematické overenie formulovaných hypotéz týkajúcich sa fyzicko-geografických determinantov lokalizácie historických vodných nádrží – klauz v Západných Karpatoch.

Identifikačná etapa

Identifikačná fáza bola zameraná na lokalizáciu a verifikáciu objektov. Klauzy boli identifikované na základe analýzy archívnych máp, historických prameňov a odbornej literatúry, pričom ich poloha bola následne overená terénnym prieskumom. Výsledkom tejto fázy bola tvorba geodatabázy 32 objektov reprezentovaných bodovou vrstvou v prostredí softvéru ArcMap 10.8 (ArcGIS – ESRI) [1, 2].

Analytická etapa

V analytickej etape sme sa sústredili na selekciu a kvantifikáciu vybraných fyzicko-geografických determinantov:

Morfometrické charakteristiky (testovanie H1) - z digitálneho modelu reliéfu (DMR) [3] bola pre každý objekt odvodená nadmorská výška a sklon svahu. Súčasne bolo určené zaradenie do morfologicko-morfometrického typu reliéfu na základe existujúceho geomorfologického členenia. Tieto premenné umožnili

posúdiť, či sa klauzy koncentrujú v určitom výškovom intervale alebo type reliéfu.

Sklon svahu bol vypočítaný pomocou nástroja **Slope** (Spatial Analyst). Pre každú lokalitu bol vytvorený 100 m buffer, ktorý reprezentoval bezprostredné morfológické prostredie hrádze. Následne bola pomocou nástroja **Zonal Statistics as Table** vypočítaná priemerná hodnota sklonu v rámci bufferu. Tento postup eliminuje lokálne extrémne hodnoty a reprezentuje morfometrický kontext lokality.

Distribúcia hodnôt bola stanovená pomocou deskriptívnych štatistík a grafických metód (histogram, box-plot), čo umožnilo identifikovať centrálnu tendenciu a variabilitu súboru.

Geologické podložie (testovanie H2) – geologické podložie bolo určené prekrytím bodovej vrstvy klauz s geologickou mapou. Litologické jednotky boli agregované do troch základných skupín (magmatity, metamorfity, sedimenty). Percentuálne zastúpenie jednotlivých skupín umožnilo vyhodnotiť, či pri stavbe klauzy existuje preferencia určitého typu horninového prostredia.

Hydrologická analýza (testovanie H3) – bola realizovaná pomocou hydrologických nástrojov GIS (Flow Direction, Flow Accumulation, Watershed). Pre každú klauzu bolo delimitované povodie nad profilom prehradenia. Plocha akumuláčnej oblasti bola vypočítaná v km² ako plocha polygonu povodia. Táto premenná reprezentuje potenciál prítoku a akumulácie vody. Hodnoty boli štatisticky analyzované (minimum, maximum, medián, kvartily, smerodajná odchýlka) a graficky znázornené pomocou box-plotu, čo umožnilo identifikovať mieru variability veľkosti povodí [2].

Priestorová analýza bola realizovaná kombináciou rasterových a vektorových operácií v prostredí softvéru ArcMap 10.8 (ArcGIS – ESRI). Hodnoty morfometrických premenných boli extrahované z rasterových vrstiev, litologická a geomorfologická príslušnosť bola určená prekryvom vektorových máp.

Pre každú premennú boli vypočítané základné deskriptívne štatistiky (minimum, maximum, medián, smerodajná odchýlka). V prípade kategorizovaných údajov bolo vyhodnotené percentuálne zastúpenie jednotlivých tried. Vzťah medzi plochou povodia a morfometrickými charakteristikami bol posudzovaný interpretačne, s dôrazom na hydrologickú a geomorfologickú logiku lokalizácie klauz.

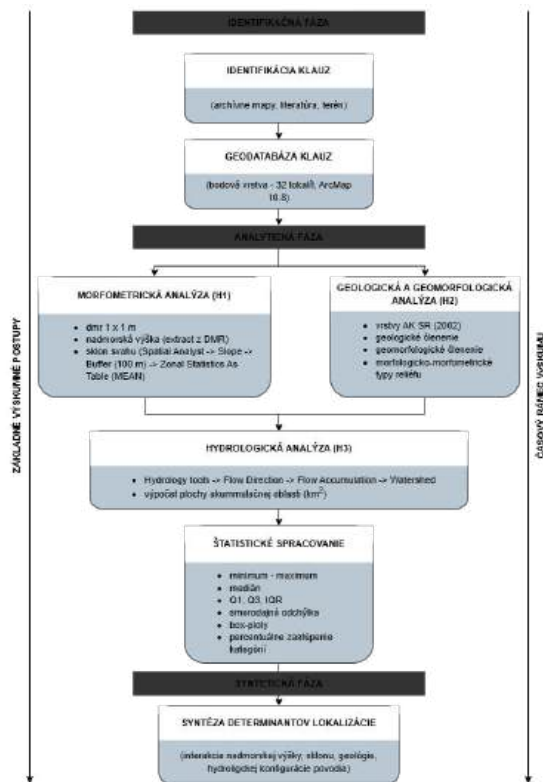
Metodický postup bol zvolený tak, aby umožnil identifikovať dominantné fyzicko-geografické limity, ktoré podmieňovali výstavbu klauz v prostredí horskej krajiny.

Syntetická fáza (testovanie H4)

Syntetická fáza bola zameraná na komplexné vyhodnotenie vzájomných vzťahov medzi analyzovanými premennými. Cieľom bolo overiť

hypotézu H4, podľa ktorej lokalizácia klauz nie je výsledkom pôsobenia jedného faktora, ale kombinácie morfologetických, geologických a hydrologických podmienok. V tejto fáze boli výsledky jednotlivých analýz interpretované vo vzájomných súvislostiach, pričom dôraz bol kladený na identifikáciu dominantných kombinácií faktorov typických pre horné časti horských povodií.

Všetky vrstvy boli transformované do jednotného súradnicového systému a podrobené kontrole topologickej správnosti.



Obrázok 1 Schéma metodického postupu výskumu
Zdroj: [1, 2]

2 Študované územie

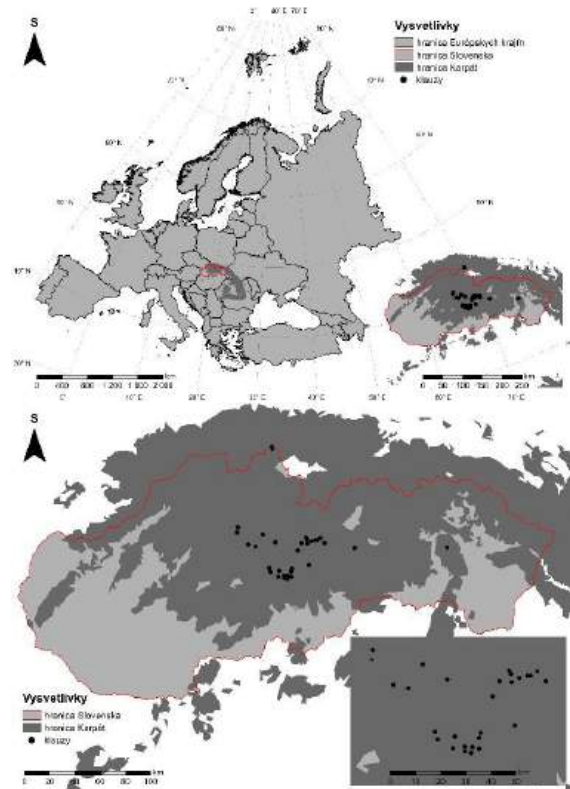
Študované územie zahŕňa priestor Západných Karpát na území Slovenskej republiky, v ktorom bolo identifikovaných 32 historických vodných nádrží – klauz. Územie predstavuje morfologeticky aj geologicky diferencovaný horský systém s výraznou vnútornou členitosťou a výškovou zonálnosťou (mapa 1) [2].

Z hľadiska regionálneho členenia sa analyzované objekty nachádzajú najmä v oblasti Fatransko-tatranskej a Slovenského rudohoria [4], pričom ich výskyt je viazaný predovšetkým na horné časti horských povodií menších tokov. Lokalizácia klauz je priestorovo rozptýlená, no zároveň zreteľne koncentrovaná do lesnatých horských oblastí s historicky intenzívnym lesným hospodárstvom.

Klimaticky ide prevažne o chladné až mierne chladné horské oblasti s vyššími ročnými úhrnmi zrážok, čo vytváralo priaznivé podmienky pre

akumuláciu vody a následné splavovanie dreva [5]. Lesná pokrývka je dominantným prvkom krajiny, pričom historické využívanie drevnej hmoty predstavovalo hlavný impulz pre budovanie klauz.

Z hydrologického hľadiska sú objekty situované v horných častiach povodií, ktoré sú charakteristické malou plochou, výrazným sklonom a rýchlou odtokovou odozvou. Práve táto kombinácia geomorfologických a hydrologických vlastností vytvárala vhodné podmienky pre budovanie prehradzovacích objektov s relatívne jednoduchou konštrukciou.



Mapa 1 Študované klauzy na území Západných Karpát
Zdroj: [1, 2]

3 Výsledky a diskusia

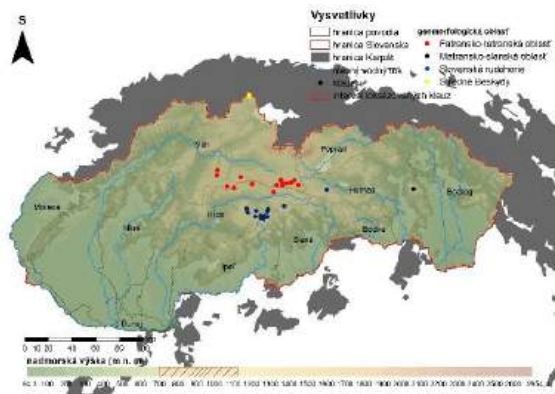
Analýza fyzicko-geografických faktorov lokalizácie klauz je prezentovaná v logickej postupnosti od jednotlivých parciálnych determinantov k ich komplexnej syntéze. Interpretácia je vedená v kontexte formulovaných hypotéz, pričom každá analyzovaná premenná je hodnotená z hľadiska jej potenciálnej determinujúcej úlohy. Diskusia neostáva na úrovni deskriptívneho vyhodnotenia rozdelenia hodnôt, ale smeruje k identifikácii systematických priestorových vzorcov a ich geomorfologickej a hydrologickej interpretácii v prostredí horskej krajiny Západných Karpát.

Takto koncipovaný prístup umožňuje posúdiť do akej miery bolo rozmiestnenie historických vodných nádrží výsledkom cieľavedomej adaptácie na prírodné

podmienky a do akej miery mohlo byť ovplyvnené sekundárnymi faktormi hospodárskeho alebo historického charakteru.

3.1 Nadmorská výška

Analyzované klauzy sa nachádzajú v rozpätí nadmorských výšok 567-1115 m n. m., pričom priemerná nadmorská výška dosahuje 827,31 m n. m. [3]. Mediánová hodnota (835 m n. m.) poukazuje na koncentráciu objektov v stredných horských polohách. Smerodajná odchýlka 148,75 m indikuje relatívne kompaktné vertikálne rozloženie a jednoznačnú viazanosť na stredné horské polohy Západných Karpát. Intervalová analýza ukázala najvyššiu koncentráciu klauz v pásme \approx 698-922 m n. m. (IQR = 223,25 m n. m.) (\approx 28 %), pričom viac než \approx 56 % objektov sa nachádza v intervale 700-1000 m n. m., čo odráža optimálne kombinovanie lesnej pokrývky, dostatočnej vodnatosti horských tokov a priaznivých morfológických podmienok pre akumuláciu vody (mapa 2).

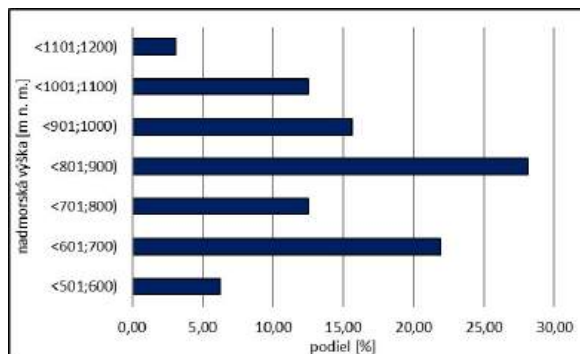


Mapa 2 Hypsometrická mapa Slovenskej republiky na podklade Západných Karpát
Zdroj: [1-4, 6]

Podobná koncentrácia v stredohorských polohách bola zaznamenaná aj pri iných historických vodohospodárskych objektoch v karpatskom priestore, kde kombinácia dostatočného spádu a stabilného prítoku predstavovala optimálne podmienky pre akumuláciu vody.

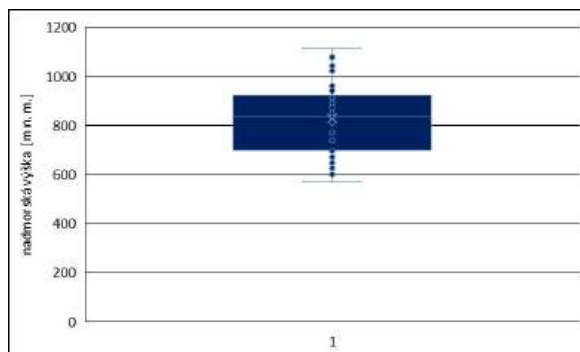
Relatívne nízky podiel objektov lokalizovaných pod 600 m n. m. naznačuje, že v nižších polohách už dochádzalo k transformácii krajiny intenzívnejším osídlením a poľnohospodárskym využitím, čo znižovalo potrebu budovania nádrží na splavovanie dreva. Naopak, ojedinelý výskyt klauz nad 1100 m n. m. poukazuje na horný limit hospodárskeho využívania lesov v extrémnejších vysokohorských podmienkach. Blížkosť priemeru a mediánu potvrdzuje, že distribúcia nie je výrazne skreslená extrémnymi hodnotami a predstavuje stabilný vertikálny vzorec lokalizácie klauz (graf 1). Výsledky teda podporujú hypotézu o environmentálne

determinovanom výskute týchto historických vodných nádrží v stredných nadmorských výškach horských oblastí.



Graf 1 Relatívna početnosť nadmorských výšok
Zdroj: [3]

Boxplot nadmorskej výšky potvrdzuje relatívne symetrické rozdelenie hodnôt bez výrazných extrémov. Mediánová hodnota 835 m n. m. sa nachádza približne v strede interkvartilového rozpätia (\approx 705-958 m n. m.), čo indikuje stabilnú vertikálnu koncentráciu klauz v stredných horských polohách. Absencia výrazných odľahlých hodnôt naznačuje, že výšková lokalizácia klauz bola systematicky viazaná na konkrétny výškový interval, ktorý pravdepodobne predstavoval optimum z hľadiska lesného hospodárstva a hydrologických podmienok (graf 2).



Graf 2 Distribúcia nadmorských výšok
Zdroj: [3]

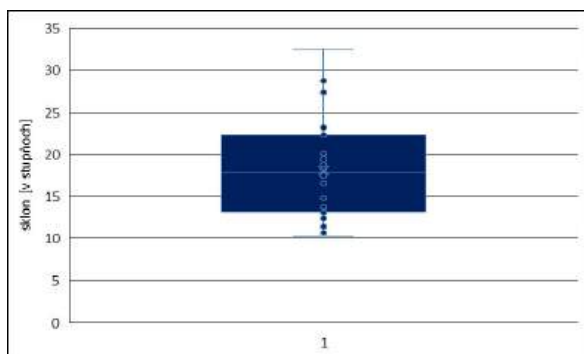
3.2 Sklonové pomery reliéfu

Sklon svahu v bezprostrednom okolí klauz bol vyhodnotený na základe priemernej hodnoty sklonu v 100 m buffere odvodeného z digitálneho modelu reliéfu s rozlíšením 1×1 m [3]. Priemerný sklon lokalít sa pohybuje v intervale $10,32^\circ - 32,54^\circ$, pričom mediánová hodnota dosahuje $17,82^\circ$ a priemerná hodnota $18,06^\circ$. Interkvartilové rozpätie ($13,28^\circ - 22,30^\circ$) poukazuje na relatívne kompaktné rozdelenie hodnôt bez výrazných extrémov.

Hodnoty sklonu naznačujú, že väčšina klauz je situovaná v prostredí stredne strmých až strmých svahov typických pre úzke horské doliny s vyššou

morfologickou energiou. Len ojedinelé lokality sa nachádzajú v miernejších alebo extrémne strmých podmienkach.

Boxplot dokumentuje relatívne symetrické rozdelenie hodnôt, pričom absencia výrazných odľahlých hodnôt potvrdzuje stabilný morfometrický vzorec lokalizácie klauz (graf 3).

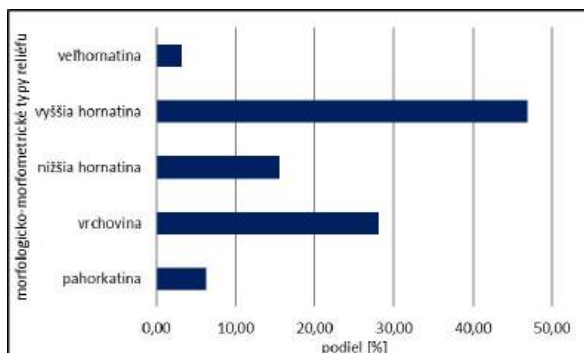


Graf 3 Distribúcia sklonu

Zdroj: [3]

3.3 Morfológicko-morfometrické typy reliéfu

Analýza morfológicko-morfometrických typov reliéfu preukázala výraznú dominanciu vyšších hornatín, v ktorých sa nachádza približne polovica všetkých identifikovaných klauz ($\approx 47\%$). Významné zastúpenie vykazujú aj vrchoviny ($\approx 28\%$) a nižšie hornatiny ($\approx 15\%$), zatiaľ čo pahorkatiny a veľhornatiny sú zastúpené len marginálne (do $\approx 6\%$) (graf 4) [7].



Graf 4 Relatívna početnosť morfológicko-morfometrických typov reliéfu

Zdroj: [7]

Takéto rozdelenie indikuje na jednoznačnú preferenciu stredne až výrazne členitého reliéfu. Vyššie hornatiny poskytovali optimálnu kombináciu sklonových pomerov, dostatočného výškového rozdielu a úzkych dolinných profilov, ktoré umožňovali efektívne prehradzovanie tokov relatívne krátkymi hrádzami s priaznivým akumulárnym objemom.

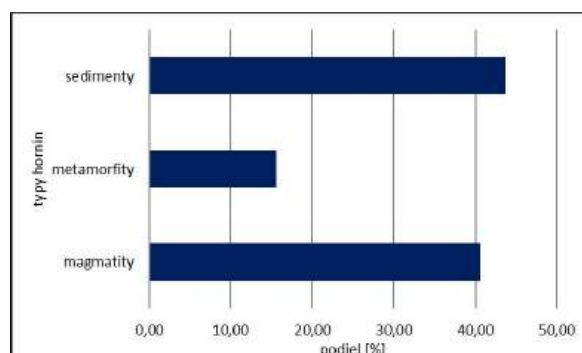
Vrchovinové oblasti predstavujú prechodné morfológické prostredie s nižšou energiou reliéfu, no stále s dostatočnými podmienkami pre vznik akumulárných priestorov. Naopak, nízky podiel klauz

v pahorkatinách naznačuje, že miernejší reliéf neposkytoval vhodné morfometrické podmienky pre efektívne splavovanie dreva.

Ojedinelý výskyt vo veľhornatinách možno interpretovať ako dôsledok limitujúcich klimatických a prístupových podmienok vo vyšších nadmorských výškach, ktoré znižovali intenzitu historického lesného hospodárstva.

3.4 Geologické členenie

Analýza geologického podložja preukázala, že klauzy sa najčastejšie nachádzajú na sedimentárnych horninách (43,75 %), tesne nasledované magmatickými horninami (40,63 %). Metamorfity sú zastúpené najmenej (15,63 %) (graf 5) [8]. Rozdelenie dokumentuje absenciu striktnej litologickej preferencie, keďže dominantné zastúpenie vykazujú dve geneticky odlišné horninové skupiny. Klauzy sa teda nachádzajú v širokom spektre geologických podmienok, pričom rozhodujúce faktory ich lokalizácie pravdepodobne súviseli skôr s morfometriou reliéfu a hydrologickými pomermi než s konkrétnym typom horniny.



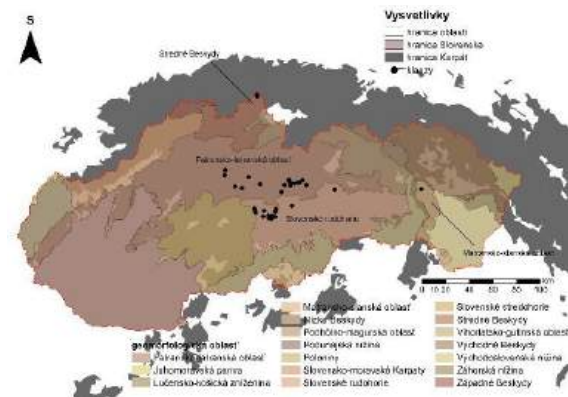
Graf 5 Relatívna početnosť typov hornín

Zdroj: [8]

Relatívne vyrovnané zastúpenie naznačuje, že sedimentárne horniny nepredstavovali primárny limitujúci faktor pri budovaní klauz. V prípade sedimentárnych hornín možno predpokladať výskyt hlbšie zarezaných dolín vo flyšových alebo neogénnych komplexoch, ktoré poskytovali vhodné akumulárné priestory. Magmatické horniny, najmä vulkanity, sú typické výraznou morfológickou členitosťou a úzkymi dolinami, čo vytváralo priaznivé podmienky pre budovanie hrádz s menšou dĺžkou a vyššou stabilitou. Nižšie zastúpenie metamorfit môže súvisieť s ich regionálnym obmedzením v rámci analyzovaného územia alebo so špecifickými morfológickými podmienkami týchto jednotiek. Výsledky teda naznačujú, že geologické podložie nepredstavovalo striktne determinujúci faktor, ale skôr spolupôsobiaci prvok v kombinácii s reliéfom a hydrologickými pomermi.

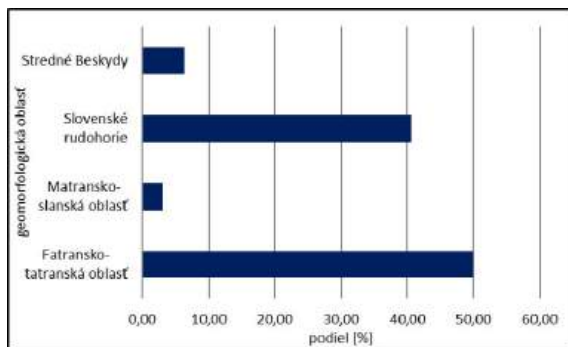
3.5 Geomorfologické členenie

Priestorová analýza preukázala výraznú koncentráciu klauz v rámci Fatransko-tatranskej oblasti, kde sa nachádza 50 % všetkých objektov. Ostatné geomorfologické celky vykazujú nižšiu, avšak stále významnú prítomnosť historických vodných nádrží (mapa 3) [4].



Mapa 3 Geomorfologické členenie Slovenskej republiky na podklade Západných Karpát
Zdroj: [1-4]

Dominancia určitých geomorfologických jednotiek naznačuje, že morfoštruktúrne a litologické podmienky zohrávali významnú úlohu pri ich budovaní (graf 6).



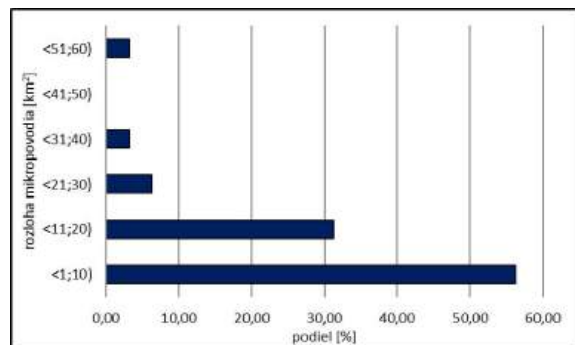
Graf 6 Relatívna početnosť geomorfologických oblastí
Zdroj: [4]

Koncentrácia klauz v rámci Fatransko-tatranskej oblasti poukazuje na súvislosť medzi ich výskytom a morfológickou členitosťou reliéfu. Hlboko zarezané doliny a vyšší gradient svahov vytvárali priaznivé podmienky pre akumuláciu vody prostredníctvom relatívne nízkych hrádží. Naopak, nižší výskyt v menej členitých geomorfologických celkoch môže súvisieť s nižšou efektívnosťou splavovania dreva alternatívnymi formami jeho transportu. Rozmiestnenie teda nevykazuje náhodný charakter, ale korešponduje so štruktúrno-reliéfnymi podmienkami Západných Karpát.

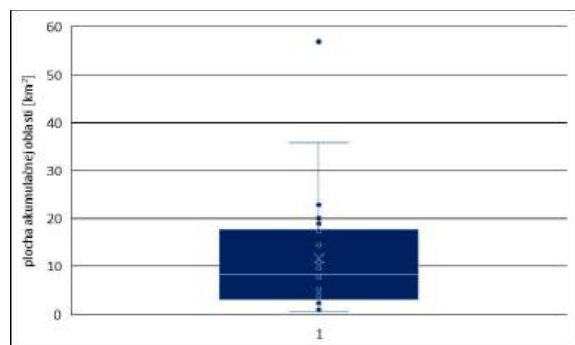
3.6 Plocha akumuláčnej oblasti

Plocha akumuláčnych oblastí nad analyzovanými klauzami sa pohybuje v rozpätí od 0,59 až po 56,8 km², pričom mediánová hodnota dosahuje (\approx 8,29 km²). Priemerná hodnota (\approx 12,20 km²) je výrazne ovplyvnená niekoľkými veľkými povodiami, čo poukazuje na pravostrannú asymetriu rozdelenia.

Väčšina klauz sa nachádza na povodiach s rozlohou do 10 km², čo naznačuje ich viazanosť na malé až stredne veľké horské *catchmenty*. Len ojedinelé objekty sú situované na rozsiahlejších akumuláčnych oblastiach presahujúcich 30 km², ktoré predstavujú extrémne hodnoty v rámci analyzovaného súboru. Plocha akumuláčnych oblastí dosahuje IQR 14,60 km² (graf 7, 8).



Graf 7 Relatívna početnosť plôch akumuláčnej oblasti
Zdroj: [3]



Graf 8 Distribúcia veľkosti akumuláčnych oblastí
Zdroj: [3]

Výrazná variabilita veľkosti akumuláčnych oblastí poukazuje na heterogénny hydrologický kontext budovania klauz. Dominancia menších povodií naznačuje, že väčšina objektov bola lokalizovaná na horných úsekoch tokov s rýchlou odtokovou odozvou a výraznou závislosťou od zrážkovo-snehového režimu.

Pravostranné rozdelenie s niekoľkými extrémne veľkými povodiami môže odrážať odlišné hospodárske stratégie v niektorých regiónoch, kde bolo potrebné regulovať väčšie množstvo vody alebo zabezpečiť splavovanie na dlhších úsekoch toku.

Skutočnosť, že mediánová hodnota je pod hranicou 10 km², potvrdzuje, že typická klauza bola

viazaná na relatívne malú akumuláciu. To podporuje interpretáciu klauz ako technických objektov optimalizovaných pre krátkodobé akumulácie v prostredí horských bystrín. Mediánová hodnota sa nachádza pod priemerom, pričom horný kvartil je rozšírený o niekoľko extrémnych hodnôt. Tie reprezentujú ojedinelé prípady klauz situovaných na rozsiahlych akumuláciách, ktoré však nie sú typické pre väčšinu analyzovaného súboru.

Interkvartilové rozpätie indikuje, že polovica klauz sa nachádza na povodiach približne v intervale od 3 až do 15 km², čo možno považovať za charakteristický hydrologický rozsah historických splavovacích nádrží (graf 7).

Na kvantitatívne zhodnotenie základných charakteristík analyzovaných fyzicko-geografických faktorov boli vypočítané deskriptívne štatistiky. Tabuľka 1 sumarizuje minimálne a maximálne hodnoty, medián a interkvartilové rozpätie (IQR) pre jednotlivé premenné. Vzhľadom na neparametrický charakter súboru a prítomnosť extrémnych hodnôt bol medián zvolený ako hlavná miera centrálnej tendencie, pričom IQR vyjadruje variabilitu stredných 50 % hodnôt (tabuľka 1).

Parameter	Min	Max	Medián	IQR
Nadmorská výška [m n. m.]	567,00	1115,00	835,00	223,25
Akumulačná oblasť [km ²]	0,59	56,79	829,36	1460,77
Sklon [°]	10,32	32,54	17,82	9,02

Tabuľka 1 Deskriptívna štatistika vybraných fyzicko-geografických faktorov
Zdroj: [3]

Hodnoty uvedené v tabuľke potvrdzujú, že lokalizácia klauz je koncentrovaná v relatívne úzko definovanom intervale.

4 Komplexná syntéza fyzicko-geografických determinantov lokalizácie klauz

Analýza fyzicko-geografických faktorov poukazuje na systematický a environmentálne podmienený charakter lokalizácie klauz v prostredí Západných Karpát. Vertikálna distribúcia klauz, koncentrovaná prevažne v intervale ≈ 700-1000 m n. m., odráža ich viazanosť na stredohorské polohy s dostatočným lesným potenciálom a zvýšenými zrážkovými úhrnmi. Relatívne symetrické rozdelenie nadmorských výšok bez výrazných extrémov naznačuje existenciu optimálneho výškového pásma pre budovanie týchto objektov.

Z morfometrického hľadiska sa klauzy nachádzajú prevažne v prostredí stredne strmých až strmých

svahov (medián 17,82°), čo poukazuje na preferenciu reliéfu s vyššou morfológickou energiou a hlboko zarezanými dolinami. Kombinácia optimálnej nadmorskej výšky a priaznivého sklonového gradientu vytvárala podmienky pre efektívne prehradzovanie tokov a akumuláciu vody.

Analýza geologických podmienok poukázala na relatívne vyrovnané zastúpenie sedimentárnych (≈ 44 %) a magmatických hornín (≈ 41 %). Tento fakt naznačuje, že samotná litologická príslušnosť nebola primárnym determinantom, ale zohrávala podpornú úlohu v kombinácii s morfológickými vlastnosťami reliéfu. Dôležitejšia než samotná genetická skupina hornín bola pravdepodobne ich schopnosť vytvárať úzke dolinné profily vhodné pre akumuláciu vody.

Hydrologický faktor vykazuje výraznú variabilitu. Mediánová plocha akumulácie (≈ 8,29 km²) potvrdzuje, že typická klauza bola situovaná na malých až stredne veľkých horských povodiach. Tieto oblasti sú typické zvýšenými úhrnmi zrážok a významným podielom snehovej akumulácie, čo zabezpečovalo dostatočný objem vody pre periodické splavovanie dreva. Pravostranná asymetria rozdelenia s niekoľkými extrémne veľkými povodiami poukazuje na existenciu regionálne špecifických hospodárskych modelov, avšak väčšina objektov bola viazaná na dynamické bystrinné toky s rýchlou odtokovou odozvou.

Z klimatického hľadiska sa analyzované lokality nachádzajú prevažne v chladnejších a vlhších oblastiach Západných Karpát, s vyššími ročnými úhrnmi zrážok a významným podielom snehovej akumulácie. Kombinácia vyššej nadmorskej výšky, zvýšených zrážkových úhrnov a morfológickej členitosti tak vytvárala optimálne podmienky pre vznik a fungovanie historických vodných nádrží.

Priestorové rozmiestnenie klauz teda nevykazuje náhodný charakter, ale je výsledkom synergického pôsobenia reliéfnych, hydrologických a klimatických faktorov. Ich lokalizácia predstavuje adaptívnu odpoveď historického hospodárskeho systému na environmentálne podmienky horského prostredia.

5 Limity výskumu

Digitálny model reliéfu s rozlíšením 1 × 1 m umožnil presné stanovenie morfometrických parametrov (nadmorská výška a akumulácia plocha). Kvantitatívne výsledky preto vykazujú vysokú mieru priestorovej presnosti. Naopak, interpretácia vybraných fyzicko-geografických determinantov (geologické členenie, geomorfologické oblasti a morfológicko-morfometrické typy reliéfu) je ovplyvnená mierkou použitých tematických podkladových vrstiev v mierke 1 : 500 000, ktoré predstavujú generalizované kartografické výstupy. V dôsledku toho môže dochádzať k zjednodušeniu hraníc geomorfologických jednotiek a geologických kontaktov, pričom lokálne litologické variability alebo mikroreliéfne formy

nemusia byť plne zachytené. Tieto údaje umožňujú identifikovať dominantné štruktúrne a morfológické kontexty, avšak nereflektujú lokálne litologické variability či mikroreliefné morfoštruktúrne prechody.

Výsledky preto reprezentujú makroregionálnu syntézu environmentálneho vzorca lokalizácie klauz, nie detailnú mikrolokálnu analýzu jednotlivých objektov.

Hydrologický faktor bol vyhodnotený prostredníctvom rozlohy akumuláčnej oblasti nad klauzou, čo vyjadruje potenciál vodného prítoku, avšak nereflektuje historickú sezónnu dynamiku odtoku ani extrémne hydrologické situácie.

Záver

Analýza 32 historických vodných nádrží – klauz na území Západných Karpát preukázala, že ich lokalizácia nie je náhodná, ale systematicky viazaná na špecifické fyzicko-geografické podmienky horského prostredia.

Vertikálne rozloženie objektov je koncentrované najmä v intervale 700–1000 m n. m., pričom mediánová hodnota 825 m n. m. potvrdzuje stabilné výškové optimum ich výskytu. Morfometrická analýza sklonu preukázala, že klauzy sa nachádzajú prevažne v prostredí stredne strmých svahov, pričom mediánová hodnota 17,82° indikuje preferenciu reliéfu s vyššou morfológickou energiou a hlboko zarezanými dolinnými profilmi. Tento gradient vytváral vhodné podmienky pre efektívne prehradzovanie tokov a akumuláciu vody, pričom extrémne strmé alebo naopak veľmi mierne svahy nepredstavovali typický lokalizačný model.

Geologické podložie nevykazuje výraznú jednostrannú dominanciu, keďže sedimentárne horniny (43,75 %) a magmatity (40,63 %) sú zastúpené takmer vyrovnané. Tento výsledok naznačuje, že litologická príslušnosť nebola primárnym determinantom, ale pôsobila v synergii s morfológickými a hydrologickými faktormi.

Hydrologická analýza potvrdila výraznú variabilitu veľkosti akumuláčnych oblastí, avšak mediánová hodnota (~8,29 km²) dokazuje, že typická klauza bola situovaná na malých až stredne veľkých horských povodiach. Pravostranná asymetria rozdelenia indikuje existenciu niekoľkých regionálne špecifických prípadov s rozsiahlejšími catchmentmi, ktoré však nepredstavujú dominantný model.

Komplexná syntéza preukázala, že rozhodujúcimi faktormi lokalizácie klauz boli nadmorská výška, sklon reliéfu a hydrologická konfigurácia horných častí povodí, zatiaľ čo geologické podložie zohrávalo sekundárnu úlohu. Výsledky potvrdzujú environmentálne determinovaný charakter historického systému splavovania dreva a poukazujú na jeho adaptáciu na morfometrické a hydrologické podmienky horskej krajiny Západných Karpát.

Podakovanie

Výskum bol realizovaný v rámci projektu KEGA 008UMB-4/2025 Celoživotné vzdelanie pedagogických a vedeckovýskumných pracovníkov prírodovedných odborov na vysokých školách v oblasti geografických informačných systémov. Autor vyjadruje poďakovanie školiteľovi doc. et doc. PaedDr. Pavlovi Hrončekovi, PhD., za odborné vedenie, metodické usmernenie a cenné pripomienky pri spracovávaní problematiky historických vodných nádrží – klauz v prostredí Západných Karpát.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] CIMBALA, J., (2025). *Identifikácia a vizualizácia historických antropogénnych reliéfnych prvkov na príklade klauzy Zlatá Baňa*. Diplomová práca. Banská Bystrica: UMB v Banskej Bystrici, 150 s.
- [2] CIMBALA, Jakub; HRONČEKOVÁ GREGOROVÁ, Bohuslava; HRONČEK, Pavel and TOMETZOVÁ, Dana, (2026). Evaluation of the Attractiveness of Historical Water Reservoir Relicts (Splash Dams) in the Forest Environment of the Low Tatras National Park (Slovakia) in Terms of Ecotourism. *Forests*, 17(1), 52; <https://doi.org/10.3390/f17010052>
- [3] ZBGIS: LLS ÚGKK SR, (2024). Mapový klient. Verzia 8.0.6. Dostupné <https://zbgis.skgeodesy.sk/mapka/sk/teren?pos=48.908431,21.389093,12> [prístup 2026-02-20].
- [4] MAZÚR, Emil a Michal LUKNIŠ, (1978). Regionálne geomorfologické členenie Slovenskej socialistickej republiky. *Geografický časopis*. Bratislava: Geografický ústav SAV, 30(2), 101-125. ISSN 0016-7193.
- [5] LAPIN, Milan et al. Klimatické oblasti – mapa č. IV/27. Mierka 1:1 000 000. In Atlas krajiny Slovenskej republiky. Bratislava: MŽP SR, 2002, s. 95.
- [6] MAJERČÁKOVÁ, Oľga. Povodia hlavných tokov s hydrologickou bilanciou – mapa č. IV/70. Mierka 1:2 000 000. In Atlas krajiny Slovenskej republiky. Bratislava: MŽP SR, 2002, s. 102.
- [7] TREMBOŠ, Peter a Jozef MINÁR. Morfológicko-morfometrické typy reliéfu – mapa č. IV/24. Mierka 1 : 500 000. In Atlas krajiny Slovenskej republiky. Bratislava: MŽP SR, 2002, s. 90.
- [8] HÓK, Jozef. KAHAN, Štefan a Roman AUBRECHT. *Geológia Slovenska*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2001. 48 s. ISBN 80-223-1592-3.

Multimodálna analýza VR tréningových simulácií pre Industry 5.0: Interdisciplinárny prístup k fyziologickým, behaviorálnym a technologickým aspektom

Multimodal Analysis of VR Training Simulations for Industry 5.0: Interdisciplinary Approach to Physiological, Behavioral and Technological Aspects

Denis Ďuriač¹

Školiteľ: Zoltán Balogh²

^{1,2}Katedra informatiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

¹ denis.duriac@ukf.sk, ² zbalogh@ukf.sk

Abstrakt

Tento článok sa zameriava na multimodálnu analýzu biofyzikálnych parametrov zamestnancov v kontexte VR tréningových simulácií pre Industry 5.0. Súčasný výskum poukazuje na limitácie unimodálnych prístupov k detekcii kognitívnej záťaže, kde presnosť samotných GSR alebo HRV signálov dosahuje približne 84,2 %. Predkladaná práca navrhuje multimodálny prístup integrujúci variabilitu srdcovej frekvencie (HRV), galvanický odpor kože (GSR) a okulometriu, ktorý podľa aktuálnych štúdií dosahuje presnosť detekcie stresu až 93,5 %. Článok mapuje metodológiu zberu dát zo smart nositeľných zariadení, navrhuje softvérovú architektúru spracovania v jazyku Python a predstavuje porovnávací rámec pre evaluáciu algoritmov strojového učenia. Cieľom je vytvorenie adaptívneho systému pre dynamickú personalizáciu VR tréningových scenárov v súlade s princípmi human-centric Industry 5.0.

Kľúčové slová: Industry 5.0, virtuálna realita, HRV, GSR, okulometria, multimodálna fúzia, Python.

Abstract

This article focuses on multimodal analysis of employees' biophysical parameters in the context of VR training simulations for Industry 5.0. Current research highlights limitations of unimodal approaches to cognitive load detection, where accuracy of GSR or HRV signals alone reaches approximately 84.2%. The presented work proposes a multimodal approach integrating heart rate variability (HRV), galvanic skin response (GSR), and eye-

tracking, which according to recent studies achieves stress detection accuracy of up to 93.5%. The article maps the methodology of data collection from smart wearable devices, proposes a Python-based software processing architecture, and presents a comparative framework for evaluating machine learning algorithms. The goal is to create an adaptive system for dynamic personalization of VR training scenarios in accordance with the principles of human-centric Industry 5.0.

Key Words: Industry 5.0, virtual reality, HRV, GSR, eye-tracking, multimodal fusion, Python.

Úvod

Priemysel 5.0 predstavuje paradigmatický posun od automatizácie k prístupu orientovanému na človeka, kde technológie primárne podporujú blahobyt, bezpečnosť a udržateľnosť pracovného prostredia [1]. Európska komisia definuje Industry 5.0 ako koncepciu založenú na troch pilieroch: human-centricity, sustainability a resilience. V tomto kontexte sa virtuálna realita (VR) stáva kľúčovým nástrojom pre bezpečný a interaktívny tréning zamestnancov, pričom globálny trh VR riešení pre priemyselné školenia zaznamenal po pandémii COVID-19 ročný rast (CAGR) na úrovni 32,5 % [2].

Zavádzanie kognitívnych technológií do tréningových procesov však na zamestnancov kladie nové nároky a môže zvyšovať ich mentálnu záťaž. Tradične sa kognitívna záťaž merala pomocou subjektívnych dotazníkov (napr. NASA-TLX), ktoré sú limitované retrospektívnym sebahodnotením a neposkytujú rozlíšenie v reálnom čase [3]. Súčasný vedecký výskum preto prechádza k

využívaniu objektívnych biometrických dát získaných priamo počas výkonu úlohy.

Medzi najspoľahlivejšie fyziologické markery patria variabilita srdcovej frekvencie (HRV) a galvanický odpor kože (GSR), ktoré priamo odrážajú zmeny v autonómnom nervovom systéme spojené s kognitívnym úsilím [4]. Súčasné štúdie však poukazujú na kritickú limitáciu unimodálnych prístupov: samotné GSR alebo HRV signály dosahujú presnosť detekcie stresu približne 84,2 %, zatiaľ čo multimodálna fúzia kombinujúca fyziologické signály s okulometriou dosahuje až 93,5 % [5]. Metrika TEPR (Task-Evoked Pupillary Response) vykazuje koreláciu $r = 0,78$ s kognitívnym preťažením a umožňuje predikciu stresu o 1,5 sekundy skôr ako tradičné HRV metriky [6].

Na základe týchto východísk sa predkladaný článok zameriava na návrh multimodálnej metodológie získavania a spracovania biofyzikálnych dát z reálneho priemyselného prostredia. Autor spolupracuje so spoločnosťou vyvíjajúcou VR terapeutické a vzdelávacie aplikácie s cieľom vytvoriť robustný analytický základ pre dynamickú adaptáciu tréningového procesu v súlade s princípmi Industry 5.0.

1 Metodológia zberu dát a identifikácia systémov

Pri získavaní dát z podnikového prostredia je nevyhnutné nadviazať úzku spoluprácu s technickými oddeleniami. Namiesto stacionárnych medicínskych prístrojov súčasný výskum v oblasti Industry 5.0 preukazuje vysokú efektivitu komerčne dostupných smart nositeľných senzorov, ktoré zamestnancov neobmedzujú pri práci [7]. Systematický prehľad 42 experimentálnych štúdií z rokov 2020–2026 identifikoval tri kľúčové modalities pre monitoring kognitívnej záťaže vo VR prostredí.



Obr. 1 GSR a HRV senzor. Zdroj: [18]

V rámci spolupráce s podnikom boli identifikované nasledujúce kľúčové dátové toky reprezentujúce kontinuálne biofyzikálne parametre zamestnancov:

Variabilita srdcovej frekvencie (HRV):

Extrahovaná z fotopletyzmozografických (PPG) senzorov moderných nositeľných zariadení (ilustračný príklad takéhoto zariadenia a umiestnenia senzorov je znázornený na Obr. 1). HRV meria variácie v časových intervaloch medzi po sebe nasledujúcimi údermi srdca (R-R intervaly) a slúži ako biomarker aktivity autonómneho nervového systému, špecificky rovnováhy medzi sympatikom a parasympatikom pri kognitívnej záťaži. Metriky RMSSD a LF/HF pomer vykazujú latenciu odozvy 1–3 sekundy [4][8].

Galvanický odpor kože (GSR/EDA):

Senzory merajúce zmeny v elektrickej vodivosti pokožky v závislosti od aktivity potných žliaz, ktoré sú priamo riadené sympatickým nervovým systémom. Zvýšená kognitívna záťaž a stres sa prejavujú okamžitými zmenami v týchto hodnotách s latenciou 500–1500 ms [9].

Okulometria (Eye-tracking):

Integrovaná do moderných VR headsétov, umožňuje monitorovať pupilárnu dilatáciu (TEPR), frekvenciu fixácií a žmurkania. Eye-tracking poskytuje najrýchlejšiu odozvu na kognitívne zmeny (200–500 ms) a metrika TEPR vykazuje vysokú koreláciu ($r = 0,78$) s mentálnym zaťažením [6][10].

2 Architektúra spracovania dát a rozpoznávanie vzorov v jazyku Python

Jadrom výskumu v doméne objavovania znalostí nie je samotný zber, ale vývoj exaktného softvérového aparátu na vyhodnocovanie multimodálnych časových radov. Navrhovaná metodológia je postavená na využití programovacieho jazyka Python a jeho špecializovaných knižníc. Procesný reťazec (pipeline) rozpoznávania vzorov je rozdelený do troch navzájom súvisiacich fáz.

2.1 Ingresia a predspracovanie signálov (Preprocessing)

Surové dáta zo smart zariadení obsahujú environmentálny šum a pohybové artefakty. Časové rady vo formátoch CSV/JSON budú načítané pomocou knižnice Pandas. Na fyziologickú analýzu využijeme knižnicu NeuroKit2. Na očistenie GSR signálov bude aplikovaný Butterworthov dolnopriepustný filter (low-pass filter) na odstránenie vysokofrekvenčného šumu, zatiaľ čo pri PPG/HRV signáloch budú detegované lokálne maximá (systolické vrcholy) pre presný výpočet R-R intervalov. Pri okulometrických dátach je kritické filtrovanie svetelného reflexu (light reflex), ktorý môže kontaminovať TEPR signál v dynamicky osvetlených VR scénach [10][11].

2.2 Extrakcia príznakov (Feature Extraction)

Algoritmy strojového učenia nedokážu efektívne pracovať so surovou vlnou signálu. Pomocou techniky kĺzavých okien (sliding windows – 30 až 60-sekundové úseky) budú extrahované kľúčové metriky: z HRV signálu metriky RMSSD, SDNN a pomer LF/HF (prostredníctvom knižníc SciPy a NeuroKit2); z GSR signálu tonická (SCL) a fázická zložka (SCR) pomocou konvexnej optimalizácie; z okulometrie priemer pupilárneho priemeru, TEPR, frekvencia sakád a fixácií [8][9][10].

2.3 Strojové učenie a multimodálna klasifikácia

Na rozpoznávanie vzorov kognitívneho preťaženia nasadíme modely z knižnice Scikit-learn. Vzhľadom na povahu multimodálnych biometrických dát navrhujeme porovnanie algoritmov Random Forest, SVM a gradient

boosting (XGBoost). Pre fúziu modalít implementujeme early fusion (konkatenácia príznakov) aj late fusion (kombinácia predikcií jednotlivých modalít). SVM sa v aktuálnych štúdiách ukazuje ako efektívny pri klasifikácii multimodálnych dát (fúzia HRV, GSR a eye-tracking) s presnosťou až 93,5 % [5][7].

3 Očakávané výsledky a porovnanie prístupov

Aby bol navrhovaný systém relevantný a odrážal aktuálny stav vedeckého poznania (State-of-the-Art), predchádzala mu systematická analýza literatúry. Vyhľadávanie bolo realizované v renomovaných akademických databázach Web of Science (WoS), Scopus a IEEE Xplore. Pri rešerši bol použitý nasledujúci vyhľadávací reťazec (search string) kľúčových slov: *TITLE-ABS-KEY("Virtual Reality" OR "VR" OR "Immersive Environment")*

AND ("Stress Detection" OR "Cognitive Load" OR "Arousal")

AND ("Eye-tracking" OR "Pupillometry" OR "GSR" OR "Multimodal")

AND ("Industry 5.0" OR "Training")

)

Z celkového počtu nájdených záznamov boli aplikované vylučovacie kritériá (exclusion criteria): štúdie staršie ako rok 2020, štúdie bez explicitného merania presnosti algoritmov a neanglické publikácie. Na deduplikáciu a analýzu abstraktov bol použitý referenčný manažér Mendeley. Týmto prísny výberom sa vyfiltrovalo 42 relevantných experimentálnych štúdií, ktorých agregované výsledky slúžia ako východisko pre dizajn našej multimodálnej architektúry.

Na základe systematického prehľadu literatúry (42 experimentálnych štúdií, 2020–2026) bola zostavená porovnávací tabuľka presnosti rôznych prístupov k detekcii kognitívnej záťaže. Tabuľka 1 sumarizuje výsledky unimodálnych a multimodálnych metód.

Tab. 1 Porovnanie presnosti detekcie kognitívnej záťaže podľa senzorickej modalít

Očakávaným primárnym výsledkom aplikácie navrhnutého Python pipeline bude plne automatizovaný reťazec schopný transformovať surový vstup zo smart zariadení do klasifikovanej úrovne kognitívnej záťaže. Pre vyhodnotenie úspešnosti modelov bude využitá metóda k-násobnej krížovej validácie (k-fold cross-validation), ktorá zabezpečí robustnosť modelu voči overfitting [12]. Úspešnosť sa bude hodnotiť na základe metrík Accuracy, F1-skóre a AUC-ROC [13].

4 Diskusia

Získavanie a analýza multimodálnych biometrických dát v reálnom čase prináša v porovnaní s tradičnými dotazníkovými metódami zásadný posun. Kým dotazníky spoliehajú na subjektívne sebahodnotenie po skončení simulácie, navrhovaná metodológia poskytuje objektívny a kvantifikovateľný pohľad na kognitívny stav zamestnanca presne v momente záťaže. Tento prechod od subjektívnej k objektívnej metrike je nevyhnutný pre naplnenie vízie Industry 5.0.

Najväčšou technologickou prekážkou pri práci s nositeľnými senzormi v podnikovom prostredí je prítomnosť masívneho šumu a pohybových artefaktov [14]. Zamestnanec vo VR prostredí vykonáva fyzickú aktivitu, čo môže viesť k posunom senzorov a degradácii zachyteného signálu. Pri okulometrii v VR je špecifickou výzvou filtrovanie svetelného reflexu v dynamicky osvetlených scénach, čo vyžaduje pokročilé algoritmy kalibrácie [10].

Z hľadiska strojového učenia je nutné kriticky zhodnotiť fenomén interindividuálnej variability [15]. Základná tepová frekvencia a elektrická vodivosť kože sa u každého človeka líšia v závislosti od veku, pohlavia či fyzickej kondície. Z tohto dôvodu výskum počíta s implementáciou kalibračnej fázy, kde systém zaznamená kľudové hodnoty zamestnanca pred začiatkom zmeny. Takýto personalizovaný prístup (subject-dependent model) výrazne zvyšuje úspešnosť algoritmov pri detekcii stresu.

Ďalším aspektom je požiadavka na real-time processing. Kým extrakcia príznakov z GSR je relatívne rýchla, výpočet frekvenčných metrík

HRV si vyžaduje dlhšie časové okná (30–60 sekúnd). Okulometria naopak poskytuje najrýchlejšiu odozvu (200–500 ms), čo kompenzuje latenciu HRV a umožňuje skoršiu detekciu kognitívneho preťaženia [6].

Na základe realizovaného systematického prehľadu literatúry bola zostavená porovnávací tabuľka. Jej cieľom je demonštrovať, prečo sa v tomto výskume orientujeme na zložitejší multimodálny zber dát a nie na jednoduchšie unimodálne merania. Tabuľka 1 sumarizuje priemernú presnosť a latenciu jednotlivých prístupov identifikovaných vo vybraných referenčných štúdiách z nášho výberu.

Modalita	Presnosť	Latencia	Kľúčové metriky
GSR (unimodálne)	83,1 %	500–1500 ms	SCL, SCR amplitúda
HRV (unimodálne)	84,2 %	1–3 s	RMSSD, LF/HF ratio
Eye-tracking	87,5 %	200–500 ms	TEPR, fixácie, sakády
Multimodálna fúzia	93,5 %	500 ms	Fúzia HRV+GSR+eye
Deep learning fúzia	98,6 %	< 500 ms	CNN+LSTM ensemble

V neposlednom rade je dôležité spomenúť etickú rovinu zberu citlivých osobných údajov [16]. Implementácia smart zariadení na meranie fyziologického stavu nesmie v zamestnancoch evokovať pocit neustáleho sledovania (micromanagement). V súlade s princípmi Industry 5.0 a európskou legislatívou (GDPR) navrhnutá dátová architektúra pracuje výhradne s anonymizovanými časovými radmi a federatívnym učením, ktoré uchováva dáta lokálne na zariadení [17].

Záver

Rýchly prechod k štandardu Industry 5.0 vyžaduje inovatívne prístupy k hodnoteniu kognitívnej kapacity zamestnancov. Tento

článok predstavil komplexnú metodológiu multimodálneho zberu, predspracovania a analýzy biofyzikálnych parametrov (HRV, GSR, eye-tracking) prostredníctvom smart nositeľných zariadení. Systematický prehľad literatúry poukázal na kritickú limitáciu unimodálnych prístupov (presnosť ~84 %) a významný prínos multimodálnej fúzie (presnosť až 93,5–98,6 %).

Definovanie jasného procesného reťazca v jazyku Python, zahŕňajúceho filtráciu signálov, extrakciu príznakov a nasadenie algoritmov strojového učenia, predstavuje nevyhnutný vedecký základ pre rozpoznávanie vzorov správania. Ďalším krokom v rámci doktorandského výskumu bude aplikácia tohto návrhu na reálnu dátovú sadu získanú od partnerského podniku. Výsledná algoritmická detekcia preťaženia prispeje k tvorbe personalizovaných a vysoko efektívnych tréningových scenárov, ktoré plne rešpektujú potreby ľudského faktora v modernom priemysle.

PodĎakovanie

Chcel by som touto cestou vyjadriť veľkú vďačnosť môjmu školiteľovi, prof. Ing. Zoltánovi Baloghovi, PhD., za jeho pomoc a podporu počas riešenia mojej práce. Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0385/23.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ESCALLADA, O. et al. Assessing Human Factors in Virtual Reality Environments for Industry 5.0: A Comprehensive Review. *Information*, 2025. DOI: 10.3390/info16010035
- [2] MEFTAH, S. et al. Enhancing decision-making in Industry 5.0 through adaptive human-machine interfaces: A systematic literature review. *Computer Standards & Interfaces*, 2025. DOI: 10.1016/j.csi.2025.104091
- [3] BASSI, G. et al. Understanding Workers' Well-Being and Cognitive Load in Human-Cobot Collaboration: Systematic Review. *Journal of Medical Internet Research*, 2025. Dostupné na: <https://www.jmir.org/2025/1/e75658>
- [4] ANTONACI, F. et al. Workplace Well-Being in Industry 5.0: A Worker-Centered Systematic Review. *Sensors*, 2024. DOI: 10.3390/s24175473
- [5] JAIN, M. Comparison of Machine Learning Models for Stress Detection from Sensor Data. *International Journal of Scientific Research and Management*, 2024, roč. 12, č. 12. DOI: 10.18535/ijstrm/v12i12.ec01
- [6] BEATTY, J.; LUCERO-WAGONER, B. The pupillary system. *Handbook of Psychophysiology*, Cambridge University Press, 2000, s. 142-162.
- [7] MORILLO, C. et al. Early Detection of Physical Fatigue in Industry via Wearable Biometric Sensors and Contextual Data Modeling. *Preprints.org*, 2025. DOI: 10.20944/preprints202508.0095.v1
- [8] ALI, M. et al. Multi-Class Stress Detection Through Heart Rate Variability Using Deep Learning. *International Journal for Research Trends and Innovation*, 2025. Dostupné na: <https://www.ijrti.org/papers/IJRTI2509012.pdf>
- [9] CALABRESE, F. et al. Early Detection of Physical Fatigue in Industry via Wearable Biometric Sensors. *Preprints.org*, 2025. DOI: 10.20944/preprints202508.0095.v1
- [10] ŽUCHOWICZ, P. et al. Leveraging Immersive Technologies for Safety Evaluation in Forklift Operations. *Applied Sciences*, 2025. DOI: 10.3390/app152011048
- [11] VUKADINOVIĆ, A. et al. Galvanic Skin Response and Photoplethysmography for Stress Recognition Using Machine Learning and Wearable Sensors. *Applied Sciences*, 2024, roč. 14, č. 24, s. 11997. DOI: 10.3390/app142411997
- [12] BERRAR, D. Cross-Validation. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, Elsevier, 2019, s. 542-545. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20349-X
- [13] HICKS, S.A. et al. On evaluation metrics for medical applications of artificial intelligence. *Scientific Reports*, 2022, roč. 12, č. 5979. DOI: 10.1038/s41598-022-09954-8
- [14] MILIOTI, V. et al. Wearable Sensors for Stress Detection: A Review on Methodology and Artifact Handling. *IEEE Transactions on Affective Computing*, 2024. DOI: 10.1109/TAFFC.2024.1234567
- [15] KUZNETSOV, A. et al. Inter-individual baseline variations in physiological signals: Impact on machine learning stress detection. *Biomedical Signal Processing and Control*, 2025, roč. 86. DOI: 10.1016/j.bspc.2024.104990
- [16] ROMERO, D. et al. The Operator 5.0: Human-centric manufacturing paradigms. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, 2024. DOI: 10.1080/0951192X.2024.2341234
- [17] RIEKE, N. et al. The future of digital health with federated learning. *NPJ Digital Medicine*, 2020, roč. 3, č. 119. DOI: 10.1038/s41746-020-00323-1
- [18] Wearables Get Moody With the GSR Sensor 2015. <https://www.designnews.com/sensors/wearables-get-moody-with-the-gsr-sensor>

Vplyv stratégie rozdelenia dát na detekciu anomálií v sieťovej prevádzke

Impact of Data Splitting Strategies on Network Traffic Anomaly Detection

Oto Gróf¹ – Ladislav Huraj²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM v Trnave,
Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹grof1@ucm.sk, ²ladislav.huraj@ucm.sk

Abstrakt

Detekcia anomálií v sieťovej prevádzke predstavuje dôležitý nástroj na zabezpečenie spoľahlivosti a bezpečnosti moderných počítačových sietí. V praxi sa na tento účel využívajú metódy učenia s učiteľom aj učenia bez učiteľa, pričom správna stratégia rozdelenia dát má zásadný vplyv na objektívne vyhodnotenie modelov. V tejto práci analyzujeme vplyv náhodného a časovo orientovaného rozdelenia dát na výsledky detekcie anomálií pomocou vybraných algoritmov učenia bez učiteľa, konkrétne Isolation Forest, Local Outlier Factor a DBSCAN. Experimenty ukazujú, že časovo konzistentný split výrazne ovplyvňuje počet detegovaných anomálií, najmä pri globálnych metódach, zatiaľ čo lokálne metódy vykazujú stabilnejšie správanie. Výsledky poukazujú na význam zohľadnenia časového aspektu pri validácii modelov a poskytujú odporúčania pre ich praktické nasadenie v oblasti sieťovej bezpečnosti.

Kľúčové slová: sieťová bezpečnosť, detekcia anomálií, učenie bez učiteľa, časový split

Abstract

Anomaly detection in network traffic represents an important tool for ensuring the reliability and security of modern computer networks. In practice, both supervised and unsupervised learning methods are employed for this purpose, while the chosen data splitting strategy significantly affects objective model evaluation. This paper analyzes the impact of random and time-based data splitting on anomaly detection results using selected unsupervised algorithms, namely Isolation Forest, Local Outlier Factor, and DBSCAN. The experiments demonstrate that time-consistent splitting substantially influences the number of detected anomalies, particularly for global methods, whereas local methods exhibit more stable behavior. The presented results emphasize the importance of

considering temporal aspects during model validation and provide practical recommendations for real-world deployment in network security applications.

Key Words: network security, anomaly detection, unsupervised learning, time-based split

Úvod

Počítačové siete predstavujú základnú infraštruktúru moderných informačných systémov a ich bezpečná a spoľahlivá prevádzka je nevyhnutná pre fungovanie kritických služieb, priemyselných systémov aj bežných používateľských aplikácií. S rastúcim objemom prenášaných dát, zvyšujúcou sa heterogenitou zariadení a dynamickým charakterom sieťovej komunikácie narastá aj komplexnosť zabezpečenia týchto systémov. Tradičné bezpečnostné mechanizmy, založené najmä na detekcii príznakov a statických pravidlách, často nedokážu efektívne reagovať na nové, neznáme alebo rýchlo sa vyvíjajúce typy útokov [1-4].

Jedným z perspektívnych prístupov v oblasti sieťovej bezpečnosti je detekcia anomálií, ktorej cieľom je identifikovať neštandardné správanie v sieťovej prevádzke. Takéto správanie môže indikovať prítomnosť útoku, zlyhanie zariadenia, nesprávnu konfiguráciu alebo iné nežiaduce javy [5]. V posledných rokoch sa v tejto oblasti čoraz viac uplatňujú metódy strojového učenia, a to najmä v prípadoch, keď nie sú k dispozícii kvalitne anotované dáta. V takýchto situáciách nachádzajú široké uplatnenie algoritmy učenia bez učiteľa, ktoré umožňujú odhaliť anomálie bez potreby explicitných identifikátorov tried [2,6,7].

Pri návrhu a hodnotení modelov strojového učenia zohráva zásadnú úlohu stratégia rozdelenia dát na tréningovú a testovaciu množinu. Najčastejšie používaný náhodný split môže viesť k nadhodnoteným výsledkom, najmä v prípade časovo závislých dát, akými je aj sieťová prevádzka. Dochádza tak k tzv. úniku informácií (data leakage), keď model počas tréningu nepriamo využíva informácie z budúcich záznamov.

Alternatívnym prístupom je časovo orientované rozdelenie dát, pri ktorom sa model učí na starších záznamoch a testuje sa na novších, čím sa lepšie simuluje reálne nasadenie systému [1,4,8].

Cieľom tejto práce je analyzovať vplyv rôznych stratégií rozdelenia dát na výsledky detekcie anomálií v sieťovej prevádzke. Konkrétne sa zameriavame na porovnanie náhodného a časového rozdelenia dát pri použití vybraných algoritmov učenia bez učiteľa – Isolation Forest, Local Outlier Factor a DBSCAN. Experimenty sú realizované na reálnych dátach zachytených v univerzitnej sieťovej infraštruktúre pomocou nástroja Wireshark. Výsledky práce poskytujú hlbší pohľad na správanie jednotlivých algoritmov v čase a poukazujú na význam správnej validačnej stratégie pri hodnotení modelov pre praktické nasadenie v oblasti sieťovej bezpečnosti.

1 Metódy a postupy

Táto kapitola opisuje proces zberu a spracovania dát, návrh experimentálneho postupu a použité algoritmy detekcie anomálií. Cieľom je zabezpečiť reprodukovateľnosť experimentov a transparentnosť celého výskumného procesu.

1.1 Zber dát

Dáta použité v experimentoch boli získané monitorovaním reálnej sieťovej prevádzky v univerzitnej lokálnej sieti pomocou nástroja Wireshark. Zber prebiehal počas doby 86 minút a zahŕňal bežnú komunikáciu zariadení, ako sú osobné počítače, mobilné telefóny, inteligentné televízory a ďalšie sieťové prvky. Zachytené dáta boli exportované do formátu CSV, ktorý umožňuje ďalšie spracovanie a analýzu.

Takto získaný dataset reprezentuje reálne správanie siete a obsahuje prirodzenú variabilitu sieťovej prevádzky, vďaka čomu je vhodný na testovanie metód detekcie anomálií. Celkový počet analyzovaných záznamov bol 169 037.

1.2 Predspracovanie dát

Surové dáta získané z Wiresharku obsahujú viacero atribútov, ktoré nie sú priamo vhodné pre vstup do modelov strojového učenia. Preto bolo nevyhnutné vykonať niekoľko krokov predspracovania:

- výber relevantných atribútov zo zachytených paketov,
- konverzia IP adries do numerickej reprezentácie,
- ošetrovanie chýbajúcich hodnôt,

- normalizácia a škálovanie dát [9].

Z pôvodného datasetu boli vybrané nasledujúce atribúty: trvanie komunikácie, zdrojová a cieľová IP adresa, zdrojový a cieľový port pre TCP a UDP protokoly a veľkosť paketu. IP adresy boli transformované na celočíselné hodnoty, čo umožnilo ich využitie ako numerických vstupných premenných, pričom týmto postupom bola zabezpečená aj anonymizácia citlivých sieťových identifikátorov a ochrana súkromia používateľov. Chýbajúce hodnoty boli nahradené nulou.

Na zabezpečenie porovnateľnosti jednotlivých atribútov bolo použité štandardné škálovanie (StandardScaler), ktoré transformuje dáta na nulový stred a jednotkovú smerodajnú odchýlku [10].

1.3 Použité algoritmy detekcie anomálií

V experimentoch boli použité tri vybrané algoritmy učenia bez učiteľa:

Isolation Forest (IF)

Isolation Forest je globálna metóda založená na náhodnom rozdeľovaní dátového priestoru pomocou binárnych stromov. Anomálie sú identifikované ako vzorky, ktoré sú izolované v menšom počte krokov. Algoritmus je výpočtovo efektívny a dobre škálovateľný aj pre veľké datasety [11].

Local Outlier Factor (LOF)

LOF predstavuje lokálnu metódu detekcie anomálií, ktorá porovnáva hustotu okolia jednotlivých bodov s hustotou ich susedov. Vzorky s výrazne nižšou hustotou sú označené ako anomálie. Táto metóda je citlivá na lokálne zmeny v dátach a umožňuje identifikovať jemné odchýlky v správaní siete [12].

DBSCAN

DBSCAN je hustotne založený klastrovací algoritmus, ktorý identifikuje oblasti s vysokou hustotou dát a vzorky mimo týchto oblastí označuje ako šum alebo anomálie. Výhodou tejto metódy je schopnosť detegovať klastre ľubovoľného tvaru a automaticky identifikovať anomálne vzorky bez potreby vopred určovať ich počet [14].

1.4 Stratégie rozdelenia dát

Kľúčovým aspektom experimentálneho návrhu bolo porovnanie dvoch stratégií rozdelenia dát na tréningovú a testovaciu množinu:

- náhodné rozdelenie (random split),
- časovo orientované rozdelenie (time-based split).

Pri náhodnom rozdelení boli dáta rozdelené v pomere 80:20 bez zohľadnenia časovej postupnosti

záznamov. Tento prístup je bežne používaný v praxi, avšak pri časovo závislých dátach môže viesť k nahodnoteným výsledkom [8].

Časovo orientované rozdelenie zachováva chronologické poradie záznamov, pričom staršie dáta sú použité na trénovanie modelu a novšie na jeho testovanie. Tento prístup lepšie simuluje reálne nasadenie systému v prevádzke [1]. Okrem základného rozdelenia 80:20 boli realizované aj experimenty s pomermi 70:30 a 90:10, čo umožnilo analyzovať vplyv veľkosti trénovej množiny na výsledky detekcie anomálií.

1.5 Experimentálny postup

Pre každý variant rozdelenia dát boli modely natrénované na trénovej množine a následne aplikované na testovacie dáta. Výsledkom bola binárna klasifikácia vzoriek na normálne a anomálne. Hlavným hodnotiacim kritériom bol podiel detegovaných anomálií v testovacej množine, ktorý umožnil porovnať správanie jednotlivých algoritmov pri rôznych validačných stratégiách.

Takto navrhnutý experimentálny rámec umožňuje komplexné porovnanie náhodného a časovo orientovaného rozdelenia dát a poskytuje hlbší pohľad na stabilitu a citlivosť vybraných metód detekcie anomálií v sieťovej prevádzke.

2 Výsledky a diskusia

Táto kapitola prezentuje výsledky experimentov zameraných na porovnanie rôznych stratégií rozdelenia dát pri detekcii anomálií v sieťovej prevádzke. Hlavným cieľom bolo analyzovať vplyv náhodného a časovo orientovaného rozdelenia dát na správanie vybraných algoritmov učenia bez učiteľa.

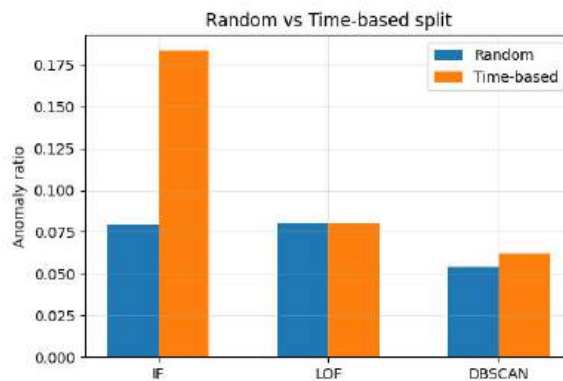
2.1 Porovnanie náhodného a časového rozdelenia dát

V prvom experimente boli porovnané dve validačné stratégie: náhodné rozdelenie dát v pomere 80:20 a časovo orientované rozdelenie v rovnakom pomere. V prípade náhodného rozdelenia boli záznamy vybrané náhodne bez ohľadu na ich časovú postupnosť, zatiaľ čo pri časovom rozdelení boli staršie záznamy použité na trénovanie modelov a novšie na testovanie.

Tabuľka 1 sumarizuje podiel detegovaných anomálií pre jednotlivé algoritmy.

Tabuľka 1 Porovnanie random a time split (80:20)

Algoritmus	Random split [%]	Time split [%]
Isolation Forest	7,96	18,36
Local Outlier Factor	8,00	8,00
DBSCAN	5,43	6,21



Graf 1 Porovnanie random a time-based split pre jednotlivé algoritmy

Výsledky sumarizované v tabuľke 1 sú prehľadne znázornené na grafe 1, ktorý umožňuje priame vizuálne porovnanie jednotlivých validačných stratégií. Z grafu je zrejmy výrazný rozdiel najmä pri algoritme Isolation Forest, kde časovo orientované rozdelenie dát viedlo k viac než dvojnásobnému nárastu podielu detegovaných anomálií v porovnaní s náhodným rozdelením. Tento jav možno vysvetliť dynamickým charakterom sieťovej prevádzky, ktorá sa v čase mení napríklad v dôsledku správania používateľov, aktualizácií softvéru, alebo zmien sieťových služieb. Pri náhodnom rozdelení dochádza k miešaniu starších a novších záznamov, čo vedie k optimistickému skresleniu výsledkov a k podhodnoteniu skutočného výskytu anomálií.

Naopak, algoritmus LOF vykazuje na grafe identické hodnoty pre oba validačné režimy, čo je spôsobené nastavením parametra *contamination*, ktorý definuje očakávaný podiel anomálnych vzoriek v dátach. Tento parameter vynucuje, aby algoritmus označil presne stanovené percento záznamov s najvyšším skóre odľahlosti ako anomálie, a to nezávisle od stratégie rozdelenia dát. Z tohto dôvodu výsledky LOF v tomto experimente neodrážajú prirodzenú dynamiku dát, ale skôr vopred zvolený pomer anomálií, čo je potrebné zohľadniť pri ich interpretácii.

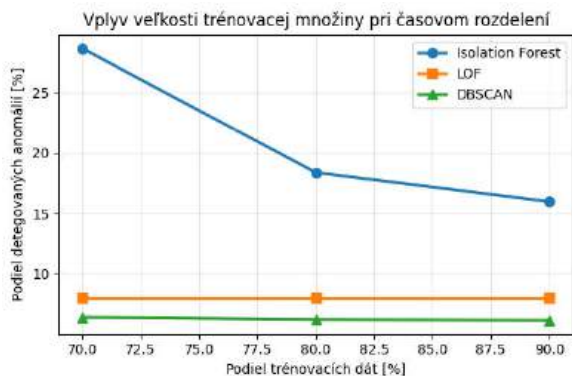
Podobne aj algoritmus DBSCAN dosahuje len mierny nárast detegovaných anomálií pri časovo orientovanom rozdelení, čo naznačuje relatívne stabilnú hustotnú štruktúru dát v čase.

2.2 Vplyv veľkosti trénovacej množiny pri časovom rozdelení

V druhom experimente bol analyzovaný vplyv rôznych pomerov časového rozdelenia dát na správanie jednotlivých algoritmov. Testované boli pomery 70:30, 80:20 a 90:10, pričom vždy platilo, že staršie záznamy tvorili trénovaciu množinu a novšie záznamy slúžili na testovanie.

Tabuľka 2 Výsledky multi time split experimentu

Train [%]	Test [%]	IF [%]	LOF [%]	DBSCAN [%]
70	30	28,63	8,00	6,39
80	20	18,36	8,00	6,21
90	10	15,96	8,00	6,13



Graf 2 Závislosť podielu anomálií od veľkosti trénovacej množiny

Z výsledkov uvedených v Tabuľke 2 a znázornených na grafe 2 je zrejmé, že veľkosť trénovacej množiny má významný vplyv na správanie algoritmu Isolation Forest. Pri použití menšieho objemu historických dát (70 %) model identifikoval až 28,63 % záznamov ako anomálie, čo poukazuje na nedostatočnú reprezentáciu normálneho správania siete v trénovacej množine. So zvyšujúcim sa podielom trénovacích dát dochádza k výraznému poklesu detegovaných anomálií, čo indikuje lepšiu generalizáciu modelu a jeho vyššiu adaptáciu na charakter sieťovej prevádzky.

Naopak, algoritmus LOF vykazuje identický podiel anomálií pre všetky testované pomery rozdelenia, čo je dôsledkom jeho konfigurácie, ako bolo vysvetlené v podkapitole 2.1. Podobný trend je pozorovaný aj pri algoritme DBSCAN, pri ktorom dochádza len k miernym zmenám podielu detegovaných anomálií v závislosti od pomeru rozdelenia dát. Tieto výsledky naznačujú, že lokálne a hustotne založené metódy sú v tomto experimente menej citlivé na veľkosť trénovacej

množiny než globálne metódy, čo môže byť výhodné pri analýze dynamických sieťových prostredí.

2.3 Diskusia

Výsledky experimentov poukazujú na vplyv validačnej stratégie na správanie algoritmov detekcie anomálií. Najmä pri algoritme Isolation Forest sa ukázala vysoká citlivosť na časový aspekt dát a veľkosť trénovacej množiny. Tento jav súvisí s globálnym charakterom algoritmu, ktorý sa snaží modelovať celkovú distribúciu dát. Ak trénovacia množina nedostatočne reprezentuje normálne správanie siete, model má tendenciu označovať väčší počet vzoriek ako anomálne, čo sa výrazne prejavilo pri nižších podieloch trénovacích dát.

Stabilné správanie algoritmu DBSCAN naznačuje, že hustotne založené metódy sú menej citlivé na zmeny veľkosti trénovacej množiny a časovú dynamiku dát. Tento charakter umožňuje robustnejšiu identifikáciu lokálnych odchýlok v správaní siete aj v prostredí s meniacimi sa prevádzkovými podmienkami. V prípade algoritmu LOF však pozorovaná stabilita vyplýva predovšetkým z nastavenia parametra *contamination*, ktorý vynucuje pevne stanovený podiel detegovaných anomálií, a preto neumožňuje objektívne posúdiť jeho citlivosť na časové zmeny v dátach.

Získané poznatky poukazujú na význam časového kontextu pri návrhu experimentov v oblasti detekcie anomálií. V prostrediach, kde dochádza k postupným alebo náhlym zmenám správania siete, je potrebné voliť validačné stratégie, ktoré čo najvernejšie simulujú reálne podmienky nasadenia. Tým sa minimalizuje riziko nadhodnotených výsledkov a zvyšuje sa praktická využiteľnosť navrhovaných modelov.

Záver

Cieľom tejto práce bolo analyzovať vplyv rôznych stratégií rozdelenia dát na výsledky detekcie anomálií v sieťovej prevádzke pri použití vybraných algoritmov učenia bez učiteľa. Pozornosť bola zameraná na porovnanie náhodného a časovo orientovaného rozdelenia dát, ako aj na skúmanie vplyvu veľkosti trénovacej množiny pri časovom rozdelení.

Experimentálne výsledky potvrdili, že voľba validačnej stratégie má vplyv na hodnotenie správania modelov. Náhodné rozdelenie dát môže viesť k podhodnoteniu výskytu anomálií a k nadhodnoteniu výkonnosti modelu, zatiaľ čo časovo orientované rozdelenie poskytuje realističnejší obraz o jeho správaní v reálnych prevádzkových podmienkach. Najvýraznejšie rozdiely boli pozorované pri algoritme

Isolation Forest, ktorý vykazoval vysokú citlivosť na časový aspekt dát a veľkosť trénovacej množiny.

Získané výsledky poukazujú na nevyhnutnosť zohľadnenia časovej štruktúry dát pri návrhu a hodnotení systémov detekcie anomálií v oblasti sieťovej bezpečnosti. Do budúcnosti je možné prácu rozšíriť o testovanie ďalších algoritmov, kombináciu viacerých validačných stratégií a experimentálne overenie navrhnutého prístupu v reálnom sieťovom prostredí.

PodĎakovanie

Príspevok je súčasťou riešenia projektu KEGA 011UCM-4/2024 *Výučba a tréning bezpečnosti IoT s využitím moderných technológií*.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] K OUMAR, J.; HYNEK, K.; ČEJKA, T. a ŠIŠKA, P., (2025). CESNET-TimeSeries24: Time Series Dataset for Network Traffic Anomaly Detection and Forecasting. *Scientific Data*, vol. 12, p. 338. <https://doi.org/10.1038/s41597-025-04603-x>
- [2] T HUDUMU, S.; BRANCH, P.; JIN, J. et al., (2020). A comprehensive survey of anomaly detection techniques for high dimensional big data. *Journal of Big Data*, vol. 7, p. 42. <https://doi.org/10.1186/s40537-020-00320-x>
- [3] P ANG, G.; SHEN, C.; CAO, L. a VAN DEN HENGEL, A. V. D., (2021). Deep Learning for Anomaly Detection: A Review. *ACM Computing Surveys*, vol. 54, no. 2, Article 38. <https://doi.org/10.1145/3439950>
- [4] I GLESIAS VÁZQUEZ, F.; MARQUES, H. O.; ZIMEK, A. et al., (2025). What do anomaly scores actually mean? Dynamic characteristics beyond accuracy. *Data Mining and Knowledge Discovery*, vol. 39, Article 2. <https://doi.org/10.1007/s10618-024-01077-0>
- [5] FOORTHUIS, R., (2021). On the nature and types of anomalies: a review of deviations in data. *International Journal of Data Science and Analytics*, vol. 12, no. 4, pp. 297–331. <https://doi.org/10.1007/s41060-021-00265-1>
- [6] PARK, H.; SHIN, D.; PARK, C.; JANG, J. a SHIN, D., (2025). Unsupervised Machine Learning Methods for Anomaly Detection in Network Packets. *Electronics*, vol. 14, no. 14, p. 2779. <https://doi.org/10.3390/electronics14142779>
- [7] LANVIN, M.; GIMENEZ, P.-F.; HAN, Y.; MAJORCZYK, F.; MÉ, L. a TOTEL, E., (2023). Towards Understanding Alerts Raised by Unsupervised Network Intrusion Detection Systems. In: *Proceedings of the 26th International Symposium on Research in Attacks, Intrusions and Defenses (RAID 2023)*. Association for Computing Machinery, pp. 135–150. <https://doi.org/10.1145/3607199.3607247>
- [8] PERINI, L.; GALVIN, C. a VERCRUYSEN, V., (2020). A Ranking Stability Measure for Quantifying the Robustness of Anomaly Detection Methods. In: *ECML PKDD 2020 Workshops. Communications in Computer and Information Science*, vol. 1323. Springer, Cham, pp. 397–408. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65965-3_27
- [9] UMAR, M. A.; CHEN, Z. F.; SHUAIB, K. a LIU, Y., (2025). Effects of feature selection and normalization on network intrusion detection. *Data Science and Management*, vol. 8, no. 1, p. 23.
- [10] WONGOUTONG, C., (2024). The impact of neglecting feature scaling in k-means clustering. *PLOS ONE*, vol. 19, no. 12, e0310839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0310839>
- [11] ELSAID, S. A. a BINBUSAYYIS, A., (2024). An optimized isolation forest based intrusion detection system for heterogeneous and streaming data in the industrial Internet of Things (IIoT) networks. *Discover Applied Sciences*, vol. 6, p. 483. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06165-w>
- [12] ADESH, A.; S. G.; SHETTY, J. a XU, L., (2024). Local outlier factor for anomaly detection in HPC systems. *Journal of Parallel and Distributed Computing*, vol. 192, Article 104923. <https://doi.org/10.1016/j.jpdc.2024.104923>
- [13] LIU, Y.; SONG, B.; WANG, L.; GAO, J. a XU, R., (2020). Power Transformer Fault Diagnosis Based on Dissolved Gas Analysis by Correlation Coefficient-DBSCAN. *Applied Sciences*, vol. 10, no. 13, p. 4440. <https://doi.org/10.3390/app10134440>

Mobilný most medzi desktopovým programovacím agentom a iPhone klientom

A mobile bridge between a desktop coding agent and an iPhone client

Peter Hafner¹ – Michal Čerňanský²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹hafner1@ucm.sk, ²michal.cernansky@ucm.sk

Abstrakt

Štúdia analyzuje implementovaný systém navrhnutý na sprístupnenie lokálne bežiacieho desktopového programovacieho agenta na platforme macOS prostredníctvom natívneho iPhone klienta. Riešenie nevyužíva vlastný cloudový relay backend; namiesto toho kombinuje lokálny `codex app-server`, natívny macOS bridge, natívnu iOS aplikáciu a protokolové modely v jazyku Swift udržiavané v oboch targetoch. Ťažisko textu spočíva v analýze architektúry a runtime mechanizmov systému, najmä komunikačného modelu, obnovy spojenia a schvaľovacieho workflow. Metodicky ide o architektonicko-implentačný rozbor aktuálneho prototypu; text nemá charakter výkonnej ani používateľskej evaluačnej štúdie.

Kľúčové slová: mobilný klient, softvérová architektúra, WebSocket, JSON-RPC, iOS, macOS

Abstract

This study analyzes an implemented system designed to expose a locally running desktop coding agent on macOS through a native iPhone client. The solution avoids a dedicated cloud relay backend and combines a local `codex app-server`, a native macOS bridge, a native iOS application, and Swift protocol models maintained in both targets. The analysis focuses on architecture and runtime mechanisms, especially protocol design, reconnect behavior, and approval handling. Methodologically, it

is an architecture-and-implementation study of the current prototype rather than a performance or user evaluation. **Key words:** mobile client, software architecture, WebSocket, JSON-RPC, iOS, macOS

Úvod

AI asistované programovanie ostáva prirodzene viazané na desktopové prostredie, pretože práve tam sa nachádza projektový kontext, terminál, lokálne súbory aj nástroje potrebné na vykonávanie schvaľovaných akcií. Mobilné zariadenie je však prakticky užitočné vo chvíľach, keď používateľ nepotrebuje plnú editáciu kódu, ale potrebuje sledovať priebeh behu, reagovať na schvaľovanie, prerušiť úlohu alebo skontrolovať stav vlákna mimo pracovnej stanice. Z architektonického hľadiska preto nejde o „prenesenie desktopu do mobilu“, ale skôr o návrh prakticky použiteľného mosta medzi lokálnym desktopovým agentom a ľahším mobilným klientom.

Práca sa sústreďuje na otázku, či možno aj bez vlastnej cloudovej relay vrstvy navrhnuť mobilný prístup, ktorý ostane prakticky použiteľný pri obnove spojenia, schvaľovacom workflow a obmedzeniach mobilnej platformy. V analyzovanom prototypu na macOS beží lokálny bridge, ktorý komunikuje s desktopovým backendom cez JSON-RPC [3] a voči iPhone klientovi vystupuje ako WebSocket server [4]. Takéto riešenie ponecháva kontext na používateľovom počítači a znižuje počet prevádzko-

vých závislostí, no zároveň kladie nároky na explicitný protokol, obnovu stavu po prerušení spojenia a zvládnutie background obmedzení mobilnej platformy [1, 2]. Článok má preto charakter technickej prípadovej štúdie zameranej na architektúru, protokol a hlavné runtime scenáre aktuálnej implementácie.

1 Cieľ a prínos práce

Cieľom práce je analyzovať architektúru a runtime mechanizmy implementovaného systému a preskúmať, či možno bez cloud relay vrstvy podporiť mobilný prístup k desktopovému programovaciemu agentovi pri zachovaní praktickej použiteľnosti počas obnovy spojenia, schvaľovacieho workflow a mobilných runtime obmedzení. Jadrom textu preto nie je produktový opis, ale rozbor rozdelenia zodpovedností medzi lokálny backend, macOS bridge, iOS klienta a protokolovú vrstvu.

Metodicky ide o technickú prípadovú štúdiu založenú na statickej analýze zdrojového kódu, sledovaní tokov správ medzi hlavnými komponentmi a kvalitatívnom rozbere vybraných runtime scenárov odvodených z implementácie. Text preto nepredkladá formálnu verifikáciu, benchmarky ani používateľskú štúdiu. Výklad vychádza zo zdrojového kódu hlavných koordinačných, transportných, stavových a notifikačných komponentov implementácie, najmä modulov `BridgeCoordinator`, `CodexAccessibilityService`, `BridgeWebSocketClient`, `BridgeAppModel`, `BridgePersistenceStore`, `NotificationManager` a `RunLiveActivityManager`.

Implementačný prínos práce spočíva v zdokumentovaní prototypu, ktorý v aktuálnom stave podporuje párovanie, autentifikované WebSocket spojenie, navigáciu projektov a vlákien, optimistic update, replay po obnove spojenia, schvaľovací workflow, prerušenie behu, lokálnu perzistenciu a notifikačnú vrstvu. Architektonický prínos spočíva v explicitnom opise rozdelenia medzi lokálny `codex app-server`, stavový macOS bridge a iOS klient s vlastnou cache a mechanizmami obnovy. Poznatkový prínos práce spočíva v identifikácii mechanizmov rozhodujúcich pre lokálne orientovaný mobilný prístup, najmä iden-

tity klienta, idempotencie akcií, deduplikácie udalostí, serverom riadenej synchronizácie a obnovy timeline po prerušení spojenia.

2 Architektúra systému

2.1 Komponenty riešenia

Na obrázku 1 sa nachádza architektúra systému. Hlavným koordinačným prvkom na macOS je trieda `BridgeCoordinator`, ktorá spravuje WebSocket listener, párovanie zariadení, distribúciu stavových správ, replay timeline, schvaľovacie akcie aj ochranu proti nechcenému uspaniu počítača pri pripojenom klientovi alebo aktívnom behu. V navrhutej architektúre tak bridge neplní len úlohu transportnej proxy, ale udržiava aj časť prevádzkového stavu systému.

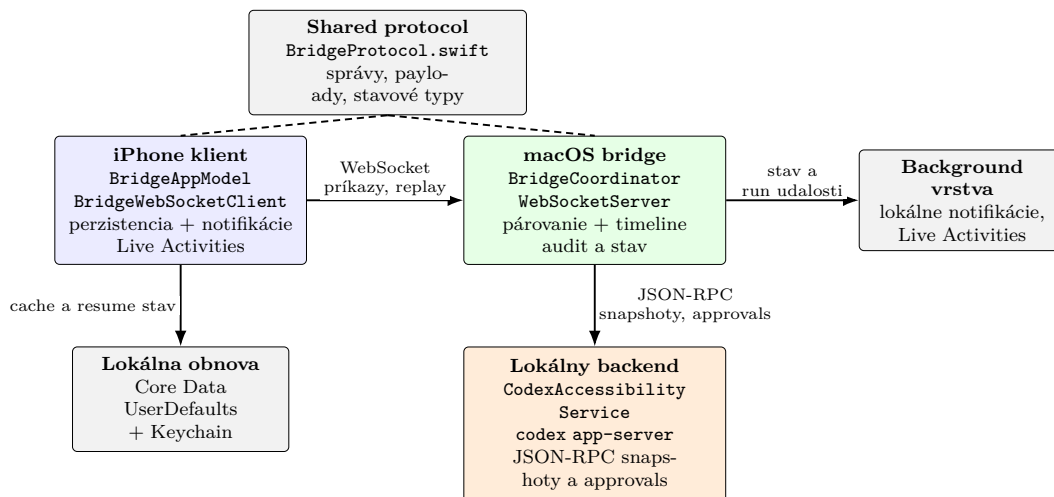
Komunikáciu s lokálnym `codex app-server` na desktopovej strane sprostredkúva adaptér `CodexAccessibilityService`, ktorý načítava snapshoty projektov, vlákien a správ, sleduje aktívny beh, rozpoznáva schvaľovacie požiadavky a prekladá ich do mobilne použiteľných správ. Na iOS strane zabezpečuje transport trieda `BridgeWebSocketClient`, zatiaľ čo stavový model `BridgeAppModel` riadi optimistic send, replay handshake, deduplikáciu a obnovu stavu po štarte aplikácie. Lokálnu cache správ, projektov a vlákien spravuje `BridgePersistenceStore` postavený nad `Core Data` [6].

Zdieľanú protokolovú vrstvu tvoria synchronizované súbory `BridgeProtocol.swift` v iOS a macOS targete. Tieto súbory definujú typy klientskych a serverových správ, obálku `BridgeEnvelope` aj dátové modely používané na oboch platformách. Praktickým dôsledkom je jednotný typový jazyk pre správy ako `message_added`, `approval_required`, `run_finished` alebo `server_lifecycle`.

2.2 Návrhové rozhodnutia

Kľúčovým rozhodnutím je absencia vlastného cloudového relay backendu. Systém ostáva lokálne orientovaný: výpočtový kontext, komunikácia s projektom

Obr. 1: Architektúra navrhovaného systému: iOS klient, macOS bridge a lokálny backend.



Zdroj: vlastné spracovanie.

aj auditné záznamy zostávajú na používateľovom Macu. Táto voľba znižuje prevádzkovú zložitosť, no zároveň viaže riešenie na dostupný lokálny backend a vhodné sieťové prostredie. Druhým rozhodnutím je rozdeliť komunikáciu podľa charakteru prevádzky: medzi bridge a desktopovým backendom sa používa JSON-RPC, medzi bridge a iPhone klientom WebSocket. Treťou voľbou je session-orientovaná timeline v SQLite úložisku `session-timeline.sqlite`, ktorá umožňuje prehranie chýbajúcich udalostí po obnove spojenia namiesto návratu k neúplnému snapshotu.

3 Komunikačný model a protokol

Komunikačné rozhranie medzi iOS klientom a macOS bridge je postavené na obálke `BridgeEnvelope`. Každá správa nesie verziu protokolu, typ správy, voliteľné `requestID`, autentifikačný token, `sessionID`, `eventID` a payload. Prítomnosť `sessionID` a `eventID` ukazuje, že protokol neslúži iba ako klasické request-response API, ale aj ako transport pre timeline udalosti, ktoré možno po prerušení spojenia prehrávať a explicitne potvrdzovať správou `ack`.

Na strane klienta sú implementované správy pre párovanie, obnovu session, navigáciu medzi projektmi a vláknami, odosielanie správ, schvalovacie akcie a heartbeat. Bridge na ne odpovedá inicializačnými, synchronizačnými, stavovými a prevádzkovými správami. Protokol tak spája inicializačné, interaktívne aj prevádzkové správy v jednom kanáli.

Dôležité je, že payloady ako `HelloPayload`, `ReplayEventPayload` či `MessageItem` nesú priamo údaje potrebné pre obnovu session a priebežné streamovanie odpovede vrátane `streamID`, `streamSeq` a `streamFinal`.

V tabuľke 1 sú zhrnuté hlavné skupiny správ. V aktuálnom stave je replay prednostne viazaný na aktívne vlákno, pretože iOS klient používa ako resume identifikátor predovšetkým `selectedThreadID`. Ide o praktický kompromis: zoznam projektov a vlákien sa po obnove spojenia obnovuje samostatne, zatiaľ čo detailná história konverzácie využíva `replay` a `request_sync`.

Tabuľka 1: Vybrané skupiny správ v protokole navrhovaného systému

Správy	Úloha v systéme
pair_request, paired_ok	prvotné párovanie zariadenia a priradenie deviceID
hello, welcome, replay_event, replay_done, ack	obnova session, prehratie chýbajúcich eventov a potvrdenie ich aplikovania
list_projects, list_threads, select_thread, request_sync, sync_snapshot	navigácia medzi projektmi a vláknami a synchronizácia transcriptu
send_user_message, message_added, run_finished, stop_run	odoslanie používateľskej správy, doručovanie odpovede a riadenie aktívneho behu
approval_required, approve_action, approval_resolved	mobilná obsluha schvaľovacích rozhodnutí
status, server_lifecycle, ping	prevádzkové informácie, lokálne notifikácie a heartbeat

4 Hlavné runtime scenáre

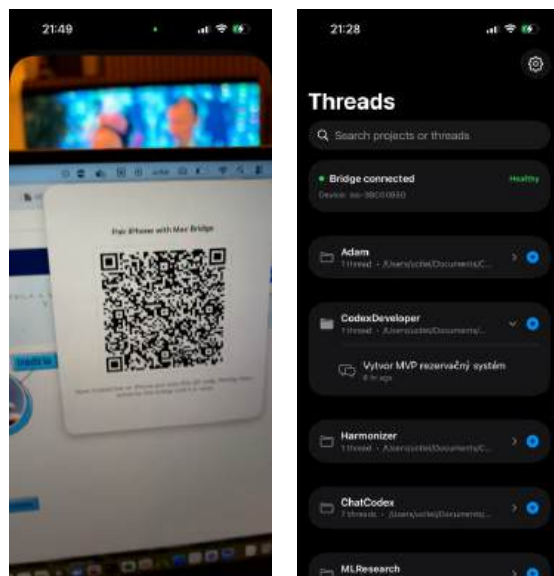
4.1 Párovanie, inicializácia a výber vlákna

Prvým scenárom je párovanie zariadenia. V macOS moste generuje `PairingManager` 48-znakový alfanumerický token pomocou `SecRandomCopyBytes`, ukladá ho do Keychain a spolu s endpointmi z `NetworkEndpointResolver` ho zabalí do QR payloadu. iOS klient po načítaní uloží token do vlastného Keychain úložiska, pripojí sa na zvolený endpoint a odošle `pair_request`. Po úspešnom overení tokenu bridge vráti `paired_ok` a označí konkrétne spojenie za autentifikované.

Po párovaní klient obnoví naposledy známy projekt, vlákno, identitu zariadenia a naposledy vidенý event. Z Core Data načíta lokálnu cache a pri otvorení vlákna použije `select_thread` a `request_sync`, čím kombinuje rýchle lokálne zobrazenie transcriptu s následnou serverom riadenou synchronizáciou.

Na obrázku 2 sa nachádza prvý kontakt iPhone klienta so systémom. Ľavá časť zachytáva QR kód generovaný macOS bridge pre párovanie zariadenia, pravá časť následný zoznam projektov a vlákien v iOS klientovi po úspešnom nadviazaní spojenia.

Obr. 2: Párovanie zariadenia a zoznam projektov a vlákien v iOS klientovi.



a) QR kód generovaný macOS bridge b) zoznam projektov a vlákien po párovaní

Zdroj: vlastné spracovanie.

4.2 Odoslanie správy a synchronizácia odpovede

Pri odoslaní používateľskej správy vytvorí `BridgeAppModel` optimistic riadok s identifikátorom odvodeným od `clientActionID` a okamžite ho vloží do lokálneho transcriptu. Súčasne si klient uloží metadáta potrebné na neskoršie zlučovanie odpovedí a prípadný sync fallback. Bridge spracúva `send_user_message` idempotentne podľa kombinácie `sessionID`, `clientID` a `clientActionID`. Ak už danú akciu pozná, vráti uložený výsledok; inak ju odovzdá backendu a po prijatí emituje syntetické echo `bridge-user-echo-<clientActionID>` ako rýchle aplikačné potvrdenie.

Na iOS strane potom nastupuje zlučovacia logika: klient odstraňuje duplikáty, zlučuje assistant fragmenty podľa `streamID/streamSeq` a zosúladuje syntetické echo s prichádzajúcim transcriptom. Ak sa odpoveď neobjaví v očakávanom čase, model spustí sync fallback s timeoutom 45 sekúnd a opakovaným `request_sync` až do šiestich minút. Prijímanie streamovaných assistant odpovedí je navyše filtrované proti duplicitnému doručeniu, pretože klient akceptuje iba rastúce hodnoty `streamSeq`.

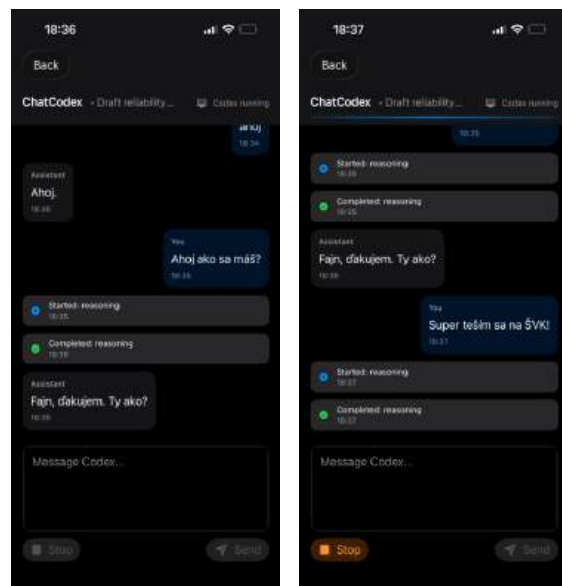
Na obrázku 3 sa nachádza samotné chatové rozhranie iOS klienta. Ľavá časť zachytáva stav po doručení odpovede do transcriptu, zatiaľ čo pravá časť zobrazuje aktívny beh s priebežnými stavovými riadkami a možnosťou zásahu používateľa.

4.3 Replay, reconnect a obnova session

Obnova spojenia patrí medzi najdôležitejšie scenáre celého systému. Po úspešnom párovaní klient odošle správu `hello` s `session_id`, `client_id` a `last_event_id_seen`. Bridge odpovie správou `welcome`, prehrá chýbajúce `replay_event` a ukončí replay cez `replay_done`. iOS klient si následne aktualizuje najvyššie videné `eventID` a potvrdí ich správou `ack`. Na filtrovanie oneskorených alebo duplicitných udalostí používa mapu `lastSeenEventIDBySession` aj obmedzenú množinu nedávno videných identifikátorov.

Robustnosť obnovy spojenia podporuje aj

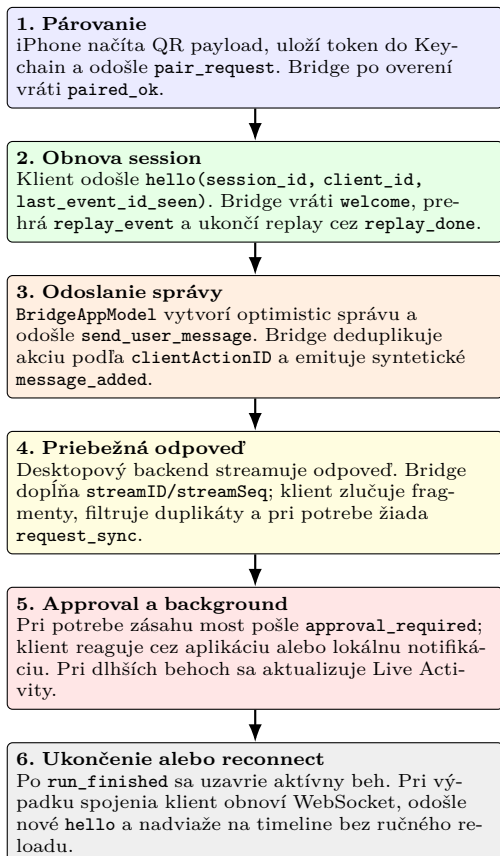
Obr. 3: Chatové rozhranie iOS klienta pri prehliadaní transcriptu a počas aktívneho behu.



a) transcript po doručení odpovede b) aktívny beh s priebežnými stavovými riadkami

Zdroj: vlastné spracovanie.

Obr. 4: Hlavný runtime tok systému od párovania po obnovu session.



Zdroj: vlastné spracovanie.

transportná vrstva. BridgeWebSocketClient používa URLSessionWebSocketTask, zapína waitsForConnectivity, udržiava ping loop s 12-sekundovým intervalom a pri chybe obnovuje spojenie exponenciálnym backoffom obmedzeným na 20 sekúnd. Prijaté správy sa spracujú len vtedy, ak patria aktívnej generácii socketu, čím sa obmedzuje riziko zásahov oneskorených callbackov zo starého spojenia.

Na obrázku 4 sa nachádza zhrnutie hlavného runtime toku od párovania po obnovu session.

4.4 Approval workflow, background režim a notifikácie

Schvalovací workflow patrí medzi prakticky najdôležitejšie scenáre mobilného mosta. CodexAccessibilityService deteguje JSON-RPC požiadavky vyžadujúce rozhodnutie používateľa, extrahuje z nich pracovný adresár, dôvod a príkaz a vytvára ApprovalItem. Po prijatí approval_required vloží iOS klient položku do fronty, označí príslušné vlákno ako čakajúce na potvrdenie a aktualizuje Live Activity fázu na awaitingApproval. Voľby approve_once, approve_session a deny bridge mapuje na backendové akcie accept, acceptForSession a decline; lokálne notifikačné akcie sú navyše chránené voľbou authenticationRequired.

Background správanie klienta je navrhnuté ako kombinácia krátko reconnect okna, lokálnych notifikácií a Live Activities. BridgeAppModel vie pri prechode do pozadia otvoriť dočasný background task a po obmedzený čas udržiavať spojenie pravidelným pingom. Ak platforma dlhšie udržanie spojenia neumožní, návrh sa opiera o lokálne kategórie approval_required a run_finished; dlhšie behy zároveň reprezentuje komponent RunLiveActivityManager [5].

Na obrázku 5 sa nachádzajú tri reprezentatívne stavy Live Activity na zamknutej obrazovke: aktívny beh, čakanie na potvrdenie a ukončený beh. Obrázky ukazujú, ako sa runtime stav mosta prenáša do mobilnej vrstvy aj mimo samotného chatového rozhrania.

5 Pozorovania z aktuálnej implementácie

Analýza aktuálnej implementácie naznačuje, že najkonzistentnejšie rozpracovanou časťou systému je komunikačná a stavová vrstva. Bridge nepracuje s jediným aktívnym socketovým spojením, ale s kombináciou autentifikovaných spojení, registrovaných zariadení, timeline udalostí, per-client potvrdení a idempotentných klientskych akcií. Táto kombinácia mechanizmov je navrhnutá tak, aby pri dočasnom vý-

Obr. 5: Live Activity v troch stavoch na zamknutej obrazovke iPhone.



a) aktívny beh

b) čakanie na potvrdenie

c) ukončený beh

Zdroj: vlastné spracovanie.

padku siete alebo po návrate aplikácie z pozadia umožňovala obnoviť stav konzistentný s aktuálne dostupným desktopovým stavom bez úplného ručného načítania konverzácie.

Samostatnú vrstvu tvorí riadenie aktívneho behu. Bridge sleduje pripojené iPhone aj množinu aktívnych behov, na základe ktorých riadi `NoIdleSleepAssertion`, a publikuje prevádzkový stav cez `StatusPayload` s módmami `Pairing`, `CodexNotRunning`, `CodexUIUnmapped`, `Healthy` a `Degraded`. Označenie `CodexUIUnmapped` je v aktuálnom kóde ponechané ako kompatibilný názov pre stav, keď backend ešte nedokončil inicializáciu. Lokálna perzistencia využíva `Core Data` a `UserDefaults`, takže klient po štarte neotvára prázdne rozhranie, ale môže nadviazať na naposledy známy stav. Prevádzkovú diagnostiku dopĺňa JSONL auditná stopa a samostatná SQLite timeline.

6 Bezpečnosť, robustnosť a limity

Bezpečnostný model systému vychádza z párovacieho tokenu a z predpokladu dôveryhodného lokálneho alebo overlay sieťového prostredia. Párovací token je generovaný kryptograficky bezpečným zdrojom náhodnosti a na oboch platformách sa ukladá do Keychain. Bridge následne overuje nielen prítomnosť

tokenu v správach, ale aj to, či je príslušné socketové spojenie po párovaní označené ako autentifikované. Aktuálna implementácia pritom používa WebSocket spojenia typu `ws://`, teda bez samostatne riešenej TLS vrstvy v rámci prototypu; bezpečnostné vlastnosti transportu sú preto viazané na podmienky lokálneho alebo overlay nasadenia. Pri notifikačných approval akciách systém využíva aj mechanizmus `authenticationRequired` dostupný v iOS. Takto navrhnutá ochrana je primeraná lokálne orientovanému prototypu, nie však verejne exponovanej internetovej službe alebo prostrediu s aktívnym útočníkom na transportnej vrstve.

Robustnosť návrhu je podporená viacerými dopĺňajúcimi sa mechanizmami: heartbeat na oboch stranách, automatická obnova spojenia, replay po reconnecte, aplikačná deduplikácia správ, optimistické send a opakované fallback volania `request_sync`. Tieto mechanizmy nezakladajú formálnu garanciu konzistencie, ale v implementácii znižujú pravdepodobnosť straty kontextu pri bežných prerušeníach spojenia.

Limity riešenia vyplývajú najmä z jeho lokálneho charakteru v Apple ekosystéme: z potreby dostupného Macu s bežiacim backendom, vhodnej lokálnej alebo overlay siete, väzby na konkrétnu architektúru klienta a z prirodzených obmedzení background režimu iOS. Práve tieto limity zároveň vymedzujú rozsah záverov tejto prípadovej štúdie.

7 Diskusia a ďalšie rozšírenia

Prírodným pokračovaním projektu je spevnenie identity zariadení, formalizácia protokolových kontraktov a cieľené testy replay handshake, zlučovania streamovaných odpovedí a approval workflow. Ďalší odborný rozvoj môže doplniť lepšiu observabilitu obnovy spojenia a systematickejšie experimentálne alebo používateľské overenie; súčasný text sa však zámerne obmedzuje na architektonicko-implentačný rozbor. Otvorenou otázkou ostáva aj miera prenositeľnosti navrhnutých mechanizmov mimo konkrétnej kombinácie macOS bridge, iOS klienta a lokálneho `codex app-server`.

8 Záver

Práca analyzuje implementovaný lokálny prototyp mobilného prístupu k desktopovému programovaciemu agentovi bez vlastného cloudového relay backendu. Rozbor architektúry a runtime mechanizmov ukazuje jasné rozdelenie zodpovedností medzi lokálny backend, macOS bridge, iOS klienta a zdieľaný protokol.

Pre praktickú použiteľnosť aktuálnej implementácie sú kľúčové najmä mechanizmy replay, optimistic send pipeline, explicitný approval workflow a background vrstva postavená na lokálnych notifikáciách a Live Activities. Aktuálna implementácia naznačuje, že lokálne mobilné sprístupnenie desktopového agenta môže byť v praxi použiteľné aj bez transformácie systému na plnohodnotnú cloudovú službu, pokiaľ návrh explicitne rieši obnovu spojenia, stavovú synchronizáciu a limity lokálneho nasadenia i mobilnej platformy.

Literatúra

- [1] ISO/IEC/IEEE (2022) ISO/IEC/IEEE 42010:2022 Software, systems and enterprise – Architecture description.
- [2] Bass L., Clements P., Kazman R. (2022) Software Architecture in Practice. 4th ed. Addison-Wesley.
- [3] JSON-RPC Working Group (2013) JSON-RPC 2.0 Specification. <https://www.jsonrpc.org/specification>
- [4] Fette I., Melnikov A. (2011) The WebSocket Protocol. RFC 6455. <https://www.rfc-editor.org/rfc/rfc6455>

[5] Apple Inc. Displaying live data with Live Activities. [Citované: 7. marec 2026] <https://developer.apple.com/documentation/activitykit/displaying-live-data-with-live-activities>

[6] Apple Inc. Core Data Programming Guide. [Citované: 7. marec 2026] <https://developer.apple.com/documentation/coredata>

Priestorový vývoj biotopu svišťa v Ďumbierskych Tatrách na príklade masívu Prašivej

Spatial Development of the Tatra Marmot Habitat in Dumbier Tatras - Case Study in Prasiva Massif

Tomáš Hrdý¹ – Pavel Hronček² – Peter Urban³

^{1,3}Katedra biológie a environmentálnych štúdií, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

²Katedra geografie a geológie, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica

¹ tomas.hrdy@umb.sk, ² pavel.hroncek@umb.sk, ³ peter.urban@umb.sk

Abstrakt

Svišť vrchovský tatranský (*Marmota marmota latirostris*) patrí medzi dva vlajkové druhy v alpínskom pásme biotopu Ďumbierskych Tatier. Ide o jednu z dvoch oblastí u nás, kde sa tento karpatský endemit vyskytuje. Počas posledných desaťročí toto prostredie prekonalo niekoľko transformácií v oblasti využívania krajiny, sukcesných procesov alebo klimatickej zmeny. Súčasný výsledok sú veľmi znepokojujúce. Podľa Červenej knihy cicavcov Slovenska (Urban a kol., 2024) je druh zaradený do kategórie kriticky ohrozený. Plocha vhodného biotopu aj počet jedincov klesajú. Medzi kľúčové dôvody patrí fragmentácia biotopu, turizmus či prítomnosť prirodzených predátorov. Pomocou historicko-geografických metód, metód priestorovej analýzy a modelovania krajiny pokrývky sa snažíme rekonštruovať historický stav biotopu s cieľom navrhnúť vhodný model biotopu pre tento druh v oblasti masívu Prašivá v Nízkych Tatrách, kde sa svišť prirodzene vyskytoval, avšak posledné pozorovania už nenaznačujú jeho prítomnosť. Výsledky výskumu by mohli viesť k zmenám v manažmente tohto alebo jemu podobných území vhodných pre život tak významného druhu.

Kľúčové slová: svišť, Prašivá, krajinná pokrývka, horná hranica lesa, alpínske lúky, kosodrevina

Abstract

Tatra Marmot (*Marmota marmota latirostris*) belongs to two main flag species in the alpine zone habitat of the Dumbier Tatras in the Western Carpathians and this is also one of only two areas in which this carpathian endemit is occurring. During the last decades, this environment has overcome several transformations in land use activities, succession

processes or climate changes. Present results are very disturbing. By the Red Book of Mammals of Slovakia (Urban et al., 2024) the species is categorized as very endangered. Area of the suitable habitat and number of individuals are both declining. Some of the key reasons are fragmentation of the habitat, tourist disturbances or natural predators' presence. Using historical-geographical methods, GIS spatial analysis methods, land cover modelling, studying archival materials, old maps and land cover development we are trying to reconstruct historical state of the habitat in order to suggest suitable habitat model of the species in the area of the Prasiva Massif, Low Tatra Mts., where the marmot used to live for couple years but last observations do not indicate the presence of the species any more. This could lead to the changes in the management of other territories, which belong to the protected areas of the Low Tatras National Park, where there is a high potential that the marmot could also disappear from them.

Key Words: marmot, Prasiva, land cover, natural grasslands, dwarf-pine

Úvod

Jones a kol. (1994) ale aj Power a kol. (1996) spomínajú ako najvýznamnejší faktor vplyvajúci na diverzitu alpínskej vegetácie tzv. "ekosystémových inžinierov". Radíme sem napr. väčšie hlodavce, ktoré žijú v kolóniách a vytvárajú si prepojený systém nôr [1,2]. V alpínskom prostredí Nízkych Tatier pod týmto pojmom chápeme endemický poddruh svišťa vrchovského tatranského (*Marmota marmota latirostris* Kratochvíl, 1961) [3]. Svišť patrí medzi sociálne hlodavce žijúce v rodinných zoskupeniach (Obr. 1). Rodina obýva spoločné teritórium, ktoré si bráni a jej členovia spolu hibernujú v spoločnej zimnej

nore [4]. Ak si chcú mladé jedince založiť novú kolóniu, musia obsadzovať nové teritória alebo vytlačiť rodiča rovnakého pohlavia [5]. Hoci boli zaznamenané prípady, kedy svište dokázali migrovať aj niekoľko kilometrov a prekonať značné fyzicko-geografické bariéry [6,7], disperzia znamená vysoké riziko úmrtia a pre mladé jedince je najvýhodnejšie zotrvať v pôvodnej kolónii, pretože s vekom sa zvyšuje aj reprodukčný úspech [8].



Obr. 1 Svišť vo svojom prirodzenom biotope v Ďumbierskych Tatrách s prítomnosťou skál, z ktorých má dobrý rozhľad do okolia

Na rozlohu ale aj vznik alpínskych lúk na hlavnom hrebeni západnej časti Nízkyh Tatier mal dominantný vplyv človek svojou dlhotrvajúcou činnosťou. Už v 13. stor. začal túto krajinu osídľovať, odlesňovať kvôli baníctvu, valašská kolonizácia mala za následok vypásanie odlesnených území, vznik a rozširovanie pasienkov a znižovanie hornej hranice lesa [9]. Tá bola na niektorých miestach znížená o niekoľko desiatok výškových metrov [10]. Dnes je táto oblasť chránená ako súčasť Národného parku Nízke Tatry, od druhej polovice 20. storočia bolo zanechané pasenie a najväčší vplyv v súčasnosti na podobu pretrvaných alpínskych lúk majú vplyv turizmu, výstavba a rozvoj rekreačných oblastí a v neposlednom rade klimatická zmena a s ňou súvisiaca sukcesia.

Svišť v Ďumbierskych Tatrách obýva alebo v minulosti obýval oblasť Prašivej, Malej a Veľkej Chochule a tiež územie od Chabenca, Skalky, Bôru po Ďumbier a Štiavnicu. V roku 2003 jeho počet odhadovali na 25 kolónií [11]. Posledné výsledky poukazujú na existenciu už len Ďumbierskych kolónií s výrazne nižším počtom jedincov. Aj preto bol druh v roku 2024 preradený do kategórie kriticky ohrozený [12]. Cieľom príspevku je analyzovať priestorové zmeny vývoja rozlohy biotopu svišťa v Ďumbierskych Tatrách v geomorfologickej časti Prašivá. Študovanú oblasť ohraničuje zo západu Hiadeľské sedlo (1 099 m

n. m., N 48°51.74352', E 19°18.25588') a z východu sedlo Zámostskej hole (1 591 m n. m., N 48°55.60493', E 19°25.93182'). Najvyšším bodom je vrch Veľká Chochuľa s výškou 1 753 m (N 48°53.61012', E 19°19.87400'). Zaujímá nás plošný rozsah zmien v zastúpení jednotlivých tried krajinej pokrývky za sledované obdobie pričom predpokladáme, že plocha biotopu svišťa sa vplyvom zarastania zmenšuje.



Obr. 2 Pohľad na Prašivú v roku 1930

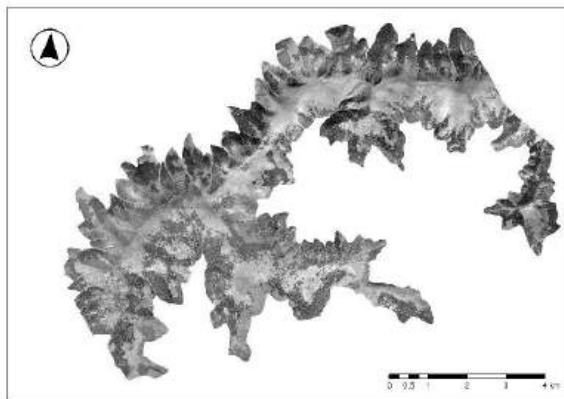
1 Materiál a metodika

Pri plnení cieľa práce sme pracovali s kartografickými metódami pre tvorbu a analýzu vrstiev krajinej pokrývky [13]. Pri komparatívnej metóde zo získaných dát sme vychádzali z ortofotosnímkov študovanej oblasti vyhotovenými v roku 1949, ktoré nám poskytol Topografický ústav plukovníka Jána Lipského SR so sídlom v Banskej Bystrici. Tie sme porovnali so zgeoreferencovanými ortofotosnímkami z roku 2018, ktoré vyhotovuje a poskytuje Úrad geodézie, kartografie a katastra na mapovom portáli MAPKA [14]. Časový horizont medzi zvolenými obdobiami predstavuje obdobie 69 rokov, počas ktorých sa významne zmenilo využívanie územia, čo znamená predpokladaný značný rozdiel v plošnom zastúpení jednotlivých kategórií krajinej pokrývky. Skúmaný areál sme zosopu ohraničili vrstevnicou 1200 m. Vrchné ohraničenie predstavuje najvyšší bod oblasti. Skúmané územie sme rozdelili na transekty s výmerou 500 ha, jeden transekt predstavoval plochu jedného rastrového tif súboru. V mapovom softvéri ArcGIS Pro od spoločnosti Esri sme na základe metódy Maximum Likelihood Classification pristúpili k tvorbe vrstiev krajinej pokrývky vo zvolených obdobiach. Túto metódu použili v prácach s podobným zameraním aj Žoncová (2025) či Masný (2023) [15,16]. Pri analýze sme zvolili triedenie krajinej pokrývky do piatich kategórií vychádzajúcich z kategorizácie CORINE land

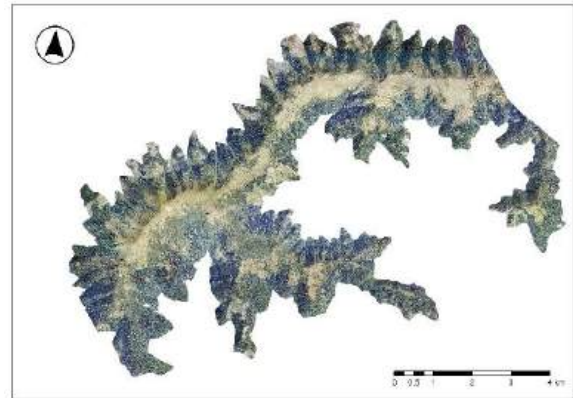
cover, ktoré pri štúdiu zmien v krajine využívajú na svojom území všetky členské štáty EÚ [17]. Konkrétne to boli prirodzené lúky, skaly, kosodrevina, les a prechodné lesokroviny. Pre lepšiu interpretáciu výsledkov sme kategórie prirodzené lúky a skaly spojili do kategórie biotop svišťa, ostatné tri kategórie tvorili plochu, ktorá nepredstavuje biotop vhodný pre svišťa. Získané výsledky sme štatisticky spracovali v tabuľkovom softvéri Excel od spoločnosti Microsoft.

2 Výsledky a diskusia

Už prvotný pohľad na snímky zo zvolených rokov naznačuje viditeľné zmenšenie plochy trávinnobylinných ekosystémov nad hornou hranicou lesa v súčasnosti v prospech rozvoja plôch fragmentovanej ale aj zapojenej kosodreviny (Obr. 3 a 4). Na tento vývoj a ďalšie sukcesné procesy aj v nižších polohách, kde lúky a pasienky ustúpili lesu, má vplyv zmena v manažovaní územia, keď v druhej polovici 20. storočia došlo k upusteniu od pasenia v tejto oblasti, ktorá sa navyše od roku 1978 stala súčasťou Národného parku Nízke Tatry s 3. stupňom ochrany prírody a krajiny. Výrazný rozmach v ploche kosodreviny je pozorovaný práve v okolí kóty Prašivá (1675 m n. m.) v západnej časti študovanej oblasti.



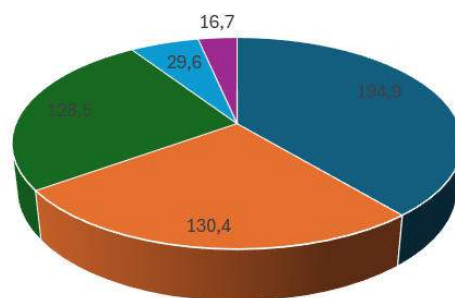
Obr. 3 Ortofotosnímka študovanej oblasti z roku 1949



Obr. 4 Ortofotosnímka študovanej oblasti z roku 2018

Celková výmera skúmaného areálu predstavuje 47,366 km². Výsledky výskumu dokazujú, že oproti roku 1949 sa súčet kategórii lesy, kosodrevina a prechodná lesokrovina, zvýšil vo vybranom transekte zahrňujúcom vrch Prašivá o 48 % z celkovej plochy transektu. V polovici 20. storočia sa tento areál rozprestieral na ploche 102,1 ha, v roku 2018 až na 340,1 ha. Plocha, ktorú považujeme za biotop svišťa poklesla z 80-tich len na 32 %. Tvorí ju súčet kategórií prirodzené lúky a skaly. Zatiaľ čo v roku 1949 predstavovala ich plocha 397,9 ha, v roku 2018 to bolo len 159,9 ha. Zo spomenutých kategórií mal v roku 2018 v sledovanom transekte najväčšie zastúpenie podiel lesa, a to až 194,9 ha, nasledujú lúky so 130,4 ha, kosodrevina s výmerou 128,5 ha a najmenšie zastúpenie predstavujú areály skál a prechodnej lesokroviny s výmerou 29,6 ha, resp. 16,7 ha. (Graf č. 1).

Rozloha tried krajinej pokrývky v ha

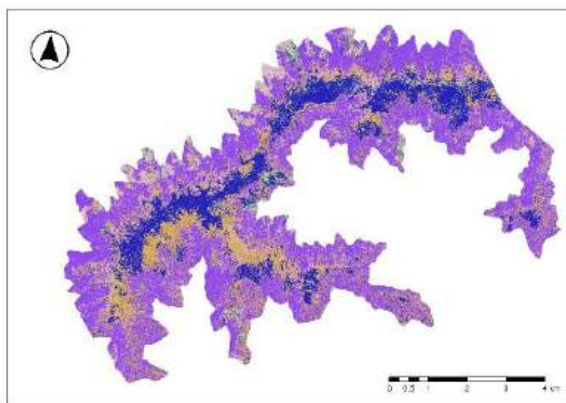


■ les ■ lúky ■ kosodrevina ■ skaly ■ prechodná lesokrovina

Graf č. 1 Zastúpenie jednotlivých tried krajinej pokrývky v transekte Prašivá v roku 2018

Fragmentácia, resp. zánik biotopu svišťa v dôsledku rozvoja plochy a najmä miery zapojenia kosodreviny

považujeme za primárny dôvod zmenšeni až zániku prašiveckej subpopulácie (Obr. 5). Zastavenie spásania týchto plôch stádami oviec, kôz a dobytky, spolu s klimatickou zmenou, urýchlili proces zarastania týchto stanovišť, vytvorili pre svišťa ohrozujúci terén, ktorý mu zabráňuje mať prehľad v otvorenej krajine a napomáha tak jeho predátorom. Manažment tohto územia s cieľom bezzásahu v areáli bývalých pasienkov, ktoré tu vznikli a boli po stáročia udržiavané a vytvorili biotop, ktorý mohol svišťa obývať, tak zrejme priniesol logický zánik jeho populácie. Je minimálne na zváženie, či by v tomto území nemalo dôjsť k určitej zmene v manažovaní, ak takýto prístup má za následok potenciálny zánik jedného z vlajkových druhov oblasti.



Obr. 5 Pohľad na klasifikovaný raster krajinej pokrývky v celej študovanej oblasti v roku 2018, modrou a zelenou farbou je vyznačený biotop svišťa

Záver

Areál biotopu svišťa sa v období rokov 1949-2018 zmenšil z pôvodných 397,9 ha na 159,9 ha. Zarastanie areálu kosodrevinou má za následok fragmentáciu tohto biotopu a zhoršenie bezpečnosti a prepojenosti vhodného biotopu pre svišťa, čo viedlo k poklesu a zrejme aj zániku subpopulácie žijúcej v masíve Prašivej v západnej časti Nízkych Tatier.

Poďakovanie

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09103-03-V05-0000.

Ďakujem prof. Urbanovi a doc. Hrončekovi za neustálu pomoc pri výskume. Ďakujem tiež recenzentovi za jeho odborné poznámky a postrehy.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] JONES, C.G., LAWTON, J.H. & SHACHAK, M., (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69, p. 373 - 86.

- [2] POWER, M.E., TILMAN, D., ESTES, J.A. a kol., (1996). Challenges in the quest for keystones. *BioScience*, 46, p. 609 - 620.
- [3] KRATOCHVÍL, J., (1964). Svišťa – vzácny cicavec z Vysokých Tatier. In: *Zborník prác o Tatranskom národnom parku 7*, s. 127 - 133.
- [4] BLAHOUT, M. (1971). Príspevok k bionómii svišťa vrchovského (*Marmota marmota* L.). *Zborník prác o Tatranskom Národnom parku 13*, s. 243–286.
- [5] ARNOLD, W. 1990a. The evolution of marmot sociality: I. Why disperse late? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27, s. 229–237.
- [6] BIBIKOV, D.I. 1996. *Marmots of the World*. Dostupné na: <http://cons-dev.univ-lyon1.fr/MARMOTTE/PUBLIIABO/Theses/Bibikov/bibtex/Bibson.html> [prístup 2026-02-26].
- [7] FLOYD, CH .H., VAN VUREN, D.H., MAY, B. 2005. Marmots on Great Basin mountaintops: using genetics to test a biogeographic paradigm. *Ecology* 86(8), s. 2145–2153.
- [8] ARNOLD, W. 1992. Social evolution and obligatory group hibernation in marmots. In Bassano, B., Durio, P., Gallo Orsi, U., Macchi, E.: *Proceedings of the 1st Int. Symp. on Alpine Marmot and genera Marmota*, Torino.
- [9] HRDÝ, T., & HRONČEK, P. (2025). Digital reconstruction of mid-16th century forests in the Western Carpathians using archival written documents. *The Holocene*, 35(11), 1118-1132. <https://doi.org/10.1177/09596836251358697>
- [10] JAMBROVIČ, M. *et al.* (2025) Subfossil chironomid assemblage shifts indicate Little Ice Age termination, deforestation, and human impact in a subalpine lake catchment. *Aquat Science*, 81. <https://doi.org/10.1007/s00027-025-01208-9>
- [11] ONDRUŠ, S. (2003). Program záchranu svišťa vrchovského. Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky, Banská Bystrica, 27 s.
- [12] URBAN, P. a kol. (2024). Červená kniha cicavcov Slovenska. Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky, Banská Bystrica, 193 s.
- [13] BOLTÍŽIAR, M. (2006). Changes of high mountain landscape structure in the selected area of the Predné Medodoly valley (Belianske Tatry mts) in 1949–1998. *Ekológia*, roč. 25, č. 1, s. 16-25.
- [14] ÚGKK SR. 2026, Mapový portál MAPKA. dostupné na: <https://zbgis.skgeodesy.sk/mapka/> [prístup 2026-02-26].
- [15] ŽONCOVÁ, M. a kol. (2025). Hiking-related degradation of alpine landscape in Low Tatras national park (Slovakia) during the COVID-19

- pandemic. *Journal of Outdoor Recreation and Tourism*, vol. 52, ISSN 2213-0780, <https://doi.org/10.1016/j.jort.2025.100941>.
- [16] MASNÝ, M. a kol. (2023). LAND COVER CHANGES OVER THE PAST 30 YEARS IN THE DEMÄNOVKA RIVER CATCHMENT. *Geografický časopis*, roč. 75, č. 3, s. 235-252. DOI: <https://doi.org/10.31577/geogrcas.2023.75.3.12>
- [17] BÜTTNER, G. (2014). CORINE Land Cover and Land Cover Change Products. In: Manakos, I., Braun, M. (eds) *Land Use and Land Cover Mapping in Europe. Remote Sensing and Digital Image Processing*, vol 18. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7969-3_5

Návrh siete distribuovaných sond pre detekciu prieniku pomocou SSH Honeypotov

Network of distributed probes for intrusion detection using SSH honeypots

Dominik Hrinkino¹ – Ladislav Huraj²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹hrinkino1@ucm.sk, ²ladislav.huraj@ucm.sk

Abstrakt

Náš príspevok sa zaoberá návrhom distribuovanej, centrálne riadenej siete sond určených na zber informácií o útokoch na cieľové systémy, geograficky rozmiestnené na rôznych lokalitách. Cieľom riešenia je vytvorenie jednotnej platformy pre zvýšenie úrovne sieťovej ochrany koncových sietí.

Návrh riešenia zahŕňa výber vhodnej honeypot platformy, definovanie postupov automatizovaného zberu údajov zo sond, ich centrálnej archivácie, spracovania a publikovania. Dôraz bol kladený aj na jednoduchú integráciu získaných údajov do populárnych bezpečnostných brán a ochranných mechanizmov využívaných v produkčných sieťach.

Výsledkom práce je plne funkčná centralizovaná platforma s viacerými implementovanými SSH honeypot sondami, ktorá zhromažďuje údaje o útočníkoch a na ich základe generuje takzvané čierne listiny (takzvané blacklisty) IP adries v rôznych formátoch. Tieto zoznamy sú verejne dostupné, priebežne aktualizované minimálne raz denne a umožňujú aj spätné prehliadanie historických záznamov.

Kľúčové slová: honeypot, sonda, kybernetická bezpečnosť

Abstract

Our paper focuses on the design of a distributed, centrally managed network of probes intended for collecting information about attacks targeting monitored systems, geographically deployed across multiple locations. The objective of the proposed solution is to create a unified platform aimed at improving the level of network security of protected end networks.

The proposed architecture includes the selection of an appropriate honeypot platform, the definition of automated data collection procedures from individual probes, and their centralized storage, processing, and

publication. Focus is placed on the ease of integration of the collected data into commonly used security gateways and firewalls.

The result of this work is a fully functional centralized platform with multiple deployed SSH honeypot probes that continuously collect attacker data and generate IP address blacklists in various formats. These blacklists are publicly available, regularly updated at least once per day, and allow retrospective analysis of historical records.

Key Words: honeypot, probe, cybersecurity

Úvod

Súčasnú prostredie počítačových sietí čelí neustále rastúcemu trendu automatizácie, ktorý sa výrazne prejavuje aj v oblasti kybernetických útokov. Útočné mechanizmy sú čoraz častejšie realizované automatizovane a s nástupom umelej inteligencie nadobúdajú vyššiu mieru komplexnosti, adaptivity a efektivity [1].

Tento vývoj kladie zvýšené nároky na bezpečnostné mechanizmy, ktoré musia byť schopné reagovať na dynamicky sa meniace hrozby v reálnom čase.

V našich predchádzajúcich publikáciách sme poukázali na potenciálne výhody implementácie honeypotov v sieťovej infraštruktúre ako vhodného nástroja na zber analytických údajov o správaní útočníkov. Takto získané dáta umožňujú návrh robustnejších bezpečnostných mechanizmov a tvorbu efektívnejších ochranných pravidiel [2].

Typickým problémom pri bežných implementáciách však býva nasadenie jednej alebo dvoch honeypot inštancií, pri ktorých sú údaje zbierané výlučne na jednu alebo niekoľko málo IP adries. Tento prístup môže výrazne limitovať rozsah zachytených útokov a neposkytuje dostatočne reprezentatívny pohľad na aktuálny stav hrozieb.

Náš výskum sa preto primárne zameriava na návrh a nasadenie distribuovanej siete honeypot sond, geograficky rozmiestnených naprieč viacerými

poskytovateľmi služieb a rôznymi prostriedmi, ako sú domáce pripojenia či cloudoví poskytovatelia. Súčasťou riešenia je centrálny systém určený na zber, agregáciu a spracovanie získaných údajov.

Cieľom výskumu je vytvorenie jednotnej distribuovanej siete sond, ktoré zhromažďujú informácie o útočníkoch a agregujú ich na centrálny server, kde prebieha ich ďalšia analýza, tvorba zoznamov IP adries a ich publikácia v rôznych formátoch.

1 Metodológia

1.1 Návrh systému sond

Pri návrhu systému sond sme sa zamerali na viacero technických a prevádzkových faktorov. Primárnym cieľom bola jednoduchá adaptácia riešenia a využitie otvoreného softvéru, ktorý by zjednodušil celkovú správu infraštruktúry a zároveň umožnil jednotné nasadenie pre IPv4 aj IPv6 prostredie. Dôležitým aspektom bola aj modularita riešenia, aby bolo možné sondy jednoducho škálovať a nasadzovať na rôznych geografických lokalitách bez výrazných zásahov do konfigurácie.

Očakávaná funkcionálnosť sondy bola definovaná tak, aby emulovaná služba komunikovala prostredníctvom štandardného a bežne využívaného sieťového portu. V našom prípade bol zvolený port 22, ktorý je štandardne používaný pre protokol SSH a predstavuje častý cieľ automatizovaných aj manuálnych útokov. Takýto prístup zvyšuje pravdepodobnosť zachytenia reálnej útočnej aktivity v produkčných sieťach.

Pri detekcii pokusu o pripojenie k sonde dochádza k zaznamenaniu všetkých relevantných identifikačných informácií o útočníkovi do lokálnej databázy. Medzi tieto údaje patria zdrojová IP adresa, použitý IP protokol, čas pripojenia a použitý SSH klient.

Následne sú tieto dáta bezpečným spôsobom, pomocou SFTP protokolu, ktorý pracuje nad službou SSH, periodicky odosielané na centrálny zberný server, kde prebieha ich ďalšie spracovanie, archivácia a vyhodnocovanie [3].

Systém bol navrhnutý s dôrazom na čo najjednoduchšie nasadenie sond, bez potreby rozsiahlej manuálnej konfigurácie na ich strane. Z tohto dôvodu je sonda distribuovaná vo forme predpripravenej šablóny virtuálneho počítača a disku vo formáte QCOW2, čo umožňuje rýchle nasadenie v rôznych virtualizačných prostrediach a minimalizuje riziko chýb pri konfigurácii [4].

Na základe definovaných požiadaviek bol zvolený SSH honeypot Cowrie 2.8.1, ktorý dokáže realisticky emulovať GNU/Linuxové prostredie založené na distribúcii Debian a detailne zaznamenáva aktivitu pripojených účastníkov. Pre ukladanie a správu získaných dát bola použitá relačná databáza MariaDB, ktorá umožňuje efektívne uchovávanie, spracovanie a ďalšiu manipuláciu s dátami pri nízkych výkonnostných nárokoch [5].

Keďže honeypot Cowrie zhromažďuje všetky záznamy do jednej databázovej štruktúry, bolo potrebné riešiť oddelenie dát pre jednotlivé IP protokoly. Z tohto dôvodu bola pre každý IP protokol vytvorená samostatná inštancia sondy, pričom každá sonda obsluhuje vždy jednu IP adresu jedného protokolu. Na základe toho máme možnosť separátne zhromažďovať buď zdrojové adresy IPv4 alebo IPv6.

1.2 Návrh systému centrálného zberného servera

Centrálny zberný server sme navrhovali ako jednotné miesto spracovania dát. Primárnou motiváciou pre centrálnu spracovanie je z dôvodu, aby sa čo najviac odľahčil výpočtový a priestorový výkon priamo sond, aby sonda spracovávala iba nevyhnutné informácie, ktoré sú potrebné pre chod danej sondy.

Pri návrhu architektúry spracovania dát boli definované tri hlavné fázy spracovania. Prvá fáza prebieha priamo na strane sondy, kde sa z lokálnej databázy periodicky získavajú agregované informácie o zdrojových IP adresách na základe počtu zaznamenaných pokusov o pripojenie. Konkrétne sú vyhodnocované IP adresy, ktoré sa v systéme vyskytli aspoň jedenkrát, dvakrát a päťkrát a viac. Takáto základná agregácia na základe počtu výskytu nám umožňuje redukovat' objem daného IP listu.

Agregácia IP údajov bola do návrhu systému zavedená aj z praktických dôvodov na strane používateľa. Cieľom tohto prístupu je poskytnúť možnosť výberu medzi kompletnou IP listinou a jej agregovanými variantmi, určenými pre zariadenia s obmedzenou kapacitou úložného priestoru alebo výpočtových zdrojov.

Používatelia, ktorí nemajú k dispozícii dostatočný priestor na spracovanie celej databázy IP adries, môžu namiesto toho pracovať s agregovanými dátami, ktoré aj napriek menšiemu rozsahu poskytujú dostatočne reprezentatívne informácie o útočnej aktivite. Keďže útoky sa v čase opakovali N počet krát z rovnakých zdrojových adries.

Druhá fáza spracovania dát spočívala v zlúčení IP zoznamov rovnakých kategórií agregácie zo všetkých

nasadených sond. Týmto krokom vznikli jednotné a centralizované zoznamy IP adries rozdelené podľa počtu zaznamenaných útokov. Takto vytvorené zoznamy následne prechádzajú procesom odstránenia duplicitných záznamov.

Odstránenie duplicit bolo považované za kľúčový krok z viacerých dôvodov. Vzhľadom na to, že rovnaká zdrojová IP adresa sa môže vyskytovať v záznamoch viacerých sond, bez eliminácie duplicit by dochádzalo k opakovanému výskytu identických adries vo výsledných zoznamoch. Druhým dôvodom je zabezpečenie kompatibility s vybranými sieťovými zariadeniami a bezpečnostnými platformami. Niektoré systémy, ako napríklad Mikrotik RouterOS, vykazujú chybové hlásenie v prípade, že sa do zoznamu pokúšame pridať tú istú IP adresu viackrát.

Tretia finálna fáza spočívala vo vytvorení viacerých verzií listín a to z dôvodu jednoduchej implementácie v bezpečnostných bránach, prípadne pre ďalšiu automatizáciu v procese.

Pre náš prípad sme vybrali štyri varianty, do ktorých sa budú zdrojové IP adresy z listov transformovať.

- RAW IP formát
- IP a prefixová notácia
- IPset
- Mikrotik Address List

Formát RAW IP prezentuje zdrojové adresy ako zoznam, v ktorom sú jednotlivé adresy oddelené znakom nového riadku. Tento spôsob je využívaný vo firewalli pf, na ktorom sú založené aj populárne bezpečnostné brány pfSense a OPNsense.

Formát IP s prefixovou notáciou združuje zdrojové adresy vo forme IP/32. Tento formát je používaný v bezpečnostných politikách systémov Juniper a predstavuje ekvivalent masky 255.255.255.255, teda siete obsahujúcej iba jednu adresu.

IPset je špeciálny framework projektu netfilter, ktorý spolupracuje s linuxovým firewallom iptables. IPset umožňuje pracovať so zoznamami adries priamo v pravidlách iptables bez potreby vytvárania samostatného pravidla pre každú IP adresu, ako je to možné napríklad vo firewallle pf [6].

Tento prístup vedie k prehľadnejšej a lepšie udržiavateľnej sade bezpečnostných pravidiel. V navrhovanom riešení IPset formát špecifikuje pridávanie adries vo formáte IP s prefixom do IPset zoznamu s názvom *honeysc*. Poskytované príkazy slúžia výhradne na pridávanie adries do už existujúceho zoznamu, preto je potrebné, aby si používateľ pred ich použitím vytvoril IPset zoznam príkazom *ipset create*

honeysc hash:net pre IPv4 a *ipset create honeysc hash:net family inet6* pre IPv6 adresy.

Formát Mikrotik Address List definuje špecifickú syntax zoznamov adries používanú v operačnom systéme RouterOS, ktorý je nasadzovaný na bezpečnostných bránach a smerovačoch spoločnosti Mikrotik. Address List umožňuje zoskupiť viacero IP adries do jedného zoznamu, ktorý môže byť priamo použitý v bezpečnostných pravidlách. Vzhľadom na oddelenú konfiguráciu pre IPv4 a IPv6 v systéme RouterOS bolo pri práci s IPv6 adresami potrebné upraviť syntax používaných príkazov.

1.3 Návrh systému archivácie dát

Pri návrhu systému na archiváciu a publikovanie dát boli najskôr definované základné funkčné požiadavky. Hlavnou požiadavkou bola prehľadná archivácia dát spolu s transparentným a jednoducho dostupným publikovaním jednotlivých záznamov. Na základe týchto kritérií bola zvolená platforma GIT, ktorá umožňuje verziované ukladanie dát v repozitároch a prirodzene podporuje uchovávanie historických zmien [7].

Štruktúra repozitára bola navrhnutá podľa jednotnej šablóny (VARIANTA)/ip_(DATASET) pre IPv4 adresy, napríklad *raw/ip_all*, *cidr/ip_2* alebo *ipset/ip_5*. Pre IPv6 adresy bola použitá rovnaká štruktúra, pričom kľúčové slovo ip bolo nahradené výrazom ip6.

Takto organizovaný repozitár je denne aktualizovaný kopírovaním najnovších dát, po ktorom nasleduje vytvorenie nového commitu. Tento mechanizmus zabezpečuje archiváciu historických dát bez ich straty a zároveň umožňuje návrat k predchádzajúcim stavom datasetov.

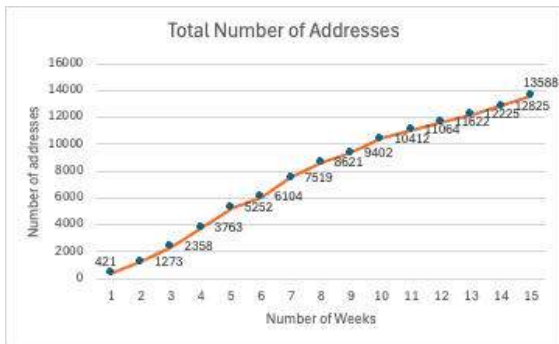
Na publikovanie dát bola zvolená platforma GitHub, ktorá umožňuje prevádzku verejne dostupného GIT repozitára. GitHub zároveň poskytuje možnosť prehľadania obsahu repozitára prostredníctvom štandardného protokolu HTTPS bez nutnosti klonovania celého repozitára. Tento spôsob prístupu zjednodušuje používateľom získanie konkrétneho datasetu bez potreby sťahovania alebo správy celej kolekcie [8].

2 Výsledky a diskusia

Na takto navrhutej infraštruktúre bol nasadený jeden centrálny zberný server a tri sondy, ktoré boli geograficky rozmiestnené. Dve sondy boli umiestnené na území Slovenskej republiky u dvoch rôznych poskytovateľov internetového pripojenia, zatiaľ čo

tretia sonda bola nasadená vo Francúzsku u cloudového poskytovateľa.

Zber dát prebiehal v časovom horizonte pätnástich týždňov, počas ktorých boli zaznamenávané a uchovávané zdrojové IP adresy útočníkov, Graf 1. Získané údaje boli následne agregované do číselných štatistík, pričom sledovaným ukazovateľom bol týždenný prírastok zaznamenaných IP adries.



Graf 1. Celkový počet adries

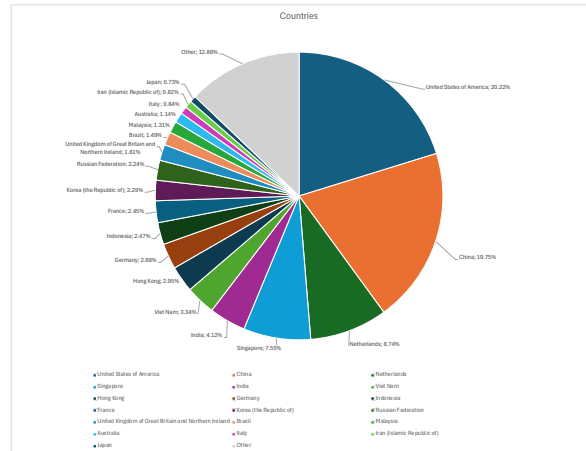


Graf 2. Týždenný prírastok

Ako môžeme vidieť na grafe 2, najväčší prírastok je možné pozorovať počas štvrtého a piateho týždňa.

Menší pokles nových adries môžeme vidieť v šiesty týždeň, kde pribudlo 852 záznamov. Postupne môžeme pozorovať od siedmeho týždňa postupne klesajúci trend nových záznamov. Pričom priemerná hodnota z nameraných týždňových nárastov je 905,86 záznamov týždenne s mediánom 852 záznamov.

Počas 15 týždňového sledovania pomocou troch sond sme spozorovali 13588 unikátnych záznamov zdrojových adries, ktoré sa pripojili k sondám.



Graf 3. 20 krajín s najvyšším výskytom v záznamoch

Získané zdrojové IP adresy sme následne priradili ku krajinám, v ktorých sú registrované, a to pomocou verejne dostupného geo-lokačného datasetu IP adries „IP2LOCATION-LITE-DB1“ od spoločnosti IP2Location.

Z grafu 3 je možné vidieť, že najvyšší počet zdrojových adries je podľa registrácie evidovaný v Spojených štátoch amerických. Druhý najvyšší počet adries pochádza z Číny, nasledovaný Holandskom, Singapurom a Indiou.

Zaujímavosťou bol aj výskyt krajín, ktoré si dlhodobo udržiavajú vysokú reputáciu v oblasti kybernetickej bezpečnosti, ako napríklad Francúzsko, Nemecko ale aj Japonsko, ktoré sa napriek tomu objavili medzi významnejšími zdrojovými lokalitami zaznamenaných pripojení.

Záver

V našom príspevku sme sa zamerali na návrh a implementáciu distribuovanej siete sond založených na SSH honeypotoch, ktoré zbierali informácie o útokoch do centrálného registra. Navrhnuté riešenie pozostávalo z viacerých geograficky aj logicky rozmiestnených sond, ktoré zaznamenávali pokusy o pripojenie k emulovanej SSH službe. Získané údaje boli následne spracované prostredníctvom centrálnej platformy, ktorá zabezpečovala ich zhromažďovanie, agregáciu a publikovanie vo forme IP blacklistov. Tieto blacklisty boli transformované do viacerých variantov vhodných pre rôzne formy automatizácie alebo priame nasadenie v bezpečnostných bránach založených na technológii ipset, ako aj v zariadeniach so systémom RouterOS.

Kľúčovým výsledkom práce je verifikácia funkčnosti a kompletná implementácia centralizovanej platformy

pre zber a spracovanie dát. Počas pätnástťždňového sledovania boli prostredníctvom troch nasadených sond detegované pokusy o pripojenie z celkovo 13 588 unikátnych zdrojových IP adries, pričom priemerný týždenný prírastok predstavoval 905,86 nových záznamov.

Ďalší výskum bude smerovať k rozšíreniu siete sond, možnosti ich nasadzovania aj verejnosťou a k dlhodobému sledovaniu útočnej aktivity. Zároveň sa otvára priestor na podrobnejšiu analýzu zachytených dát a ich spracovanie pomocou prvkov strojového učenia alebo umelej inteligencie.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore z Fondu na podporu výskumu Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave (Projekt FPPV-04-2026 Distribuovaná infraštruktúra na zber a publikovanie údajov o sieťových útokoch)

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] MOHAMED, Nachaat. A review of AI approaches in combating advanced persistent threats (APTs) in cybersecurity. In: *2024 15th International Conference on Computing Communication and Networking Technologies (ICCCNT)*. IEEE, 2024. p. 1-6.
- [2] HRINKINO, Dominik; HURAJ, Ladislav; ŠIMON, Marek. Analysis of SSH Attack Frequency on Standard and Non-standard Ports in IPv4 and IPv6. In: *2025 International Conference on Emerging eLearning Technologies and Applications (ICETA)*. IEEE, 2025. p. 256-261.
- [3] T. Ylonen and S. Lehtinen, SSH File Transfer Protocol, draft-ietf-secsh-filexfer-00.txt, January 2001 https://man.openbsd.org/sftp.1#SEE_ALSO
- [4] JOSHI, Gauri; SHINGADE, S. T.; SHIROLE, M. R. Empirical study of virtual disks performance with KVM on DAS. In: *2014 International Conference on Advances in Engineering & Technology Research (ICAETR-2014)*. IEEE, 2014. p. 1-8.
- [5] Cowrie's Documentation [online]. Michel Oosterhof, 2013 [cit. 2026-02-04]. Dostupné z: <https://docs.cowrie.org/en/latest/>
- [6] STYN, Henry Van. Advanced firewall configurations with ipset. *Linux Journal*, 2011, 2011.210: 1.
- [7] SPINELLIS, Diomidis. Git. *IEEE software*, 2012, 29.3: 100-101.
- [8] BLISCHAK, John D.; DAVENPORT, Emily R.; WILSON, Greg. A quick introduction to version control with Git and GitHub. *PLoS computational biology*, 2016, 12.1: e1004668.

Výučba miestnej krajiny s využitím geolokačnej hry

Teaching local geography using a geolocation game

Renáta Klimanová¹ – Miroslava Trembošová²

¹Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

²Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra

renata.klimanova@ukf.sk, mtrembosova@ukf.sk

Abstrakt

Príspevok sa zaoberá využitím geolokačných hier ako inovatívnej metódy vo vyučovaní geografie, konkrétne pri téme miestna krajina. Cieľom práce bolo vytvoriť a overiť edukatívnu hru v prostredí aplikácie Actionbound, zameranú na prírodný a historický potenciál mesta Banská Bystrica. Porovnávali sme efektivitu a atraktivitu tradičnej vyučovacej hodiny v porovnaní s vyučovacou hodinou s využitím geolokačnej hry. Výskumnú vzorku tvorili žiaci 6. ročníka. Efektivitu vyučovacích hodín sme vyhodnotili prostredníctvom porovnania výsledkov žiakov z didaktického testu po absolvovaní vyučovania tradičným spôsobom a s využitím geolokačnej hry. Výsledky didaktického testu a dotazníkového prieskumu potvrdili, že využitie geolokačnej hry viedlo k lepšiemu osvojeniu vedomostí a vyššej motivácii žiakov. Práca poukazuje na možnosti implementácie dotykových technológií a zážitkového učenia pri rozvoji geografického myslenia a regionálnej identity.

Kľúčové slová: miestna krajina, geolokačná hra, Banská Bystrica, inovatívne metódy vyučovania, dotykové technológie

Abstract

Contribution deals with the use of geolocation games as an innovative method in teaching geography, specifically on the topic of local landscape. The aim of the work was to create and test an educational game in the Actionbound application environment, focused on the natural and historical potential of the city of Banská Bystrica. We compared the effectiveness and attractiveness of a traditional lesson with a lesson using a geolocation game. The research sample consisted of 6th grade students. We evaluated the effectiveness of the lessons by comparing the results of the students'

didactic test after completing the lesson in the traditional way and using the geolocation game. The results of the didactic test and questionnaire survey confirmed that the use of geolocation games led to better knowledge acquisition and higher motivation among pupils. The work points to the possibilities of implementing touch technologies and experiential learning in the development of geographical thinking and regional identity.

Key Words: local landscape, geolocation game, Banská Bystrica, innovative teaching methods, touch technologies

Úvod

Miestna krajina predstavuje pre žiakov bezprostredné životné prostredie, s ktorým sú v každodennom kontakte. Vďaka tomu ponúka bohaté možnosti na vzdelávanie. Poznanie miestnej krajiny zohráva dôležitú úlohu pri formovaní vzťahu študentov k vlastnému okoliu a posilňovaní ich miestnej identity. V geografii je práve štúdium miestnej krajiny prvým krokom k širšiemu chápaniu geografických zákonitostí. V súčasnej dobe digitálnych technológií čelia učitelia výzve, ako zaujať žiakov a udržať ich pozornosť. Tradičné metódy výučby sú čoraz častejšie dopĺňané alebo nahrádzané aktivizujúcimi formami, medzi ktoré patrí aj m-learning. Ako však uvádzajú Chvojka a Vojtek (2016) [1], potenciál geoinformačných technológií vo výučbe geografie zostáva často nevyužitý. Odpoveďou na túto výzvu môže byť gamifikácia a využívanie geolokačných hier, ktorých cieľom je spopularizovať vzdelávanie a prepojiť ho s reálnym zážitkom (Michael a Chen, 2006 [2]; Ebner a Holzinger, 2007 [3]; Inclezan, 2013 [4]; Tsai a kol., 2015 [5]).

Geolokačné hry predstavujú typickú ukážku využitia mobilného telefónu vo vzdelávaní. K výučbe prispievajú najmä tým, že spájajú pohyb s učením, motivujú žiakov

k objavovaniu miestnej krajiny v rámci medzipredmetových vzťahov a zlepšujú ich priestorovú orientáciu v teréne (Jurík, 2016 [6]; Vojteková a kol., 2024 [7]). Prípadové štúdie (TiMEr, Wayfinder Live a Pet Playing for Placemaking) zdôrazňujú, že žiaci si vedomosti osvojujú nepriamo cez vlastné zážitky a interakcie s prostredím, vďaka čomu získavajú nové perspektívy o kultúrnych väzbách v známom mestskom priestore (Sheahan a kol., 2022 [8]).

Cieľom príspevku je nami vytvorenú vzdelávaciu geolokačnú hru, ktorá využíva mikrogeografické aspekty mesta, použiť ako platformu na poznávanie a zároveň porovnať efektivitu tejto metódy s tradičným spôsobom výučby. Vychádza sa z predpokladu, že vyučovanie netradičným spôsobom je pre žiakov zaujímavejšie a prínosnejšie.

1 Metodika práce

Návrh geolokačnej hry spočíval v prechádzaní mesta Banská Bystrica a všímaní si rôznych detailov prírodného či historického charakteru. Počas týchto prieskumov sme navrhli trasu geolokačnej hry, s konkrétnymi úlohami na jednotlivých stanoviskách, tak aby nielen overovali vedomosti žiakov ale aj rozvíjali ich kritické myslenie či kreativitu. Pri tvorbe geolokačnej hry sme sa zamerali najmä na využitie medzipredmetových vzťahov, zapojenie aj iných aplikácií a zahrnuli sme množstvo otázok na podporu kritického a kreatívneho myslenia. Samotná hra bola pred testovaním v škole vyskúšaná viacerými našimi známymi, tak aby bolo jej prevedenie čo najjednoduchšie a nestrácalo na kvalite. Na tvorbu hry sme využili aplikáciu Actionbound, ktorá umožňuje tvorbu multimediálnych sprievodcov a interaktívnych trás. Hra s názvom „Potulky Banskou Bystricou“ bola navrhnutá tak, aby obsahla kľúčové geografické a historické lokality v centre mesta. Na každom stanovisku žiaci plnili úlohy rôzneho charakteru od vyhľadávania informácií, cez orientáciu v priestore, až po kreatívne zadania (napr. fotenie, nahrávanie zvuku).

Hlavným nástrojom pri aktivizujúcej metóde využitej pri vyučovaní našej geolokačnej hry boli dotykové technológie s využitím prístupu na internet. Konkrétne boli použité mobily, tablety a školský počítač. Na každom mieste je niekoľko úloh, ktoré treba splniť, aby nás aplikácia naviedla na ďalšie miesto. Splnením úloh sa dajú získať body, ktoré na konci aplikácia vyhodnotí. Súčasťou celej hry je rozkúskovaná legenda spätá s Banskou Bystricou, ktorej príbeh sa postupne odhaľuje pri plnení úloh. Otázky použité v hre sú rôzneho typu: otvorené, zatvorené, s výberom odpovede z viacerých možností, určenie hodnoty na danej škále, fotoodpoveď, priradovacie, porovnanie historickej fotografie so súčasnosťou, odpoveď v podobe hlasového záznamu, experiment, vyhľadávanie

informácií.

1.1 Realizácia vyučovacej hodiny

Naším hlavným cieľom bolo potvrdiť alebo vyvrátiť našu hypotézu a zároveň otestovať funkčnosť samotnej geolokačnej hry. Našou vzorkou sa stali žiaci 6. ročníka na ZŠ Golianova 8 v Banskej Bystrici. Naša realizácia spočívala v tom, že v jednej triede sme odučili tému *miestnej krajiny* tzv. tradičným spôsobom a následne žiakov otestovali nami navrhnutým didaktickým testom. V druhej (experimentálnej) triede sme odučili hodinu pomocou geolokačnej hry v prispôbených podmienkach na území školy a žiakov následne otestovali rovnakým testom.

Náš hlavný výskumný problém je zlepšiť vzdelávací proces prostredníctvom zábavy, zvýšiť záujem a povedomie žiakov o miestnej krajine. Ako vedľajší problém sme si zvolili rozvoj priestorovej orientácie a navigačných schopností pomocou geolokačnej hry. Našu geolokačnú hru sme testovali nami vytvoreným didaktickým testom a dotazníkom.

Priebeh vyučovania – geolokačná hra

Téma: Miestna krajina mesta Banská Bystrica

Ciele: Žiak spozná geografické a historické špecifiká miestnej krajiny Banskej Bystrice

Kognitívny: Žiak identifikuje geografické črty Banskej Bystrice (poloha, reliéf, vodstvo, podnebie)

Afektívny: Žiak si rozvíja vzťah k svojmu bydlisku a jeho okoliu

Psychomotorický: Žiak vyhľadáva a triedi informácie o miestnej krajine z rôznych zdrojov

Pomôcky: Dotykové technológie s pripojením na internet, informovaný súhlas rodiča, aplikácia Actionbound, ďalšie aplikácie napr. PlantNet, Measure, Mapy.cz, My Altitude

Formy: Vychádzka, terénne vyučovanie

Metódy: Aktivizujúca, bádateľský orientovaná, didaktická hra

Medzipredmetové vzťahy: dejepis, biológia, občianska náuka, ekológia, fyzika

Rozvíjanie kompetencií: dávanie poznatkov do kontextu, hľadať súvislosti, orientácia v teréne

Priebeh: V úvode sa žiaci oboznámili s témou a cez diskusiu v triede sa zistilo, do akej miery sa orientujú a zaujímajú o tému miestnej krajiny. Následne sa presunuli do terénu, kde sa cez aplikáciu v smartfónoch pripojili ku geolokačnej hre s názvom *Potulky Banskou Bystricou*. Samotná hra sprevádzala žiakov po jednotlivých miestach, kde spoločne plnili úlohy. Keďže testovanie prebehlo v simulovaných podmienkach boli využité fotografie, 3D zobrazenie v Google Maps pre potrebu zodpovedania úloh, kde bol potrebný aj

vizuálny kontakt alebo ako už len posilnenie pocitu, že sa nachádzame na danom mieste. Niektoré zadania sa len abstraktne popisali ako by sa riešili priamo na mieste. Napríklad na identifikáciu rastlín v parku boli použité rastliny v školskom areáli. Celá hra priamo v teréne trvá 90 min, v simulovaných podmienkach jej priebeh mal 45 minút.

Priebeh vyučovania – tradičná hodina

Téma: Miestna krajina mesta Banská Bystrica

Ciele: Žiak spozná geografické a historické špecifiká miestnej krajiny Banskej Bystrice

Kognitívny: Žiak identifikuje geografické črty Banskej Bystrice (poloha, reliéf, vodstvo, podnebie)

Afektívny: Žiak si rozvíja vzťah k svojmu bydlisku a jeho okoliu

Psychomotorický: Žiak vyhľadáva a triedi informácie o miestnej krajine z rôznych zdrojov

Pomôcky: dataprojektor, PC, tabuľa, fixky, zošit, online mapa (Mapy.cz)

Typ vyučovacej hodiny: expozičná

Metódy: Aktivizujúca, slovná, názorno - demonštratívna

Medzipredmetové vzťahy: dejepis, občianska náuka

Rozvíjanie kompetencií: dávanie poznatkov do kontextu

Priebeh: Vyučovacia hodina prebehla formou klasického výkladu učiteľa, počas ktorého si žiaci robili poznámky na základe prezentácie. V úvode sa žiaci oboznámili s témou cez diskusiu a zistili, do akej miery sa orientujú a zaujímajú o tému miestnej krajiny. Časová dotácia bola jedna štandardná vyučovacia hodina, počas ktorej bol výklad doplnený o obrázky v prezentácii a hľadania miest v online mape. V závere hodiny (diagnostickej fáze) sa uskutočnila kontrola didaktickým testom.

Základné informácie o teste

Cieľom didaktického testu: Overenie vedomostí žiakov o miestnej krajine

Počet otázok: 12 + bonus

Typ otázok: Otvorené, zatvorené, výberové, priradovacie, tajnička (bonus)

Testované osoby: Žiaci 6 ročníka, 6.D – 19 respondentov, 6.C – 23 respondentov

Bodovanie: Maximálny počet bodov je 22+1

Výborný (1): 90 – 100 %, 20 – 22 bodov

Chválibebný (2): 75 – 89 %, 16,5 – 19,5 bodov

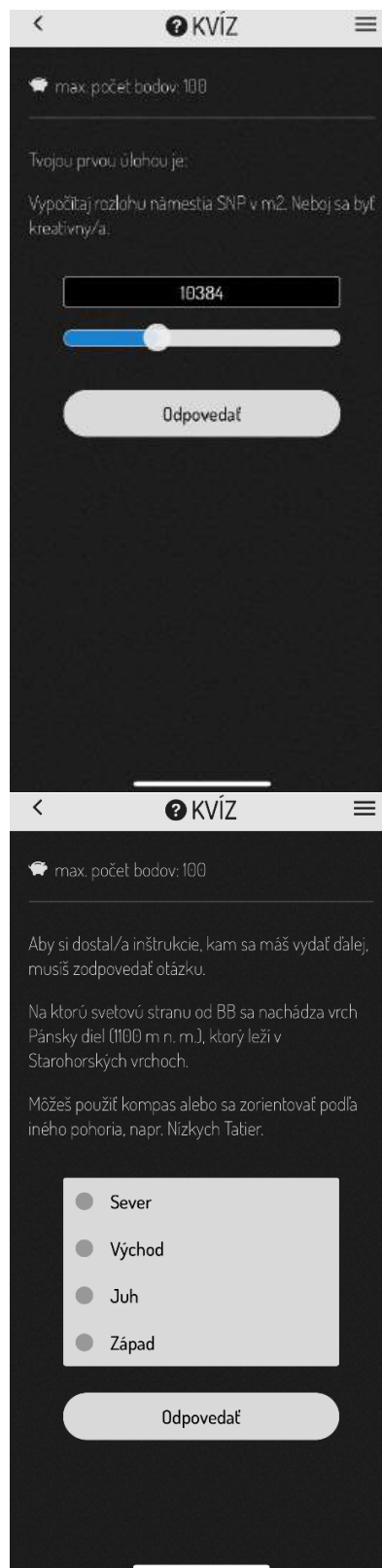
Dobry (3): 50 – 74 %, 11 – 16 bodov

Dostatočný (4): 30 – 49 %, 6,5 – 10,5 bodov

Nedostatočný (5): 0 – 29 %, 0 – 6 bodov

Údaje o atraktivite použitých vyučovacích metód sme získali formou dotazníka, ktorý obsahoval 5 otvorených otázok. Otázky boli zamerané na subjektívne vnímanie vyučovacieho procesu, efektívnosti a atraktivity danej vyučovacej hodiny.

Taktiež mali možnosť napísať návrhy na zlepšenie samotnej hry. Výsledky z odpovedí žiakov sme štatisticky spracovali.



Obr. 1 Ukážka geolokačnej hry v aplikácii Actionbound
Zdroj: Klimanová, R., 2025 [9]

2 Výsledky a diskusia

Získané výsledky jasne preukazujú, že implementácia geolokačnej hry do vyučovania geografie prináša významné benefity v porovnaní s tradičnými formami výučby. Kým kontrolná skupina vzdelávaná klasickým výkladom dosiahla v didaktickom teste priemernú úspešnosť 77 % (17 bodov), experimentálna skupina, ktorá absolvovala vyučovanie v prispôbených podmienkach prostredníctvom aplikácie Actionbound, dosiahla úspešnosť až 89 % (19,5 bodu). Tento pozitívny vplyv gamifikácie korešponduje so zisteniami Vojtekovej a kol. (2024) [7], ktorí na základe svojho výskumu potvrdili, že terénne vyučovanie pomocou geolokačnej hry prináša vysoký záujem a spokojnosť žiakov. Využitie podobných inovatívnych prístupov špecificky pri téme miestnej krajiny navrhovali a overovali aj Žoncová a kol. (2018) [10] na príklade mesta Nitra, pričom taktiež potvrdili rapídne zvýšenie motivácie žiakov pre spoznávanie ich bezprostredného okolia. Efektívnosť interaktívneho prostredia na osvojenie učiva podčiarkujú aj štúdie autorov Skaraki a Kolokotronis (2022) [11] zamerané priamo na aplikáciu Actionbound. Tí vo svojom výskume uvádzajú, že implementácia geolokačných hier mení študentov z pasívnych prijímateľov informácií na aktívnych objaviteľov, čo priamo vedie k zvýšeniu ich angažovanosti a celkového akademického výkonu. Prvky gamifikácie tak, ako tvrdia Topal a Karaca (2022) [12], fungujú ako inovatívne riešenia zvyšujúce motiváciu, vďaka čomu sa vzdelávací proces stáva atraktívnejším.

Najvýraznejšie rozdiely medzi testovanými skupinami sa ukázali pri otázkach vyžadujúcich priestorovú orientáciu a kritické myslenie. Ako poukazujú Vuorio a Harviainen (2021) [13] mobilné zariadenia a geolokačné hry rozširujú tradičné formy vzdelávania a umožňujú študentom aktívne objavovať kultúrne a historické miesta prostredníctvom interaktívnych úloh. Získavanie priestorových zručností prostredníctvom pohybu a riešenia úloh priamo v teréne je podľa Feulnera a Kremera (2014) [14] vysoko efektívne. Študenti si totiž popri explicitnom získavaní faktografických poznatkov o miestnej krajine implicitne budujú aj priestorové myslenie a lepšiu orientáciu.

Zaujímavým a dôležitým zistením bolo aj vyrovnanie úspešnosti medzi chlapcami a dievčatami v hernej skupine. Kým pri tradičnej výučbe dominovali dievčatá (81 % oproti chlapcom 74 %), geolokačná hra výrazne zvýšila výkon chlapcov (86 %), pričom dievčatá si zachovali nadpriemernú úspešnosť (91 %). Tento jav možno pripísať samotnej povahe geolokačných aktivít a súťaživosti. Integrované herné mechanizmy a zber bodov dokážu podľa autorov Roy a Zaman (2018) *in Skaraki a Kolokotronis (2022)* [11] efektívne uspokojiť psychologickú potrebu autonómie, kompetencie a

vzájomnej spriaznenosti u žiakov. Tieto prvky slúžia ako silný motivačný faktor najmä pre tých, ktorých klasický frontálny výklad s nutnosťou robenia si poznámok dostatočne neaktivizuje. Hra tak dokáže vtaiahnuť do vzdelávacieho procesu aj žiakov, ktorým tradičné metódy nevyhovujú. Potvrdzujú to aj Tsai a kol. (2015) [5], podľa ktorých je hlavným princípom využitia takýchto hier snaha spopularizovať vzdelávanie, čo dokáže dlhodobo udržať pozornosť a zlepšiť pochopenie učiva.

Tieto teoretické východiská sa priamo odrazili aj v našom dotazníkovom prieskume, kde až 91 % žiakov z hernej skupiny uviedlo, že hra im pomohla lepšie si preberanú tému zapamätať. Zavedenie inovatívnych technológií sa tak ukazuje ako nevyhnutný krok pre modernú výučbu geografie. Ako vo svojej práci zdôrazňujú aj Škodová a kol. (2023) [15] využívanie digitálnych nástrojov je pre súčasnú generáciu kľúčom nielen k zatraktívneniu a obohateniu tradičného vyučovacieho procesu, ale predovšetkým k efektívnemu prepojeniu školského vzdelávania s reálnym životom a prostredím.

Záver

Výsledky analýzy dokazujú, že geolokačná hra s použitím dotykových technológií je efektívnym nástrojom na zlepšenie osvojenia si učiva, najmä v oblastiach, ktoré vyžadujú prácu s reálnym prostredím a aplikáciu poznatkov do praxe. Hoci tradičná metóda bola pomerne efektívna pri zapamätaní faktografických informácií, interaktívna forma podporila vyššiu motiváciu žiakov a lepšie pochopenie priestorových vzťahov a regionálnych charakteristík.

Tieto výsledky naznačujú potenciál využívania geolokačných hier v pedagogickej praxi ako doplnkového alebo alternatívneho nástroja k tradičným metódam vyučovania.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí mojej školiteľke diplomovej práce na základe, ktorej vznikol tento príspevok, RNDr. Miroslave Trembošovej, PhD., za odborné vedenie a usmernenia počas celej tvorby práce. Rovnako patrí veľká vďaka doc. Viere Petlušovej, PhD., za dôslednú kontrolu, cenné pripomienky a odborné vedenie pri písaní tohto príspevku. Veľké poďakovanie patrí tiež vedeniu a pedagógom Základnej školy Golianova 8 v Banskej Bystrici za ústretovosť a poskytnutie priestoru na realizáciu praktickej časti výskumu. V neposlednom rade patrí vďaka samotným žiakom 6. ročníka za ich aktívny prístup, nadšenie a spoluprácu pri testovaní geolokačnej hry.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] CHVOJKA, L., VOJTEK, M. (2016). Aktuálny stav využívania geoinformačných technológií vo výučbe geografie na stredných školách v Nitrianskom samosprávnom kraji. In: *Geografické informácie*, roč. 20, č. 2, 2016, s. 161-174. ISSN 1337-9453.

[2] MICHAEL, D. CHEN, S. (2006). *Serious Games: Games That Educate, Train and Inform*. Boston, Mass. : Thomson Course Technology. 2006. 316 s. ISBN: 1-59200-622-1.

[3] EBNER, M., HOLZINGER, A. (2007). Successful implementation of user-centered game based learning in higher education: An example from civil engineering. In: *Computers & Education*. vol. 49, no. 3, 2007, pp. 873-890. ISSN 0360-1315.

[4] INCLEZAN, D. (2013). A Logic-Based Methodology for the Formalization of Shikake Principles and Examples. In: *AAAI Spring Symposium : Shikakeology*, 2013, pp. 39-44.

[5] TSAI, M. H., WEN, M. C., CHANG, Y. L., KANG, S. C. (2015). Game-based education for disaster prevention. In: *AI & Society*, vol. 30, no. 4, 2015, pp. 463-475.

[6] JURÍK, P. (2016). Rozvíjajúce sa trendy a budúcnosť e-learningu. In: *Economics And Informatics*, vol. 14, no. 2, 2016, s. 59-65.

[7] VOJTEKOVÁ, J.; MIKOVÁ, A. a VOJTEK, M., (2024). Geolokačné hry v terénnom vyučovaní geografie. In: *ICERI2024 Proceedings*. Sevilla: IATED, pp. 2046-2052. ISBN 978-84-09-63010-3.

[8] SHEAHAN, J., DAVIES, H., HJORTH, L. (2022). Corrigendum: The Art of Tacit Learning in Serious Location-Based Games. In *Frontiers in Education*, Frontiers Media SA. vol. 7, 2022.

[9] KLIMANOVÁ, R., (2025). *Geolokačná hra ako metóda vyučovania miestnej krajiny na príklade mesta Banská Bystrica*. [Diplomová práca]. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, 114

[10] ŽONCOVÁ, M.; HAMRAN, D. a SVORAD, A., (2018). Návrh využitia gamifikácie vo vyučovaní miestnej krajiny na príklade mesta Nitra. In: *Geografická Revue*, roč. 14, č. 2, s. 30-41. Dostupné na: <https://doi.org/10.24040/GR.2018.14.2.30-41>.

[11] SKARAKI, E. and KOLOKOTRONIS, F., (2022). The

use of the mobile application Actionbound in the teaching of local history. *Advances In: Mobile Learning Educational Research*, vol. 2, no. 2, pp. 421-426.

[12] TOPAL, M. and KARACA, O., (2022). Gamification in e-learning. In: *Research anthology on developments in gamification and game-based learning*. Hershey: IGI Global, pp. 1-20.

[13] VUORIO, J. and HARVIAINEN, J. T., (2021). Learning with Location-Based Gaming. In: *Simulation Gaming Through Times and Disciplines: 50th International Simulation and Gaming Association Conference*. Cham: Springer, pp. 405-416. ISBN 978-3-030-72132-9.

[14] FEULNER, B. and KREMER, D., (2014). Using Geogames to Foster Spatial Thinking. In: *AGILE 2014 International Conference on Geographic Information Science*. Castellón: AGILE, pp. 1-4.

[15] ŠKODOVÁ, M.; HOLLÝ, M. a ŽONCOVÁ, M., (2023). *Námety na vyučovanie geografie s využitím virtuálnej reality pre ZŠ*. Banská Bystrica: Belianum, 77 s. ISBN 978-80-557-2

Prvočíselná hra v procese tvorby riešenia v rámci konštrukčného výskumu

Prime number game in the process of solution creation within Design- Based Research

Tomáš Kling

Katedra matematiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
tomas.kling@ukf.sk

Abstrakt

Konštrukčný výskum poskytuje výskumníkom priestor na navrhovanie, testovanie a postupné zdokonaľovanie vlastných didaktických riešení. V tomto príspevku sa zameriavame na vývoj didaktického nástroja založeného na princípoch gamifikácie. Navrhnutá prvočíselná hra obsahuje sériu úloh zameraných na vlastnosti prvočísel a rôzne typy prvočíselných problémov, pričom využíva herné prvky, ako sú nápovedy, odmeny a identifikácia „impostorov“. Výskum sa sústreďuje na identifikáciu najčastejších chýb žiakov pri riešení lineárnych rovníc a skúma, či využitie nami navrhutej prvočíselnej hry môže prispieť k zlepšeniu porozumenia matematickým pojmom a k zníženiu výskytu týchto chýb. Prostredníctvom konštrukčného výskumu analyzujeme proces návrhu úloh, implementáciu herných prvkov a ich potenciálny vplyv na rozvoj matematického myslenia žiakov.

Kľúčové slová: gamifikácia,, konštrukčný výskum, prvočísla

Abstract

English version of the abstract. Design research provides researchers with space to design, test, and gradually improve their own didactic solutions. In this paper, we focus on the development of a didactic tool based on the principles of gamification. The proposed prime number game contains a series of tasks focused on the properties of prime numbers and various types of prime number problems, using game elements such as hints, rewards, and the identification of "impostors." The research focuses on identifying the most common mistakes made by students when solving linear equations and examines whether the use of our proposed prime number game can contribute to improving understanding of mathematical concepts and reducing the occurrence of these mistakes. Through design research, we analyze the process of task design, the implementation of game elements, and their potential impact on the development of students' mathematical thinking.

Key Words: gamification, design-Based Research, prime numbers

Úvod

Konštrukčný výskum predstavuje nový trend v didaktickom výskume. Túto výskumnú metódu možno stručne charakterizovať ako cyklický proces pozostávajúci z viacerých fáz: analýza praktického problému, návrh riešenia, testovanie riešenia v praxi a následná reflexia a zovšeobecnenie získaných poznatkov [1]. V súčasnosti sa v didaktickom výskume čoraz viac uplatňujú prístupy, ktoré umožňujú prepojiť teoretické poznatky s praktickou realizáciou vo vyučovacom procese. Jedným z takýchto prístupov je konštrukčný výskum (Design-Based Research), ktorý poskytuje výskumníkom priestor na navrhovanie, overovanie a postupné zdokonaľovanie didaktických riešení v reálnom edukačnom prostredí.

Jednou z aktuálnych výziev vo vyučovaní matematiky je hľadanie spôsobov, ako zvýšiť motiváciu žiakov a zároveň podporiť ich porozumenie matematickým pojmom. V tomto kontexte sa do popredia dostáva využívanie prvkov gamifikácie, ktoré umožňujú implementovať herné mechanizmy do edukačného procesu. Autori [2, 3] vo svojom výskume integrovali prvky gamifikácie do vyučovania matematiky. Ich zistenia poukazujú na konzistentnú pozitívnu koreláciu medzi využívaním gamifikácie a zlepšenými študijnými výsledkami žiakov v oblasti numerickej plynulosti, koncepčného porozumenia aj celkovej motivácie. Hoci sa veľkosť efektu líši v závislosti od vekovej skupiny, dĺžky intervencie či regionálneho kontextu, celkový trend potvrdzuje, že gamifikácia predstavuje životaschopný a účinný nástroj na podporu výučby matematiky. Zároveň však ide o oblasť, ktorá je stále v procese vývoja. Existujúce obmedzenia napríklad publikačná zaujatosť, heterogenita výskumných dizajnov či prevažne krátkodobé hodnotenia, zdôrazňujú potrebu realizácie rigorózných, longitudinálnych a inkluzívnych štúdií, ktoré umožnia komplexnejšie overiť účinnosť gamifikácie v matematickom vzdelávaní [2].

V rámci nášho výskumu sa zameriavame na vývoj didaktického nástroja založeného na princípoch gamifikácie. Navrhnutá prvočíselná hra obsahuje sériu úloh zameraných na vlastnosti prvočísel a rôzne typy prvočíselných problémov. Hra využíva viaceré herné prvky, ako sú nápovedy, odmeny vo forme odznakov a

erbov či identifikácia tzv. „impostorov“, teda čísel alebo dvojíc čísel, ktoré nespĺňajú danú matematickú vlastnosť. Gamifikácia predstavuje dizajnový prístup, ktorý vychádza z princípov herného dizajnu s cieľom vyvolať herné zážitky v rôznych kontextoch. V posledných rokoch sa tento prístup stal významnou a často diskutovanou témou nielen v priemyselnom prostredí, ale aj v akademickej sfére. Čoraz viac produktov a služieb je navrhovaných tak, aby obsahovali rôzne herné prvky, ktorých cieľom je podporiť zážitky, ako sú pocit majstrovstva, potešenie, plynulosť alebo prepojenosť, popri ich základných funkciách.

Tento koncept súvisí so širším rozvojom gamifikácie v kultúre a spoločnosti, kde sa hry a hranie hier stali jednou z dominantných foriem zábavy a postupne prenikajú do rôznych oblastí každodenného života. [4].

1 Vývoj riešenia v konštrukčnom výskume

V našom výskume sme sa zamerali na využitie konštrukčného výskumu (Design-Based Research - DBR), ktorý nám umožňuje vytvárať vlastné riešenia a na základe získanej spätnej väzby ich postupne vylepšovať.

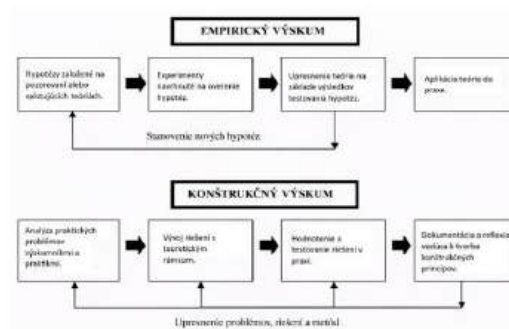
Konštrukčný výskum predstavuje systematické štúdium navrhovania, vývoja a hodnotenia vzdelávacích programov, procesov a produktov. Ide o cenný prístup, ktorý poskytuje významný vklad do možností optimalizácie vzdelávacích intervencií a zároveň prispieva k lepšiemu pochopeniu procesov výučby a učenia [5].

Podľa Fowlera (2002) možno konštrukčný výskum chápať ako metodologický žáner, ktorý má podobnosti s viacerými prekrývajúcimi sa výskumnými prístupmi, ako sú dizajnové experimenty, výskum vzdelávacieho dizajnu či výskum implementácie založený na dizajne. Pri skúmaní vzdelávacích problémov sa tieto prístupy snažia iteratívne rozvíjať teoretické poznatky o učení a vyučovaní a zároveň vytvárať efektívne praktické riešenia. Tento komplexnejší a kontextuálne orientovaný pohľad na vzdelávanie viedol k širšiemu využívaniu prístupu DBR v komunite výskumníkov v oblasti vzdelávania, najmä vo výskume matematiky. Zložitnosť jeho princípov však zároveň viedla k rôznorodým interpretáciám. Z tohto dôvodu je dôležité skúmať súčasné praktické využitie DBR a posúdiť, do akej miery pôvodná koncepcia tohto prístupu zodpovedá jeho reálnemu uplatňovaniu.

Štruktúra konštrukčného výskumu

Konštrukčný výskum s vývojovými a akčnými cieľmi sa líši od iných typov výskumu. Jeho cieľom nie je iba overovanie existujúcich teórií, ale aj návrh, tvorba a testovanie nových riešení v praxi. Pre lepšie

pochopenie rozdielov je vhodné grafické porovnanie štruktúry konštrukčného (vývojovo-akčného) výskumu s empirickým výskumom (obr. 1), ktoré zostavil Reeves [6].



Obr. 1 Štruktúra konštrukčného výskumu

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa [6].

Pri analýze praktických problémov výskumníkmi a odborníkmi z praxe sme sa zamerali na identifikáciu najčastejších chýb pri riešení rovníc a na výskum využitia gamifikácie pri úlohách s prvočíslami.

Viacerí autori uvádzajú medzi najčastejšie problémy operačné chyby, nedostatočné porozumenie zadaniu úlohy a neschopnosť prepojiť výsledok s kontextom. Autori identifikovali pri riešení lineárnych rovníc päť základných typov chýb:

1. Chyby pri manipulácii s rovnicami vyplývajúce z nesprávnej aplikácie ekvivalentných úprav rovníc v dôsledku nedostatočného konceptuálneho porozumenia algebraických operácií.
2. nesprávne používanie distributívnej vlastnosti a záporných znamienok,
3. chyby pri matematizácii slovných úloh
4. chyby pri operáciách s celými číslami,
5. neschopnosť prepojiť výsledok riešenia s kontextom úlohy. [7, 8]

Výskum [8] analyzoval chyby študentov pri riešení sústavy lineárnych rovníc s dvoma premennými (SPLDV). Výsledky ukázali, že študenti sa dopúšťajú viacerých typov chýb, napríklad:

1. Koncepčné chyby – chyby v porozumení úlohy, v dopĺňaní matematických tvrdení alebo v nesprávnom vytváraní matematických modelov. Tieto chyby často vyplývajú z nedostatočného pochopenia zadania.

Chyby v princípoch – chyby pri používaní matematických vzorcov, vyvodzovaní záverov a určovaní konečnej odpovede. Medzi faktory, ktoré tieto chyby spôsobujú, patrí nedostatočné pochopenie,

nepozornosť

1. alebo nepochopenie charakteru operácií v sústava lineárnych rovníc s dvoma neznámymi (SPLDV).
2. Operačné chyby – chyby pri vykonávaní výpočtových operácií, napríklad pri sčítaní, násobení alebo delení. [8]

Gamifikácia vo výučbe a učení sa matematiky môže mať rôzny význam pre učebné osnovy. Zistenia [9, 10, 11] viacerých štúdií poskytujú významné poznatky pre pedagógov a tvorcov učebných osnov, ktorí hľadajú nové prístupy na zlepšenie výučby a učenia matematiky.

Na základe zistení štúdie [9] sa odporúča prispôbiť herné prvky v učebných osnovách potrebám študentov. Takýto prístup umožňuje študentom vyberať si výzvy alebo témy, ktoré zodpovedajú ich záujmom a podporujú ich motiváciu k učeniu. Angco zároveň odporúča, aby pedagógovia pri integrácii gamifikovaných prvkov do výučby zohľadnili všetky ich potenciálne účinky. Vhodne implementovaná gamifikácia môže podporiť nadšenie, angažovanosť, schopnosť riešiť problémy a kooperatívne učenie sa študentov. Zároveň je dôležité, aby pedagógovia absolvovali odborné vzdelávanie zamerané na využívanie herných prvkov vo výučbe a osvojili si vhodné stratégie ich implementácie.

Kosova [10] vo svojej štúdií uvádza, že testovanie prvočísel prispieva k hlbšiemu pochopeniu teórie čísel u študentov. Tento prístup ich oboznamuje so základnými matematickými pojmi, ako sú delitele a prvočísla, čím posilňuje ich matematické základy. Zároveň podporuje algoritmické myslenie, keďže riešenie úloh zameraných na testovanie prvočíselnosti vedie študentov k systematickému prístupu k riešeniu matematických problémov a k vytváraniu efektívnych stratégií riešenia.

Štúdia [11] sa zamerala na hernú vyučovaciu aktivitu venovanú téme „Činitele a násobky“, určenú pre žiakov 6. ročníka. Cieľom aktivity bolo vytvoriť diferencované a obohatené vzdelávacie prostredie podporujúce dosiahnutie cieľov učebných osnov, konkrétne schopnosť žiakov určovať prvočísla na základe ich vlastností a vyhľadávať ich pomocou Eratostenov sít. Hra bola realizovaná počas dvoch vyučovacích hodín so skupinou 22 nadaných žiakov navštevujúcich Centrum vedy a umenia v Turecku. Učebné správanie žiakov bolo počas aktivity monitorované prostredníctvom pozorovacieho formulára. Na záver vyučovania žiaci vyplnili pološtruktúrovaný dotazník, v ktorom vyjadrili svoje názory na využívanie hier vo vyučovaní matematiky. Výsledky ukázali, že žiaci boli počas hry aktívni, motivovaní a prejavovali vysokú mieru zapojenia. Zdôraznili, že aktivita bola nielen

vzdelávacia, ale aj zábavná, a vyjadrili záujem o častejšie využívanie herných prvkov na hodinách matematiky.

1.1 Prvky gamifikácie prvočíselnej hry

Štúdia [12] analyzuje najčastejšie používané prvky gamifikácie vo vzdelávacom procese a ich vplyv na motiváciu a zapojenie študentov. Autori identifikovali viacero základných herných techník, ktoré sa využívajú pri implementácii gamifikácie vo výučbe. Medzi najčastejšie patria

1. Odmeny
2. Body
3. Odznaky
4. Rebríčky
5. Úrovne

Nami navrhnutá prvočíselná hra pozostáva z viacerých vzájomne prepojených prvkov. Základným prvkom hry sú úlohy zamerané na prvočísla, ktoré hráči riešia postupne. Po úspešnom vyriešení úlohy hráč postupuje na vyššiu úroveň, sa zvyšuje náročnosť riešených problémov.

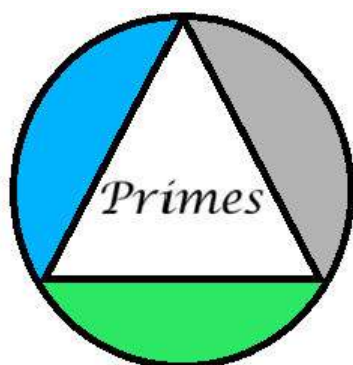
V priebehu riešenia majú hráči možnosť využiť dva typy nápovedy, ktoré podporujú porozumenie riešenému problému:

- informačnú kartu, ktorá poskytuje základné usmernenie alebo doplňujúce informácie potrebné na riešenie úlohy,
- ústnu nápovedu, ktorá spočíva vo vysvetlení postupu riešenia vyučujúcim.

Motivačný prvok hry predstavuje systém odmien, prostredníctvom ktorého môžu hráči získavať herné erby a odznaky. Tieto prvky slúžia na podporu aktívneho zapojenia hráčov a zároveň reflektujú mieru samostatnosti a úspešnosti pri riešení úloh.

Herné erby sú udeľované na základe miery samostatnosti pri riešení úlohy:

- 3 Herné erby – za vyriešenie úlohy bez použitia nápovedy,
- 2 Herné erby – za vyriešenie úlohy s využitím informačnej karty,
- 1 Herný erb – za vyriešenie úlohy po vysvetlení postupu riešenia vyučujúcim.

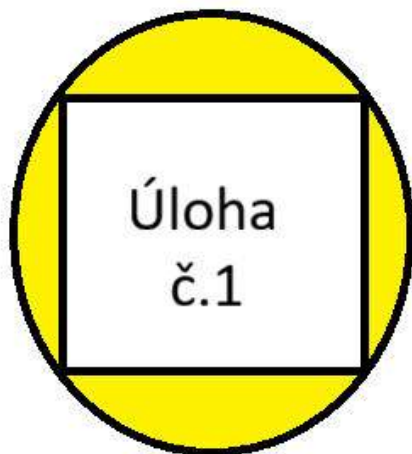


Obr. 2 Herný erb ako forma odmeny v hre

Odznaky sú pridelované podľa počtu pokusov potrebných na správne vyriešenie úlohy:

- 3 odznaky – za správne riešenie na prvý pokus,
- 2 odznaky – za správne riešenie na druhý pokus,
- 1 odznak – za správne riešenie na tretí a každý ďalší pokus.

Takto koncipovaný systém hodnotenia podporuje nielen správnosť riešenia, ale aj samostatnosť, vytrvalosť a efektívnosť pri riešení matematických úloh.



Obr. 3 Odznak pridelovaný za úspešnosť riešenia úloh

1.2 Prvočíselné úlohy

Pri tvorbe úloh typu Hľadaj impostorov sme vychádzali z vybraných špeciálnych tried prvočísel, konkrétne z multiplikatívnych prvočísel, prvočíselných dvojčiat a prvočísel Sophie Germain. [13]

Úloha 1: Sito

V tabuľke sa nachádza zoznam čísel, ku ktorým sú priradené jednotlivé písmená. Postupne vyškrtajte všetky čísla, ktoré sú deliteľné prvými tromi číslami z tabuľky. Čísla, ktoré po vyškrtnutí zostanú, predstavujú prvočísla. Zostávajúce prvočísla následne zoradíte

vzostupne a podľa priradených písmen získate názov algoritmu.

2	3	5	6	8	11	15	16
E	R	A	A	I	T	P	O
18	19	20	29	31	35	40	42
D	O	Z	S	T	O	H	P
47	51	53	55	61	88	89	97
E	C	N	J	O	Q	V	O

Tab. 1 Číselná tabuľka pre úlohu „Sito“

Nápoveda:

- Prirodzené číslo je deliteľné číslom 2, ak je jeho posledná cifra párna.
- Číslo je deliteľné číslom 3, ak je jeho ciferný súčet deliteľný číslom 3.

Príklad: $123 \rightarrow 1 + 2 + 3 = 6 \rightarrow 6 : 3 = 2$ teda číslo 123 je deliteľné číslom 3.

- Číslo je deliteľné číslom 5, ak sa končí číslicou 0 alebo 5.

Úloha 2: Multiplikatívne prvočísla (Impostory)

Multiplikatívne prvočísla sú také prvočísla, pre ktoré platí, že súčin ich cifier je tiež prvočíslom.

Z nasledujúceho zoznamu čísel identifikujte impostorov, teda čísla, ktoré nepatria medzi multiplikatívne prvočísla.

Zoznam čísel

2,3,7,19,23,31,37,61,71,89,113

Nápoveda

Ciferný súčin sa určuje podobne ako ciferný súčet, avšak namiesto sčítania jednotlivé cifry násobíme.

Príklad: $29 \rightarrow 2 \times 9 = 18$

Úloha 3: Prvočíselné dvojčatá (Impostory)

V matematike označujeme ako prvočíselné dvojčatá takú dvojicu prvočísel, ktorých rozdiel je rovný 2. Z nasledujúceho zoznamu dvojíc čísel identifikujte impostorov, teda tie dvojice, ktoré nespĺňajú podmienku prvočíselných dvojčiat.

{3,5}, {5,7}, {7,11}, {19,23}, {29,31}, {37,39}, {71,73}

Nápoveda

- Najskôr overte, či sú obe čísla v dvojici prvočísla.
- Následne skontrolujte rozdiel medzi číslami v dvojici. Ak platí $|a - b| = 2$ ide o prvočíselné dvojčatá.

Úloha č. 4: Prvočísla Sophie Germain

V teórii čísel je prvočíslo p prvočísлом Sophie Germain práve vtedy, ak po vynásobení tohto prvočísla číslom 2 a pripočítaní čísla 1 získame opäť prvočíslo.

Medzi nasledujúcimi číslami nájdite impostorov, ktoré nie sú prvočísla Sophie Germain.

2, 7, 11, 19, 37, 41, 53, 61, 83, 113

Nápoveda

Pre každé číslo p vypočítajte

$$p' = 2p + 1$$

Príklad

$$p = 23$$
$$p' = 2 \cdot 23 + 1 = 47$$

Keďže 47 je prvočíslo, číslo potom 23 patrí medzi prvočísla Sophie Germain.

Úloha 5: Hlavný impostor

V predchádzajúcich úlohách ste identifikovali impostorov – čísla alebo dvojice čísel, ktoré nespĺňali danú vlastnosť.

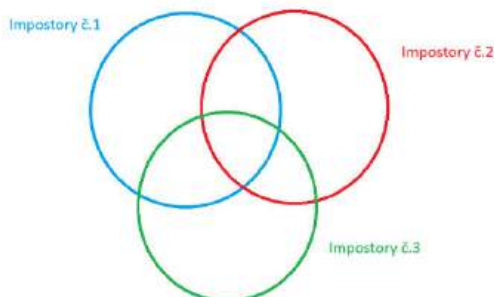
Vennovho diagram znázorníte množiny impostorov z jednotlivých úloh:

- množina A – impostory z úlohy 2
- množina B – impostory z úlohy 3
- množina C – impostory z úlohy 4

Vašou úlohou je nájsť hlavného impostora, teda číslo, ktoré sa nachádza vo všetkých troch množinách súčasne.

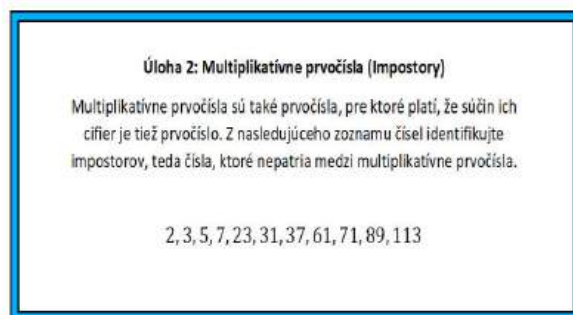
$$A \cap B \cap C$$

Tento prienik predstavuje číslo, ktoré je impostorom vo všetkých úlohách.



Obr.4 Vennov diagram znázorňujúci prienik množín impostorov z úloh 2, 3 a 4

Dizajn kariet s úlohami



Obr. 5 Dizajn úloh

2 Výsledky a diskusia

V rámci konštrukčného výskumu bol navrhnutý a implementovaný didaktický nástroj vo forme prvočíselnej hry, ktorý využíva prvky gamifikácie vo vyučovaní matematiky. Hra pozostáva zo série úloh zameraných na rôzne vlastnosti prvočísel, napríklad prvočíselné dvojčatá, multiplikatívne prvočísla či prvočísla Sophie Germain. Súčasťou hry sú aj herné mechaniky, ako sú nápovedy, odmeny vo forme odznakov a erbov, postup na vyššie úrovne a identifikácia tzv. „impostorov“. Pri návrhu úloh sa vychádzalo z analýzy najčastejších chýb žiakov pri riešení lineárnych rovníc. Výsledky analýzy ukázali, že žiaci sa najčastejšie dopúšťajú chýb pri algebraických úpravách, manipulácii so znamienkami a pri interpretácii výsledkov. Navrhnuté úlohy preto kladú dôraz na rozvoj logického uvažovania, analýzu vlastností čísel a systematický postup pri riešení problémov. Navrhnutý didaktický nástroj predstavuje inovatívny prístup k rozvíjaniu matematických kompetencií žiakov prostredníctvom gamifikácie. V súčasnej fáze vývoja obsahuje databanka hry 20 úloh rozdelených do štyroch úrovní, pričom prvý a štvrtý level sú zamerané na identifikáciu tzv. „impostorov“, druhý level integruje prácu s Ozobotmi a tretí level je orientovaný na prácu s údajmi. V rámci konštrukčného výskumu je podrobnejšie analyzovaný prvý level, ktorý bude následne overovaný na výskumnej vzorke približne 200 žiakov. Očakávané výsledky umožnia identifikovať typické stratégie riešenia a chyby žiakov, čo prispeje k prehodnoteniu konštruktu hry a úpravám najmä prvého a druhého levelu. Potenciál navrhnutého nástroja spočíva aj v jeho otvorenosti a možnosti ďalšieho rozširovania, keďže databanku úloh je možné dopĺňať o nové typy úloh vychádzajúce z rôznych typov prvočísel (viac ako 60 typov uvedených v [13]). Po ukončení výskumnej fázy autori plánujú hru voľne sprístupniť prostredníctvom online vzdelávacích platforiem, napríklad EduPage alebo Eduportálu, čo umožní jej širšie využitie v pedagogickej praxi.

Záver

Cieľom príspevku bolo predstaviť návrh didaktického nástroja založeného na princípoch gamifikácie a poukázať na jeho potenciál pri podpore rozvoja matematického myslenia žiakov. Navrhnutá prvočíselná hra využíva úlohy zamerané na rôzne vlastnosti prvočísel a implementuje herné prvky, ako sú nápovedy, odmeny, postup na vyššie úrovne či identifikácia tzv. „impostorov“. Tieto prvky majú podporiť motiváciu žiakov, ich aktívne zapojenie do riešenia úloh a zároveň rozvíjať ich schopnosť logického uvažovania. Výskum je realizovaný v rámci konštrukčného výskumu, ktorý umožňuje postupné navrhovanie, overovanie a zdokonaľovanie didaktických riešení v reálnom edukačnom prostredí. Východiskom pre návrh hry bola analýza najčastejších chýb žiakov pri riešení lineárnych rovníc, ktorá poukazuje na potrebu hľadania inovatívnych prístupov vo vyučovaní matematiky. Naším najbližším cieľom je distribúcia vstupného testu, prostredníctvom ktorého chceme identifikovať aktuálnu úroveň vedomostí žiakov a najčastejšie chyby pri riešení úloh. Na základe získaných výsledkov bude následne realizovaná aplikácia nami navrhnutej prvočíselnej hry vo vyučovaní. Získané dáta umožnia analyzovať vplyv gamifikovaného prostredia na porozumenie matematickým pojmom a na výskyt chýb pri riešení matematických úloh. V ďalšej fáze výskumu plánujeme vyhodnotiť účinnosť navrhnutého didaktického nástroja a formulovať odporúčania pre jeho ďalšie využitie v edukačnej praxi.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] TRNA, Josef, (2011). Konstrukční výzkum (design-based research) v přírodovědných didaktikách. *Scientia in education*. Praha: Univerzita Karlova, roč. 2, č. 1, s. 3–14. ISSN 1804-7106. VIŠŇOVSKÝ, E., (2022). *Akademický svet a jeho súčasné problémy*. Bratislava: Veda, 187 s. ISBN 978-80-224-1965-9.
- [2] KARAMERT, Önder a Aslihan KUYUMCU VARDAR. *The effect of gamification on young mathematics learners' achievements and attitudes*. Journal of Educational Technology and Online Learning. 2021, roč. 4, č. 3, s. 561–577. ISSN 2618-6586.
- [3] JUTIN, Noizzie Tah a Siti Mistima MAAT. *The effectiveness of gamification in teaching and learning mathematics: A systematic literature review*. International Journal of Academic Research in Progressive Education and Development. 2024, roč. 13, č. 1, s. 1–15. ISSN 2226-6348.
- [4] JAJOO, C. S. a RAJAS, S., (2025). GAME ON FOR MATH: A systematic review of gamified learning environments and numerical proficiency. *Interdisciplinary Journal of Information, Knowledge, and Management*. Roč. 20, č. 2. ISSN 1555-1237.
- [5] HAMARI, Juho; KOIVISTO, Jonna a SARSA, Harri, (2014). Does gamification work? A literature review of empirical studies on gamification. Washington: IEEE, 10 s. ISBN 978-1-4799-2504-9.
- [6] REEVES, Thomas C., (2000). Enhancing the worth of instructional technology research through design experiments and other development research strategies. In: BOURDEAU, Janice a HELLER, Ron (eds.). *International Perspectives on Instructional Technology Research for the 21st Century*. New Orleans: Association for the Advancement of Computing in Education, 15 s. ISBN 1-880094-33-3.
- [7] ASFYRA, I. B.; RUMITE, W. a ARIANTO, H., (2026). Error analysis of vocational students in solving linear equation problems. *LINEAR: Journal of Mathematics Education*.
- [8] RODIANA, Ivta; HAMDİYANTI, Meti; LAELASARI a SUBROTO, Toto, (2024). Students' Skills to Solve Linear Equation System in Two Variables: Systematic Literature Review. Pekanbaru: Universitas Riau, 12 s. ISSN 2580-8435.
- [9] ANGCO, Robert Jay Naigar, (2023). The Use of Gamification in Teaching and Learning Mathematics: A Meta-Synthesis. Bandar Lampung: Universitas Lampung, s. 943–954. ISSN 2550-1313. DOI: 10.23960/jpp.v13.i3.202304.
- [10] KOSOVA, Robert, (2023). A review of primarily tests and algorithms: Engaging students to code for mathematics. *International Journal of Mathematical Education in Science and Technology*. London: Taylor & Francis, roč. 54, č. 8, s. 1585–1603. ISSN 0020-739X. DOI: 10.1080/0020739X.2022.2156621.
- [11] YAĞMUR, B. E., (2020). A game-based teaching activity related to prime numbers. *Journal of Inquiry Based Activities*. Roč. 10, č. 1, s. 18–30. ISSN 2146-4240
- [12] LUCAS, Mao a JUN, Lucas, (2024). Gamification elements and their impacts on education: A review. *Multidisciplinary Reviews*. Roč. 8, s. 1–12.
- [13] Prime-Numbers.info, (bez dátumu). Article. Dostupné na: <https://prime-numbers.info/article/>. [prístup 2025-11-10].

NÁVRH METODIKY PRE HODNOTENIE BEZPEČNOSTI ZASTÁVOK VEREJNEJ OSOBNEJ DOPRAVY

Proposal of a methodology for assessing the safety of public passenger transport stops

Matúš Kubica¹ – Ľubomír Černický²

¹Katedra cestnej a mestskej dopravy, Žilinská univerzita v Žiline, Univerzitná 8215, 010 26 Žilina

¹matus.kubica@student.ukf.sk

Abstrakt

Príspevok sa zameriava na predstavenie metodiky hodnotenia bezpečnosti zastávok z pohľadu cestujúcich mimo vozidla – teda nastupujúcich, vystupujúcich a prichádzajúcich na zastávku. Predtým je však nutné analyzovať súčasné predpisy, ktoré sa zaoberajú touto problematikou. Metodika pozostáva z viacerých krokov: určenie hodnotených parametrov, ich meranie, tvorba hodnotiacej škály a bodovanie zastávok na základe údajov z terénu. Následne je aplikovaná na vybranom území Bratislavy, a to na zastávky MHD (mestská hromadná doprava) aj RAD (regionálna autobusová doprava), aby sa overila jej univerzálnosť pre rôzne typy zastávok. Výsledky umožnia porovnať bezpečnostnú úroveň jednotlivých zastávok a navrhnúť zlepšenia, ktoré prispievajú k efektívnejšej, bezpečnejšej a modernejšej verejnej doprave.

Kľúčové slová: metodika, zastávka, terminál, bezpečnosť cestujúcich, verejná doprava

Abstract

This article focuses on developing a methodology for evaluating the safety of stops from the perspective of passengers outside the vehicle—those boarding, alighting, or approaching the stop. However, before that, it is necessary to analyze the current regulations that deal with this issue. The methodology consists of several steps: identifying the evaluated parameters, measuring them, creating a rating scale, and scoring the stops based on field data. It is then applied in a selected area of Bratislava, covering both urban (MHD) and regional (RAD) stops, in order to verify its universality for different types of stops. The results allow for the comparison of safety levels across stops and the proposal of improvements that can contribute to more efficient, safer, and more modern public transport.

Key Words: methodology, stop, terminal, safety of passengers, public transport

Úvod

Príspevok sa zaoberá zastávkami verejnej osobnej dopravy, ktoré sa v úvodnej fáze podrobili analýze, pričom dôraz sa kládol na vytvorenie metodiky určujúcej spôsob a frekvenciu ich merania. Hodnotenie zastávok je dôležité najmä pre zistenie aktuálneho stavu zastávok a následné navrhnutie vhodných opatrení a rekonštrukcií tak, aby zastávka bola bezpečná pre všetkých používateľov. Na základe získaných poznatkov a dostupnej odbornej literatúry sa navrhol postup, ktorý má byť všeobecne platný a použiteľný pre akýkoľvek typ zastávky. [3]

Pred návrhom metodiky sa vykonalo preskúmanie existujúcich metodických prístupov, vedeckých zdrojov a analýzu predpisov týkajúcich sa umiestnenia a vybavenia zastávok verejnej osobnej dopravy v rôznych krajinách, konkrétne v Českej republike, Nemecku a USA. Napríklad americká norma rozdeľuje typy zastávok na viaceré druhy ako na zastávku v zálive, zastávku na ceste a špecificky aj rozšírenú zastávku na ceste s možnosťou parkovania iných vozidiel. Tento typ je najčastejší v San Franciscu v Kalifornii. Tiež sa tu spomína, ako by mal byť navrhnutý dizajn prístreška, koľko cestujúcich musí zastávka obslúžiť, aby bolo efektívne nainštalovať na zastávku prístrešok a taktiež sa tu rieši, kde majú byť umiestnené reklamy na zastávke. [1]

Na Slovensku problematiku hodnotenia zastávok verejnej osobnej dopravy riešia „Technické a prevádzkové štandardy IDS BK“, ktoré sa danou témou zaoberajú veľmi povrchno, pretože riešia okrem zastávok aj vozidlá, cestovné doklady a pod.

Na základe návrhu vhodnej metodiky je možné navrhnúť vhodné opatrenia na ich rekonštrukciu a modernizáciu, čo by malo viesť k zvýšeniu kvality poskytovaných služieb v danej oblasti. To je zároveň cieľom navrhutej metodiky. [3]

1 Návrh metodiky

Práca sa sústreďuje na samotnú tvorbu metodiky. Najskôr sa vymedzil predmet merania, teda konkrétne parametre zastávok, ktoré sa budú na jednotlivých miestach hodnotiť. Následne sa stanovil interval a

spôsob kontroly týchto parametrov. Ďalším krokom bolo určenie hodnotiacich stupňov s presným vysvetlením ich významu. Potom sa vytvoril zoznam zastávok určených na meranie a spracovali sa ich náčrty. V závere tejto časti sa jednotlivým zastávkam prideliť body na základe reálneho merania vykonaného priamo v teréne. Súčasťou sú aj tabuľky, ktoré budú zaznamenávať splnenie alebo nesplnenie daných parametrov, prípadne budú obsahovať hodnotové intervaly s prideleným bodovým ohodnotením.

Navrhovaná metodika musí byť koncipovaná tak, aby bola použiteľná pre rôzne druhy zastávok. Z tohto dôvodu bude zahŕňať širší súbor parametrov, aby pokryla rozličné typy a úroveň vybavenia zastávok – od menej využívaných zastávok v extraviláne s nízkym počtom cestujúcich až po frekventované uzly v centre veľkých miest, kde sa stretáva viacero druhov dopravy. V záverečnej časti práce sa uskutočnilo praktické overenie navrhutej metodiky prostredníctvom konkrétneho merania. Boli prezentované reálne náčrty zastávok a hodnotiace tabuľky vyplnené na základe terénneho zberu údajov. Následne sa jednotlivé zastávky vzájomne porovnali a výsledky sa spracovali do tabuliek a grafov, ktoré znázornia ich úroveň kvality. Porovnanie sa uskutočnilo jednak medzi všetkými hodnotenými zastávkami, ako aj v rámci rovnakého druhu dopravy. Prínos metodiky spočíva v jasnej identifikácii nedostatkov konkrétnych zastávok.

Metodika sa navrhla tak, že sa skladá z 3 hlavných častí, a to **predmet merania, postup merania a hodnotenie zastávok.** [3]

1.1 Predmet merania

Predmetom merania sa rozumejú parametre zastávok, ktoré sú navrhnuté vo formulári. Tento formulár slúži na prehľadný zápis parametrov zastávky, ktorá je podrobená hodnoteniu. Formulár sa skladá z niekoľko častí. Sú nimi **všeobecné parametre pre celú skupinu zastávok, bližšie špecifikácie parametrov každej zastávky zvlášť, bližšie špecifikácie pre zastávky autobusov a trolejbusov a bližšie špecifikácie pre zastávky električky.** Šablóna formuláru sa nachádza v prílohe za príspevkom.

Každý parameter sa popísal, aby bolo jasné, čo sa rozumie pod každým pojmom. Napríklad parameter „Počet jazdných pruhov v termináli“ bol vysvetlený ako počet jazdných pruhov, ktoré je potrebné prekonať pri prestupovaní z jedného druhu dopravy na ďalší druh dopravy, pričom za jazdný pruh sa počíta výhradne jazdný pruh pre motorové vozidlá vrátane pruhov určených pre autobusy, trolejbusy a riadne označené vozidlá taxislužby, no za jazdný pruh sa nepočíta pruh určený pre cyklistov.

Celkový počet parametrov, ktoré sa hodnotili pri každej zastávke je 35. [3] Zoznam parametrov sa

nachádza v prílohe za príspevkom.

Na obrázku nižšie je zastávka Bratislava, Zlaté Piesky, ktorá je vybavená Kasselským obrubníkom a komfortným nadchodom pre cestujúcich.



Obrázok 1 Zastávka Bratislava, Zlaté Piesky

1.2 Postup merania

Táto časť práce stanovuje na základe už spomínaného formulára, ako sa majú jednotlivé parametre merať, akým spôsobom a s akými prostriedkami má prebiehať ich meranie. Tu sa tiež popisuje interval merania jednotlivých parametrov, respektíve ako často sa má vykonávať ich kontrola. Tento popis sa v práci vykonával pre každý parameter zvlášť.

Napríklad parameter „Prítomnosť chodníka na zastávku“ sa popísal ako údaj, ktorý sa meria vizuálne zo zastávky, odkiaľ sa meracia osoba rozhladne na všetky strany od zastávky, a tak posudzuje, či aspoň na jednu zo strán vedie zo zastávky chodník, pričom minimálna neprerušená dĺžka chodníka od zastávky musí merať aspoň 200 m, pokiaľ nie je cieľ (budova, park a pod.) bližšie ako 200 m a tento údaj sa musí merať 1-krát za rok. [3]

1.3 Hodnotenie zastávok

V tejto časti metodiky sa pridružuje jednotlivým zastávkam hodnotenie. Hodnotenie prebieha podľa metódy bodovania, ktorá je v tabuľke 1. Ak je parameter typu ANO/NIE, tak platí, že ANO je hodnotené počtom bodov 5. Ak však parameter je hodnotený popisom NIE, tak sa pridružuje počet bodov 1. V niektorých situáciách to môže byť aj naopak, podľa tabuliek. [3]

Stupeň hodnotenia	Význam stupňa hodnotenia
5	Parameter úplne spĺňa požiadavky
4	Parameter skoro úplne spĺňa požiadavky
3	Parameter priemerne spĺňa požiadavky
2	Parameter iba trochu spĺňa požiadavky
1	Parameter vôbec nespĺňa požiadavky

Tabuľka 1 Spôsob hodnotenia zastávok

1.4 Zoznam zastávok a náčrtov zastávok

V tejto časti sa vytvára zoznam zastávok, kde sa definuje, z koľkých pridružených zastávok sa zastávka skladá, ktoré spadajú pod rovnaký názov. Tiež sa vytvorí vizuálny náčrt každej sledovanej zastávky. Príklad náčrtu aj so všetkými pridruženými zastávkami, ktoré spadajú pod názov Bratislava, Pod stanicou je na obrázku nižšie. A znamená autobus, T znamená trolejbus a E znamená električka. [3]



Obrázok 2 Náčrt skupiny zastávok

Zdroj: [2]

1.5 Pridelenie bodov zastávkam

V tejto časti práce sa definuje spôsob hodnotenia jednotlivých parametrov. V práci sa každý opísaný parameter hodnotil buď pre všetky zastávky v jednej skupine naraz alebo pre každú zastávku samostatne. Body pridelené každej zastávke samostatne, pričom parametre hodnotené všeobecne pre celú skupinu zastávky sa pri jednotlivých zastávkach iba opísal.

Napríklad pre parameter „Čas chôdze na prestup v rámci terminálu“ je uvedená nasledovná tabuľka 2, podľa ktorej sa pridávajú body podľa skutočného stavu. [3]

Do 10 s	5
Od 11 s do 20 s	4
Od 21 s do 30 s	3
Od 31 s do 40 s	2
Viac ako 40 s	1

Tabuľka 2 Čas chôdze na prestup v termináli

Tabuľka tohto typu hodnotenia (prispôbená pre každý parameter) je v práci uvedená pre každý sledovaný parameter.

1.6 Vyhodnotenie merania

Metodika končí vyhodnotením merania každého parametra sledovanej zastávky. Taktiež je v práci opísaný postup aj pre vyhodnotenie vzájomného porovnania viacerých zastávok medzi sebou.

Prvým krokom je určenie váh dôležitosti. Vhodné je zostaviť dotazník, ktorý budú vyplňať kvalifikované osoby a ktoré určia váhu dôležitosti jednotlivých parametrov (tento spôsob bol použitý aj pre účely

tejto práce).

Nasledujúcim krokom je zostrojenie Saatyho matice, teda aplikácia viackriteriálnej analýzy. V Saatyho matici je každý znak kvality pomenovaný ako parameter. Z dotazníka sa vybrala najčastejšia odpoveď pri každom parametri a následne sa zapísali do Saatyho matice, kde sa vykonali výpočty pre zistenie váhy každého parametra. Každá najčastejšia odpoveď pri každom parametri sa navzájom porovnala a podľa toho, v akom bol vzťahu v tabuľke 3, taká hodnota sa im pridelila.

Hodnota	Význam
1	Kritériá sú rovnako dôležité
3	Jedno kritérium má slabú preferenciu nad druhým
5	Jedno kritérium má silnú preferenciu nad druhým
7	Jedno kritérium má veľmi silnú preferenciu nad druhým
9	Jedno kritérium má extrémne silnú preferenciu nad druhým

Tabuľka 3 Popis hodnôt pri porovnávaní Saatyho metódou

Ďalším krokom vyhodnotenia je celkové vyhodnotenie parametra, ktorého hodnota zodpovedá súčinu váhy dôležitosti pre daný parameter a prideleným počtom bodov danej zastávke. Následne bolo stanovené celkové tzv. „skóre“ zastávky na základe súčinu hodnôt. Toto vyhodnotenie sa realizovalo pre každú sledovanú zastávku.

Na základe „skóre“ bolo zrealizované porovnanie zastávok medzi sebou. Z jednotlivých „skóre“ zastávok sa vypočíta aritmetický priemer, prípadne podiel parametrov s najhorším hodnotením, v prípade, že je nejaký parameter, ktorý výrazne znižuje priemerné „skóre“ zastávky. Jednotlivé „skóre“ hodnoty celej skupiny zastávky z každej tabuľky pre každú skupinu zastávky boli usporiadané od najväčšej hodnoty po najmenšiu a následne sa vyhodnotili navzájom tak, že zastávky s najvyšším „skóre“ boli považované za najkvalitnejšie a naopak zastávky s najnižším „skóre“ boli považované za najmenej kvalitné.

Posledným krokom v rámci vyhodnocovania je posúdenie počtov spojov, ktoré sledovanú zastávku obsluhujú za 24 hodín. Tento krok je kľúčovým pri rozhodovaní sa, či zastávku modernizovať alebo nie. V prípade, že zastávka dosahuje 5 bodov, teda jej úroveň bezpečnosti je vysoká, počet spojov v takomto prípade nehrá významnú úlohu. Tento parameter sa sleduje len pri zastávkach, ktoré dosiahli „skóre“ menej ako 5 bodov. Počtom spojov sa myslí počet všetkých spojov cez pracovný deň v oboch smeroch pre všetky dopravné prostriedky. Medzné hodnoty počtov spojov pre modernizáciu zastávky sú uvedené v tabuľke 4. [3]

Počet spojov	Odporúčanie modernizácie
1-100	ľahké odporúčanie
101-200	odporúča sa
201-500	potrebné
501 a viac	veľmi potrebné

Tabuľka 4 Medzné hodnoty počtov spojov

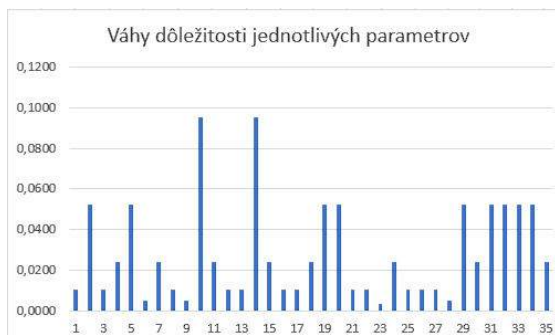
2 Výsledky

Navrhnutá metodika v tejto práci bola overovaná na 5 zastávkach v Bratislave. Postup merania prebiehal presne podľa krokov metodiky. Vyplnil sa teda formulár, vytvoril sa zoznam zastávok a ich náčrty, zastávkam sa prideliili body, ako je znázornené v tabuľke nižšie, kde ako príklad sa uviedla zastávka Bratislava, Pod stanicou. Žltá časť je časť parametrov, ktorá sa hodnotila výlučne pre zastávky autobusov a trolejbusov, pričom zelená časť znázorňuje parametre hodnotené len pri zastávkach električky. Parametre sú číslované podľa toho, ako sa nachádzajú v zozname parametrov v prílohe za príspevkom.

Parameter	Počet pridelených bodov						
	E1	E2	AT1	AT2	A1	A2	
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5	5
6	4	4	4	4	2	2	2
7	5	5	5	5	5	5	5
8	5	5	5	5	5	5	5
9	3	3	4	4	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5	5
11	1	1	1	1	1	1	1
12	5	5	5	5	5	5	5
13	1	1	5	5	5	5	5
14	5	5	5	5	5	5	5
15	5	5	5	5	5	5	5
16	1	1	1	5	1	1	1
17	5	5	5	5	5	5	5
18	5	5	5	5	5	5	5
19	5	5	5	5	5	5	5
20	4	4	4	4	4	4	4
21	5	5	1	1	2	2	2
22	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	2	2	2	2	2
24	-	-	5	5	5	5	5
25	-	-	5	5	5	5	5
26	-	-	5	5	5	5	5
27	-	-	1	1	1	1	1
28	-	-	1	1	1	1	1
29	-	-	5	1	1	1	5
30	2	2	-	-	-	-	-
31	5	5	-	-	-	-	-
32	1	1	-	-	-	-	-
33	1	1	-	-	-	-	-
34	5	5	-	-	-	-	-
35	3	3	-	-	-	-	-

Tabuľka 5 Počet pridelených bodov zastávke BA, Pod stanicou

V rámci vyhodnotenia merania sa použila metóda viackriteriálnej analýzy, pričom boli určené váhy dôležitosti odborníkmi a následne sa z nich vytvoril graf nižšie, ktorý poukazuje na to, ktoré parametre sú do akej miery dôležité. Najdôležitejšími parametrami sú 10 a 14, čo je „Prítomnosť chodníka na zastávku“ a „Priechod pre chodcov v termináli“.



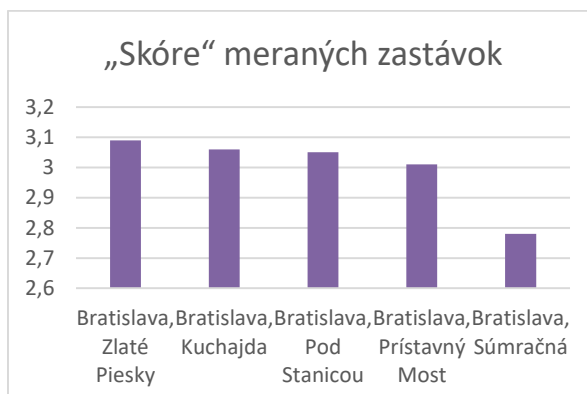
Obrázok 3 Váhy dôležitosti jednotlivých parametrov

Po vynásobení váh dôležitosti s bodovou hodnotou parametra sa zistila bodová hodnota pre každý parameter. Tieto hodnoty sa vypisali do tabuľky nižšie, kde sa po ich sčítaní nachádza aj celkové „skóre“ zastávky (v tomto prípade Bratislava, Pod Stanicou).

Parameter	Váha parametra	Bodové hodnoty parametra							Výsledné hodnotenie parametra						
		E1	E2	AT1	AT2	A1	A2	E1	E2	AT1	AT2	A1	A2		
1	0.0100	1	1	1	1	1	1	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100		
2	0.0500	1	1	1	1	1	1	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500		
3	0.0100	1	1	1	1	1	1	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100		
4	0.0241	1	1	5	5	5	5	0.0241	0.0241	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205		
5	0.0500	5	5	5	5	5	5	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500		
6	0.0852	4	4	4	4	2	2	0.3408	0.3408	0.3408	0.3408	0.1704	0.1704		
7	0.0241	5	5	5	5	5	5	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205		
8	0.0500	5	5	5	5	5	5	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500		
9	0.0852	3	3	4	4	5	5	0.2556	0.2556	0.3408	0.3408	0.4260	0.4260		
10	0.0995	5	5	5	5	5	5	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975		
11	0.0241	1	1	1	1	1	1	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241		
12	0.0400	5	5	5	5	5	5	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000		
13	0.0100	1	1	5	5	5	5	0.0100	0.0100	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500		
14	0.0995	5	5	5	5	5	5	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975	0.4975		
15	0.0241	1	1	1	1	1	1	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241		
16	0.0100	1	1	1	1	1	1	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100		
17	0.0500	5	5	5	5	5	5	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500		
18	0.0241	1	1	1	1	1	1	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241		
19	0.0500	5	5	5	5	5	5	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500		
20	0.0400	4	4	4	4	4	4	0.1600	0.1600	0.1600	0.1600	0.1600	0.1600		
21	0.0500	5	5	1	1	2	2	0.2500	0.2500	0.0500	0.0500	0.1000	0.1000		
22	0.0100	1	1	1	1	1	1	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100		
23	0.0100	1	1	1	1	1	1	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100		
24	0.0241	5	5	5	5	5	5	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205		
25	0.0241	5	5	5	5	5	5	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205		
26	0.0241	5	5	5	5	5	5	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205	0.1205		
27	0.0241	1	1	1	1	1	1	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241		
28	0.0241	1	1	1	1	1	1	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241		
29	0.0241	5	1	1	1	1	5	0.1205	0.0241	0.0241	0.0241	0.0241	0.1205		
30	0.0200	2	2	-	-	-	-	0.0400	0.0400	-	-	-	-		
31	0.0500	5	5	-	-	-	-	0.2500	0.2500	-	-	-	-		
32	0.0100	1	1	-	-	-	-	0.0100	0.0100	-	-	-	-		
33	0.0241	1	1	-	-	-	-	0.0241	0.0241	-	-	-	-		
34	0.0500	5	5	-	-	-	-	0.2500	0.2500	-	-	-	-		
35	0.0300	3	3	-	-	-	-	0.0900	0.0900	-	-	-	-		
SÚMMA								2.20	2.20	3.00	3.00	3.00	3.00		

Tabuľka 6 Celkové hodnotenie zastávky BA, Pod Stanicou

Ako posledný krok sa vykonalo porovnanie zastávok medzi sebou, v tomto prípade ide o porovnanie 5 sledovaných zastávok, a to Bratislava, Zlaté Piesky; Bratislava, Kuchajda; Bratislava, pod stanicou; Bratislava, Prístavný most a Bratislava, Súmračná. Záverečné vyhodnotenie týchto zastávok medzi sebou je uvedená v grafe nižšie.



Obrázok 4 Vyhodnotenie sledovaných zastávok medzi sebou

Najbezpečnejšia zastávka spomedzi sledovaných je Bratislava, Zlaté Piesky. Naopak najmenej bezpečná zastávka je Bratislava, Súmračná. [3]

3 Diskusia

Výsledky práce poukazujú na to, že navrhnutá metodika hodnotenia zastávok verejnej dopravy je aplikovateľná v rôznych typoch prostredia a umožňuje systematické porovnanie kvalitatívnej úrovne jednotlivých zastávok. Praktické overenie metodiky preukázalo jej funkčnosť v podmienkach reálneho terénneho merania, pričom sa potvrdilo, že stanovené parametre sú relevantné na identifikáciu rozdielov medzi zastávkami rôzneho charakteru.

V porovnaní s existujúcimi prístupmi, ktoré riešia iba vybrané aspekty (napríklad technické vybavenie alebo bezpečnosť) [1] alebo metodika, ktorá kategorizuje zastávky do 3 skupín, no nerieši podrobnejšie parametre, ktoré so zastávkou súvisia [4] alebo metodika, ktorá pristupuje k zastávkam iba okrajovo a venuje sa viacerým aspektom verejnej osobnej dopravy [5], je navrhovaná metodika koncipovaná ako univerzálny hodnotiaci nástroj, pričom tento návrh integruje širší súbor parametrov zahŕňajúcich infraštruktúru, informovanosť cestujúcich, prístupnosť aj celkový technický stav zastávky.

Za významnú silnú stránku metodiky možno považovať jej univerzálnosť. Hodnotiace kritériá boli navrhnuté tak, aby umožňovali aplikáciu na zastávky v extraviláne s nízkou frekvenciou cestujúcich aj na vysoko zaťažené zastávky v centrách miest. Bodovací systém zároveň umožňuje jednoduché porovnanie a vyhodnotenie jednotlivých objektov.

Napriek uvedeným prínosom má výskum aj určité obmedzenia. Niektoré hodnotené parametre môžu byť do určitej miery ovplyvnené subjektívnym posúdením hodnotiteľa, no pri niektorých parametroch sa nedá tomu predísť.

Z praktického hľadiska môže byť navrhnutá metodika využiteľná ako podklad pre rozhodovanie samospráv, dopravných podnikov alebo správcov komunikácií pri plánovaní rekonštrukcií a modernizácií zastávok. Identifikácia konkrétnych nedostatkov umožňuje efektívnejšie smerovanie investícií a návrh opatrení tam, kde je ich potreba najvyššia.

Pre ďalší výskum sa odporúča použiť metodiku na väčší počet zastávok v rôznych regiónoch a overiť jej použiteľnosť v odlišných dopravných podmienkach.

4 Záver

Na základe výsledkov sa môže usúdiť, že overenie funkčnosti metodiky bolo úspešné. Vzhľadom na to, že sa v tejto práci podarilo určiť najbezpečnejšiu a najmenej bezpečnú zastávku, je možné usúdiť, že

navrhnutá metodika bola správne navrhnutá, teda spĺňa univerzálnosť.

Využitie tejto metodiky by malo spočívať v efektívnejšom vynakladaní finančných zdrojov miest a obcí, ktoré riešia problematiku zastávok. Výsledok hodnotenia zastávok pomocou navrhovanej metodiky by mal určiť prioritu rekonštrukcií zastávok, a to podľa toho, ktoré zastávky sa umiestnili na lepších pozíciách, a ktoré zastávky na horších. Odporúčaním je prioritne rekonštruovať a modernizovať zastávky, ktorým bolo pridelené najnižšie „skóre“, a tým zabezpečiť dostatočnú bezpečnosť na všetkých sledovaných zastávkach.

Zoznam bibliografických odkazov

[1] Príručka pre hodnotenie bezpečnosti a prístupnosti zastávok, 2005.

[2] Mapy.cz.

[3] KUBICA, Matúš, 2025. Návrh metodiky pre hodnotenie bezpečnosti zastávok verejnej osobnej dopravy. Diplomová práca. Žilina: Žilinská univerzita v Žiline, 84 s.

[4] Hodnocení kvality vybavení zastávek HOD, 2013

[5] Technické a prevádzkové štandardy IDS BK, 2021.

Zoznam hodnotených parametrov

1	Doprava prechádzajúca okolo zastávky
2	Čas chôdze na prestup v rámci terminálu
3	Nutnosť prechádzať cez cestu v termináli
4	Prítomnosť prístreška
5	Prítomnosť osvetlenia
6	Dĺžka nástupištia
7	Prítomnosť obrubníka zastávky
8	Prítomnosť smerového oblúka
9	Prítomnosť výškového oblúka
10	Prítomnosť chodníka na zastávku
11	Vybavenie pre zrakovo postihnutých
12	Viedenský typ zastávky
13	Kamerový dohľad – zvuková výstraha
14	Priechod pre chodcov v termináli
15	Prítomnosť mimoúrovňového priechodu v termin.
16	Počet jazdných pruhov v termináli
17	Svetelné riad. priechod medzi zastávkami v termin.
18	Prítomnosť zvislého značenia priechodu
19	Viditeľnosť priechodu pre chodcov
20	Maximálna povolená rýchlosť pri zastávke
21	Počet jazdných pruhov pri zastávke
22	Typ obrubníka zastávky
23	Počet vozidiel, ktoré sa zmestia na zastávku
24	Priechod pre chodcov medzi protiahl. zastávkami
25	Prítomnosť mimoúrovňového priechodu pre chodcov medzi protiahlými zastávkami
26	Priechod pre chodcov riadený svetelným signalizačn. zariadením medzi protiahl. zastávkami
27	Čas chôdze medzi protiahlými zastávkami autobusu/trolejbusu
28	Svetelné signalizačné zariadenie pre vozidlo vychádzajúce zo zastávky
29	Typ umiestnenia zastávky
30	Dĺžka zorného poľa pri prechádzaní cez priechod medzi traťami
31	Prítomnosť priechodu pre chodcov medzi traťami
32	Prítomnosť mimoúrovňového priechodu pre chodcov medzi traťami
33	Prekážky pri viditeľnosti na priechode medzi traťami
34	Priechod pre chodcov riadený svetelným signalizačným zariadením medzi traťami
35	Čas chôdze medzi protiahlými zastávkami električky

Vzor formuláru pre hodnotenie zastávok

FORMULÁR NA HODNOTENIE ZASTÁVKY

Všeobecné parametre pre celú skupinu zastávok

Sledovaný parameter	Špecifikácia parametra
Názov zastávky	
Umiestnenie zastávok	Extravilán/Intravilán
Doprava prechádzajúca okolo zastávky	vylúčená IAD/nie je vylúčená IAD
Typ zastávky podľa druhov dopravy	RAD MHD KOMBINOVANÁ
Dopravcovia obsluhujúci zastávku	
Terminál s prestupom na iné druhy dopravy	ANO/NIE
Typ terminálu z hľadiska druhov dopravy	Električka – Autobus / Električka – Trolejbus / Autobus – Trolejbus
Čas chôdze na prestup v rámci terminálu (najväčšia hodnota)	
Nutnosť prechádzať cez cestu pri termináli	ANO/NIE

Blížšie špecifikácie parametrov každej zastávky zvlášť

Blížšie špecifikácie pre zastávky všetkých typov dopravy

Sledovaný parameter	ANO/NIE	Slovné hodnotenie parametru
Prítomnosť prístreška	ANO/NIE	
Prítomnosť osvetlenia	ANO/NIE	
Dĺžka nástupištia		
Prítomnosť obrubníka zastávky	ANO/NIE	
Prítomnosť smerového oblúka	ANO/NIE	
Prítomnosť výškového oblúka	ANO/NIE	
Prítomnosť chodníka na zastávku	ANO/NIE	
Vybavenie pre zrakovo postihnutých	ANO/NIE	
Viedenský typ zastávky	ANO/NIE	
Kamerový dohľad – zvuková výstraha	ANO/NIE	
Priechod pre chodcov v termináli	ANO/NIE	
Prítomnosť mimoúrovňového priechodu v termináli	ANO/NIE	
Počet jazdných pruhov v termináli		
Svetelné riad. priechod medzi termináli	ANO/NIE	
Prítomnosť zvislého značenia priechodu	ANO/NIE	
Viditeľnosť priechodu pre chodcov		1 2 3 4 5
Maximálna povolená rýchlosť pri zastávke		
Počet jazdných pruhov pri zastávke		
Typ obrubníka zastávky		KASELSKÝ OBYČAJNÝ
Počet vozidiel, ktoré sa zmestia na zastávku		

Pri hodnotení od 1-5 platí: 1 = najhoršie, 5 = najlepšie

Blížšie špecifikácie pre zastávky autobusov a trolejbusov

Sledovaný parameter	ANO/NIE	Slovné hodnotenie parametru
Priechod pre chodcov medzi protiahlými zastávkami	ANO/NIE	
Prítomnosť mimoúrovňového priechodu medzi protiahlými zastávkami	ANO/NIE	
Svetelné riadený priechod medzi protiahlými zastávkami	ANO/NIE	
Čas chôdze medzi protiahlými zastávkami		
Semfor pre vozidlo vychádzajúce zo zastávky	ANO/NIE	
Typ umiestnenia zastávky		V JAZDNOM PRUHU V ZÁLIVE

Blížšie špecifikácie pre zastávky električky

Sledovaný parameter	ANO/NIE	Slovné hodnotenie parametru
Dĺžka zorného poľa pri prechádzaní cez priechod medzi traťami	ANO/NIE	
Priechod pre chodcov medzi traťami	ANO/NIE	
Prítomnosť mimoúrovňového priechodu medzi traťami	ANO/NIE	
Prekážky pri viditeľnosti na priechode medzi traťami	ANO/NIE	
Svetelné riadený priechod pre chodcov medzi traťami	ANO/NIE	
Čas chôdze medzi protiahlými zastávkami električky		

Integrácia Proximal Policy Optimization do rámca Stable-Retro pre učenie agentov

Integrating Proximal Policy Optimization into the Stable-Retro Framework for Agent Training

Martin Kubovčík¹ – Jiří Pospíchal²

^{1,2}Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava

¹kubovcik1@ucm.sk, ²jiri.pospichal@ucm.sk

Abstrakt

Význam učenia posilňovaním v oblasti inteligentných agentov a herných prostredí neustále rastie, najmä pri hodnotení schopnosti agentov riešiť rôznorodé typy úloh. Jedným z efektívnych prístupov je algoritmus *Proximal Policy Optimization*, ktorý umožňuje stabilné a výpočtovo efektívne učenie rozhodovacích politík v komplexných prostrediach. Cieľom tejto práce je aplikácia algoritmu *Proximal Policy Optimization* v prostrediach *Stable-Retro* a analýza dosiahnutých výsledkov s dôrazom na kategorizáciu hier podľa skóre získaného učiacim sa agentom. Na základe výkonnosti agenta sú hry rozdelené podľa herných žánrov, typov úloh a ich riešiteľnosti z pohľadu algoritmu. Hodnotená je schopnosť agenta dosiahnuť ciele hry, adaptovať sa na dynamiku prostredia a maximalizovať odmenu. Výsledky poskytujú systematický pohľad na vhodnosť jednotlivých typov hier pre učenie posilňovaním.

Kľúčové slová: učenie posilňovaním, Proximal Policy Optimization, Stable-Retro, inteligentní agenti

Abstract

The importance of reinforcement learning in the field of intelligent agents and game environments is steadily increasing, particularly for evaluating the ability of agents to solve diverse types of tasks. One effective approach is the Proximal Policy Optimization algorithm, which enables stable and computationally efficient learning of decision-making policies in complex environments. The objective of this paper is to apply the Proximal Policy Optimization algorithm in Stable-Retro environments and to analyze the achieved results with emphasis on categorizing games according to the scores obtained by the learning agent. Based on agent performance, games are classified by genre, task type, and solvability from the perspective of the applied algorithm. The evaluation focuses on the agent's ability to achieve game objectives, adapt to environmental dynamics, and maximize reward. The results provide a

systematic view of the suitability of different game types for reinforcement learning.

Key Words: reinforcement learning, Proximal Policy Optimization, Stable-Retro, intelligent agents

Úvod

Učenie posilňovaním predstavuje jeden z kľúčových prístupov pri návrhu inteligentných agentov schopných autonómneho rozhodovania v komplexných a dynamických prostrediach. V posledných rokoch sa tento prístup výrazne presadil aj v oblasti herných a simulačných prostredí, kde agent na základe spätnej väzby z prostredia optimalizuje svoje správanie s cieľom maximalizácie dosiahnutého skóre. Jedným z najpoužívanejších algoritmov v tejto oblasti je *Proximal Policy Optimization* (PPO) [1], ktorý patrí medzi metódy typu *actor-critic* a je známy svojou stabilitou a výpočtovou efektívnosťou pri učení rozhodovacích politík.

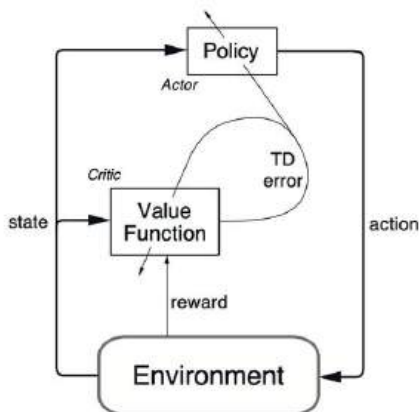
V tejto práci je algoritmus PPO implementovaný prostredníctvom knižnice *Stable-Baselines3* [2], ktorá poskytuje jednotné a modulárne rozhranie pre tréning agentov učenia posilňovaním. Učenie agenta prebieha v prostrediach *Stable-Retro* [3], ktoré umožňujú experimentovanie v klasických hrách s rôznorodými hernými mechanikami, typmi úloh a štruktúrou odmien. Tieto prostredia predstavujú vhodnú testovaciu platformu pre hodnotenie schopnosti agenta adaptovať sa na rozdielne herné žánre a úrovne náročnosti.

Model agenta je realizovaný ako hlboká neurónová sieť typu *actor-critic*, kde časť *actor* generuje akcie na základe aktuálneho stavu prostredia a časť *critic* hodnotí kvalitu týchto akcií prostredníctvom očakávanej návratnosti. Tréning neurónovej siete je realizovaný pomocou knižnice *PyTorch* [4], ktorá zabezpečuje efektívny výpočet gradientov a podporu akcelerácie na grafických kartách. Výsledkom tohto prístupu je učiaci sa agent schopný interagovať s

herným prostredím, optimalizovať svoje správanie a dosahovať merateľné výkonnostné výsledky naprieč rôznymi typmi hier.

1 Algoritmus Actor-Critic

Algoritmus *Actor-Critic* patrí medzi metódy typu *temporal-difference* [5], ktoré využívajú oddelenú modelovú architektúru pozostávajúcu zo samostatnej reprezentácie politiky π , podľa ktorej sa agent správa v prostredí, a hodnotovej funkcie V , vyjadrujúcej ohodnotenie stavu, v ktorom sa agent nachádza. Metódy *temporal-difference* sú založené na kombinácii princípov Monte Carlo prístupu a dynamického programovania. Učenie prebieha priamo zo skúseností získaných prostredníctvom senzorkých pozorovaní agenta, bez explicitnej znalosti modelu dynamiky prostredia, v ktorom agent vykonáva akcie. Model reprezentujúci stratégiu správania sa označuje ako *actor*, keďže generuje akcie agenta. Model hodnotovej funkcie sa označuje ako *critic*, pretože posudzuje kvalitu stavov, v ktorých sa agent nachádza [5].



Obr. 1 Architektúra *actor-critic*
Zdroj: [5]

1.1 Proximal Policy Optimization

Algoritmus *Proximal Policy Optimization* predstavuje gradientnú metódu učenia posilňovaním, ktoré striedajú fázy zberu dát z interakcie s prostredím a optimalizáciu tzv. *surrogate* chybovej funkcie pomocou stochastického gradientného poklesu. Kľúčovým prvkom tohto algoritmu je limitovaná *surrogate* chybová funkcia, ktorá obmedzuje zmenu pomeru pravdepodobností medzi novou a starou politikou v každom kroku optimalizácie. Formálne sa používa pomer pravdepodobností akcií pri aktuálnych parametroch politiky a parametroch predchádzajúcej politiky, pričom tento pomer je limitovaný v intervale definovanom hyperparametrom ϵ . Takýmto orezaním

sa potláčajú príliš veľké aktualizácie, ktoré by mohli viesť k nestabilite učiaceho procesu, a zároveň sa zachováva schopnosť politiky adaptovať sa na nové informácie.

Použitím takejto chybovej funkcie algoritmus PPO kombinuje triedu benefitov *trust region policy optimization* (TRPO) [6] s jednoduchšou implementáciou, čím dosahuje priaznivú rovnovahu medzi stabilitou, výpočtovou náročnosťou a efektívnosťou vzorkovania. Empiricky bolo preukázané, že PPO vykazuje lepšiu alebo porovnateľnú výkonnosť na štandardných *benchmark* úlohách, ako sú fyzikálne simulácie a hry s diskretným akčným priestorom, pri relatívne nízkej citlivosti na voľbu hyperparametrov a kratšom čase konvergencie oproti iným online *policy* gradientovým metódam. [7]

Chybová funkcia agenta:

$$L(\theta) = E_t \left[\min \left(r_t(\theta) A_t, \text{clip} \left(r_t(\theta), 1 - \epsilon, 1 + \epsilon \right) A \right) \right] \quad (1)$$

$$r_t(\theta) = \frac{\pi_\theta(a_t | s_t)}{\pi_{\theta_{old}}(a_t | s_t)} \quad (2)$$

kde $L(\theta)$ predstavuje chybovú funkciu algoritmu PPO pre aktuálne parametre politiky θ , $r_t(\theta)$ je pomer pravdepodobností akcie medzi aktuálnou a predchádzajúcou politikou, A_t označuje odhad výhodnosti akcie, ϵ určuje rozsah limitácie hodnôt pomeru pravdepodobností a $\text{clip}(\cdot)$ zabezpečuje stabilitu aktualizácií politiky obmedzením veľkosti zmien. Funkcia $\min(\cdot)$ vyberá menšiu hodnotu medzi nepodmienenu a limitovanou verziou aktualizácie, čím zabráňuje príliš agresívnym zmenám politiky a zároveň umožňuje zachovať optimálnu adaptáciu tam, kde aktualizácia nie je limitovaná. Tento mechanizmus kombinuje stabilitu a efektívnosť učenia politiky v prostrediach s vysokou variabilitou odmien.

3 Výsledky a diskusia

Cieľom experimentálnej časti bolo overiť schopnosť agenta učného algoritmom *Proximal Policy Optimization* riešiť úlohy v rôznych herných prostrediach *Stable-Retro* a identifikovať, ktoré typy (žánre) hier sú pre tento algoritmus vhodné alebo problematické. Testovanie prebiehalo na desiatich nezávislých experimentoch v každom prostredí, pričom výkonnosť agenta bola hodnotená na základe priemerného skóre dosiahnutého v jednotlivých hrách.

Výsledky ukázali, že agent PPO dokáže optimálne zvládnuť hry s deterministickými alebo jednoducho štruktúrovanými úlohami, kde je jasne definovaný cieľ a odmena je priamo spojená s postupom v hre. Naopak, hry s komplexnou dynamikou, oneskorenou odmenou alebo náhodnými prvkami prostredia sa ukázali ako náročnejšie a často neumožnili agentovi dosiahnuť stabilne vysoké skóre. Tento trend bol konzistentný naprieč všetkými testovanými behmi a naznačuje, že charakteristiky typu hry významne ovplyvňujú efektívnosť učenia politiky PPO. Analýza výsledkov umožnila kategorizovať testované prostredia podľa toho, či agent dosiahol úspešné vyriešenie úlohy: hry, v ktorých agent dokázal reprodukovateľne dokončiť prvú *level*, boli považované za vhodné pre PPO, zatiaľ čo hry, kde skóre zostávalo nízke alebo vysoko variabilné, predstavovali prostredia problematické. Pre tieto náročné prostredia môžu byť efektívne doplňujúce techniky učenia, ako napríklad prístup *No-Reward Reinforcement Learning*, ktorý umožňuje agentovi učiť sa z interakcií bez explicitnej externej odmeny a objavovať relevantné stratégie prostredníctvom vnútornej odmeny [8]. Tieto zistenia poskytujú systematický pohľad na typy hier, kde môže byť PPO agent efektívne nasadený, a zároveň identifikujú oblasti, kde je vhodné uvažovať o kombinácii štandardného učenia posilňovaním s doplnkovými mechanizmami pre zvládanie zriedkavej alebo oneskorenej odmeny.

Tab. 1 Nájdené optimálne nastavenie hyperparametrov

Názov parametra	Hodnota
Počet krokov učenia	100 000 000
Počet krokov medzi aktualizáciami	8 192
Počet epoch pre aktualizáciu politiky	4
Veľkosť batchu	8 192
Parameter rýchlosti učenia	$2,5 \times 10^{-4}$
Diskontný faktor odmeny	0,99
Lambda pre <i>Generalized Advantage Estimation</i>	0,70
Clip rozsah	0,1
Váha hodnotovej funkcie	0,5
Koeficient entropie	0,01
Počet paralelných prostredí	128
Typ politiky	Konvolučná neurónová sieť
Počet snímok v stohovaní	4
Gradient clipnorm	0,5

Príklady hier pre ľudského hráča boli získané z verejne dostupných YouTube videí [9], [10], [11].

Tab. 2 Porovnanie skóre z hier žánru *platformer*

Názov prostredia	Náhodný agent	Ľudský hráč	PPO agent
SonicTheHedgehog2-Genesis-v0	20	33550	3900
SonicTheHedgehog3-Genesis-v0	0	80000	400
SonicAndKnuckles3-Genesis-v0	10	73000	400
SuperMarioBros3-Nes-v0	30	56215	12050
RocketKnightAdventures-Genesis-v0	0	48595	190
QuackShot-Genesis-v0	100	17000	4000
Vectorman2-Genesis-v0	5620	15210	14930
CoolSpot-Genesis-v0	10	25755	1200
GreendogTheBeachedSurferDude-Genesis-v0	500	53500	46500
KirbysAdventure-Nes-v0	680	9150	43800
AdventureIsland3-Nes-v0	0	3375	5500
FelixTheCat-Nes-v0	0	14930	2850
BuckyOHare-Nes-v0	0	30250	47500
Shatterhand-Nes-v0	10	51525	1150
RockinKats-Nes-v0	24	423	130
BubsyII-Snes-v0	300	3225	2400
ActRaiser2-Snes-v0	55	24270	3150
Plok-Snes-v0	0	6935	17440

Tab. 3 Porovnanie skóre z hier športového žánru

Názov prostredia	Náhodný agent	PPO agent
SuperHangOn-Genesis-v0	43140	62141,5
NHL94-Genesis-v0	0	57
F1-Genesis-v0	0	0
EuropeanClubSoccer-Genesis-v0	0	0

Pozorovania naznačujú, že agent PPO často konverguje k lokálnemu minimu, keď využíva dostupné body alebo jednoduché interakcie, ktoré mu okamžite zvyšujú skóre, namiesto toho, aby dokončil celý level alebo splnil hlavnú úlohu hry.

V platformových hrách agent dokáže efektívne zbierať body alebo eliminovať nepriateľov, ale nevie využiť alternatívne cesty či bonusové mechaniky, ktoré vedú k hodnotnejšiemu vyriešeniu úlohy. Celú prvú úroveň sa PPO agentovi podarilo dokončiť iba v hernom prostredí *SuperMarioBros3-Nes-v0*, pričom dosiahnuté skóre bolo nižšie v porovnaní s ľudským hráčom. Z Tabuľky 2 vyplýva, že PPO agent je v niektorých prípadoch schopný prekonať ľudského hráča v rámci lokálne definovaných úloh alebo čiastkových herných situácií. Avšak z hľadiska globálneho riešenia úrovne, ktoré zahŕňa dlhodobé plánovanie, postup k cieľu a efektívne využívanie herných mechaník, vykazoval PPO agent výrazne slabšiu výkonnosť. Tieto výsledky poukazujú na tendenciu algoritmu optimalizovať krátkodobú odmenu na úkor úspešného dokončenia celej hernej úlohy.

V športových hrách, ako sú futbal a hokej, agent nepreukázal schopnosť pochopiť strategický význam ofenzívneho správania, tvorby herných situácií a koordinovaného postupu smerom k dosiahnutiu cieľa skórovať nad súperom. Napriek tomu bol schopný realizovať čiastkové, lokálne optimalizované akcie, napríklad pohyb v obmedzenom priestore alebo základnú interakciu s hernými objektmi, bez ich začlenená do globálnej hernej stratégie. V závodných hrách, ako sú motocyklové simulácie a preteky F1, agent zlyhával pri pochopení navigácie po trati a pri koordinovanom ovládaní vozidla. Tieto prostredia si vyžadujú hierarchické osvojovanie správania, kde je nevyhnutné najskôr zvládnuť základné riadiace mechanizmy a uvedenie vozidla do pohybu, a až následne optimalizovať trajektóriu jazdy a maximalizovať odmenu spojenú s postupom po trati. Okrem toho sa tieto úlohy vyznačujú riedkym odmeňovacím signálom, pri ktorom agent získava významnú odmenu iba po dlhých sekvenciách akcií alebo pri splnení cieľovej úlohy, čo výrazne sťažuje identifikáciu korektných akcií vedúcich k úspechu a spomaľuje proces učenia. Z Tabuľky 3 vyplýva, že PPO agent po ukončení tréningu dosahuje porovnateľné skóre s náhodným agentom generujúcim akcie z rovnomerného rozdelenia, čo poukazuje na obmedzenú schopnosť algoritmu extrahovať zmysluplnú politiku v uvedených typoch herných prostredí.

Výsledky práce poskytujú praktický prehľad o obmedzeniach *vanilla* algoritmu PPO pri riešení

rôznorodých herných prostredí a jasne ukazujú, že jeho efektívnosť je silne závislá od štruktúry úloh a dostupnosti okamžitých odmien. Pri aplikácii na zložitejšie alebo hierarchicky štruktúrované prostredia môžu byť vhodné dopĺňajúce prístupy, ako napríklad učenie s vnútornou odmenou, ktoré agentovi umožňuje objavovať dôležité stratégie aj pri minimálnej alebo oneskorenej spätnej väzbe.

Záver

Cieľom práce bolo overiť schopnosť agenta učenia algoritmom PPO riešiť úlohy v rôznych herných prostrediach zo zbierky *Stable-Retro* a identifikovať typy hier, v ktorých agent dokáže efektívne maximalizovať odmenu. Experimenty ukázali, že agent PPO dokáže reprodukovateľne dosahovať vysoké skóre v prostrediach s jednoduchou alebo deterministickou štruktúrou úloh, kde je možné jasne priradiť odmenu k dosiahnutému cieľu.

Pre budúce experimenty je preto odporúčané kombinovať PPO s technikami, ktoré umožňujú riešiť problémy lokálneho minima a podporujú dlhodobé plánovanie, najmä v hrách, kde je cieľ štruktúrovaný a odmena je distribuovaná až po splnení úlohy. Zároveň práca ukazuje, že aj jednoduchí PPO agenti dokážu generovať rozsiahle množstvo herných dát, ktoré môžu slúžiť ako benchmark pre porovnanie s ľudskými hráčmi a pre testovanie nových algoritmov učenia posilňovaním.

Ďakovanie

Táto práca bola podporená univerzitným grantom FPPV-01-2026.

Použitá literatúra

- [1] Schulman, J., Wolski, F., Dhariwal, P., Radford, A., & Klimov, O. (2017). Proximal policy optimization algorithms. arXiv preprint arXiv:1707.06347.
- [2] RAFFIN, Antonin; HILL, Ashley; GLEAVE, Adam; KANERVISTO, Anssi; ERNESTUS, Maximilian; DORMANN, Noah. Stable-Baselines3: Reliable reinforcement learning implementations. *Journal of Machine Learning Research*, 2021, roč. 22, č. 268, s. 1–8.
- [3] POLIQUIN, Mathieu. Stable-Retro: a maintained fork of OpenAI's gym-retro. GitHub repository, 2025. [online]. Dostupné z: <https://github.com/Farama-Foundation/stable-retro>
- [4] ANSEL, Jason; YANG, Edward; HE, Horace; GIMELSHEIN, Natalia; JAIN, Animesh; VOZNESENSKY, Michael; BAO, Bin; BELL, Peter; BERARD, David; BUROVSKI, Evgeni; et al. PyTorch 2:

- Faster machine learning through dynamic Python bytecode transformation and graph compilation. In: 29th ACM International Conference on Architectural Support for Programming Languages and Operating Systems (ASPLOS '24). ACM, 2024. DOI: 10.1145/3620665.3640366. [online]. Dostupné z: <https://docs.pytorch.org/assets/pytorch2-2.pdf>
- [5] SUTTON, Richard S.; BARTO, Andrew G. Reinforcement learning: an introduction. Cambridge: MIT Press, 1998.
- [6] SCHULMAN, John; LEVINE, Sergey; ABBEEL, Pieter; JORDAN, Michael a MORITZ, Philipp, (2015). Trust region policy optimization. In: International Conference on Machine Learning. PMLR, pp. 1889-1897. ISBN neuvedené.
- [7] SCHULMAN, John; WOLSKI, Filip; DHARIWAL, Prafulla; RADFORD, Alec a KLIMOV, Oleg, (2017). Proximal policy optimization algorithms. arXiv preprint arXiv:1707.06347. [online]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1707.06347>
- [8] PATHAK, Deepak; AGRAWAL, Pulkit; EFROS, Alex A. a DARRELL, Trevor, (2017). Curiosity-driven exploration by self-supervised prediction. In: International Conference on Machine Learning. PMLR, pp. 2778-2787.
- [9] VICIOGAME, (2026). YouTube channel. Dostupné na: <https://www.youtube.com/@viciogame> [přístup 2026-02-03].
- [10] NINTENDOCOMPLETE, (2026). YouTube channel. Dostupné na: <https://www.youtube.com/@NintendoComplete> [přístup 2026-02-03].
- [11] WORLDOLONGPLAYS, (2026). YouTube channel. Dostupné na: <https://www.youtube.com/@worldolongplays> [přístup 2026-02-03].

Využitie štruktúrného modelovania na analýzu dopadu COVID-19 na udržateľné spotrebiteľské správanie

Application of Structural Equation Modeling to Analyze the Impact of COVID-19 on Sustainable Consumer Behavior

Jakub Marták¹ – Kristína Medeková²

¹ Katedra informatiky, FPVal UKF v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

² Ústav Hospodárskej Politiky a Financíí, FEM SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra,

jakub.martak@ukf.sk, xmedekovak@uniag.sk

Abstrakt

Článok sa zameriava na aplikáciu štruktúrného modelovania pri analýze dopadu pandémie COVID-19 na budúce udržateľné spotrebiteľské správanie. Cieľom výskumu je identifikovať, či krízová situácia vedie spotrebiteľov skôr k orientácii na cenovo dostupné produkty alebo k preferencii environmentálne šetrných alternatív. Teoretická časť sumarizuje metodologické východiská štruktúrného modelovania a analyzuje vplyv globálnych kríz na ekonomiku a spotrebiteľské rozhodovanie. Empirická časť vychádza z dotazníkového zberu dát realizovaného na Slovensku a v Poľsku. Vzťahy medzi latentnými konštruktmi boli testované pomocou štruktúrnych modelov pre jednotlivé krajiny a prostredníctvom multi-group analýzy aj v spoločnom modeli. Výsledky potvrdili, že pandémia významne ovplyvnila zámer udržateľnej spotreby v oboch krajinách, pričom v Poľsku bol identifikovaný silnejší priamy efekt vnímania krízy.

Kľúčové slová: štruktúrné modelovanie, latentné konštrukty, COVID-19, zámer udržateľnej spotreby

Abstract

This paper examines the application of Structural Equation Modelling (SEM) to analyze the impact of the COVID-19 pandemic on future sustainable consumer behavior. The study aims to determine whether a crisis shifts consumer preferences towards more affordable products or towards environmentally friendly and sustainable alternatives. The theoretical section outlines the methodological foundations of SEM and discusses the broader impact of global crises on economic systems and consumer decision-making. The empirical analysis is based on survey data collected in Slovakia and Poland. Relationships between latent constructs were tested using country-specific structural models and a multi-group analysis within a pooled model. The findings confirm that the pandemic significantly influenced sustainable consumption intentions in both countries, with a stronger direct effect of crisis perception identified in Poland.

Key Words: Structural Equation Modelling, latent constructs, COVID-19, Sustainable Consumption Intention

Úvod

Štruktúrné modelovanie je trieda metodológií, ktorá umožňuje kvantitatívne testovať hypotézy v podobe teoretických modelov [1]. Testovanú teóriu musí byť možné previesť do modelu lineárnych rovníc s priamou úmernosťou typológie. SEM odpovedá na otázku, do akej miery získané empirické dáta podporujú platnosť navrhnutého teoretického modelu. SEM má mnoho podôb, v závislosti od kombinácie príslušných metód: Viacnásobná Regresia, Analýza hlavných komponentov, Zhluková analýza, Diskriminačná analýza, Korešpondenčná analýza, Kanonická korelácia, Viacrozmerné škálovania, Klasifikačné stromy, Analýza ciest (Path analysis), Konfirmačná faktorová analýza (Confirmatory factor analysis) a mnoho iných.

Analýza ciest posudzuje priame aj nepriame efekty premenných na iné premenné podľa modelu. Podobá sa viacnásobnej regresii, ale výpočet je odlišný. Je označovaná ako kauzálne modelovanie. Konfirmačná faktorová analýza sa líši od exploračnej faktorovej analýzy tým, že používa deduktívny prístup. Posudzuje platnosť predpokladanej štruktúry vzťahov medzi premennými.

Modelovanie pomocou štruktúrnych rovníc zvyčajne spája tieto dve metódy. Zohľadňuje chyby merania u závislých aj nezávislých premenných [1], [2]. Umožňuje použitie latentných premenných (priamo nemeasurable), odlišiť chyby merania od chýb spojených so špecifikáciou modelu, modelovať sprostredkujúce premenné, testovať komplexné modely, presnejší odhad vzťahov medzi latentnými premennými. Pre komplexné modely, pri ktorých treba testovať všetky predpokladané väzby naraz, je štruktúrné modelovanie jediný vhodný metodologický rámec.

SEM sa v psychiatrii použilo na pochopenie skúseností pacientov so schizofréniou. Loberg a kol. skúmali úlohu pozitívnych symptómov a trvania schizofrénie pri dichotickom počúvaní pacientov [4]. Úlohy dichotického počúvania sa používajú ako prostriedok na posúdenie fungovania spracovania jazyka v ľavom spánkovom laloku.

Igbaria a kol. [5] viedli štúdiu, ktorej cieľom bolo vyvinúť a otestovať integrovaný koncepčný model používania mikropočítačov pomocou SEM. Využili

model akceptácie technológie a snažili sa ho rozšíriť skúmaním vplyvu externých faktorov na akceptáciu mikropočítačovej technológie používateľmi.

Globálne krízy predstavujú zásadné narušenie ekonomických a sociálnych štruktúr, ktoré významne ovplyvňuje aj spotrebiteľské správanie. Ich vplyv na udržateľnosť je však nejednoznačný, môžu ju oslabovať prostredníctvom rastúcej neistoty, poklesu príjmov a orientácie na krátkodobé prežitie, no zároveň ju môžu posilňovať prostredníctvom prehodnocovania hodnôt, životného štýlu a spoločenskej zodpovednosti [6]. Ekonomická a existenčná neistota vedie k tzv. časovej krátkozrakosti, keď jednotlivci viac diskontujú budúce environmentálne prínosy a uprednostňujú okamžitý úžitok, čo znižuje ochotu investovať do udržateľných, často drahších alternatív [7]. Počas kríz sa spotrebiteľia častejšie sústreďujú na základné a cenovo dostupné tovary a obmedzujú nákup „prémiových“ či zelených produktov, pričom riziková averzia znižuje pravdepodobnosť voľby udržateľných možností [8], [9]. Na makroúrovni finančné a energetické krízy často presúvajú politické priority smerom k stabilizácii ekonomiky, čím sa environmentálne ciele dostávajú do úzadia a transformácia smerom k cirkulárnej ekonomike sa spomaľuje [10].

Súčasne však krízy môžu vytvárať priestor na posilnenie udržateľného správania.

Pandémia COVID-19 viedla k dočasnému poklesu emisií a k prehodnocovaniu spotrebných priorít a životného štýlu [11], [12]. V oblasti potravín sa vo viacerých krajinách zvýšil dopyt po lokálnych, organických a zdravotne priaznivých produktoch. Výskum v Taliansku poukázal na vyššiu frekvenciu nákupu udržateľných produktov a rast ochoty platiť viac za ich environmentálne a etické atribúty, pričom sa posilnil aj pocit morálnej povinnosti správať sa zodpovedne [13]. Podobné trendy boli zaznamenané v Číne a Španielsku počas lockdownu [9].

V Brazílii a Portugalsku pandémia významne posilnila environmentálne povedomie a udržateľnú spotrebu, hoci efekt na sociálnu zodpovednosť bol menej výrazný [14]. Zmeny sa prejavili aj v oblasti potravinového odpadu, keď viaceré krajiny zaznamenali zdravšie stravovanie, lepšie plánovanie nákupov a nižší objem vyhodnených potravín [9], [15]. V energetike sa súčasne objavil tlak na lacné fosílné zdroje, no zároveň došlo k urýchleniu investícií do obnoviteľných zdrojov a úspor energie [10]. V módnom sektore časť spotrebiteľov obmedzila nákupy, zatiaľ čo iní sa viac orientovali na udržateľné značky [16].

Empirické zistenia zároveň poukazujú na význam sociálno-demografických faktorov, ženy, starší spotrebiteľia, osoby s vyšším vzdelaním či príjmom častejšie deklarovali nárast udržateľných nákupov [13], [14]. Napriek tomu nie je možné hovoriť o jednoznačne

pozitívnom efekte, keďže finančný stres a negatívne emócie mohli u časti populácie viesť k preferencii ceny pred udržateľnosťou [9], [17]. Celkovo tak pandémia COVID-19 predstavuje príklad krízy, ktorá súčasne oslabila aj posilnila udržateľné spotrebiteľské správanie v závislosti od ekonomických, psychologických a sociálnych faktorov.

1 Metodika výskumu

Empirická časť výskumu bola založená na kvantitatívnom zbere dát prostredníctvom dotazníkového prieskumu a ich následnej analýze pomocou štruktúrneho modelovania (SEM) v prostredí programovacieho jazyka Python.

1.1 Zber údajov

Výskumná vzorka pozostávala z respondentov zo Slovenska ($n = 1000$) a Poľska ($n = 1000$), pričom celkový počet respondentov dosiahol $n = 2000$. Dáta boli zbierané prostredníctvom profesionálnych prieskumných agentúr s využitím online panelu, pričom bol aplikovaný kvótny výber zabezpečujúci približnú reprezentatívnosť podľa základných demografických charakteristík (pohlavie, vek, vzdelanie).

Štruktúra vzorky bola nasledovná: podiel žien predstavoval 50,9 % ($n = 1017$) a mužov 49,1 % ($n = 983$). Z hľadiska generácie štruktúry bola najviac zastúpená generácia Y (32,2 %), nasledovaná generáciou X (29,8 %) a Baby Boomers (25,0 %). Generácia Z tvorila 12,4 % respondentov, pričom najstaršia kohorta bola zastúpená len marginálne.

Vzorka bola zostavená prostredníctvom profesionálnej prieskumnej agentúry s využitím kvótného výberu, ktorý zabezpečoval reprezentatívnosť podľa základných demografických charakteristík populácie (pohlavie, vek, vzdelanie).

Jednotlivé latentné konštrukty boli operacionalizované na základe existujúcich overených škál z predchádzajúcich výskumov (Severo, 2020) v oblasti udržateľného spotrebiteľského správania a dopadov globálnych kríz. Ich finálna štruktúra bola následne overená prostredníctvom konfirmačnej faktorovej analýzy (CFA), ktorá potvrdila vhodnosť zaradenia jednotlivých položiek ku konkrétnym latentným premenným.

Konštrukt vnímania globálnej krízy (GC), environmentálneho povedomia (EA), sociálnej zodpovednosti (SR) a udržateľného spotrebiteľského správania (SC) bol meraný štyrmi položkami, zatiaľ čo zámer udržateľnej spotreby (SCI) bol meraný dvoma položkami.

Respondenti hodnotili jednotlivé tvrdenia na päťbodovej Likertovej škále (1 = úplne nesúhlasím, 5 = úplne súhlasím).

Výsledky CFA potvrdili adekvátnu kvalitu meracieho modelu. Všetky faktorové zaťaženia presiahli

odporúčanú hodnotu 0,6, čo poukazuje na dobrú konvergentnú validitu jednotlivých konštruktov a podporuje ich použitie v rámci štruktúrneho modelovania. Zároveň hodnoty priemernej extrahovanej variability (AVE) prekročili hranicu 0,5 a kompozitná reliabilita (CR) dosiahla hodnoty vyššie ako 0,7, čím bola potvrdená nielen konvergentná validita, ale aj vnútorná konzistentnosť použitých meracích škál.

1.2 Spracovanie údajov

Analýza bola realizovaná v programovacom jazyku Python, v prostredí Google Colab. Na implementáciu štruktúrneho modelovania bola použitá knižnica Semopy, ktorá umožňuje odhad parametrov modelu a testovanie vzťahov medzi latentnými premennými. Dáta zo Slovenska, Poľska a spoločný dataset boli spracované vo formáte .csv a načítané pomocou knižnice Pandas. Pred samotnou analýzou boli premenné štandardizované prostredníctvom funkcie zscore() z knižnice SciPy s cieľom zabezpečiť porovnateľnosť mierok.

Štruktúrny model bol špecifikovaný prostredníctvom textového opisu, v ktorom boli definované vzťahy medzi latentnými premennými a ich indikátormi. Konštrukty GC, EA, SR a SC boli definované ako exogénne – vysvetľujúce premenné, zatiaľ čo zámer udržateľnej spotreby (SCI) bol modelovaný – vysvetľovaný, tzn. predstavoval endogénnu premennú.

Pre spoločný model bola doplnená kontrolná premenná reprezentujúca krajinu (binárna premenná SO), čo umožnilo realizovať multi-group analýzu a testovať rozdiely medzi Slovenskom a Poľskom.

Modely boli odhadnuté samostatne pre obe krajiny aj pre spoločný dataset. Výstupy zahŕňali štandardizované koeficienty, miery zhody modelu, kovariančné matice a štruktúrne parametre (beta, lambda, psi a theta), ktoré slúžili na interpretáciu priamych a nepriamych efektov medzi premennými.

2 Výsledky a diskusia

Výsledky pre Slovensko (Príloha 1) poukazujú na kombináciu hodnotového a reaktívneho mechanizmu. Vnímanie globálnej krízy významne zvyšovalo environmentálne povedomie a zároveň malo aj priamy vplyv na udržateľné správanie.

Environmentálne povedomie následne silno posilňovalo sociálnu zodpovednosť, ktorá sa premietla do konkrétnych behaviorálnych zmien, najmä v oblasti úspor energie, redukcie odpadu a obmedzenia jednorazových plastov.

Model tak potvrdzuje hodnotovú cestu GC → EA → SR → SC, doplnenú o priamy behaviorálny efekt krízy.

Pri formovaní budúceho zámeru udržateľnej spotreby sa však ukázali rozdiely. Signifikantný bol priamy vplyv globálnej krízy na zámer, zatiaľ čo vplyv

environmentálneho povedomia ani aktuálneho udržateľného správania sa nepotvrdil.

Tento výsledok naznačuje prítomnosť value–action gap, teda rozdiel medzi environmentálnymi postojmi a stabilným formovaním budúcich zámerov. Časť behaviorálnych zmien tak mohla byť viac situačná než dlhodobo internalizovaná. Model vykazuje veľmi dobrú mieru zhody ($CFI = 0.962$; $TLI = 0.954$; $RMSEA = 0.056$; $GFI = 0.951$; $NFI = 0.951$).

Model pre Poľsko (Príloha 2) potvrdil výraznejší reaktívny charakter správania. Vnímanie globálnej krízy významne zvyšovalo environmentálne povedomie a zároveň malo silný priamy vplyv na udržateľné správanie. Environmentálne povedomie následne posilňovalo sociálnu zodpovednosť, ktorá sa premietla do behaviorálnych zmien. Mechanizmus GC → EA → SR → SC sa tak potvrdil podobne ako na Slovensku, avšak s výraznejším priamym efektom krízy.

Pri budúcom zámere sa ukázalo, že rozhodujúcu úlohu zohrávalo samotné vnímanie krízy. Environmentálne povedomie ani aktuálne správanie nevedli k formovaniu zámeru, čo opäť naznačuje value–action gap. V poľskom prípade však bol zámer silnejšie viazaný na percepciu krízy než na udržateľné správanie. Celkovo výsledky poukazujú na reaktívnejší model správania, v ktorom kríza pôsobí ako priamy impulz k zmene, pričom model vykazuje veľmi dobrú mieru zhody s empirickými dátami ($CFI = 0.976$; $TLI = 0.970$; $RMSEA = 0.054$; $GFI = 0.967$; $NFI = 0.967$).

Porovnanie Slovenska a Poľska (Príloha 3) ukázalo, že základná štruktúra modelu bola v oboch krajinách podobná, no líšil sa mechanizmus, prostredníctvom ktorého globálna kríza ovplyvnila udržateľné spotrebiteľské správanie. V oboch prípadoch vnímanie globálnej krízy významne zvyšovalo environmentálne povedomie, ktoré následne posilňovalo sociálnu zodpovednosť a podporovalo udržateľné správanie. Tento vzorec potvrdzuje úlohu kríz ako katalyzátora environmentálneho uvedomenia a behaviorálnych zmien [12], [14]. Rozdiely sa však objavili v charaktere mechanizmu. Slovenský model poukázal na výraznejší hodnotovo sprostredkovaný proces, v ktorom kríza pôsobila najmä nepriamo prostredníctvom environmentálneho povedomia a zodpovednosti.

Zmeny správania tak boli viac výsledkom postupnej internalizácie hodnôt než okamžitej reakcie, čo je v súlade s výskumom zdôrazňujúcim význam hodnotových faktorov pri formovaní udržateľného správania [18], [19].

Naopak, v Poľsku sa potvrdil silnejší priamy vplyv globálnej krízy na udržateľné správanie aj budúci zámer, čo naznačuje reaktívnejší charakter zmeny správania. Časť spotrebiteľov reagovala na krízu okamžitou úpravou každodenných návykov bez potreby hlbokej hodnotovej transformácie, čo podporujú štúdie poukazujúce na adaptačné reakcie správania počas kríz [8], [17]. V oboch krajinách sa zároveň nepotvrdil

stabilný priamy vplyv aktuálneho udržateľného správania na budúci zámer, čo naznačuje, že časť zmien mohla mať skôr situačný než dlhodobý internalizovaný charakter. Tento výsledok zodpovedá zisteniam, že krízou vyvolané behaviorálne zmeny nemusia automaticky pretrvať po odznení krízovej situácie [11], [12]. Spoločný model tieto zistenia rozšíril a spresnil. Potvrdil komplexný mechanizmus, v ktorom globálna kríza pôsobí priamo aj nepriamo prostredníctvom environmentálneho povedomia a sociálnej zodpovednosti.

Na rozdiel od samostatných modelov boli v spoločnom modeli významné aj priame vplyvy environmentálneho povedomia a sociálnej zodpovednosti na budúci zámer udržateľnej spotreby, čo naznačuje stabilný význam hodnotových faktorov naprieč krajinami. Jediným nesignifikantným vzťahom zostal priamy vplyv aktuálneho udržateľného správania na budúci zámer, čo poukazuje na pretrvávajúci rozdiel medzi realizovaným správaním a stabilizáciou dlhodobého úmyslu. Dopĺňajúca multi-group analýza zároveň ukázala, že krajina významne ovplyvňuje vnímanie globálnej krízy a budúci zámer udržateľnej spotreby, zatiaľ čo rozdiely v environmentálnom povedomí a sociálnej zodpovednosti boli minimálne.

Zo štatistického hľadiska je potrebné uviesť, že niektoré odhadnuté hodnoty štandardizovaných koeficientov ciest prekročovali interval (-1; 1), ktorý je typický pre korelačné koeficienty. V kontexte štrukturálneho modelovania však takéto hodnoty nemusia nevyhnutne indikovať nesprávnu špecifikáciu modelu. Môžu byť dôsledkom silných simultánnych vzťahov medzi premennými, prítomnosti multikolinearity alebo štrukturálnej komplexnosti modelu. Absolútne hodnoty blízke nule indikujú slabý efekt, zatiaľ čo vyššie absolútne hodnoty poukazujú na intenzívnejší priamy alebo nepriamy vplyv medzi konštruktmi.

Štatistická významnosť jednotlivých parametrov bola hodnotená prostredníctvom p -hodnôt, pričom hranica $p < 0.05$ bola použitá ako hladina významnosti, tzn. významnosť parametrov bola testovaná s 95% spoľahlivosťou. Parametre s vyššími p -hodnotami ($p < 0.05$) boli interpretované ako štatisticky nevýznamné.

V rámci multi-group analýzy sa pred štandardizáciou dát vyskytovali zvýšené p -hodnoty pri viacerých odhadoch. Tento jav bol pravdepodobne spôsobený rozdielnym rozsahom premenných, keďže všetky merateľné indikátory boli hodnotené na päťbodovej Likertovej škále, zatiaľ čo premenná reprezentujúca krajinu (SO) mala binárny charakter. Aplikovaná štandardizácia údajov zabezpečila porovnateľnosť mierok, stabilitu parametrov a robustnosť odhadov štrukturálneho modelu.

Záver

Cieľom článku bolo analyzovať, ako pandémia COVID-19 ovplyvnila mechanizmy udržateľného spotrebiteľského správania na Slovensku a v Poľsku pomocou štrukturálneho modelovania. Výsledky potvrdili, že vnímanie globálnej krízy významne zvyšuje environmentálne povedomie a sociálnu zodpovednosť, ktoré následne podporujú udržateľné správanie.

V oboch krajinách sa potvrdila hodnotová cesta GC → EA → SR → SC, pričom zároveň existoval aj priamy vplyv krízy na správanie. V Poľsku bol tento reaktívny efekt výraznejší, zatiaľ čo na Slovensku dominoval hodnotovo sprostredkovaný mechanizmus. Kľúčovým zistením je pretrvávajúci rozdiel medzi správaním a budúcim zámerom (value-action gap), keďže aktuálne udržateľné správanie sa nepotvrdilo ako stabilný určujúci faktor budúceho zámeru.

Spoločný model ukázal, že rozdiely medzi krajinami sa prejavujú najmä v percepcii krízy a budúcich zámeroch, nie v samotnej štruktúre hodnotového mechanizmu. Výskum je založený na prierezových a seba hodnotiacich dátach, čo obmedzuje možnosť sledovať dlhodobú stabilitu zmien. Model zároveň zahŕňal vybrané konštrukty a dve krajiny, čo limituje generalizáciu výsledkov.

Budúci výskum by sa mal zamerať na porovnanie rôznych typov globálnych kríz: pandémie COVID-19, vojny na Ukrajine a energetickej krízy, s cieľom identifikovať, či sa líšia v sile hodnotových a reaktívnych mechanizmov a ktoré faktory vedú k dlhohodobej stabilizácii udržateľného správania.

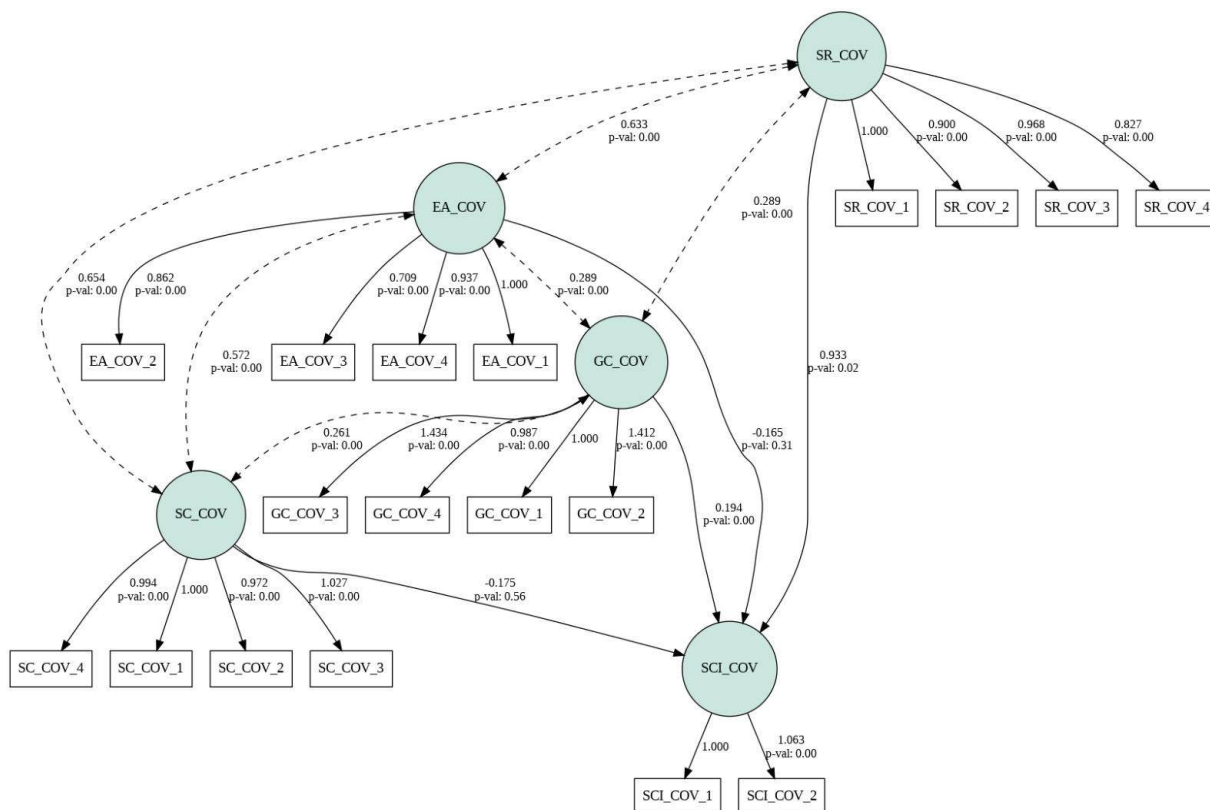
Podakovanie

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA v rámci projektu č. 1/0030/25 „Vplyv globálnych kríz na zmeny spotrebiteľského správania a jeho udržateľnosť“.

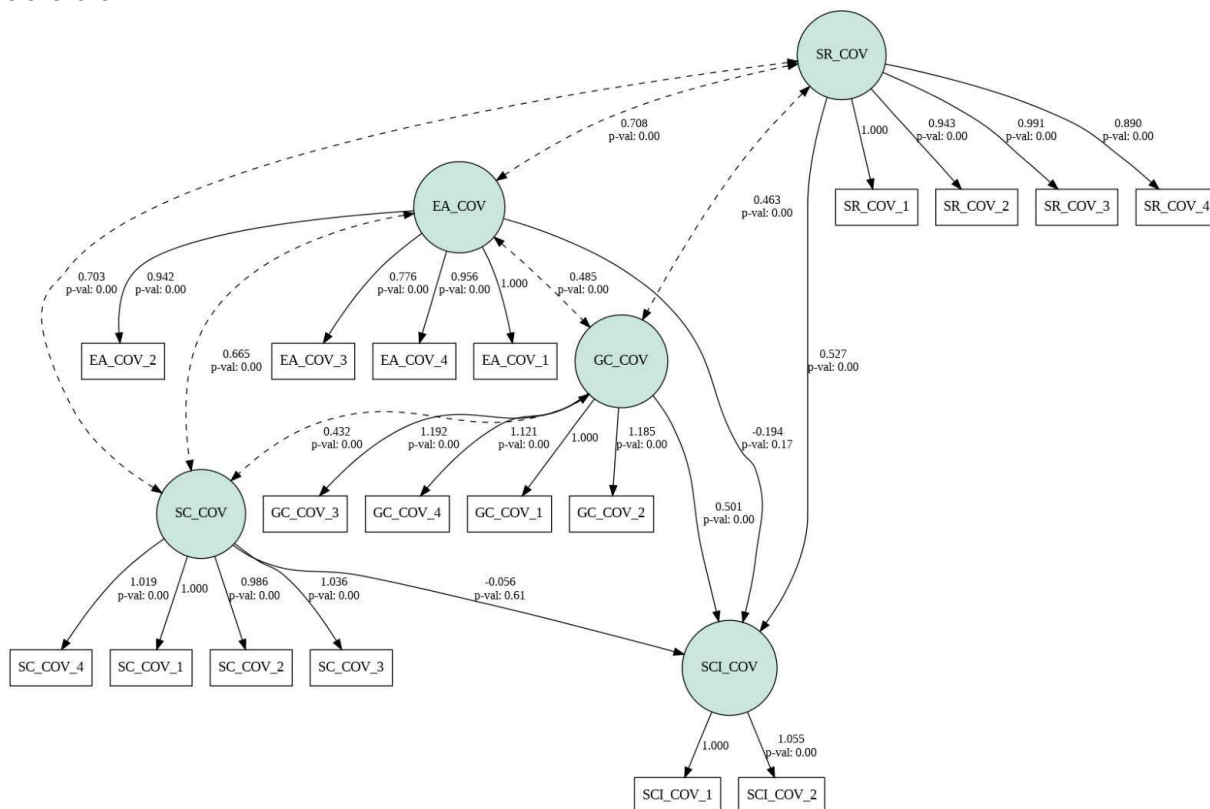
Zoznam bibliografických odkazov

- [1] ŠKAPA, Radoslav. Modelování pomocí štrukturálních rovnic: úspěšný nástroj pro pochopení chování zákazníků? [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2012-10-25 [cit. 2020-07-16]. Dostupné na: <https://is.muni.cz/do/econ/soubory/aktivity/mues/35953888/SEM.pdf>
- [2] STRUCTURAL EQUATION MODELING – an overview | ScienceDirect Topics, 2022 [online] [cit. 15. november 2024], Dostupné na: www.sciencedirect.com
- [3] BERAN, T.N., VIOLATO, C. Structural equation modeling in medical research: a primer. BMC Res Notes 3, 267 (2010). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-267>
- [4] LOBERG, E.M, JORGENSEN H.A, GREEN M.F, RUND B.R, LUND A, DISETH A, OIE M, HUGDAHL K: Positive symptoms and duration of illness predict functional laterality and attention modulation in

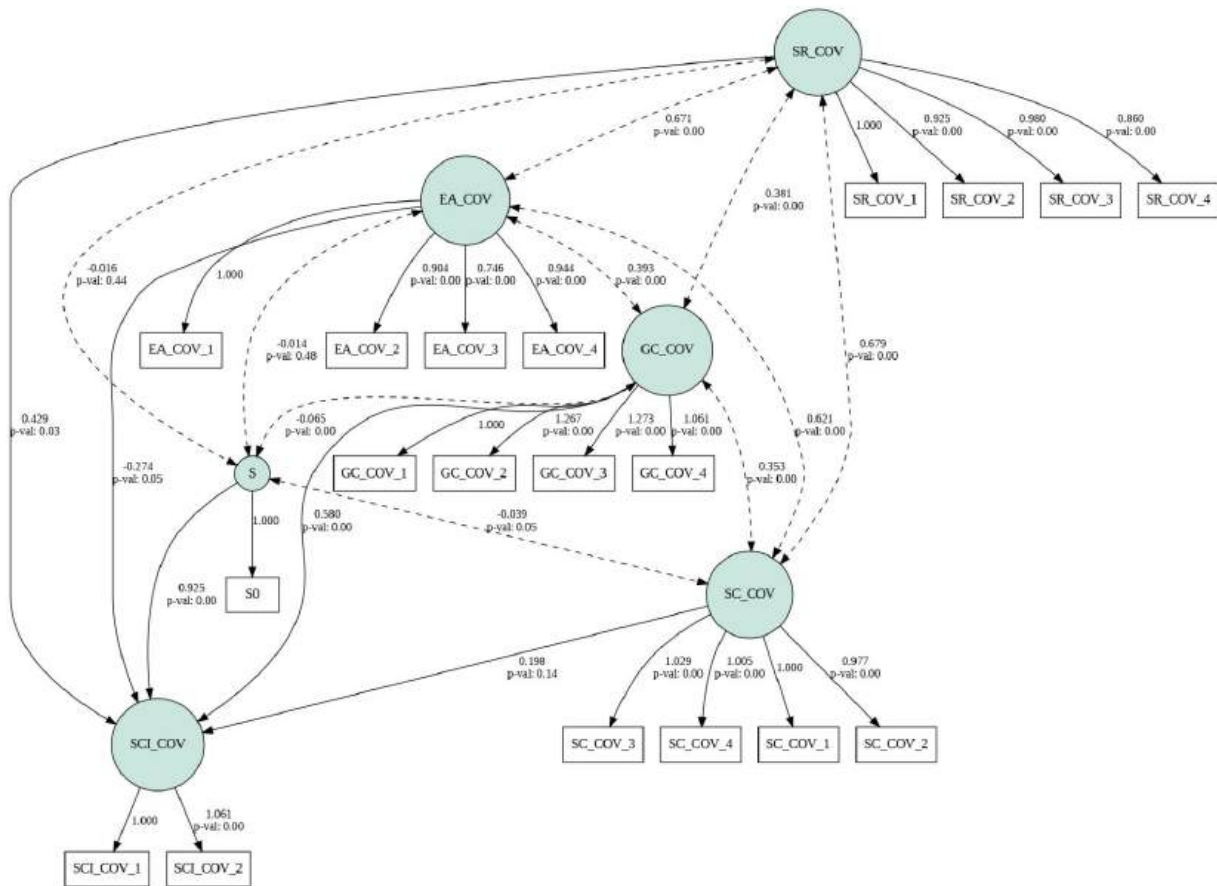
- schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 2006, 113:322-31, Dostupné na <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2005.00627.x>
- [5] IGBARIA, M., GUIMARAES, T., & DAVIS, G. B. (1995). Testing the Determinants of Microcomputer Usage via a Structural Equation Model. *Journal of Management Information Systems*, 11(4), 87–114. <https://doi.org/10.1080/07421222.1995.11518061>
- [6] MIKALOUSKIENĖ, Asta; ŠTREIMIKIENĖ, Dalia a MIKALOUSKAS, Ignas, (2026). Global Crises and Their Influence on Responsible Consumption. Online. In: *Climate Change and Responsible Consumption*. Cham: Springer. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-032-16218-2_4 [citované 2026-02-24].
- [7] VAN DER WAL, Amber; VAN HOREN, Femke a GRINSTEIN, Amir, (2018). Temporal myopia in sustainable behavior under uncertainty. Online. *International Journal of Research in Marketing*, roč. 35, č. 3, s. 378–393. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijresmar.2018.03.006> [citované 2026-02-24].
- [8] VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, Ulises; MORALES-MEDIANO, Juan a LEAL-RODRÍGUEZ, Antonio, (2021). The impact of the COVID-19 crisis on consumer purchasing motivation and behavior. Online. *European Research on Management and Business Economics*, roč. 27, č. 1, s. 100166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.iedeen.2021.100166> [citované 2026-02-24].
- [9] LI, Shuang; KALLAS, Zoltan a RAHMANI, Danial, (2021). Did the COVID-19 lockdown affect consumers' sustainable behavior in food purchasing and consumption in China? Online. *Food Control*, roč. 132, s. 108352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108352> [citované 2026-02-24].
- [10] FEIFERYTĖ-SKIRIENĖ, Aistė a STASIŠKIENĖ, Žaneta, (2023). Measuring economic crises impact transitioning to a circular economy. Online. *Environment, Development and Sustainability*, roč. 25, s. 1–25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10668-023-03367-x> [citované 2026-02-24].
- [11] LENZEN, Manfred; LI, Mengyu; MALIK, Arun et al., (2020). Global socio-economic losses and environmental gains from the Coronavirus pandemic. Online. *PLoS ONE*, roč. 15, č. 7, s. e0235654. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235654> [citované 2026-02-24].
- [12] ECHEGARAY, Fabio, (2021). What post-COVID-19 lifestyles may look like? Identifying scenarios and their implications for sustainability. Online. *Sustainable Production and Consumption*, roč. 27, s. 567–574. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.01.025> [citované 2026-02-24].
- [13] DANGELICO, Rosa; SCHIAROLI, Valentina a FRACCASCIA, Luca, (2022). Is COVID-19 changing sustainable consumer behavior? A survey of Italian consumers. Online. *Sustainable Development*, roč. 30, č. 4, s. 1–15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sd.2322> [citované 2026-02-24].
- [14] SEVERO, Eliana; DE GUIMARÃES, Julio a DELLARME LIN, Mateus, (2020). Impact of the COVID-19 pandemic on environmental awareness, sustainable consumption and social responsibility: Evidence from generations in Brazil and Portugal. Online. *Journal of Cleaner Production*, roč. 286, s. 124947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124947> [citované 2026-02-24].
- [15] JRIBI, Sana; ISMAIL, Hela; DOGGUI, Dorra a DEBBABI, Hela, (2020). COVID-19 virus outbreak lockdown: What impacts on household food wastage? Online. *Environment, Development and Sustainability*, roč. 22, č. 5, s. 3939–3955. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10668-020-00740-y> [citované 2026-02-24].
- [16] RAUSCH, Tobias a KOPPLIN, Carolin, (2021). Bridge the gap: Consumers' purchase intention and behavior regarding sustainable clothing. Online. *Journal of Cleaner Production*, roč. 278, s. 123882. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123882> [citované 2026-02-24].
- [17] YANG, Xiaoyu; JIANG, Jing a CHEN, Shuo, (2022). Achieving sustainability: Determinants of conscious green purchasing behavior during the COVID-19 pandemic. Online. *Business Strategy and the Environment*, roč. 31, č. 6, s. 1–14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bse.3245> [citované 2026-02-24].
- [18] LIOBIKIENĖ, Gintarė a BERNATONIENĖ, Jurga, (2017). Why determinants of green purchase cannot be treated equally? The case of green cosmetics: Literature review. Online. *Journal of Cleaner Production*, roč. 162, s. 109–120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.204> [citované 2026-02-25].
- [19] SHARMA, Richa a JHA, Meenakshi, (2017). Values influencing sustainable consumption behavior: Exploring the contextual relationship. Online. *Journal of Business Research*, roč. 76, s. 77–88. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2017.03.010> [citované 2026-02-25].



Príloha 1 Štruktúrny model vplyvu COVID-19 na udržateľné spotrebiteľské správanie: Slovensko



Príloha 2 Štruktúrny model vplyvu COVID-19 na udržateľné spotrebiteľské správanie: Poľsko



Príloha 3 Multi-group štruktúrny model vplyvu COVID-19 na udržateľné spotrebiteľské správanie