VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM DEKOMPOZICE ORGANICKÉ HMOTY V PŮDĚ POMOCÍ METODY "ČAJOVÝCH SÁČKŮ"

STUDY OF DECOMPOSITION OF ORGANIC MATTER IN SOIL USING THE METHOD OF "TEA BAGS"

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. Kateřina Lišková
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
SUPERVISOR

Brno 2021

ABSTRAKT

Hlavním cílem této diplomové práce bylo na základě provedených literárních rešerší navrhnout metodu optimální pro studium dekompozice organického materiálu v půdě. K tomuto účelu byla zvolena tzv. *tea bag* metoda. S ohledem na kompletnost práce byla provedena také fyzikálně-chemická charakterizace půdního prostředí a HL z ní izolovaných. Degradovaný organický materiál byl pak dále charakterizován, a to za využití termogravimetrické analýzy, elementární analýzy, FT-IR spektroskopie a byl rovněž stanoven celkový obsah vodou extrahovatelných polyfenolických látek ve vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tea bag metoda, dekompozice, organická hmota

ABSTRACT

The main aim of this master thesis was to introduce an optimal method which could be used for study of a decompostion of an organic matter in a soil. For this purpose was chosen based on a literaly review so-called *tea bag* method. With regard to the completeness of the work, a physico-chemical characterization of the soil environment and HS isolated from it was also performed. The degraded organic material was then further characterized using thermogravimetric analysis, elemental analysis, FT-IR spectroscopy, and the total content of water-extractable polyphenolic substances in the samples was also determined.

KEY WORDS

Tea bag method, decomposition, organic matter

LIŠKOVÁ, Kateřina. *Studium dekompozice organické hmoty v půdě pomocí metody "čajových sáčků"*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Vojtěchu Enevovi, PhD. za za trpělivost, ochotu, odborné rady, cenné podněty a čas, který mi věnoval při psaní této práce.

OBSAH

ÚVOD **6**

1. TEORETICKÉ ZÁKLADY **7**

1.1 PŮDA A PŮDNÍ ORGANICKÁ HMOTA 7
1.2 SLOŽENÍ PŮDY 8
1.3 HUMINOVÉ LÁTKY 9
1.3.1 Rozdělení huminových látek *10*
1.4 VZNIK HUMINOVÝCH LÁTEK 12
1.4.1 Ligninová teorie *13*
1.4.2 Polyfenolová teorie *14*
1.4.3 Teorie podle Maillarda *14*
1.5 MOLEKULÁRNÍ STRUKTURA HUMINOVÝCH LÁTEK 14
1.5.1 Polymerní teorie *15*
1.5.2 Supramolekulární teorie *17*
1.6 VYUŽITÍ HUMINOVÝCH LÁTEK 19
1.7 ZELENÝ ČAJ 20
1.7.1 Polyfenolické látky obsažené v zeleném čaji *21*

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY **23**

2.1 VLIV PŮDNÍCH KONDICIONÉRŮ NA VLASTNOSTI HL A ÚRODNOST PŮDY 23
2.2 DEKOMPOZICE ORGANICKÝCH LÁTEK V PŮDĚ 24

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **29**

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 29
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE 29
3.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ ČAJE LIPTON 29
3.4 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE ORGANICKÉHO MATERIÁLU ČAJE 30
3.4.1 Elementární analýza *30*
3.4.2 Termogravimetrická analýza *30*
3.4.3 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací *30*
3.4.4 Stanovení celkového množství polyfenolů pomocí Foulin-Ciocaulteova činidla *30*
3.5 IZOLACE HUMINOVÝCH LÁTEK Z PŮDNÍHO VZORKU 31
3.5.1 Separace HK *31*
3.5.2 Separace FK *32*
3.5.3 Fyzikálně-chemická charakterizace izolovaných HL *33*

4. VÝSLEDKY A DISKUZE **36**

4.1 IZOLACE A CHARAKTERIZACE PŮDNÍCH HL 36
4.1.1 TG a elementární analýza *36*
4.1.2 Molekulová absorpční spektroskopie v UV-Vis oblasti *37*

4.1.3 FTIR spektroskopie *41*
4.2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE ORGANICKÉHO MATERIÁLU ČAJE 43
4.2.1 Termogravimetrická analýza *44*
4.2.2 Elementární analýza *46*
4.2.3 Stanovení celkového obsahu vodou extrahovatelných polyfenolů *47*
4.2.4 FT-IR spektroskopie organického materiálu čaje *50*
5. ZÁVĚR **53**
6. ZDROJE **55**
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ **60**
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 60
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ 61
PŘÍLOHY **62**

ÚVOD

Znalost průběhu a charakteru dekompozičních procesů organické hmoty (OM) probíhajících v půdě je klíčová v mnoha odvětvích. Doposud běžně používané metody pro studium dekompozice OM nebyly schopny poskytovat mezi sebou srovnatelná data, nehledě na fakt, že výsledky byly často zavádějící a sběr dat byl příliš zdlouhavý. V hojné míře používaná *litter bag* metoda toho byla ukázkovým příkladem. Ke studiu dekompozice byl v tomto případě používán rostlinný materiál běžně se vyskytující v dané oblasti. Výchozí materiál pro degradaci byl tím pádem vždy odlišný, a proto nebylo možné mezi sebou srovnat získaná data z různých lokalit. Problematickou byla často i volba uložení organického materiálu. Používané pytle či vaky v mnoha případech měly nevyhovující velikost ok, takže docházelo buď k propadávání studovaného materiálu, nebo byla oka příliš malá a nedocházelo pak k dostatečným interakcím mezi studovaným materiálem a půdním prostředím. V neposlední řadě také bylo možné pozorovat vytvoření vlastního mikroklimatu uvnitř vaku, což rovněž omezovalo a zkreslovalo interakce se samotným půdním prostředím.

Při použití *tea bag* metody slouží jako materiál ke studiu dekompozice zelený čaj. Už tento fakt s sebou přináší výhody v podobě univerzality a uniformity studovaného materiálu, nehledě na to, že vzorky pak mají kromě přesně definovaného výchozího složení i jednotnou velikost. Zelený čaj je tvořen velkým množstvím polyfenolických látek, jedná se především o epigallokatechin-3-gallát, epigallokatechin, epikatechin-3-gallát a epikatechin. Dle polyfenolové teorie jsou polyfenolické látky prekurzory vzniku huminových látek. Při zvolení správných fyzikálně-chemických metod by tedy bylo možné mimo jiné charakterizovat časový průběh humifikace i jednotlivé složky účastnící se tohoto procesu.

1. TEORETICKÉ ZÁKLADY

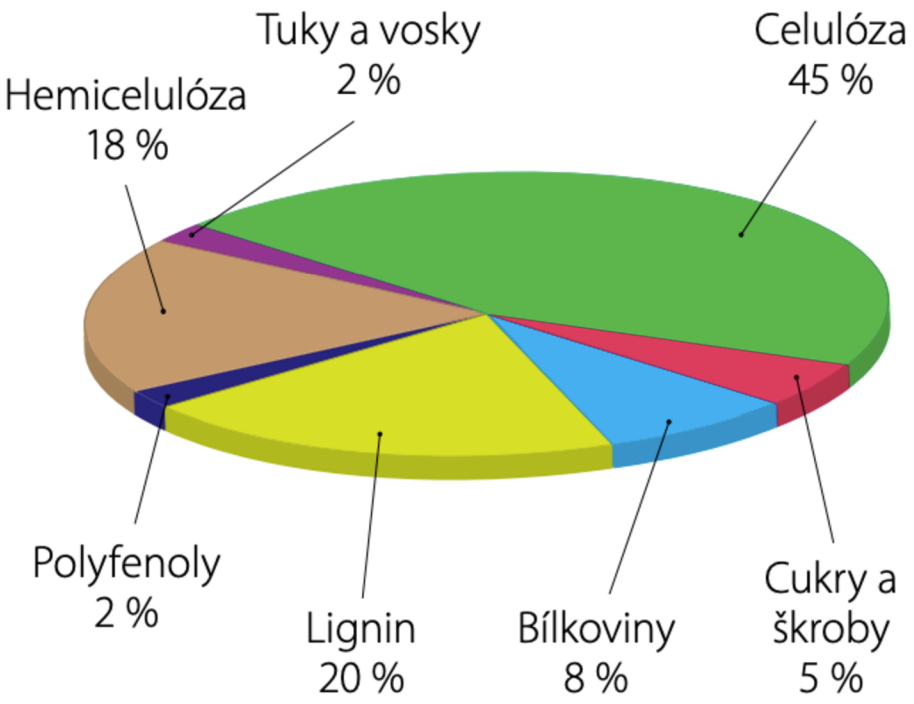
1.1 Půda a půdní organická hmota

Půdu lze chápat jako samostatný přírodně-historický útvar, který vznikl v důsledku komplexního působení vnějších činitelů jako jsou klima, podzemní voda či biologické faktory na mateční horninu v určitém čase. Statický pohled pokládá půdu za neživou směs zvětralých hornin a odumřelých organických zbytků v různém stupni rozkladu. Ruský geolog V. V. Dokučajev pak položil základy dynamickému pojetí půdy. Dokučajev na půdu nazíral jako na povrchové vrstvy jakýchkoliv hornin, které jsou přeměněny současným působením vody, vzduchu a rozličných organismů [1].

Označením *půdní organická hmota* jsou zahrnovány všechny organické složky vyskytující se v půdě. Takové označení ovšem přináší zjevné obtíže při zvažování živých organismů, zejména makrofauny nebo kořenů vyšších rostlin. Obtížnost při vytváření odpovídající definice půdní organické hmoty pramení z heterogenní povahy organické hmoty nalezené v půdě, jejího původu a stavu rozkladu. Stevenson definoval půdní organickou hmotu jako organické složky obsažené v půdě bez nerozložených rostlinných a živočišných tkání, produktů jejich „částečného rozkladu“ (organických zbytků) a půdní biomasy (živé mikrobiální tkáně). Mimo jiné zavedl Stevenson zaměnitelné používání pojmů *půdní organická hmota* a *humus*. Organická hmota v půdě je složena ze tří frakcí, a to z nehuminových látek, z čerstvých úlomků a snadno rozložitelného materiálu (tj. humusotvorné látky) a z huminových látek (vlastní humus). Nehumusové látky můžeme chápat v podstatě jako meziprodukty rozkladu a syntézy. Půdní organická hmota představuje významnou část organického uhlíku v biosféře a v závislosti na podmínkách prostředí může omezovat uvolňování skleníkových plynů z půdy. Jedná se o nejdůležitější část půdy, protože určuje fyzikální, chemické i biologické vlastnosti půdy. Půdní organickou hmotu je pak možné rozdělit na dvě složky – labilní nebo aktivní a stabilní. Aktivní část zahrnuje rostlinné zbytky, biomasu a nehumusové látky, které nejsou vázány na minerální složky. Aktivní část zároveň slouží jako zdroj živin (především N, P a S) pro rostliny a v neposlední řadě i mikroorganismy. Stabilní složka pak slouží výhradně pro zásobování rostlin živinami a je důležitá pro dlouhodobou rovnováhu v půdě [1,2].

Průměrné složení organické hmoty, která se dostává do půdy, je zobrazeno na Obrázek 1. Dominantními složkami jsou bezesporu celulóza a hemicelulóza. Celulóza je navzdory své vyšší chemické odolnosti mikrobiální cestou poměrně snadno rozložitelná za účasti enzymů celuláz a beta glukozidázy na vodu a oxid uhličitý. Odbourávání hemicelulózy je vzhledem k její nižší odolnosti jednodušší, přičemž její rozklad začíná hydrolýzou na cukry za přítomnosti hydrolytických enzymů ze skupiny hemiceluláz. Nezanedbatelnou část tvoří lignin, který představuje jednu z hlavních součástí dřevní hmoty a pokládá se za látku odolnou mikrobiálnímu rozkladu. V přírodním materiálu se lignin nevyskytuje volný, ale jako součást komplexů zejména s celulózou. Jeho rozklad může probíhat pouze za vhodných podmínek a podílí se na něm hlavně mikromycety a aktinomycety. Produkty rozkladu ligninu dále reagují s dusíkatými látkami za vzniku látek humusové povahy. Dusíkaté látky jsou do půdy přijímány až v polovině případů ve formě bílkovin, přičemž při jejich rozkladu heterotrofními mikroorganismy dochází k uvolňování dusíku, který se pak přeměňuje na minerální formu.

Tato forma je pak přístupná rostlinám. Pryskyřice, tuky, vosky a třísloviny jsou ve srovnání se sacharidy a proteiny těžko rozložitelné chemickou cestou a více vzdorují rovněž mikrobiálnímu rozkladu, v anaerobním prostředí tyto látky nepodléhají prakticky vůbec žádné degradaci.



Obrázek 1 – Průměrné složení organické hmoty vstupující do půdy

Z výše uvedeného výčtu je patrná různá odolnost jednotlivých sloučenin vůči rozkladu v půdním prostředí. Rychlost rozkladu klesá v následujícím pořadí: cukry, jednoduché proteiny – bílkoviny – hemicelulóza – celulóza – tuky, vosky – lignin.

1.2 Složení půdy

Složení půdy je jedním z významných faktorů ovlivňujících půdní vlastnosti jako jsou sorpce živin v půdě, půdní reakce, pufrační schopnosti půdy či redukční a oxidační procesy v půdě. U půd můžeme rozlišovat složení fázové (tj. tuhá, kapalná a plynná fáze půdy), zrnitostní a chemické [2].

Tuhá fáze půdy zahrnuje soubor všech pevných částic půdy rozmanitého složení a velikostí. Celkem 92–95 % z hmotnosti půdy tvoří minerální podíl, který vznikl zvětráváním hornin pevné zemské kůry, zbylou menší část (2–5 %) pak představuje půdní organická hmota. Mezi nejrozšířenější minerály tvořící horniny a minerální složky půdy patří primární a sekundární křemičitany. Menší podíl je pak tvořen oxidy, uhličitany, fosforečnany, sírany, sulfidy a dusičnany. Primární hlinitokřemičitany tvoří součást magmatických hornin. Představují zbytky hornin, které jsou zvětráváním částečně rozrušené, ale chemicky jen málo pozměněné, slouží tedy jako zásobárna minerálních živin v půdě. Do fyzikálně-chemických procesů

probíhajících v půdě zasahují jen nepatrně, protože jsou tvořeny relativně velkými zrny s malým specifickým povrchem. Jedná se především o draselné a sodnovápenaté živce (např. ortoklas $KAlSiO_3O_8$, anortit $CaAlSi_2O_8$ aj.). Mezi sekundární hlinitokřemičitany jsou řazeny jílové materiály vzniklé zvětráváním primárních křemičitanů. Tyto látky mají velký význam při formování základních vlastností půd. Ze skupiny oxidů je v půdě zastoupen ve velké míře křemen SiO_2, který je velmi odolný vůči chemickému zvětrávání. Kromě křemene se v půdě vyskytují rovněž oxidy železa – magnetit FeO, hematit Fe_2O_3 či limonit $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$. Jako zdroj vápníku slouží kalcit $CaCO_3$, dolomit $CaCO_3 \cdot MgCO_3$ je pak typickým zdrojem hořčíku. Fosforečnany, především apatit $Ca_5(PO_4)_3$, je důležitý jako zdroj biogenního fosforu.

Pojmem kapalná fáze půdy rozumíme půdní vodu, která podmiňuje existenci koloběhu látek v půdě, tzv. půdní roztok. Složení i koncentrace půdního roztoku závisí na působení řady fyzikálních, chemických a biologických procesů probíhajících v půdě v úzké souvislosti s teplotou, vlhkostí, aerací půdy a složením tuhé fáze půdy. V závislosti na těchto podmínkách obsahuje půdní roztok řadu rozpuštěných anorganických i organických látek v různém množství a poměru. Jedná se mimo jiné o K^+, Na^+, NH_4^+, Ca^{2+}, HCO_3^- či SO_4^{2-}. Celková koncentrace solí v půdním roztoku se pohybuje v řádu setin procenta až po jednotky procent. Za normální se považuje hodnota přibližně 0,05 %.

Plynnou fázi půdy představuje půdní vzduch. Vyplňuje póry bez vody a ve srovnání s atmosférickým vzduchem obsahuje větší množství oxidu uhličitého, méně kyslíku a zvýšené množství vodní páry. Vzduch se v půdě může nacházet ve volně pohyblivé formě, či vázaný na pevnou nebo kapalnou fázi. K tomu dochází prostřednictvím fyzikálních vazeb na povrchu pevné fáze či rozpouštěním jednotlivých plynů ve fázi kapalné. Vzduch může být také mechanicky uzavřen v podobě uzavřených bublinek v kapilárních pórech. Přestože mezi půdou a ovzduším dochází neustále k výměně plynných složek, nedochází k plynulému vyrovnávání těchto rozdílů. Oxid uhličitý v půdním vzduchu dosahuje koncentrace v průměru 0,3 %. Pokud nedochází k dostatečné aeraci, může obsah CO_2 dosahovat hodnot až 1–5 %. Ke zvyšování obsahu CO_2 se v půdě dochází v důsledku rozkladu organických látek půdními mikroorganismy, dýcháním kořeny rostlin nebo nedostatečným provzdušněním půdy. Oxid uhličitý s vodou tvoří kyselinu uhličitou, která je významným regulátorem reakce půdy (rozmezí pH 5,2–6,5) a působí přímo i při výživě rostlin v důsledku protonace solí HL, přičemž jsou těmito biokoloidními sloučeninami uvolňovány výživové prvky do půdního roztoku. Koncentrace kyslíku v půdním vzduchu se pohybuje v rozmezí 10–20 %. Kyslík v půdě zajišťuje dýchání všech půdních organismů a slouží k oxidaci organických i minerálních látek. Nedostatek kyslíku vede k redukci zvláště železitých a manganatých sloučenin. Redukce je podporovaná přítomností organických zbytků při nedostatečném provzdušnění a zasahuje i jiné sloučeniny (SO_4^{2-}) [3][4][5].

1.3 Huminové látky

Udává se, že huminové látky (HL) patří mezi vůbec nejrozšířenější látky na Zemi. HL tvoří významnou část organické hmoty v půdách, rašelině, hnědém uhlí a sedimentech, stejně tak jako v povrchových a podzemních vodách. Jedná se o přírodní organické sloučeniny tmavého zabarvení, přičemž je důležité podotknout, že tyto sloučeniny nejsou jasně definované

konkrétním chemickým vzorcem, ale že se pohybujeme v široké řadě různorodých molekul s relativně nízkou molekulovou hmotností (typicky v rozmezí 200 až 3000 Da). Díky tomu HL nevykazují specifické fyzikální a chemické vlastnosti (jako je ostrý bod tání, přesný index lomu, elementární složení, případně specifické IR spektrum atd.), jak je tomu u jiných, přesně definovaných organických sloučenin. Molekuly HL mají velmi podobnou chemickou strukturou, společnými znaky jsou především aromatické jádro s různou mírou substituce postranními alifatickými řetězci či rozličnými funkčními skupinami. Tyto jednotlivé menší molekuly jsou pak navzájem agregovány do složitějších supramolekulárních struktur pomocí slabých vazebných interakcí jako jsou Van der Waalsovy síly, π-π interakce, CH-π interakce a v neposlední řadě také vodíkovými můstky. Co se týče prvkového složení HL, majoritní prvky v jejich struktuře jsou jednoznačně uhlík a kyslík. Méně zastoupen je dusík, nalézt jej můžeme především v amidových jednotkách odvozených od peptidických struktur. Zastoupení jednotlivých prvků ve struktuře HL se liší a kolísá v závislosti na původu vzorku, způsobu extrakce a zvolených purifikačních krocích.

HL představují důležitou součást půdy. Tyto látky mají pozitivní vliv na schopnost zadržovat vodu a již od velmi nízkých koncentrací HL byl prokázán i jejich pozitivní vliv na úrodnost. Existují rovněž opodstatněné předpoklady, že HL slouží jako prekurzory mnoha důležitých sloučenin jako je kerogen, bitumen, specifické části lignitu nebo uhlí [5][6].

1.3.1 Rozdělení huminových látek

Existuje mnoho možností, jak dělit HL, ale nejpoužívanějším způsobem dělení HL je bezesporu dělení podle jejich rozpustnosti ve vodných roztocích při určitých hodnotách pH. Toto dělení je používáno již dlouhou dobu především díky tomu, že rozpustnost je dobrým kritériem vzhledem k její závislosti na důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je obsah kyselých funkčních skupin, molekulová hmotnost, aromaticita a další. Rozlišujeme tyto základní frakce HL:

Huminové kyseliny, které jsou rozpustné v alkalických roztocích,

Fulvinové kyseliny, které jsou rozpustné v alkalických i kyselých roztocích,

Huminy, nerozpustné v alkalickém ani kyselém prostředí.

Hymatomelanové kyseliny, frakce huminových kyselin oddělitelná alkoholovou extrakcí.

Výše uvedené skupiny se mezi sebou liší především zastoupením jednotlivých funkčních skupin, které jsou pak odpovědné za odlišnosti v jejich vlastnostech. Pro HL je také typické, že se jejich vlastnosti i složení mohou lišit v závislosti na jejich původu a také na způsobu jejich extrakce. To je sotva překvapivé, když si vezme v úvahu složitost přírodního materiálu a mnoho různých chemických a biologických reakcí, které se podílejí na jejich genezi [5].

Huminové kyseliny

Huminové kyseliny jsou tmavě hnědé, polyfenolické, amorfní látky, které se většinou hromadí na místě vzniku. Za běžných půdních podmínek jsou pevně vázány na minerální podíl půdy a ve vodě jsou velmi omezeně rozpustné. Charakteristické jsou naopak velmi dobrou

rozpustností v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. V kyselém prostředí pak dochází ke vzniku koagulantů HK [6].

Tabulka 1- Elementární složení HK z různých klimatických oblastí (Schnizter, 1977) [7]

Prvek (at. %)	Arktický pás	Mírný pás		Subtropický pás	Tropický pás
		Kyselé půdy	Neutrální půdy		
C	56,2	53,8–58,7	55,7–56,7	53,6–55,0	54,4–54,9
H	6,2	3,2–5,8	4,4–5,5	4,4–5,0	4,8–5,6
N	4,3	0,8–2,4	4,5–5,0	3,3–4,6	4,1–5,5
S	0,5	0,1–0,5	0,6–0,9	0,8–1,5	0,6–0,8
O	32,8	35,4–38,3	32,7–34,7	34,8–36,3	34,1–35,2

Pomocí elementární analýzy bylo zjištěno, že HK jsou tvořeny převážně uhlíkem a kyslíkem, navíc vždy obsahují vodík a v minoritním zastoupení i dusík. HK ve své struktuře také často obsahují fosfor a síru, obsah těchto prvků ale závisí na původu vzorku (viz. Tabulka 1) či postupu extrakce a může být snížen ultracentrifugací za účelem odstranění jílových minerálů anebo přídavkem směsi kyselin HCl a HF [5].

Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny tvoří frakci HL typickou svou rozpustností v celém rozsahu pH. Jedná se o látky žluté až hnědé barvy, velmi mobilní a lehce se přemísťující v půdním profilu. Od huminových kyselin se liší především jednodušší stavbou „makromolekuly“ i celkovým elementárním složením. Konovova předpokládala, že FK jsou tvořeny stejnými strukturálními či stavebními jednotkami jako HK, ovšem s tím rozdílem, že podíl aromatických jednotek tvořících FK je podstatně menší než u HK, zatímco podíl alifatických řetězců je naopak vyšší. Výsledky prováděných elementárních analýz vzorků FK prokázaly, že FK jsou tvořeny stejnými prvky jako HK, ovšem ve zcela jiném poměru. FK obsahují oproti odpovídající frakci HK méně uhlíku a přibližně dvakrát více kyslíku. Tento fakt je způsoben především vysokým obsahem karboxylových –COOH skupin, což vysvětluje také jejich vyšší celkovou kyselost oproti HK. FK obsahují také velký podíl –OH fenolických skupin. Naopak C=O karbonylové a C–O etherové funkční skupiny jsou oproti –COOH a –OH zastoupeny v mnohem menší míře [6].

Tabulka 2 - Elementární složení FK z různých klimatických oblastí (Schnizter, 1977) [7]

Prvek (at. %)	Arktický pás	Mírný pás		Subtropický pás	Tropický pás
		Kyselé půdy	Neutrální půdy		
C	47,7	47,6–49,9	40,7–42,5	42,2–44,3	42,8–50,6
H	5,4	4,1–4,7	5,9–6,3	5,9–7,0	3,8–5,3
N	1,1	0,9–1,3	2,3–2,8	3,1–3,2	2,0–3,3
S	1,6	0,1–0,5	0,8–1,7	2,5	1,3–3,6
O	44,2	43,6–47,0	47,1–49,8	43,1–46,2	39,7–47,8

Huminy

Huminy (HU) jsou specifickým typem HL, často bývají charakterizovány jako nerozpustné formy HK. Jedná se pravděpodobně o silně karbonizovanou organickou hmotu, která je pevně vázaná na minerální podíl půdy. Z tohoto důvodu se nedá získat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi z dekalcinované půdy. Právě fakt, že huminy jsou ve vodě v celém rozsahu pH nerozpustné, značně komplikuje možnost jejich studia. Průlomovou byla v tomto ohledu ^{13}C nukleární magnetická rezonance. Bylo zjištěno, že huminy jsou velmi podobné HK s tím rozdílem, že typicky obsahují vyšší podíl polysacharidů a polypeptidů. HU v půdě mají pak za úkol zlepšovat schopnost zadržovat vodu, zlepšují strukturu půdy, udržují její stabilitu, zajišťují fungování kationtového výměnného systému a přispívají k celkovému zlepšení úrodnosti půdy. Kvůli těmto důležitým funkcím jsou HU klíčovou složkou úrodných půd [8].

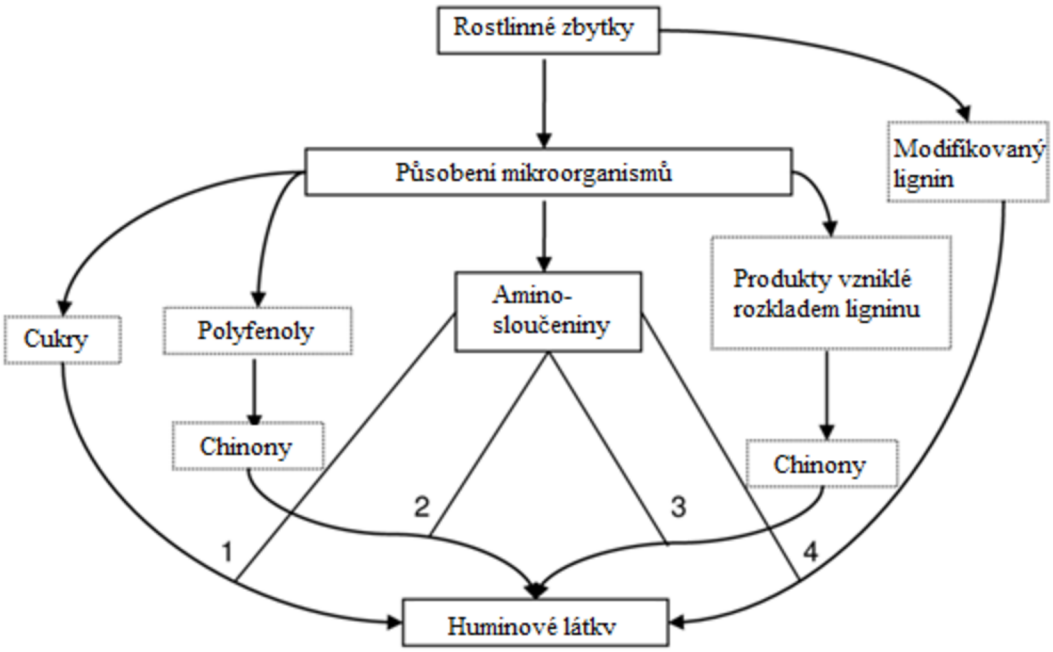
Hymatomelanové kyseliny

Pojmem *hymatomelanové kyseliny* rozumíme frakci HK, která je oddělitelná alkoholovou extrakcí. Tyto látky mají žluté až žlutohnědé zbarvení a oproti HK mají nižší molekulovou hmotnost. Bylo zjištěno, že tyto látky obsahují více než 60 % uhlíku a v jejich struktuře jsou zastoupeny především $–OCH_3$, –COOH a –OH funkční skupiny [7].

1.4 Vznik huminových látek

Proces, při kterém dochází ke vzniku HL, se nazývá humifikace. Jeho podstatou je přeměna odumřelého rostlinného a živočišného materiálu. Samotná humifikace pak zahrnuje velký soubor na sebe navazujících biochemických a enzymatických reakcí. Je doprovázena mineralizací výchozích složek, což znamená, že nikdy nedojde k humifikaci veškerého výchozího organického materiálu. Důležitým aspektem je, jaký výchozí materiál podléhá degradaci. Škroby, bílkoviny či celulóza podléhají degradačním reakcím snáze než tuky, vosky, lignin či další fenolické látky. I přes snahu široké vědecké společnosti objasnit tento proces tak ovšem není doposud znám přesný mechanismus humifikace. V současnosti patří mezi nejdiskutovanější a nejuznávanější teorie ligninová, polyfenolová a teorie dle Maillarda.

Všechny tyto cesty jsou schématicky zachyceny na Obrázek 2 - Mechanismus vzniku HL dle Stevensona [9][10][11].



Obrázek 2 - Mechanismus vzniku HL dle Stevensona

1.4.1 Ligninová teorie

Podle ligninové teorie je hlavním prekurzorem pro vznik HL tzv. modifikovaný lignin. Ten vzniká v důsledku přednostního rozkladu jiných než ligninových částí pletiv a teprve takto vyextrahovaný lignin podléhá různým typům přeměn na huminové látky. Jinými slovy je lignin půdními mikroorganismy neúplně využit a vznikající reziduum se stává součástí půdního humusu. Modifikace ligninu spočívá v odštěpení methoxylové $–OCH_3$ skupiny ligninu za tvorby o-hydroxyfenolů a oxidaci alifatického řetězce, což pak vede ke tvorbě karboxylových –COOH skupin. Waksman ve své práci uvedl podložené argumenty k podpoře ligninové teorie, a to že jak lignin, tak HK jsou pro velkou většinu hub a bakterií rozložitelné jen velmi obtížně. Poukázal také na podobnost v rozpustnosti ligninu a HK – obě tyto látky jsou částečně rozpustné v alkoholech a pyridinu. Klíčová pro něj byla přítomnost methoxylové skupiny v obou těchto látkách a také zjištění, že dojde-li k ohřátí ligninu v alkalickém roztoku, dojde k jejich přeměně na HK obsahující právě methoxyl. Přestože je lignin rozkládán mikroorganismy méně snadno než jiné rostlinné složky, v přírodě existují mechanismy pro jeho úplný aerobní rozklad, jinak by docházelo k hromadění nerozložených zbytků na povrchu půdy a obsah organické hmoty v půdě by se postupně zvyšoval, dokud by nedošlo k vyčerpání CO_2 z atmosféry. Je tedy zřejmé, že schopnost mikroorganismů degradovat lignin byla v mnoha vědeckých kruzích hrubě podhodnocena. V normálních aerobních půdách může být lignin před syntézou HL plně rozložen na nízkomolekulární produkty. Na druhou stranu mikroorganismy, a především houby, podílející se na úplné degradaci ligninu se obvykle nevyskytují v nadměrně vlhkých oblastech. Lze tedy předpokládat, že modifikovaný lignin hraje zásadní roli především

při tvorbě HL v rašeliništích, jezerních sedimentech a podmáčených půdách, zatímco v klasických půdách bude mít pouze minoritní zastoupení [9][12].

1.4.2 Polyfenolová teorie

Ligninovou teorii nahradila v šedesátých letech 20. století teorie polyfenolová. Základním principem je oxidační polymerizace polyfenolů, která může být katalyzována enzymy stejně jako přítomností určitých anorganických sloučenin. Jsou dvě možnosti, jak získat polyfenoly. V prvním případě slouží jako zdroj polyfenolů lignin. Fenolické aldehydy a kyseliny, které jsou uvolněny z ligninu pomocí mikrobiálního rozkladu, procházejí enzymatickou přeměnou na chinony, které polymerují za vzniku HL, a to bez ohledu na přítomnost aminosloučenin. Ve druhém případě dochází k mikrobiální syntéze polyfenolů z jiných zdrojů uhlíku než z ligninu, například z celulózy. Poté dochází stejně jako v prvním případě k enzymatické oxidaci vzniklých polyfenolů na chinony a dále na HL. Podle současných konceptů jsou chinony ligninového původu spolu s chinony vzniklými syntézou mikroorganismů hlavními prekurzory vzniku HL [10][12].

1.4.3 Teorie podle Maillarda

Teorie dle Maillarda je známá také jako kondenzace sacharidů s aminy. Myšlenka, že ke tvorbě humusu může docházet rovněž ze sacharidových jednotek, sahá až do samotných počátků huminové chemie. Podle tohoto konceptu se na vzniku HL podílejí redukující sacharidy a aminokyseliny vytvářené jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu. Tyto látky jsou pak podrobeny neenzymatické polymeraci za vzniku hnědých dusíkatých polymerů. Počáteční reakce při kondenzaci zahrnuje adici aminu na aldehydovou skupinu sacharidu za vzniku N-substituovaného glykosylaminu. Dále dochází k přeskupení takto vzniklých glykosylaminů na N-substituované aminodeoxyketózy, které podléhají fragmentaci a dochází ke vzniku zbytků aldehydů a ketonů s tříuhlíkatým řetězcem (např. glyceraldehyd, acetol, dihydroxyaceton, …). Všechny tyto vzniklé sloučeniny jsou velmi reaktivní a za přítomnosti aminosloučenin snadno polymerují.

Samotné kondenzační reakce probíhají za normálních teplot v půdě velmi pomalu, což je i hlavní námitka proti této teorii. Když ovšem vezmeme v úvahu časté a drastické změny v půdním prostředí (např. v závislosti na počasí – zmrznutí a opětovné rozmrznutí půdy, vysušení, …) spolu s přítomností minerálního materiálu, který může mít katalytické vlastnosti, pak může kondenzace probíhat mnohem snadněji a rychleji, přestože se nejspíš ani tak nebude jednat o dominující proces vzniku HL [13][14].

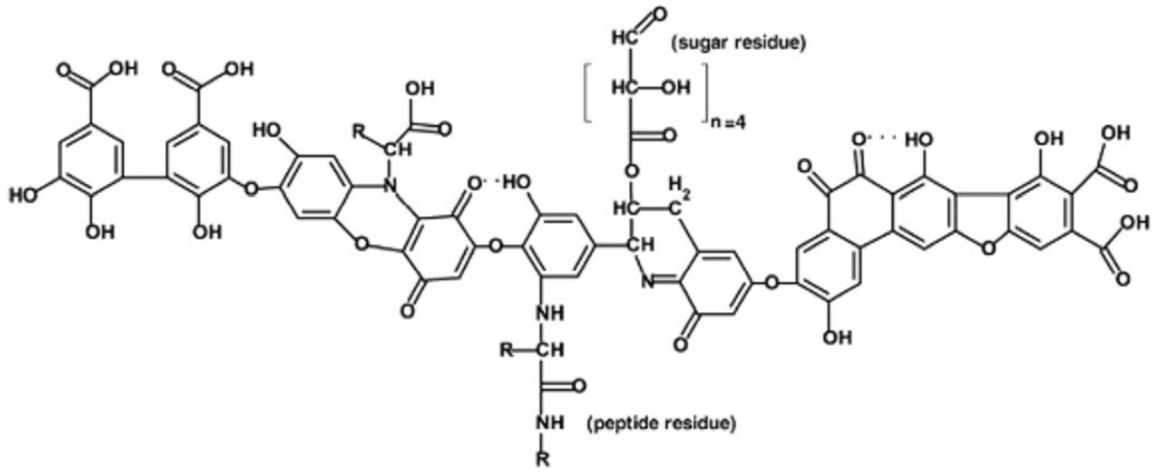
1.5 Molekulární struktura huminových látek

Pochopení struktury HL je klíčové pro správné pochopení jejich fyzikálně-chemických interakcí v prostředí. Rozklíčování skutečné struktury HL bylo vzhledem k jejich složité povaze dlouhou dobu limitováno dostupnými fyzikálně-chemickými a analytickými metodami, a ani v současné době není pohled na strukturu HL napříč vědeckou společností zcela jednotný [11].

1.5.1 Polymerní teorie

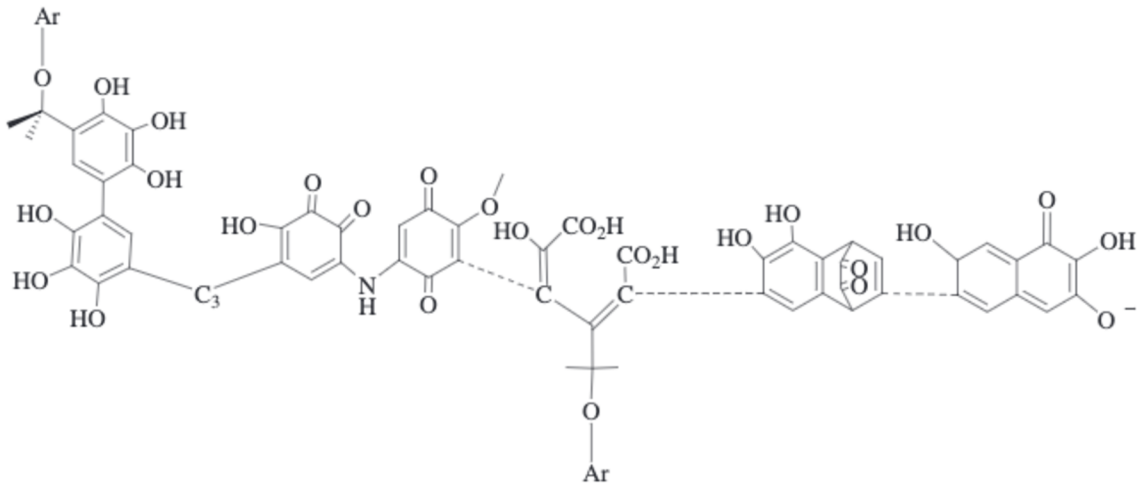
Historicky nejstarší publikovanou teorií je polymerní teorie, podle které jsou HL považovány za ohebné lineární polymerní sloučeniny, které jsou schopné zaujímat různé konformace makromolekulárního klubka v závislosti na náboji, hodnotě pH a přesném chemickém složení polymerního řetězce. Polymerní pohled na HL zahrnoval obecnou myšlenku polydisperzity (Dubach a Metha, 1963), podle které jsou HL složeny z polymerů o různé molekulové hmotnosti, podobně jako jiné biomakromolekuly – např. bílkoviny, polysacharidy či lignin. Tato myšlenka byla podpořena i obtížnou izolací chemicky homogenních frakcí HL, stejně jako u biopolymerů syntetizovaných v živých buňkách. Ničím nepodložená podobnost podpořila polymerní chápání HL a odůvodnila pozorování, že se jedná o směs sloučenin. Koncept polydisperzních polymerů o vysoké molekulové hmotnosti se pak stal paradigmatickou součástí později navrhovaných a publikovaných definic HL [12][15].

V souladu s polymerní teorií bylo navrženo i velké množství hypotetických struktur HL. Nejznámější je pravděpodobně strukturní model navržený Stevensonem (1963). Tento model je typický vysokým podílem aromatických struktur, za zmínku stojí i fenolické skupiny, a to jak volné, tak i vázané pomocí vodíkových můstků. Můžeme si povšimnout rovněž karboxylových funkčních skupin, které jsou ve většině případů vázané přímo na aromatické struktury. Stevenson do strukturního vzorce zařadil také zbytky sacharidů a bílkovin.



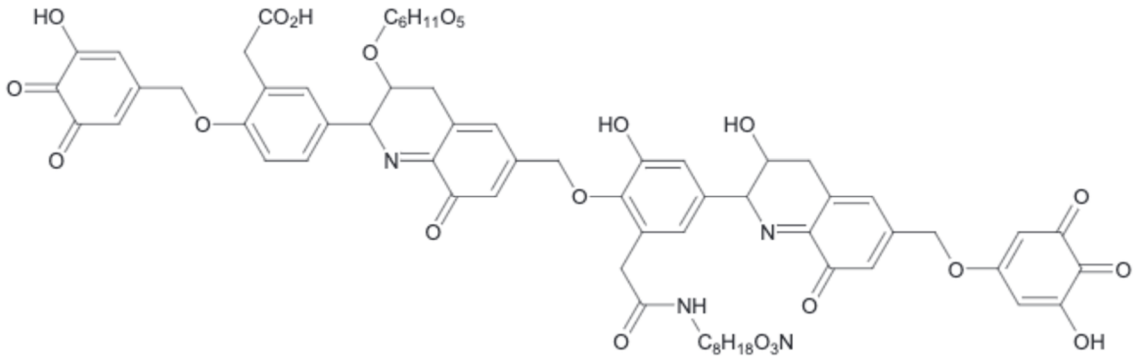
Obrázek 3 - Strukturní model huminové kyseliny dle Stevensona (1963)

Dalším známým modelem je Flaigův model, který vychází z ligninových monomerních jednotek. Opět je na první pohled zřejmý vysoký obsah aromatických struktur především díky přítomnosti substituovaným benzenovým kruhům. Na rozdíl od modelu navrženého Stevensonem se v tomto modelu nevyskytují žádné residua bílkovin. Dalším problémem je nedostatečný počet karboxylových funkčních skupin v poměru k fenolickým a také nízké zastoupení alifatických jednotek.



Obrázek 4 - Struktura huminové kyseliny dle Flaiga

Za zmínku stojí rovněž Dragunovův strukturní vzorec. V tomto vzorci jsou přítomny di- a trihydroxy- substituovaná benzenová jádra, přičemž část z nich je vázána dvojnou vazbou s chinonovou skupinou. Aromatické kruhy jsou pak přemostěny pomocí etherových či amidových vazeb. Dále je možné si povšimnout, že atom dusíku je buď součástí aromatických struktur, nebo se vyskytuje v postranních řetězcích jako součást sacharidových a proteinových zbytků.



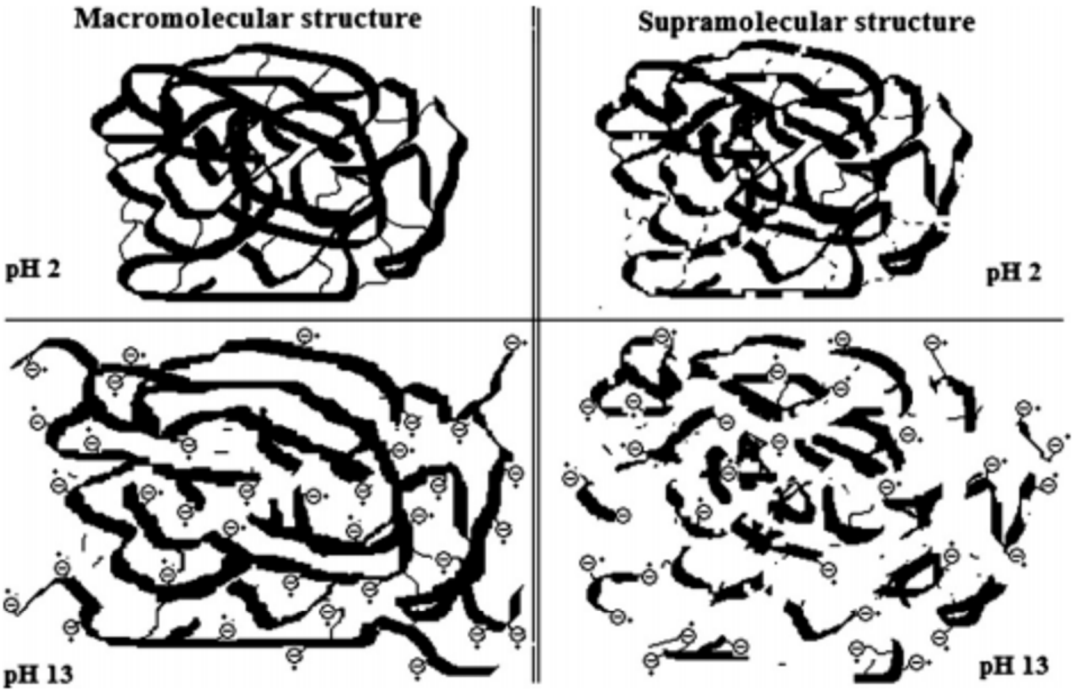
Obrázek 5 - Strukturní vzorec dle Dragunovova

Předpoklad, že HL jsou polymery bez přesně dané struktury polymerního řetězce, vedl k používání jednoduchých fyzikálně-chemických měření pro jejich charakterizaci. Příkladem může být index E_4/E_6, značící poměr absorbance HL při 465 nm k absorbanci HL při 665 nm. Tento index byl poprvé představen Weltem (1955) a znovu navržen Konovovou (1961). Měl by naznačovat vztah mezi střední molekulovou hmotností, stupněm aromaticity a kondenzací aromatického jádra. Navzdory pokračujícímu používání indexu E_4/E_6 bylo opakovaně prokázáno, že předpokládaný vztah s molekulovou hmotností, tedy čím vyšší je hodnota poměru E_4/E_6, tím menší by měla být molekulová hmotnost, není zcela správný. Hodnota tohoto indexu je totiž silně závislá na hodnotě pH. Pomocí gelové permeační chromatografie bylo prokázáno, že HL s nejnižší střední dobou zadržení měly nejvyšší poměr E_4/E_6 (Campbell

a spol., 1967). Handerson a Hepburn (1977) opět pomocí gelové permeační chromatografie prokázali, že huminové frakce tvořené většími molekulami a s nízkým poměrem E_4/E_6 byly tvořeny převážně alifatickými složkami, zatímco frakce tvořené menšími molekulami měly nejvyšší zastoupení aromatických látek. S dalším rozvojem moderních instrumentálních metod jako jsou vysokotlaká vylučovací chromatografie, hmotností spektrometrie či NMR bylo zjištěno, že předpokládaná polymerní struktura HL je ke správnému popisu struktury HL nedostačující. To bylo mimo jiné prokázáno i zjištěním, že HL mají ve vodném roztoku, obdobně jako povrchově aktivní látky, tendenci vytvářet agregáty podobné micelám. Pomocí intra- či intermolekulárních interakcí docházelo ke vzniku uspořádaných struktur s vnitřní hydrofobní oblastí, oddělenou od vnějšího vodného prostředí hydrofilními vrstvami. Jako příklad může sloužit zvýšení fluorescence pyrenu v roztoku HL po přidání kationtů Mg^{2+}, k čemuž dochází v důsledku kationtem podpořené tvorby micel s hydrofobními doménami, které pak chrání pyrenovou sondu před zhášecími anionty (např. Br^-) [7] [12] [16] [17] [18].

1.5.2 Supramolekulární teorie

K vysvětlení molekulární struktury HL slouží v současnosti nejlépe supramolekulární teorie. Ta na HL pohlíží jako na relativně malé heterogenní molekuly různého původu, které tvoří organizované supramolekulární konformace. Huminové suprastruktury pak nejsou spojeny klasickými kovalentními vazbami, ale k jejich stabilizaci slouží pouze slabé vazebné interakce – již zmiňované van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce či π-π a π-CH interakce. Tyto interakce pak určují konformační strukturu HL, čímž řídí i jejich reaktivitu v životním prostředí. Je důležité podotknout, že koncept supramolekulární struktury uvažuje i zahrnutí fragmentů biomolekul do konformace HL. Biomolekulární komponenty byly z tradičního strukturního pojetí HL vyřazovány, přestože velké množství těchto fragmentů je úzce spjato s huminovou strukturou, v některých případech dokonce i kovalentními vazbami, a nelze je tedy efektivně oddělit. Piccolo a spol. (2005) přišli s návrhem, že relevantní definice struktury HL by měla zahrnovat všechny molekuly pevně poutané v huminové frakci, to znamená všechny takové, které nelze odstranit bez významné změny chemických vlastností frakce. Mimo to Fischer a spol. (2017) ve své práci potvrdili, že jednotlivé supramolekulární frakce HL jsou *in situ* prostorově uspořádány do vrstev podle své polarity. Nejpolárnější vrstvy jsou na povrchu v kontaktu s půdním roztokem, zatímco méně polární vrstvy jsou uschovány hlouběji v takto vzniklé struktuře [19].



Obrázek 6 – Srovnání současných představ o struktuře HL

Je tedy zřejmé, že na HL je nutné pohlížet jako na komplexní a složité struktury, čemuž je nutné přizpůsobit i výběr fyzikálně-chemických a analytických metod pro popis těchto supramolekulárních látek. Na tuto skutečnost upozornili mimo jiné i Baigorri a spol. (2007), když ve své práci analyzovali molekulární agregáty HL v roztoku. Pro popis distribuce jednotlivých fragmentů v závislosti na hodnotě pH, které tvoří supramolekulu HL, byla prokázána účinnost komplementárního použití analytických technik, jako je ultrafiltrace, dynamický rozptyl světla (DLS) či vylučovací chromatografie, a to i navzdory nemalým omezením každé z těchto analytických technik, pokud by byly tyto metody použity pouze samostatně. Tyto metody rovněž pomohly objasnit chování supramolekuly HL v závislosti na hodnotě pH při použití metody acidifikace a následné alkalizace roztoku HL hydroxidem sodným. Okyselení vodného roztoku HL (kys. chlorovodíková, kys. octová) na velmi nízké hodnoty pH způsobuje disagregaci v důsledku narušení relativně slabých mezimolekulárních sil – v tomto případě především elektrostatických interakcí, vodíkových můstků a hydrofobních interakcí, které jsou jinak za alkalických podmínek stabilní. Při acidifikaci roztoku kys. octovou bylo při použití ultrafiltrace možné pozorovat nárůst v molekulární frakci odpovídající velikosti molekul vyšší než 0,45 μm. Tento jasný agregační účinek byl s největší pravděpodobností spojen se zvýšením iontové síly roztoku, ke kterému dochází ve vzorcích ošetřených kyselinou octovou. Tyto velké agregáty vzniklé v důsledku zvýšení iontové síly roztoku po přídavku kyseliny octové by mohly být složeny buď z jednotlivých makromolekul nebo velmi stabilních molekulárních agregátů. Roztok HL je tedy za určitých podmínek a za použití určité analytické metody schopen vykazovat rovněž vlastnosti typické pro polymerní sloučeniny [19][20][21][22].

1.6 Využití huminových látek

HL mají díky své specifické struktuře vysokou chemickou i biologickou aktivitu, vysoké vazebné a sorpční schopnosti a v neposlední řadě jsou také schopné účastnit se různých biochemických procesů. Proto jsou i aplikační možnosti HL velmi široké a různorodé.

Zemědělství

Primární využití nalézají HL bezesporu v zemědělství. HL mají totiž pozitivní vliv na růst a vývoj u mnoha zemědělských plodin. Počínaje tím, že HL jsou schopny prokazatelně zvyšovat klíčivost semen, rovněž podporují a zlepšují tvorbu kořenového systému, zvyšují nárůst biomasy a zlepšují kvalitu produkce plodin, a to především díky jejich účasti při chelatizaci prvků biologického významu. HL tvoří chelátové vazby nejčastěji s mědí, železem i dalšími kovy a optimalizují tím podmínky výživy rostlin stopovými prvky. Z hlediska ekologických vztahů mezi půdou a rostlinou jsou velmi důležité vápenaté soli HK. Díky kationtu Ca^{2+} dochází k pospojování jednotlivých molekul mezi sebou a vzniku micel. Micely pak umožňují vznik organominerálního sorpčního komplexu, který pozitivně ovlivňuje strukturní vlastnosti půdy, zároveň s tím vzniká také rezervoár minerálních iontů vázaných na povrch tohoto komplexu. Přítomnost HL v půdě rovněž minimalizuje přechod toxických látek do zemědělských plodin. Pro HL je typické, že se jejich vliv na metabolismus rostlin projevuje již při jejich velmi nízkých koncentrací v půdním roztoku.

HL také nalézají široké využití jak v chovech hospodářských zvířat, tak v chovech zájmových. Mají stimulační účinky na trávení a využití živin, zlepšují konverzi krmiva a tím příznivě ovlivňují růst zvířat. U dojeného skotu došlo při podávání huminových látek k mírnému zvýšení produkce mléka a k významnému zvýšení obsahu mléčného tuku a proteinu. Přídavek huminových kyselin do krmné dávky vede k tvorbě zdravého střevního epitelu, stabilizaci střevní mikroflóry a pH v trávicím traktu a ke zlepšení kondice. Pro své antimikrobiální účinky se huminové látky využívají také pro zvýšení ochrany proti infekci, zejména u mladých zvířat [11].

Průmyslové využití

V papírenském průmyslu nachází využití sodná forma HK, humát sodný. Ten je používán jako barvivo papíru. Jeho přítomnost zároveň zlepšuje retenci papíroviny a snižuje průnik toxických látek do podsítných vod. Barvení je bezproblémové jak u technologie, kdy je barva přidávána přímo do hmoty rozvlákněného papíru, tak u technologie, kdy se barva na povrch papíru nanáší na klížícím lisu.

Ve stavebnictví se HL uplatňují jako účinná složka plastifikátorů betonových směsí. Plastifikátory s obsahem HK řeší základní problém transportbetonu – zablokování hydratace cementu a zachování konzistence betonové směsi během její dopravy bez negativního vlivu na rychlost nárůstu počátečních pevností betonu. Plastifikátory na bázi HK jsou ve své třídě kvalitativně srovnatelné se zahraničními výrobky při nižší ceně [6].

Ochrana životního prostředí

Skutečnost, že jsou HK díky přítomnosti karboxylových a fenolických funkčních skupin ve své struktuře schopné na sebe vázat toxické kovy a pro životní prostředí nebezpečné organické látky jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, je známa již dlouhou řadu let a je využívána především při čištění a dekontaminaci odpadních vod. HK jsou na rozdíl od průmyslově vyráběných ionexů mnohem snadněji dostupné, cenově výhodnější a šetrnější k životnímu prostředí. V současné době je zkoumána aplikace jednak neupravených extrahovaných HK, podstatně lepší výsledky ale vykazují fyzikálně či chemicky modifikované vzorky HK. Fyzikální modifikací rozumíme především zahřívání extrahované HK, chemická modifikace pak zahrnuje zahřívací proces spolu s přídavkem $CaCl_2$, v literatuře je pak možné dohledat i modifikace pomocí sulfonace či promývání minerálními kyselinami.

Výzkum, který předložili T. T. Aye a spol. (2019), se zabývá využitím modifikovaných HK jako sorbentů při odstraňování kyselých a zásaditých barviv. Jako zástupce zásaditých barviv byla použita methylenová modř, z kyselých barviv bylo použito barvivo congo red. Bylo zjištěno, že za použití chemicky modifikovaných vzorků HK při počáteční koncentraci barviva 30 $mg \cdot l^{-1}$ došlo k odstranění 80–90 % původní koncentrace barviva. Je tedy zřejmé, že i v této oblasti se jeví využití HK jako sorbentů velmi slibně [23].

Velký potenciál by mohly mít i kombinované sorbenty HK spolu s chitosanem. Bylo prokázáno, že při pokrytí uhelné matrice chitosanem došlo ke zvýšení její sorpční účinnosti a operačního rozsahu na sorpci těžkých kovů. Tento poznatek je příznivý i z ekonomického hlediska, protože při povrchovém pokrytí matrice je množství potřebného chitosanu velmi nízké [24].

1.7 Zelený čaj

Zelený čaj se získává z rostliny *Camellia sinensis,* což je rostlina původem z jihovýchodní Asie. V současné době je tato rostlina pěstována ve více než 30 zemích po celém světě. Při výrobě zeleného čaje z listů čajovníku nedochází k oxidaci polyfenolů, lístky zeleného čaje se nechávají pouze několik hodin zavadnout a enzymy obsažené v čajových lístcích, které způsobují jejich oxidaci, jsou inaktivovány působením tepla – lístky čajovníku jsou buď sušeny na pánvích anebo napařovány. Zpracování čajových lístků je pak ukončeno jeden až dva dny od jejich sběru [25][26].

Složení zeleného čaje může kolísat v závislosti na klimatických podmínkách, použitých zemědělských postupech či v neposlední řadě stáří listu. Listy čajovníku obsahují značné množství bílkovin, aminokyselin, vlákniny, lipidů, sacharidů, vitamínů, minerálů a sekundárních metabolitů, jako jsou alkaloidy (např. kofein), polyfenolů včetně katechinů a saponinů [27].

Tabulka 3 - Složení zeleného čaje v hm. % přepočtené na sušinu [28]

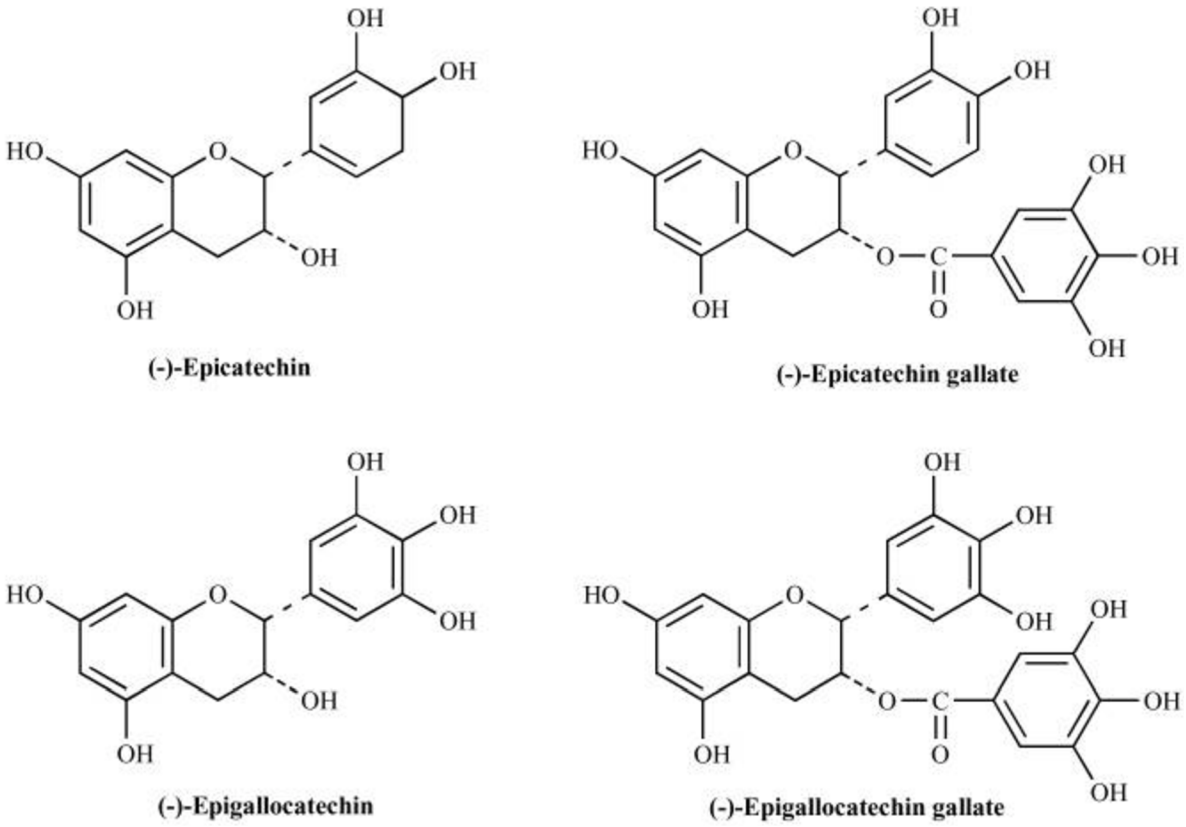
Polyfenoly	36,0	Sacharidy	25,0
Methyl xanthiny	3,5	Bílkoviny	15,0
Aminokyseliny	4,0	Lignin	6,5
Organické kyseliny	1,5	Lipidy	2,0
Karotenoidy	0,1	Chlorofyl	0,5
Těkavé látky	0,1	Popel	5,0

1.7.1 Polyfenolické látky obsažené v zeleném čaji

Mezi nejvíce zastoupené polyfenolické látky v zeleném čaji patří epikatechin, epigalokatechin, epikatechin galát a epigalokatechin galát, které řadíme do skupiny katechinů nebo také 3-flavanolů [25].

Tabulka 4 – Obsah jednotlivých katechinů v zeleném čaji v hm. % přepočtený na sušinu [28][28]

Katechin	1–2	Gallokatechin	1–3
Epikatechin	1–3	Epigallokatechin	3–6
Epikatechin gallát	3–6	Epigallokatechin gallát	7–13



Obrázek 7 – Strukturní vzorce čtyř hlavních katechinů obsažených v zeleném čaji

Katechiny jsou bezbarvé, ve vodě rozpustné organické sloučeniny. Jsou snadno oxidovatelné, i když se jejich oxidační potenciál liší. Bývají využívány jako potravinové antioxidanty, jsou

totiž schopny zpomalovat žluknutí v tucích a olejích potlačením aktivity peroxidů volných radikálů, která je způsobena aerobní oxidací. Strukturu těchto katechinů je možné vidět na Obrázek 7. Katechiny jsou také odpovědné za hořkost a trpkost čaje, a především za antioxidační účinky zeleného čaje v organismu, které byly podloženy mnoha výzkumy. Účinky extraktů ze zeleného čaje a frakcí polyfenolů ze zeleného čaje jsou prokazatelně lepší než u kyseliny askorbové (vitamin C) a tokoferolu (vitamin E) [26][29].

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vliv půdních kondicionérů na vlastnosti HL a úrodnost půdy

Jako půdní kondicionéry označujeme takové látky, které jsou schopné zlepšovat funkce půdy a také její úrodnost. Půdní kondicionéry zahrnují velké množství organických materiálů (jako je například kompost a vermikompost), přírodních depozitů, různých ve vodě rozpustných polymerů, živé rostliny, mikroby a další. Právě vlivem kompostu a vermikompostu na vlastnosti půdy se zabývá celá řada půdních chemiků. Jedná se o důležité téma, neboť současný trend intenzifikace zemědělství může mít celou řadu negativních důsledků, jako je zvýšená eroze půdy, snížená biologická rozmanitost a snížení obsahu organických látek v půdě, což má za následek snížení kvality a úrodnosti zemědělských půd. Použití kompostu či vermikompostu jako půdního kondicionéru může značným způsobem přispět k udržitelnosti globálního zemědělství.

Fyzikálně-chemickými vlastnostmi kompostu a vermikompostu připraveného z kuchyňského odpadu se ve své práci zabývali N. Tiwari a spol. [30]. Oba zkoumané vzorky byly připraveny z kuchyňského odpadu, kravského hnoje a půdy. Vzorek vermikompostu se skládal z 300 g odpadu, 150 g hnoje a 50 g půdy. Pro výrobu vermikompostu byly použity žížaly hnojní (*Eisena foetida*). Vzorek kompostu byl připraven ze 3 kg odpadu, 2 kg půdy a 1 kg kravského hnoje. Takto připravené vzorky byly ponechány 40 dnů, poté byly analyzovány. Byl stanoven obsah vlhkosti, porozita a schopnost zadržovat vodu, stejně jako pH a vodivost vzorků. Dále byl spektrofotometricky stanoven obsah fosforu, Kjehdalovou metodou obsah dusíku a pomocí plamenové absorpční fotometrie byl stanoven také obsah draslíku. V případě vzorku kompostu docházelo k přeměně organického materiálu za pomoci mikroorganismů, zatímco ve vzorku vermikompostu se tohoto procesu účastnily jak mikroorganismy, tak i *Eisena foetida*. Bylo zjištěno, že vermikompost obsahoval oproti kompostu větší množství dusíku, fosforu i draslíku. Právě obsah těchto prvků v půdě je klíčovým pro správný růst rostlin. Zajímavý poznatek přineslo také měření porozity jednotlivých vzorků.

Vliv zemědělského kompostu na kvalitu půdy a úrodu plodin zkoumali D'Hose a spol. [31]. Výzkum probíhal na experimentální farmě Gentské univerzity v Melle od roku 2004 a v roce 2010, kdy byl vydán tento článek, výzkum stále běžel. Pro experiment byly použity čtyři druhy zemědělských plodin, a to krmná řepa (FB), krmná kukuřice (M), růžičková kapusta (BS) a brambory (P). Rostliny pak byly rozděleny na dvě části podle množství zemědělského kompostu, kterým byly pohnojeny, a to buď 0 $m^3 \cdot ha^{-1}$ nebo 50 $m^3 \cdot ha^{-1}$ zemědělského kompostu, podle toho pak byly označeny jako FC0 nebo FC1. Každý rok byl pomocí TOC určen celkový obsah uhlíku v každém odebraném vzorku půdy, dále byla provedena analýza počtu hlístic a počtu žížal. Vzorky byly dále charakterizovány pomocí objemové hustoty a pH. Výsledky ukazují, že s přídavkem zemědělského kompostu se snížila (ne signifikantně) objemová hustota. Pokles objemové hustoty byl připsán smíchání půdy s méně drobtovitým organickým materiálem. Navíc bylo zjištěno, že přídavkem zemědělského kompostu došlo ke zvýšení hodnoty pH všech zkoumaných vzorků, což pravděpodobně způsobila vysoká hodnota pH samotného kompostu (průměrná hodnota 8,1). Organický uhlík v půdě je nejčastěji uváděným atributem a je považován za nejdůležitější ukazatel kvality půdy a zemědělské

udržitelnosti. Obecně je aplikace organických materiálů s vysokým obsahem stabilního organického uhlíku na půdu velmi logickým způsobem, jak zvýšit nebo udržet zásoby organického uhlíku v půdě. Prováděný výzkum prokázal, že kontinuální používání kompostu jako půdního kondicionéru podstatně zvýšila obsah organického uhlíku v porovnání se vzorky, ke kterým kompost nebyl přidáván. Dále bylo prokázáno, že aplikace zemědělského kompostu výrazně zvýšila výnosy plodin po čtvrté aplikaci kompostu (2007), což potvrzuje schopnost kompostu podporovat výnosy plodin.

Úpravou kvality půdy pomocí humifikovaného kompostu se zabývali A. Piccolo a R. Spaccini [32]. Výzkum probíhal na experimentálních farmách Turínské (Tetto Frati, TF) a Neapolské univerzity (Torre Lama, TL). Úpravy byly prováděny každoročně na jaře, těsně před orbou, po dobu tří po sobě jdoucích let na polích pro kukuřici. Kompost používaný na obou farmách byl tvořen z 50 % z domácího organického odpadu, ze 40 % ze zbytků kukuřice a zbylých 10 % tvořily zbytky z dřevní hmoty. Kompost byl vytvořen procesem anaerobního kompostování během 30 dnů mezofilní aktivní fáze, po které následovalo 120 dnů vytvrzovací fáze. Po sklizni kukuřice byly odebrány reprezentativní vzorky půdy (5 kg) z každého pozemku, vysušeny na vzduchu a uloženy pro následné analýzy. Byl stanoven celkový obsah organického uhlíku, ze vzorků odebrané půdy pak byly alkalickým způsobem extrahovány huminové kyseliny a podrobeny měření ^{13}C-CPMAS-NMR spekter, ze kterých byly zjištěny další biochemické charakteristiky huminových kyselin, jako je hydrofobní index udávající poměr alkylového a aromatického uhlíku v porovnání s hydrofilním uhlíkem, index aromaticity a poměr ligninu. Po třech letech experimentů s úpravami půdy přídavky kompostu na dvou zemědělských půdách s různým složením bylo zjištěno, že přídavky kompostu a malé zvýšení celkového organického uhlíku v půdě neovlivnilo molekulární charakteristiku huminových kyselin extrahovaných z těchto půd v průběhu experimentálního období.

2.2 Dekompozice organických látek v půdě

Dekompozicí rozumíme rozklad odumřelých rostlinných a živočišných materiálů za přítomnosti půdních organismů. Na dekompozici má vliv celá řada biologických, fyzikálních a fyzikálně-chemických faktorů, jako je složení organické hmoty, vlhkost, teplota či pH. Dekompozice organického materiálu je klíčovým procesem pro uvolňování CO_2 z půdy.

T. R. Moore a spol. [33] studovali ve své práci rozklad organického materiálu ve smrkových lesích východní Kanady pomocí *litter bag* metody, což je běžná a ustálená metoda pro studium dekompozice. Jejím principem je nashromáždění rostlinného materiálu typického pro danou oblast do síťového vaku či pytle a jeho umístění do půdního profilu tam, kde by za normálních podmínek probíhala dekompozice. Tam jsou vaky ponechány po dobu i několika let, následně se měří hmotnostní úbytek materiálu a související fyzikálně-chemické změny jako je obsah uhlíku, dusíku či fosforu. Tato metoda bývá ale často předmětem kritiky, protože jako studovaný materiál slouží ve většině případů pouze jeden druh rostlinného materiálu. Rovněž může docházet k vyloučení půdních mikroorganismů z celého procesu, pokud má vak příliš malou síťku, nebo naopak může docházet k propadnutí částic vzorku, je-li síťka příliš velká. Mimo to se vyskytují i obavy, že ve vacích dochází ke tvorbě vlastního prostředí odlišného od okolní půdy, pokud jde o teplotu a vlhkost. Byl zkoumán průběh rozkladu šesti různých vzorků

(*Picea mariana*, *Cladina stellaris*, *Betula glandulosa* a *Ledum groenlandicum*) a celulózy. Měření probíhalo po dobu 2 let. Hmotnostní úbytky po uplynutí této doby se pohybovaly mezi 10 a 60 %, přičemž k největším úbytkům došlo u listů *B. glandulosa* a *L. groenlandicum*, k nejmenšímu pak u *C. stellaris*. Bylo zjištěno, že v rozkládajících se tkáních dochází ke značnému úbytku vápníku, hořčíku a draslíku, na rozdíl od uhlíku. Všechny vzorky, s výjimkou *B. glandulosa*, vykazovaly rovněž akumulaci dusíku spojenou s vysokými poměry C/N.

J. A. Keuskamp a spol. [34] zavedli unikátní projekt pro globální mapování funkcí půdy. Ve své práci popisují takzvaný tea bag index (TBI), který je schopen poskytovat inovativní, standardizovanou, levnou a dostupnou metodu, jak získat data o stupni rozkladu a stabilizaci organického materiálu v půdě. Jako studovaný materiál byly použity čaje Lipton, zelený a roiboos, v pyramidových syntetických sáčcích, tyto vzorky byly zakopány do půdy do hloubky cca 10 cm a ponechány 90 dní k inkubaci. Poté byly vykopány a analyzovány. TBI se skládá ze dvou parametrů – míry dekompozice k a stabilizace zbytků S. Tyto parametry pro popis dekompozice organických látek se dají univerzálně aplikovat napříč různými ekosystémy. Zelený čaj představuje labilnější, dekompozici snáze podléhající materiál, zatímco čaj rooibos slouží k charakterizaci dekompozice odolnějšího organického materiálu. Vzorky obou typů čaje byly analyzovány a rozděleny na jednotlivé frakce postupnou extrakcí: nepolární extrakty, složky rozpustné ve vodě, složky rozpustné v kyselém prostředí a složky nerozpustné v kyselém prostředí. Dále byl zjištěn celkový obsah dusíku a uhlíku. Výsledky dokazují, že výše zmiňované parametry jsou velmi úzce propojeny s charakterem ekosystému. K úplnému porozumění a pochopení je ovšem potřeba mnohem větší datový soubor z různých oblastí.

Použitím tea bag indexu (TBI) zavedeného Keuskampem se ve své práci zabývali S. Duddigan a spol. [35]. Pro vytvoření časové posloupnosti degradace byly v květináčích prováděny laboratorní inkubace předem zvážených čajových sáčků usušených v sušárně. Květináče byly naplněny 500 g čerstvě proseté půdy. Každý květináč obsahoval tři sáčky zeleného čaje a tři čajové sáčky rooibos, každý ze tří různých výrobních šarží. Květináče byly ponechány ve tmě při teplotě 20° C. Vzorky pak byly odebírány vždy po 7 dnech (celkem bylo odebráno 234 čajových pytlíků). Čajové sáčky byly usušeny v sušárně, přilnavé částice půdy byly jemně odstraněny rukou a sáček byl před vážením rozřezán. Pro zajištění dostatečného množství materiálu pro následné analýzy byl obsah vždy tří odpovídajících vzorků zhomogenizován. Vzorky pak byly podrobeny ^{13}C PMAS NMR a dále byl zjištěn stupeň rozkladu pomocí zvolených poměrů, a to AC/AOC poměr a CC/MC poměr. Oba tyto poměry srovnávají obsah relativně nestálých a snadno degradujících funkčních skupin (O-alkyl uhlíku a uhlíku obsaženého v sacharidech) k obsahu stabilnějších a degradaci odolnějších komponent (alkylový uhlík a methoxylový uhlík ligninu). Výsledky získané touto studií vyzdvihla některá klíčová hlediska vyžadovaná při interpretaci údajů TBI. Použití této metody v systémech s omezeným obsahem dusíku může značným způsobem ovlivnit výsledky, protože rozklad čaje rooibos vyžaduje vnější přísun dusíku. Metoda TBI dále předpokládá, že hydrolyzovatelná frakce je labilní, tudíž podléhá degradaci, a že všechny chemické složky, které nejsou hydrolyzovatelné, jsou vůči degradaci odolné. Data získaná metodou ^{13}C PMAS NMR ukázala, že organické sloučeniny rozpustné ve vodě nebo v kyselém roztoku, jako jsou jednoduché cukry a celulóza, postupně degradují v obou typech čajů. Píky spojené s těmito sloučeninami však

v průběhu inkubace úplně nemizí. Část labilní frakce se v materiálu stabilizuje, navíc v sáčcích mohou přetrvávat hydrolyzovatelné nepolární extrakty, jako jsou tuky a vosky.

Charakterizací rychlosti rozkladu v obnovených rašeliništích pomocí tea bag indexu se ve své práci zabývali E. MacDonald a spol. [36]. Rašeliniště jsou charakteristické svou tendencí akumulovat organickou hmotu kvůli inhibici mikrobiální aktivity v důsledku podmáčeného podloží a z toho vyplívající nízké rychlosti rozkladu organického materiálu. Při narušení rašeliniště ovšem dochází ke změně místních fyzikálně-chemických podmínek, což má za následek úbytek půdní organické hmoty a uvolňování CO_2 z půdy. Obnova rašeliniště může snížit oxidaci rašeliny, problém ovšem představují tradiční měření míry dekompozice, která jsou časově velmi náročná. Z tohoto důvodu zvolili autoři článku jako hlavní metodu TBI. Pro srovnání a zjištění korelace mezi daty získanými pomocí TBI metody bylo měření prováděno současně i klasickou *litter bag* metodou. Rychlost dekompozice byla stanovována na čtyřech obnovených rašeliništích na území Kanady, dvě v provincii Alberta, další v provincii Manitoba a poslední v provincii Quebec. Vybraná rašeliniště byla buď použita pro těžbu samotné rašeliny, nebo došlo k jejich narušení v důsledku těžby ropy. S ohledem na kompletnost práce bylo měření provedeno i na nenarušených místech. Současně byla zaznamenávána teplota a pH půdy včetně hladiny podzemní vody, neboť tyto faktory hrají při dekompozici zásadní roli. Po vyhodnocení získaných dat bylo zjištěno, že výše zmiňované faktory nijak významně nesouvisely s rychlostí dekompozice k, ale korelovaly se stabilizačním faktorem S. Pomocí metody TBI nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v rychlosti rozkladu mezi neobnovenými a obnovenými rašeliništi. Ve všech studovaných lokalitách byly zjištěny významné rozdíly ve velikosti stabilizačního faktoru S. Rychlostní konstanty získané metodou TBI a metodou *litter bag* se lišily, ale konzistentně se měnily napříč oblastmi s různou výškou hladiny podzemní vody. Tyto výsledky naznačují, že výsledky získané pomocí TBI metody nejsou snadno srovnatelné s tradiční *litter bag* metodou a nemusí být dostačující jako individuální metoda k identifikaci úspěšnosti obnovy rašelinišť. Přestože použití metody TBI významně šetří čas a náklady spojené s měřením, pro tuto aplikaci je nutné použít ji ve spojení s dalšími měřeními, než bude možné vyvozovat pevné závěry.

Vliv interakcí mezi trimethoprimem (širokospektrální antibiotikum) a 17α-estradiolem (ednokrinní disruptor) na vodní mikrobiální aktivitu pomocí tea bag indexu studovali ve své práci W. R. Hunter a spol. [37]. Uvolňování komplexní směsi léčiv, včetně antimikrobiálních látek a endokrinních disruptorů, do vodního prostředí představuje velký problém, neboť tyto látky mají potenciál výrazně ovlivnit vodní mikrobiální metabolismus a změnit biogeochemický cyklus uhlíku a živin. Pro samotný experiment bylo připraveno 40 lahviček obsahujících vždy 100 ml 2% agarového gelu. Do 10 lahviček byla přidána dávka obsahující jen 688 $\mu mol \cdot l^{-1}$ trimethoprimu, do dalších 10 lahviček bylo přidáno pouze 688 $\mu mol \cdot l^{-1}$ 17α-estradiolu, a dalších 10 lahviček bylo obohaceno o dávku jak 688 $\mu mol \cdot l^{-1}$ trimethoprimu, tak i 688 $\mu mol \cdot l^{-1}$ 17α-estradiolu. Posledních 10 lahviček neobsahovalo žádná léčiva, pouze čistý agarový gel. Do lahviček byl poté umístěn vždy jeden předem zvážený a vysušený čajový sáček zeleného čaje a jeden sáček čaje Lipton rooibos. Vzorky byly umístěny do půdy a inkubovány po dobu 83 dní. Po uplynutí této doby byly čajové sáčky vyčištěny, vysušeny a byl zjištěn jejich hmotnostní úbytek. Na základě těchto dat byly vypočítány stabilizační faktor S a rychlost

rozkladu labilního organického materiálu *k* dle Keuskampa. Bylo zjištěno, že expozice trimethoprimem a 17α-estradiolem měla významné negativní dopady na rozklad labilního organického materiálu (vzorky zeleného čaje), což naznačuje aditivní účinky na mikrobiální aktivitu. Přídavky těchto látek způsobily stabilizaci labilního organického materiálu proti mikrobiální degradaci a snížily tak i samotnou rychlost degradace. Expozice vzorků samotným 17α-estradiolem zapříčinila snížení rychlosti degradace odolnějšího organického materiálu – vzorky čaje roiboos. Na základě získaných výsledků byla metoda TBI doporučena pro testování dopadů znečišťujících látek na mikrobiální aktivitu.

Posouzení vlivu klimatu a intenzity využití půdy za využití tea bag indexu studovali J. N. Becker a Y. Kuzyakov [38]. Pro experiment bylo zvoleno zastoupení deseti ekosystémů typických pro oblast východní Afriky podél unikátního 3 km dlouhého výškového gradientu na jihozápadním úpatí hory Kilimandžáro v rozmezí 951 až 4190 m n. m. Pro celkové srovnání získaných dat je nejpřínosnější fakt, že půdní typy na hoře Kilimandžáro jsou podobně staré a vytvořené z podobného matečného materiálu. Na každé z 10 zvolených lokalit bylo do hloubky přibližně 8 cm zakopáno devět párů čajových sáčků, vždy sáček zeleného čaje spolu s čajem roiboos. Čajové sáčky byly v půdě inkubovány po dobu 90 dní, poté byly sáčky vykopány, očištěny a důkladně vysušeny v sušárně. Tento postup byl opakován celkem 4× během různých klimatických období. Na základě získaných dat byly stanoveny rychlost dekompozice a stabilizační faktor dle Keuskampa. Výsledky korelují s již získanými daty v obdobných průzkumech. Nejvyšší hodnotu stabilizačního faktoru *S* a současně nejnižší rychlost dekompozice *k* vykazovaly alpinské ekosystémy v nejvyšší nadmořské výšce, což podporuje jeden ze základních předpokladů TBI, a to že *S* silně závisí na environmentálních a klimatických faktorech.

Metodu tea bag index aplikovali ve svém výzkumu také T. Elumeeva a spol. [39], a to při studiu dekompozice a stabilizace organického materiálu ve vysokohorských ekosystémech. Vzhledem k tomu, že horské oblasti vykazují velmi proměnlivé rychlosti rozkladu v důsledku silných rozdílů v podnebí a vegetaci, bylo pro inkubaci vzorků zvoleno celkem 12 rostlinných společenstev charakteristických pro oblast ruského Kavkazu. Experiment byl proveden se vzorky zeleného čaje a čaje roiboos a za účelem přizpůsobení experimentu nízkým rychlostem rozkladu v horských oblastech byly vzorky inkubovány po dobu jednoho roku namísto třech měsíců. Aby mohlo dojít k relevantnímu vyhodnocení výsledků, byl u všech studovaných půd zjištěn obsah vody a určena hodnota pH. Po uplynutí jednoho roku byly zjištěny hmotnostní úbytky jednotlivých vzorků, ze kterých byly následně určeny stabilizační faktor *S* a rychlost rozkladu labilního organického materiálu *k* dle Keuskampa. Jednalo se o první práci, ve které byla zkoumána korelace mezi rychlostí rozkladu a stabilizací organického materiálu ve vysokohorských ekosystémech. Hlavními faktory pro stanovení *S* byly v této studii nadmořská výška, pH půdy a vlhkost. Bylo zjištěno, že na rozdíl od stabilizačního faktoru nebyla rychlost dekompozice nijak významně spojena s pozorovanými vlastnostmi půdy. Celkově byl pak stabilizační faktor v subalpínském pásu nižší než v alpském pásu, přičemž hodnota *S* se snižovala se zároveň se zvyšujícím se pH a vlhkostí půdy. Tato práce dále zdůrazňuje význam výslovného zvážení stabilizačního faktoru při studii dekompozici organického materiálu, aby nedocházelo k nesprávné interpretaci dat. V alpském

pásu ukazuje poměrně vysoká míra stabilizace materiálu význam stabilizace pro sekvestraci uhlíku v alpských půdách.

Kinetiku rozkladu organické hmoty půdními enzymy studovali ve své práci B. Wang a S. D. Allison [40]. Vliv půdních enzymů na rozklad organické hmoty je poměrně nové téma, které začalo být rozebíráno až od 90. let 20. stol. Na popis kinetiky degradace organické hmoty v půdě enzymy byl prvotně aplikován vztah Michaelies-Mentenové, ovšem brzy vyšly najevo nedostatky této teorie. Autoři článku proto použili prostorově explicitní rámec mikrobiálního modelování. Jako substrát pro degradaci byla použita celulóza, přičemž ve vybraných dnech byly v prostorové mřížce analyzovány koncentrace enzymu a substrátu. Výsledky těchto modelových analýz objasnily nejistoty obklopující kinetiku enzymatické degradace organických látek v půdě, ovšem je důležité si uvědomit, že tyto formulace nedokážou zachytit celý rozsah závislostí rychlosti rozkladu na koncentraci substrátu a enzymu. Tato nekonzistence vyplývá z heterogenity půdního systému v prostoru a čase, kterou nelze zachytit a zapsat pomocí jediné přímé či zpětné rovnice.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- katex pryskyřice Amberlite 120 IR H^+ form, výrobce Sigma Aldrich;
- hydrofobní pryskyřice DAX-8, výrobce Sigma Aldrich;
- ultra-čistá voda PURELAB Flex, výrobce Purelab®;
- chlorid draselný p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- dihydrogenfosforečnan sodný p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- hydrogenfosforečnan sodný p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- Folin-Ciocaulteovo činidlo;
- 0,1M HCl, 0,1M NaOH – Normanal Lach-Ner s.r.o., Neratovice;
- methanol p.a., výrobce Sigmal Aldrich

3.2 Použité přístroje

- skleněná kolona malá pro XAD-8 (l ~ 250 mm, d ~ 40 mm);
- skleněná kolona velká pro Amberlite IR 120 (l ~ 600 mm, d ~ 50 mm);
- membránový filtr MCE 0,45 μm, výrobce ChemLand;
- skleněná aparatura na ultrafiltraci;
- rotační odparka;
- pH a konduktometr Mettler Toledo;
- lyofilizátor Vir-Tis;
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments;
- elementární analýza – Euro Vector EA3000;
- Hitachi U3900H – UV/Vis spektrometr;
- Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc – FTIR spektrometr

3.3 Příprava vzorků čaje Lipton

Bylo připraveno celkem 36 pytlíků se zeleným čajem Lipton. Pytlíky byly důkladně označeny a ponechány po dobu 8 hodin v sušárně. Po vychladnutí byly zváženy na analytických vahách a jejich hmotnosti byly zaznamenány. Takto připravené vzorky byly poté v říjnu 2019 zakopány cca 15 cm pod úroveň povrchu. Časové intervaly odběrů vzorků včetně jejich hmotností po vysušení zobrazuje Tabulka 5.

Tabulka 5 - Hmotnosti vysušených čajových pytlíků Lipton a jejich rozdělení do skupin dle časových intervalů odběru

1 týden	m (g)	2 týdny	m (g)	3 týdny	m (g)	4 týdny	m (g)
1	1,961	**5**	2,027	**9**	2,092	**13**	2,061
2	2,097	**6**	1,975	**10**	1,959	**14**	1,947
3	1,904	**7**	2,068	**11**	1,897	**15**	1,975
4	2,009	**8**	2,057	**12**	2,051	**16**	2,063

2 měsíce	m (g)	3 měsíce	m (g)	6 měsíců	m (g)	1 rok	m (g)
17	2,062	**21**	2,091	**25**	1,977	**29**	2,023
18	2,146	**22**	2,014	**26**	2,013	**30**	2,076
19	2,024	**23**	2,025	**27**	2,069	**31**	2,058
20	2,068	**24**	1,931	**28**	2,015	**32**	2,048

Po uplynutí příslušné doby inkubace a vykopání vzorků byly čajové pytlíky důkladně očištěny od zbytků půdy a kořínků rostlin a byly ponechány v sušárně po dobu 8 hodin. Po vychladnutí byly vzorky opět zváženy a jejich hmotnosti zaznamenány. Obsah čajových pytlíčků byl poté uschován pro pozdější fyzikálně-chemickou charakterizaci.

Je důležité zmínit, že došlo ke ztrátě vzorků s dobou odběru po třech měsících a po jednom roce. Experiment se vzorky inkubovanými po dobu třech měsíců byl zopakován, ovšem probíhal za jiných klimatických podmínek než zbylé vzorky.

3.4 Fyzikálně-chemická charakterizace organického materiálu čaje

Pro získání základních informací o složení inkubovaných vzorků, a především o změnách v kompozici organického materiálu čaje byly zvoleny metody elementární analýza (EA), termogravimetrie (TG) a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Dále byl spektrofotometricky stanovován i celkový obsah vodou extrahovatelných polyfenolů, a to pomocí kalibrační křivky kyseliny gallové za použití Folin-Ciocalteuova činidla.

3.4.1 Elementární analýza

Elementární složení organického materiálu čaje bylo stanoveno pomocí elementárního analyzátoru EA3000. Ke kalibraci přístroje byla použita standardní látka 4-aminobenzensulfonamid. Navážené vzorky byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru 980° C. Pomocí vyhodnocovacího programu Callidus, verze 5.1 bylo zjištěno celkové elementární složení vzorků, které bylo poté přepočítáno na atomová procenta.

3.4.2 Termogravimetrická analýza

Byly naváženy vzorky o hmotnosti ~ 7–20 mg, které byly spáleny z počáteční laboratorní teploty na konečnou teplotu 700° C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min^{-1} a s rychlostí ohřevu pece 10° C·min^{-1}. Pomocí získaných dat byl stanoven nespalitelný podíl všech vzorků (obsah popela) a byla zjištěna celková vlhkost vzorků. Pro měření v inertní atmosféře byly naváženy vzorky o hmotnosti ~ 7–20 mg, které byly spáleny z počáteční laboratorní teploty na konečnou teplotu 700° C v atmosféře dusíku s průtokem 50 ml·min^{-1} a s rychlostí ohřevu pece 10° C·min^{-1}.

3.4.3 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervená spektrometrie byla v této práci zvolena za účelem sledování obsahu jednotlivých funkčních skupin a za účelem charakterizace změn v zastoupení jednotlivých funkčních skupin po inkubaci vzorků v půdě. Všechna infračervená spektra byla změřena v rozmezí vlnočtů 4000–400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} a s celkovým počtem akumulovaných skenů 128 na infračerveném spektrometru Nicolet iS50.

3.4.4 Stanovení celkového množství polyfenolů pomocí Foulin-Ciocaulteova činidla

Celkové množství polyfenolických látek bylo stanoveno za použití molekulové absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření (UV/Vis). Nejprve byla připravena kalibrační křivka kyseliny gallové. Z připraveného zásobního roztoku kys. gallové bylo odpipetováno požadované množství viz. Tabulka 6, poté byl zbytek odměrné baňky doplněn po

rysku deionizovanou vodou. Do vialky bylo odpipetováno v následujícím pořadí 1 cm^3 Folin-Ciocalteuova činidla, 1 cm^3 de-onizované vody, 50 μl standardu kys. gallové a 1 cm^3 nasyceného roztoku Na_2CO_3. Požadované množství bylo převedeno do křemenné kyvety a na spektrometru bylo po uplynutí 2 hodin změřeno UV/Vis spektrum vzorku v rozsahu vlnových délek 600–900 nm.

Na analytických váhách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 100 mg vzorku. Navážka byla poté zalita 10 cm^3 vroucí deionizované vody a vzorky pak byly ponechány po dobu 24 hodin na třepačce. Po uplynutí této doby byly vzorky přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 45 μm. Následně bylo do vialky odpipetováno 1 cm^3 Folin-Ciocalteuova činidla, 1 cm^3 deionizované vody, 50 μl přefiltrovaného vzorku a na závěr 1 cm^3 nasyceného roztoku Na_2CO_3. Takto připravený vzorek byl převeden do křemenné kyvety a po uplynutí 2 hodin bylo opět změřeno UV/Vis spektrum vzorku v rozsahu 600–900 nm.

Tabulka 6 – Kalibrační řada kyseliny gallové

c ($mg \cdot dm^{-3}$)	$V_{kys.\ gallové}$ (cm^3)
50	1,25
100	2,50
200	5,00
250	6,25
300	7,50
400	10,00
500	12,50

3.5 Izolace huminových látek z půdního vzorku

S ohledem na kompletnost práce a možnost posouzení zvolené metody byl studován rovněž vzorek půdy, ve které probíhala inkubace čajových sáčků. Na základě provedených literárních rešerší bylo totiž zjištěno, že zásadním faktorem při studiu dekompozice je obsah dusíku v prostředí, kde dochází k dekompozici. Mimo to bylo cílem zohlednit také charakter a vlastnosti HL vyskytujících se v inkubačním prostředí vzorků. Z pevného vzorku půdy bylo nejprve nutné připravit pomocí alkalické extrakce výluh HL, ve kterém jsou obsaženy směs HK, FK a snadno hydrolyzujících organických kyselin. Do PE nádoby bylo naváženo 150,48 g vzorku půdy. K navážce půdy bylo poté přidáno 1000 ml extrakčního činidla (0,1 M roztok NaOH). Takto připravená suspenze byla ponechána na rotační třepačce přes noc při rychlosti 10 $ot. \cdot min^{-1}$. Pevný podíl byl od supernatantu odstraněn odstředěním při 2700 × g po dobu 20 minut. Aby došlo k odstranění případného zbytku půdy z roztoku HL, byl supernatant filtrován přes papírový filtr za sníženého tlaku.

3.5.1 Separace HK

Alkalický roztok HL byl okyselen přídavkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové o koncentraci ~ 35 % obj. Celkový přídavek kyseliny chlorovodíkové byl zvolen na základě hodnoty pH roztoku, kdy výsledná hodnota pH byla < 2. Ke koagulaci HK docházelo přes noc, tedy přibližně po dobu 18 hod. Po uplynutí této doby byly HK z roztoku odstraněny centrifugací při 2700 × g po dobu 30 minut. Roztok nad vysráženými HK byl uchován pro následnou izolaci

FK (1). Vysrážené HK byly znovu rozpuštěny přídavkem 100 ml 0,1 M roztoku hydroxidu draselného. Poté bylo k roztoku přidáno 2,2 g chloridu draselného. Takto vzniklý roztok HK byl odstředěn při 2700 × g po dobu 30 minut. Z hlediska purifikačních procedur je tento krok velmi důležitý, protože dochází k uvolnění nerozpustných frakcí, a to zejména HU, z makromolekulárního klubka HK. Po odstranění nerozpustné frakce byl roztok HK okyselen přídavkem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH < 2. Jako v předešlém případě ke koagulaci HK docházelo přes noc, opět po dobu přibližně 18 hod. Po uplynutí této doby byly HK z roztoku odstraněny centrifugací při 2700 × g po dobu 30 minut. Roztok nad vysráženými HK byl uchován pro následnou izolaci FK (2). K vysráženým HK bylo přidáno 500 ml směsi roztoku 0,1 M HCl a 0,3 M HF. Takto připravená suspenze byla ponechána na třepačce po dobu 7 dnů. Díky použití tohoto purifikačního kroku jsou z vysrážených HK odstraněny především sorbované křemičitany, případně některé sloučeniny minerálních sloučenin (např. kaulinit a montmorillonit). Po uplynutí této doby byly HK odděleny od supernatantu centrifugací při 2700 × g po dobu 30 minut. Poté byly HK převedeny do dialyzační membrány o velikosti pórů 1000 Da. Dialýza probíhala po dobu pěti dnů proti ultračisté vodě. Následně byly HK vymraženy na rotační odparce v lyofilizačních baňkách a lyofilizovány na laboratorním lyofilizátoru do úplného vysušení. HK byly získány ve formě tmavě hnědého jemného prášku.

3.5.2 Separace FK

Vzhledem k faktu, že FK jsou rozpustné jak v alkalických, tak i kyselých roztocích a také tomu, že roztoky pro izolaci FK obsahovaly i jinou nežádoucí rozpustnou organickou hmotu, tj. snadno hydrolyzující organické kyseliny, bylo nutné využít k jejich separaci a zisku opravdu čistého vzorku selektivní adsorpci na hydrofobní pryskyřici DAX-8.

Příprava pryskyřice DAX-8

Požadované množství pryskyřice, které je dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky a zalito takovým množstvím methanolu, aby jeho hladina nad vrstvou pryskyřice byla alespoň 2 cm vysoká. Suspenze pryskyřice byla ponechána na magnetické míchačce při 350 ot.·min^{-1} po dobu 15 min. Methanol byl slit. Pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Voda sahala cca 2 cm nad pryskyřici, aby nedošlo k vysychání či mikrobiální degradaci pryskyřice.

Adsorpce FK na pryskyřici DAX-8

Před samotnou separací FK na chromatografické koloně bylo nutné získaný roztok FK podrobit ultrafiltraci na filtru o velikosti pórů 0,45 nm, aby došlo k odstranění případných nežádoucích pevných částic, především koagulovaných zbytků huminových kyselin z roztoku. Veškerý vzorek FK byl nadávkován jednou na kolonu. Po nadávkování veškerého obsahu FK byla chromatografická kolona promývána vodou, dokud hodnota absorbance vody na výstupu z kolony nedosáhla při vlnové délce 350 nm hodnoty A < 0,015. Tímto způsobem byla z kolony eluována rozpuštěná organická hmota (DOM), jejíž převážná část je tvořena snadno hydrolyzujícími organickými kyselinami. Desorpce FK z pryskyřice byla provedena pomocí roztoku 0,1 M NaOH, a to do té doby, dokud hodnota absorbance desorpčního roztoku na výstupu z kolony nedosáhla při vlnové délce 350 nm hodnoty A < 0,03.

Regenerace pryskyřice DAX-8

Po nadávkování a vymytí příslušného vzorku FK bylo nutné pryskyřici připravit na nové použití. Toho bylo docíleno pomocí promývání pryskyřice roztokem 0,1 M HCl. Promývání probíhalo tak dlouho, dokud hodnota pH roztoku vytékajícího z kolony nebyla shodná s pH roztoku na vstupu do kolony. Následně byla kolona promývána vodou, a to opět tak dlouho, dokud hodnota pH vody na výstupu do kolony nebyla stejná jako na vstupu z kolony.

Příprava katexu Amberlite IR 120

Požadované množství pryskyřice, které je dáno rozměry skleněné kolony, bylo převedeno do kádinky a zalito takovým množstvím methanolu, aby jeho hladina nad vrstvou pryskyřice byla alespoň 2 cm vysoká. Suspenze pryskyřice byla ponechána na magnetické míchačce při 350 ot.·min^{-1} o dobu 15 min. Methanol byl následně slit. Pryskyřice byla promyta destilovanou vodou. Voda sahala cca 2 cm nad pryskyřici, aby nemohlo dojít k vysychání pryskyřice.

Zpětná protonace FK na pryskyřici Amberlite

Protože v důsledku promývání z pryskyřice DAX-8 byly získány FK ve formě sodných solí, bylo nutné FK zpět naprotonovat. Z alkalického roztoku fulvokyselin byly kationty Na^+ odstraněny pomocí katexu Amberlite IR 120 výměnou za H^+ ionty. Roztok fulvinových kyselin byl opakovaně proléván kolonou, dokud hodnota elektrické vodivosti vytékajícího roztoku neklesla pod hodnotu 120 μS·cm^{-1}. Následně byla kolona promývána vodou do té doby, dokud hodnota absorbance vody na výstupu z kolony neklesla při vlnové délce 350 nm pod hodnotu $A < 0{,}015$.

Regenerace pryskyřice Amberlite

Obdobně jako u pryskyřice DAX bylo nutné zregenerovat i pryskyřici Amberlite, aby byla připravena na opětovné použití. Ke zpětné protonaci pryskyřice a vymytí nasorbovaných Na^+ iontů byla využita 0,1 M HCl. Kolona byla promyta celkovým objemem 1000 ml 0,1 M HCl. Následně byla promývána takovým množstvím destilované vody, aby se hodnota pH vody vytékající z kolony pohybovala kolem hodnoty 7. Poté byla kolona připravena pro další použití. Pokud se bezprostředně po regeneraci nepokračovalo v izolaci FK, bylo nutné kolonu konzervovat. Protože pryskyřice nesměla vyschnout, bylo do kolony dolito takové množství destilované vody, aby její hladina neklesla pod vrstvu pryskyřice. Vstup do kolony pak byl zakryt parafilmem.

Zakoncentrování získaných fulvinových kyselin

Získaný roztok FK byl zakoncentrován pomocí rotační vakuové odparky. Za použití lyofilizátoru Vir-Tis byl vzorek vymražených FK vysušen. Tímto postupem byly získány pevné vzorky fulvinových kyselin ve formě světle hnědého prášku.

3.5.3 Fyzikálně-chemická charakterizace izolovaných HL

K zisku základních fyzikálně-chemických charakteristik HL izolovaných z půdy byly zvoleny termogravimetrická analýza, elementární analýza, molekulová absorpční spektrometrie

v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací.

Elementární analýza

Elementární složení vzorku půdy a HL izolovaných z ní izolovaných bylo zjištěno pomocí elementárního analyzátoru EA3000. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfonamidu. Navážené vzorky HL byly spáleny v kyslíkové atmosféře při pracovní teplotě reaktoru 980° C. Elementární složení izolovaných HL bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu Callidus, verze 5.1. Získané elementární složení HL bylo přepočteno na atomová procenta (at. %).

TGA a stanovení obsahu HK a FK ve vzorku půdy

Vzorek půdy i HL z ní izolované byly v této diplomové práci termogravimetricky analyzovány na analyzátoru TGA Q5000, TA Instruments. Vzorky půdy a HL o navážce ~ 7–20 mg byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu 800° C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 $ml \cdot min^{-1}$ a s rychlostí ohřevu pece 10° $C \cdot min^{-1}$. Získaná data byla následně použita ke stanovení obsahu nespalitelného podílu (tj. popela) a celkové vlhkosti.

UV-Vis spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) byla v této diplomové práci vybrána k fyzikálně-chemické charakterizaci z půdy izolovaných HL. Za tímto účelem byly vybrány následující absorpční koeficienty: E_4/E_6, E_2/E_4 a E_{ET}/E_{Bz}, které jsou zpravidla definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Pro získání dat k určení absorpčního koeficientu E_4/E_6 a E_2/E_4 byly připraveny roztoky HL o koncentraci 10 a 50 $mg \cdot dm^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru o hodnotě pH 7,05 (směs $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ v poměru 0,61:0,39). Za účelem studia HL pomocí absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} byly připraveny soly těchto *bio*koloidních látek o koncentraci 10 $mg \cdot dm^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru při hodnotě pH 7,10.

Takto připravené roztoky HL byly změřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v rozmezí vlnových délek 200–900 nm v křemenné kyvetě SUPRASIL® s optickou dráhou 1 cm.

FT-IR spektrometrie

K zisku informací o zastoupení jednotlivých funkčních skupin v izolovaných HL a ve vzorku půdy byla zvolena infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, a to konkrétně metoda difuzního odrazu, v odborné literatuře označovaná jako DRIFT. Důvodem, proč byla zvolena DRIFT metoda místo klasické lisované KBr tablety je to, že v KBr tabletě může docházet k dekarboxylaci, případně i deprotonizaci kyselých funkčních skupin vyskytujících se v HL. Studované vzorky HL a vzorek půdy byly k měření připraveny následujícím postupem: bylo naváženo vždy 200 mg vyžíhaného KBr, toto množství pak bylo důkladně rozetřeno v achátové třecí misce. K takto připravenému množství KBr bylo přidáno 1–2 mg vzorku, následně byla tato směs důkladně zhomogenizována. Připravený vzorek byl vložen do nástavce difuzně-reflexní jednotky. Poloha vzorkovací pánvičky v DRIFT cele byla poté upravena tak,

aby bylo optimalizováno infračervené záření dopadající na detektor FTIR spektrometru. DRIFT FTIR spektra byla naměřena na FTIR spektrometru Nicolet iS50 vybaveném nástavcem Nicolet difuzní jednotky, model 0002-395, v rozmezí vlnočtů 4000–400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} a s celkovým počtem akumulovaných skenů 512.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Izolace a charakterizace půdních HL

Vypočtený obsah extrahovaných HL ze vzorku půdy (přepočtený na sušinu), ve které probíhala veškerá inkubace vzorků zeleného čaje, zobrazuje Tabulka 7.

Tabulka 7 – Obsah huminových látek ve studovaném vzorku půdy přepočtený na sušinu

HK (hm. %)	FK (hm. %)	HU (hm. %)	HL (hm. %)
0,58	0,10	0,46	1,13

Ve studovaném půdním vzorku bylo přítomno celkem 1,13 hm. % HL, z toho majoritní část byla tvořena huminovými kyselinami a huminem, zatímco fulvinové kyseliny byly zastoupeny pouze v minoritním množství. Tyto hodnoty odpovídají výsledkům izolací HL z terestriálních matric.

4.1.1 TG a elementární analýza

Veškeré izolované HL byly podrobeny za účelem získání kompletních informací o inkubačním prostředí vzorků základní fyzikálně-chemické charakterizaci za využití elementární a termogravimetrické analýzy. Výsledky elementárního složení spolu s výstupem z termogravimetrické analýzy, která určuje obsah nespalitelného podílu (tj. popel) a sorbované vlhkosti, jsou uvedeny v Tabulka 8.

Tabulka 8 – Elementární složení izolovaných HL v at. %, atomové poměry H/C a O/C, obsah popela a celkové vlhkosti

Vzorek	Elementární složení v at.%					H/C	O/C	popel (hm. %)	vlhkost (hm. %)
	C	H	N	O	S				
Půda	14,25	78,40	1,18	6,18	0	–	–	93,08	1,50
HU	26,71	67,94	2,72	2,64	0	–	–	77,98	5,05
HK	34,28	51,23	2,94	11,56	0	1,49	0,34	1,10	6,20
FK	31,08	49,60	2,41	16,91	0	1,60	0,54	5,80	9,30

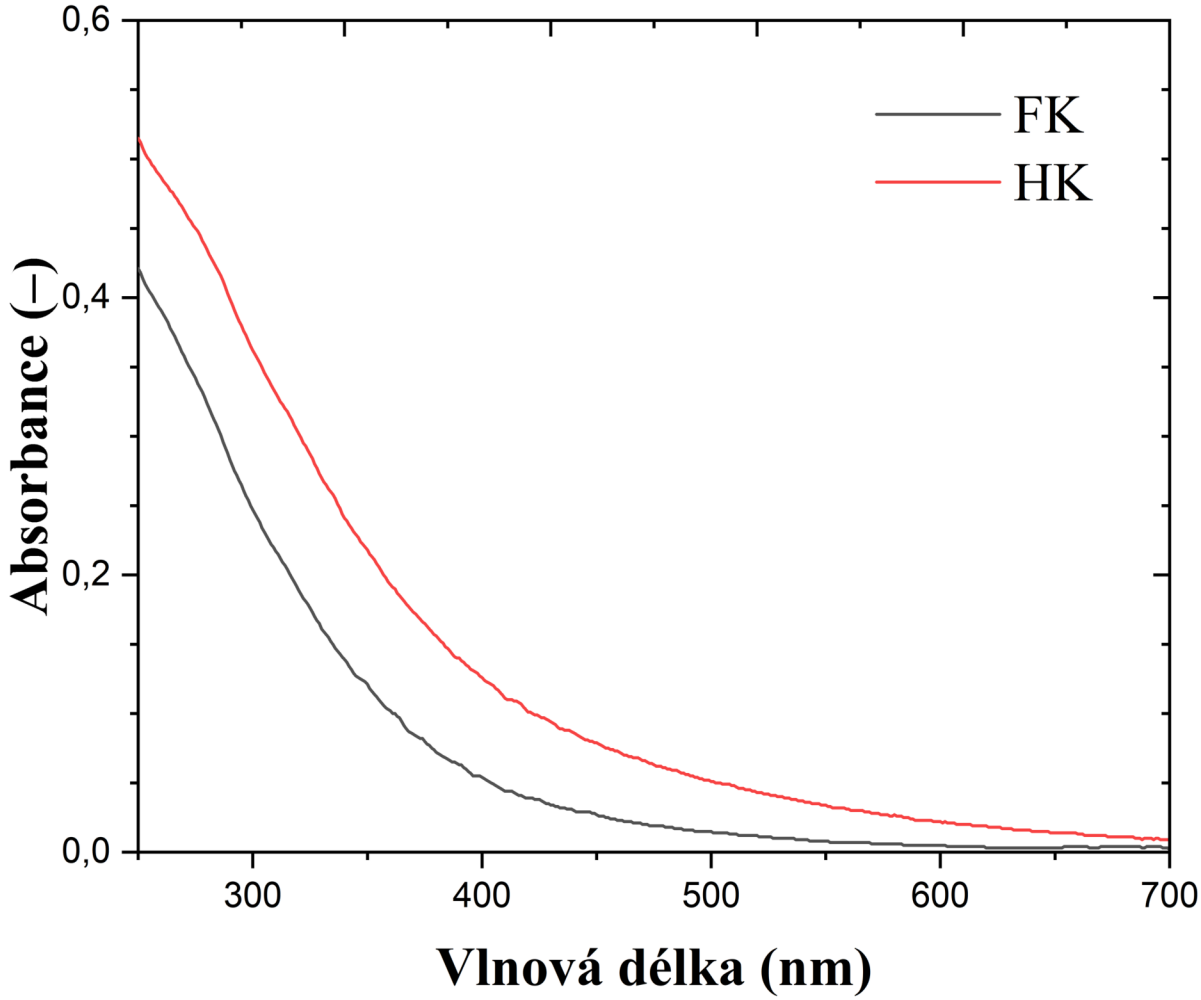
Na úvod je důležité podotknout, že pro elementární analýzu všech vzorků byla v této diplomové práci použita GC kolona, která umožňuje stanovení obsahu síry až od koncentrací vyšších než 0,5 hm. %. Výsledky jsou pak uvedeny v jednotkách at. %, protože při použití hm. % by docházelo k silnému podhodnocení celkového obsahu vodíku. Na první pohled je patrné, že jak vzorek půdy, tak vzorek izolovaného HU se vyznačují vysokým obsahem popela a z toho vyplývajícím vysokým obsahem anorganických příměsí a velmi silnou mineralizací. To je sotva překvapivé, když vezmeme v úvahu složení půdy a fakt, že HU je charakterizován jako organická hmota pevně vázaná na minerální podíl půdy, kterou není možné izolovat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi. Naopak vzorky izolovaných HK a FK se vyznačují vysokou čistotou, zejména pak vzorek HK, a to především díky poslednímu purifikačnímu kroku – přečištění pomocí směsi HCl a HF. Tento krok byl ovšem proveden pouze u vzorku

HK, z toho důvodu se vzorek FK oproti HK vyznačuje větším množstvím popela. Výsledky elementární analýzy ukazují, že vzorek HK je tvořen vyšším obsahem uhlíku a vodíku a obsahuje rovněž vyšší množství dusíku než vzorek FK. Naproti tomu je FK izolovaná z půdního vzorku bohatší na obsah kyslíku, což svědčí o přítomnosti kyselých funkčních skupin a potvrzuje kyselejší charakter FK. Tyto výsledky jsou v dobrém souladu s naměřenými FT-IR spektry izolovaných HL, kdy v případě HK byly ve spektru identifikovány ve větší míře absorpční pásy odpovídající aromatickým strukturám, zatímco FT-IR spektru FK jednoznačně dominovaly píky kyselých funkčních skupin, kam zpravidla řadíme karboxylové a –OH fenolické funkční skupiny.

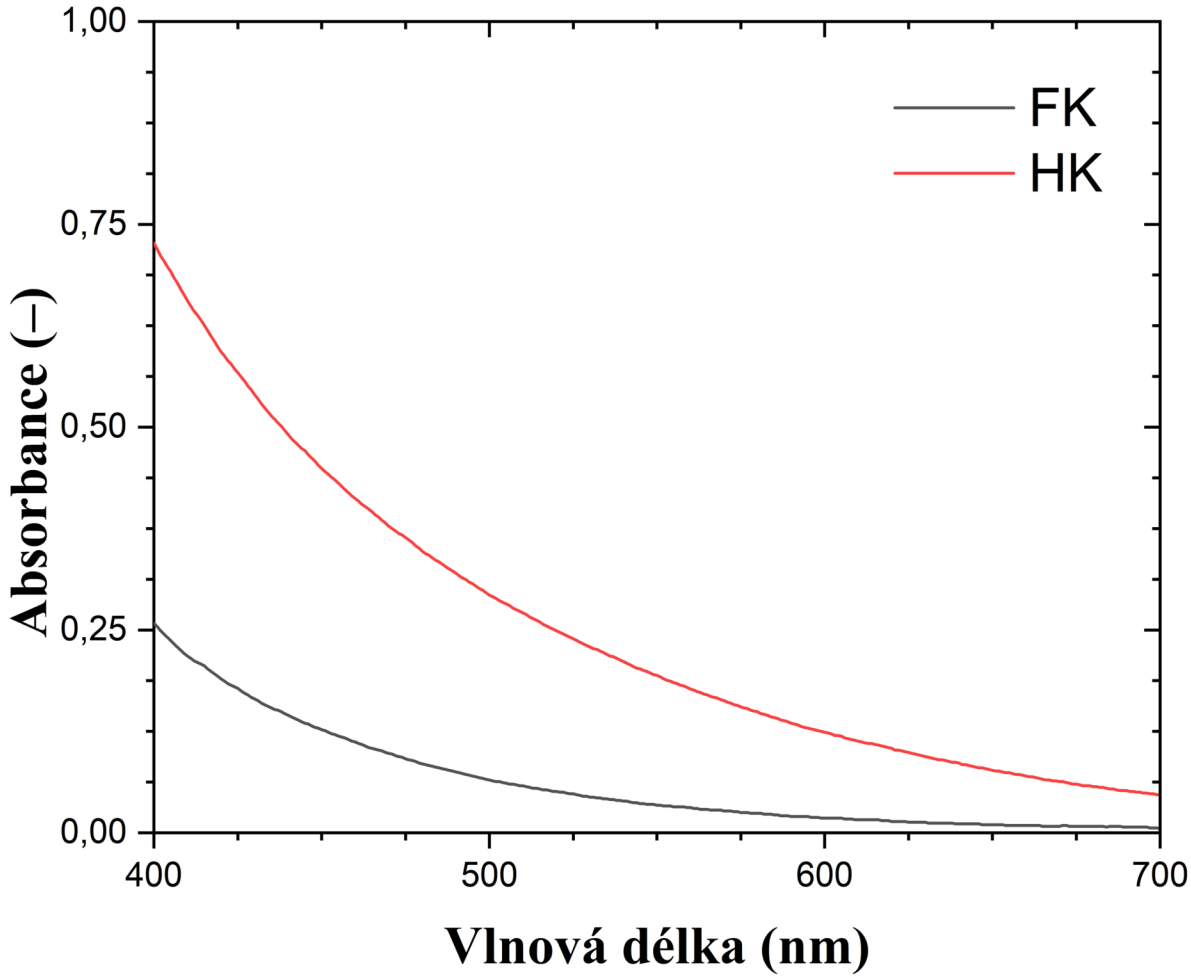
Ze zjištěného elementárního složení jednotlivých vzorků byly vypočteny atomové poměry H/C a O/C, které slouží k bližší specifikaci základních fyzikálně-chemických vlastností HL, jako je stupeň aromaticity či míra hydrogenace [12]. V širším pohledu na výsledky prezentované v Tabulka 8 můžeme říct, že vzorek izolovaných HK se oproti FK vyznačoval nižšími hodnotami poměru H/C, což svědčí o vyšší míře aromaticity studovaných HK. Rovněž hodnota poměru O/C byla stanovena nižší pro vzorek HK. Jinými slovy, vyšší hodnota poměru O/C v případě FK značí, že je tento vzorek tvořen vyšším obsahem kyslík obsahujících funkčních skupina, a také s ohledem na vyšší atomový poměr H/C lze usuzovat na nižší stupeň aromaticity či vyšší míru substituce Ar jednotek alifatickými funkčními skupinami jako jsou aryl-estery a ethery. Všechny výše uvedené výsledky jsou v dobré shodě s daty a závěry získanými pomocí UV-Vis a FT-IR spektroskopie.

4.1.2 Molekulová absorpční spektroskopie v UV-Vis oblasti

Absorpce HL probíhá zejména v oblasti vlnových délek v rozmezí 200–800 nm. Jak je patrné, naměřená spektra vzorků HL vykazovala pro tyto látky charakteristický kvaziexponenciální průběh (viz Obrázek 8 a Obrázek 9).



Obrázek 8 - UV-Vis spektrum HK a FK, koncentrace 10 mg·dm^{-3}



Obrázek 9 – UV-Vis spektrum vzorku HK a FK, koncentrace 50 mg·dm^{-3}

Ze získaných UV-Vis spekter izolovaných HL byly vypočteny absorpční koeficienty, které jsou zobrazeny v Tabulka 9. Jak již bylo zmíněno, v této diplomové práci byly k charakterizaci izolovaných HL zvoleny absorpční koeficienty E_4/E_6, E_2/E_4 a E_{ET}/E_{Bz}. Z výsledků sumarizovaných v Tabulka 9 je zjevné, že studované vzorky vykazují hodnoty absorpčních koeficientů typické pro HL izolované z terestriálních matric. Přestože jsou UV-Vis spektra některými autory považována za nic neříkající a nevypovídající žádné podstatné informace, řadou studií bylo prokázáno, že adekvátní analýzou těchto spekter je možné vyčíst zajímavé poznatky o struktuře zkoumaných HL, které pak mohou doplnit a pomoci lépe interpretovat výsledky získané pomocí jiných analytických technik. Obecně platí, že chromofory přítomné v HL, jenž jsou odpovědné za absorpci v UV oblasti, jsou v podstatě různě substituované aromatické kruhy. V UV oblasti spektra HL lze rozlišit tři různé oblasti absorpce. První pásmo označované jako pásmo místní excitace (LE) leží v oblasti vlnových délek menších než 190 nm, druhá oblast leží v rozmezí 190–240 nm a bývá nazývaná jako benzenoidové pásmo (BZ) a třetí oblast, tzv. pásmo elektronového přenosu (ET), odpovídá absorpci při vlnových délkách vyšších než 240 nm. Platí, že intenzita a rozmístění těchto pásů je z velké míry ovlivněno stupněm substituce na aromatickém kruhu, přičemž čím intenzivnější je substituce, tím více je možné pozorovat i významné zvýšení absorpce v oblasti vyšších vlnových délek tzn. v našem

případě pro absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} s jedná o pás přenosu elektronů. Nízké absorpční poměry E_{ET}/E_{BZ} tedy bývají spojovány s omezenou mírou substituce aromatických kruhů kyslík obsahujícími finkčními skupinami, jako jsou zejména –COOH a –OH nebo se majoritní substitucí alifatickými funkčními skupinami, zatímco vyšší poměr E_{ET}/E_{BZ} bude značit substituci funkčními skupinami obsahujícími kyslík – tj. hydroxyl, karbonyl, karboxyl a esterové skupiny. Izolované HK i FK však vykazují téměř totožnou hodnotu koeficientu E_{ET}/E_{BZ}, což může vypovídat právě o obsazení aromatických kruhů především alifatickými substituenty či stejno mírou substituce Ar jednotek reaktivními skupinami kyselé povahy. I když by se mohlo na první pohled zdát, že tato skutečnost je v rozporu s předpokladem, že FK jsou tvořeny fragmenty substituovanými polárnějšími funkčními skupinami než HK, mimo to tyto výsledky zcela nekorelují s daty získanými pomocí FTIR spektroskopie, kdy ve spektru FK byly identifikovány výrazné a ostré píky odpovídající právě karboxylovým či OH– fenolickým skupinám. Je tedy zřejmé, že v FTIR spektru FK je absorpční pás odpovídající karboxylovým skupinám vázán nejen na aromatické strukturní jednotky, ale jsou v jeho přítomnosti zohledněny i stavební jednotky alifatického charakteru, jako jsou lehce hydrolyzovatelné alifatické organické kyseliny, které jsou pro absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} inaktivní. Dále byly vypočítány absorpční koeficienty E_2/E_4 a E_4/E_6, které bývají často označovány jako tzv. humifikační index. Dlouho dobu byl přijímán všeobecný názor, že tyto koeficienty odpovídají stupni kondenzace a přímo souvisí s obsahem uhlíku a molekulovou hmotností HL, přesto je však v literatuře dohledatelné jen velmi malé množství experimentálních důkazů potvrzujících tyto hypotézy. Schnitzer (1977) a spol. poté prokázali, že koeficienty E_2/E_4 a E_4/E_6 korelují s obsahem volných radikálů a závisí především na velikosti částic, čímž jsou ovšem také silně závislé na hodnotě pH – udává se, že pro zisk relevantních informací je nutné měřit v oblasti pH 7–8. Mimo to bylo také prokázáno, že tyto koeficienty přímo nesouvisí se stupněm kondenzace aromatických jader, spíše však se střední molekulovou hmotností [42][43].

Tabulka 9 - Vypočtené absorpční koeficienty

Vzorek	Absorpční koeficienty		
	E_4/E_6	E_2/E_4	E_{ET}/E_{BZ}
HK	6,0	6,9	0,7
FK	13,0	17,1	0,7

Hodnoty získaných absorpčních koeficientů E_2/E_4 a E_4/E_6 byly v obou případech vyšší pro vzorek izolovaných FK, z čehož můžeme usuzovat, že FK jsou tvořeny fragmenty o nižší molekulové hmotnosti, jako jsou jednodušší aromatické organické kyseliny, které jsou substituovány kyselými, ale i alifatickými funkčními skupinami, například aryl estery a ethery, což je v souladu s obecně přijímanou definicí FK. Celkově pak můžeme na základě předložených výsledků tvrdit, že izolovaný vzorek HK je oproti FK charakterizován vyšší střední molekulovou hmotností a rovněž také vyšším stupněm aromaticity [44].

4.1.3 FTIR spektroskopie

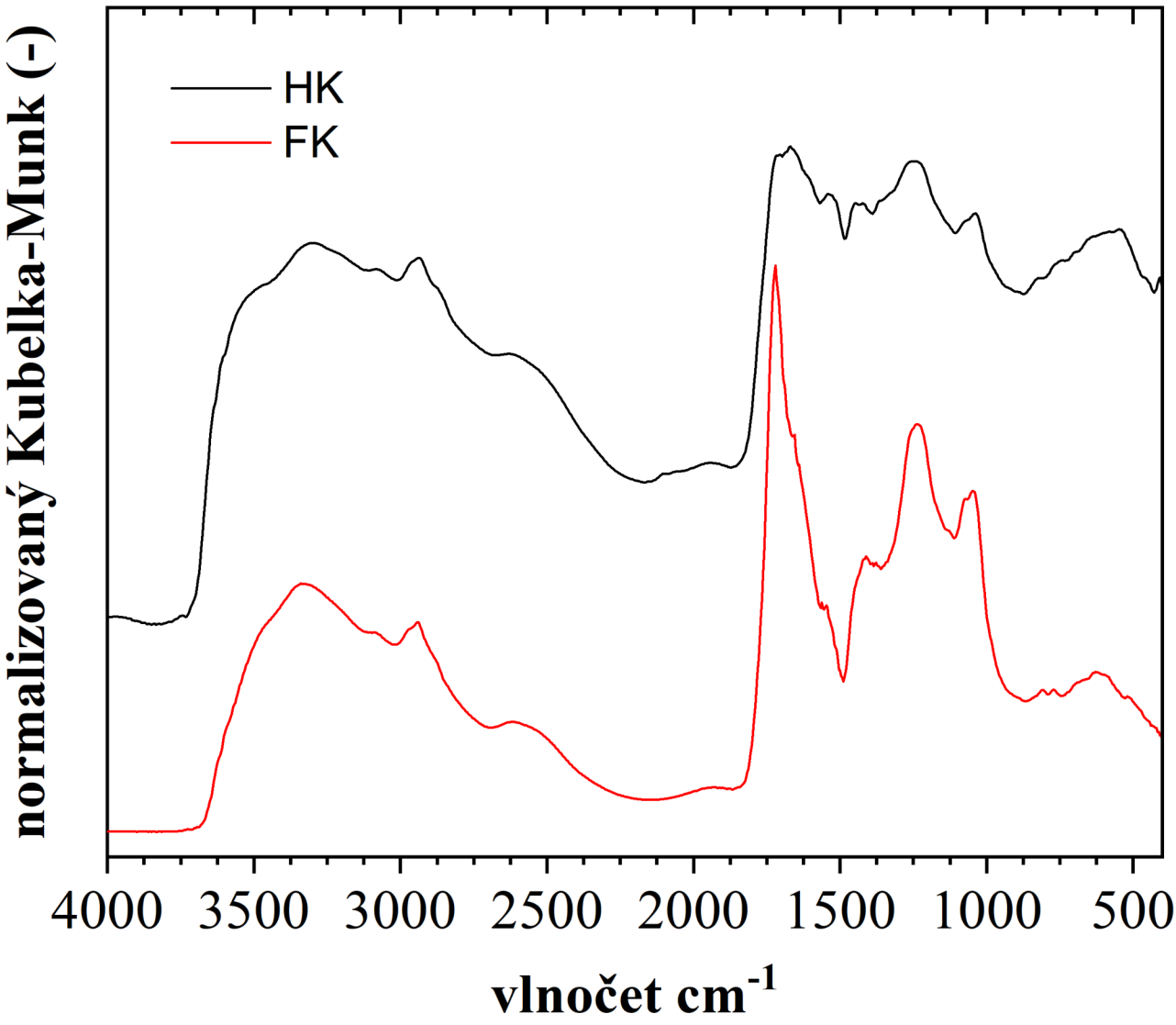
Naměřená difuzně-reflexní FTIR spektra jsou zobrazena na Obrázek 10 a Obrázek 11. Spektra byla interpretována a popsána za použití odborné literatury [41-50], pokud není uvedeno jinak.

V rozmezí 3650–3100 cm^{-1} je možné ve spektru vzorku HK a FK pozorovat poměrně široký absorpční pás. Ten bývá v odborné literatuře přisuzován valenční symetrické vibraci O–H vazby, a to jak ve fenolických, tak i alkoholových a amidových funkčních skupinách. Udává se, že tento pás indikuje také vlhkost sorbovanou ve struktuře HL.

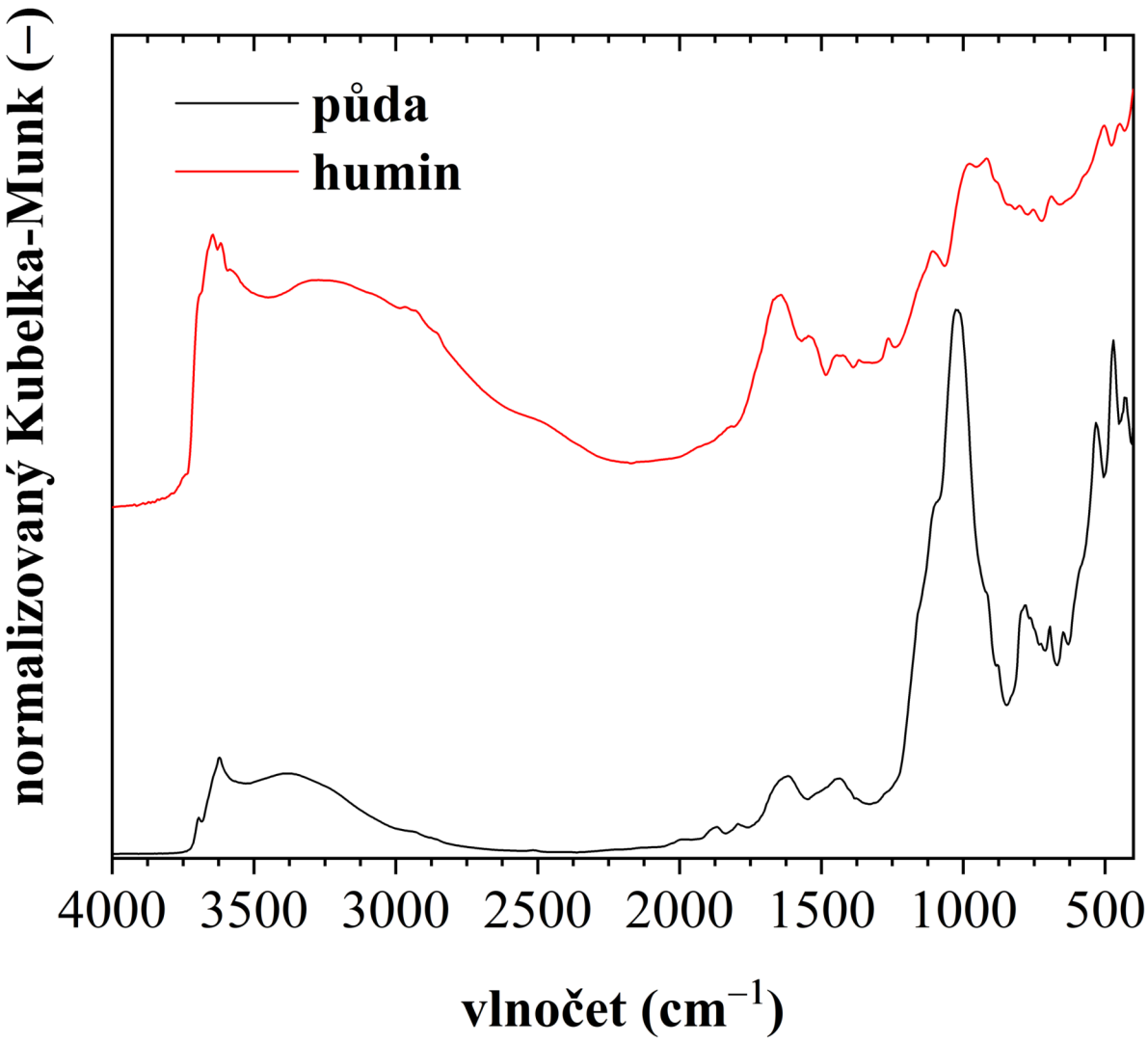
Ve FTIR spektru FK a HK byl rovněž identifikován absorpční pás při 2925 cm^{-1}. Tyto pásy vznikají v důsledku valenční asymetrické a symetrické vibrace C–H vazeb přítomných v methylenových skupinách. U vzorku FK byl tento pás potvrzen i píkem při 1388 cm^{-1}. Je nutné ovšem poznamenat, že absorpční pásy byly podstatně výraznější pro vzorek FK. FTIR spektru FK dominuje především velmi výrazný a ostrý pík při 1716 cm^{-1} odpovídající valenční symetrické vibraci C=O dvojných vazeb obsažených v karboxylových funkčních skupinách, v menší míře se ale také může jednat i o vibrační pás ketonových, aldehydových či amidových skupin, a to především z důvodu, že tento absorpční pás má povahu překrývajících se píků. Tento pík, ovšem mnohem méně výrazný, bylo možné pozorovat také ve spektru vzorku HK, což je v souladu s obecným předpokladem, že FK obsahují ve své struktuře oproti HK mnohem více funkčních skupin kyselé povahy, což má za následek jejich vyšší reaktivitu v životním prostředí. Kyselejší charakter FK byl podpořen rovněž přítomností píku při vlnočtu ~ 1230 cm^{-1}, tento pík odpovídá valenční symetrické vibraci C–O vazby a deformační vibraci O–H vazby přítomné v karboxylové funkční skupině.

Výrazný a ostrý pík bylo možné nalézt i při ~ 1038 cm^{-1}, který byl charakterizován také ve spektru HK. Tento pík bývá přisuzován valenční symetrické vibraci C–O vazby v primárních alkoholech. Dle odborné literatury může odpovídat také valenční symetrické vibraci Si–O vazby v silikátech, ale vzhledem ke zvoleným purifikačním krokům při extrakci FK a HK a nízkému obsahu popela obou vzorků (5,8 hm. % v případě vzorku FK a 1,1 hm. % pro vzorek HK) bude tento příspěvek zanedbatelný a můžeme předpokládat, že signál bude způsoben především přítomností primárních alkoholů.

DRIFT FTIR spektra vzorku půdy a HU vykazují na první pohled oproti spektrům izolovaných HL odlišný průběh. Při 3622 cm^{-1} je možné nalézt pík odpovídající valenční symetrické vibraci O–H vazby. Široký pás v oblasti 3630–3130 cm^{-1} je způsoben valenční symetrickou vibrací intermolekulárně vázaných O–H vazeb a valenční symetrickou vibrací N–H vazby přítomné v sekundárních aminech. Je zřejmé, že spektru půdy dominují především ostré píky v oblasti nižších vlnočtů. Při vlnočtu 1011 cm^{-1} byl identifikován pík odpovídající v případě vzorku půdy především valenční symetrické vibraci Si–O vazby přítomné v silikátech. Silná mineralizace a vysoký obsah anorganických příměsí ve vzorku půdy je potvrzen přítomností píků v oblasti vlnočtů kolem 780 cm^{-1}, 694 cm^{-1}, 525 cm^{-1} a 467 cm^{-1}. Tyto ostré absorpční pásy jsou způsobeny valenční vibrací Si–O vazby a deformační vibrací Si–O–Si a Si–O–Al vazby v kaolinitu či křemeni. Přítomnost těchto absorpčních pásů však není ničím překvapivá, protože právě vzorek půdy obsahoval nejvyšší obsah popela.



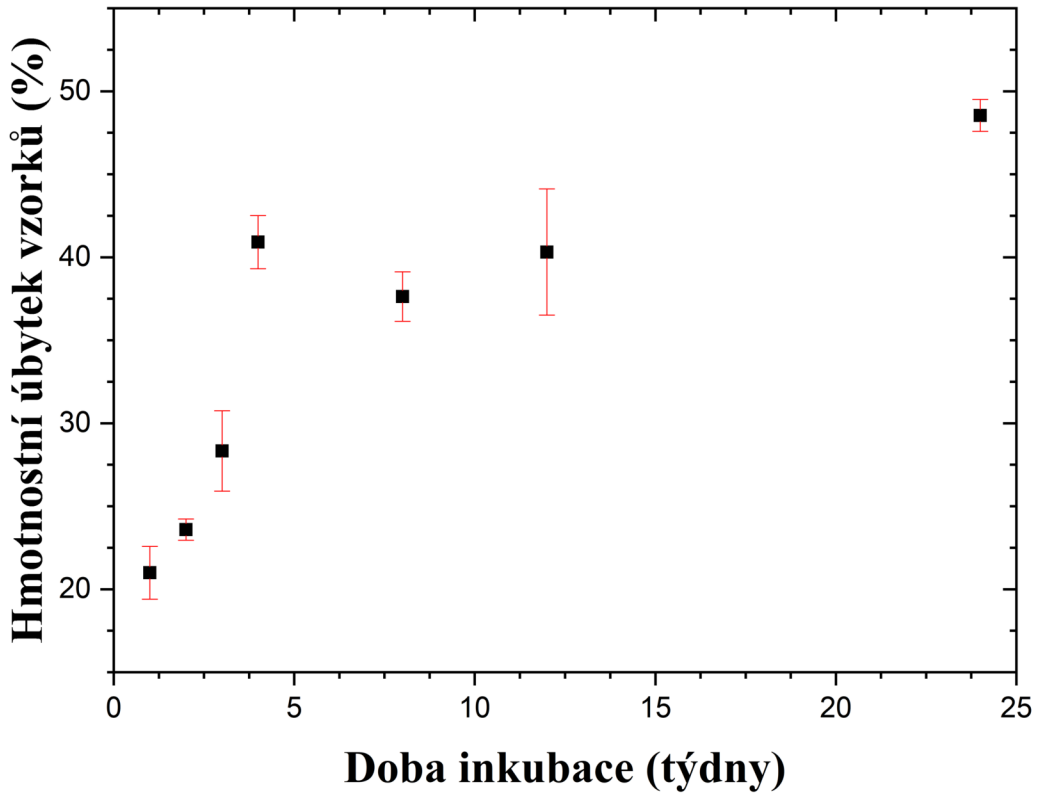
Obrázek 10 - FT-IR spektrum vzorku HK a FK



Obrázek 11 - FT-IR spektrum vzorku půdy a HU

4.2 Fyzikálně-chemická charakterizace organického materiálu čaje

Jako nejjednodušší způsob charakterizace změn probíhajících ve vzorcích při inkubace v půdě se jednoznačně nabízí sledování hmotnostního úbytku vzorků, byť může docházet k silnému ovlivnění výsledků vnějšími klimatickými podmínkami. Jak je patrné, již po uplynutí jednoho týdne klesla hmotnost na ~ 80 % původní hmotnosti vzorku. Nejvyšší rozdíl byl zaznamenán mezi vzorky uloženými v půdě tři a čtyři týdny, v tomto časovém rozmezí nejspíše docházelo k dekompozici labilnějších sloučenin obsažených v čaji. Je možné si dále povšimnout, že pro vzorky inkubované po dobu jednoho, dvou a třech měsíců dosahovala hmotnost po vykopání z půdy, usušení a očištění podobných hodnot a to ~ 60 % původní hmotnosti vzorku. Po uplynutí doby šesti měsíců pak dosahovaly vzorky přibližně 50 % své původní hmotnosti a můžeme se domnívat, že po této době již dosáhnul původní materiál čaje určité stabilizace, což je v souladu s provedenými literárními rešeršemi.



Obrázek 12 - Graf znázorňující hmotnostní úbytek vzorků

4.2.1 Termogravimetrická analýza

Veškeré inkubované vzorky včetně vzorku originálního zeleného čaje byly podrobeny termogravimetrické a elementární analýze. Termogravimetrická analýza všech studovaných vzorků byla provedena na přístroji TA Instruments TGA Q5000, a to jak v oxidační, tak inertní atmosféře. Z dat získaných při měření v oxidační atmosféře byly zjištěny obsah popela a vlhkost vzorků. Dále byla provedena derivace změny úbytku hmotnosti a na základě těchto dat bylo provedeno vyhodnocení výsledků.

Na TG křivce původního vzorku čaje v oxidační atmosféře bylo po zderivování identifikováno hned několik píků, které se pak již dále neobjevily u žádného z inkubovaných vzorků. K nejvyššímu hmotnostnímu úbytku ve vzorku došlo při teplotě 499° C. Mimo charakteristické píky v oblasti ~ 80° C (odpařování vody), poté při teplotě 303° C (hemicelulóza) a 499° C (celulóza) byly viditelné píky i při 219° C, 323° C a v neposlední řadě i 465° C. Tyto píky náleží termicky labilním a také v půdě snadno degradovatelným složkám zeleného čaje. Mohlo by se jednat o píky odpovídající katechinům, které byly detekovány i ve FT-IR spektru původního vzorku čaje. V inertní atmosféře byly patrné píky při 223° C, 259° C, 332° C, 411° C a 456° C, přičemž k nejvyššímu hmotnostnímu úbytku došlo oproti oxidační atmosféře podstatně dříve, a to již při dosažení teploty 332° C.

Na všech získaných termogravimetrických křivkách inkubovaných vzorků v oxidační atmosféře vzduchu byla viditelná přítomnost třístupňového rozkladného procesu. Při spalování organického materiálu čaje probíhaly tři hlavní procesy, a to vznik těkavých látek, spalování

těkavých látek a vznik vyhořelých zbytků. Jednalo se pak o tři teplotní intervaly, a to následující: rozmezí 80–100° C, kdy docházelo především k odpařování vody a těkavých látek; dále 290–310° C, kdy se projevila degradace hemicelulóz a štěpení vazeb spojujících lignin a hemicelulózy a na závěr rozmezí 490–505° C, což jsou teploty charakteristické pro přeměnu celulózy a zejména aromatického biopolymeru tzn. ligninu až po tvorbu zuhelnatělých zbytků. Na termogravimetrických křivkách mezi různě dlouho inkubovanými vzorky byly na první pohled znatelné rozdíly ve tvaru, intenzitě a přesné hodnotě maxim těchto tří píků [51].

U vzorků inkubovaných pouze po dobu jednoho týdne byly v oxidační atmosféře po zderivování kromě píku značícího odpařování vody ze vzorku viditelné dva velmi ostré a úzké píky, a to při teplotách ~ 295° C a při ~ 490° C. První pík, spojovaný především s rozkladem hemicelulózy a jiného termicky labilnějšího materiálu, vykazoval téměř totožnou intenzitu a hmotnostní úbytek jako pík při 490° C spojovaný s rozkladem celulózy anebo ligninu. Naopak v inertní atmosféře došlo k nejvyššímu úbytku hmotnosti již při cca 340° C.

Při ponechání vzorků v půdním prostředí po dobu dvou týdnů došlo v oxidační atmosféře k nepatrnému posunu maxim obou píků, a to k teplotám cca 315° C a 510° C, přičemž k nejvyššímu hmotnostnímu úbytku došlo až při teplotě ~ 510° C, zatímco pík v oblasti ~ 315° C vykazoval sotva poloviční intenzitu a nebyl již tak ostrý. Na základě výše uvedeného se můžeme domnívat, že již po uplynutí dvou týdnů došlo k degradaci části termicky labilního materiálu. Tato domněnka je v souladu s výsledky získanými pomocí FT-IR spektroskopie. V inertní atmosféře nastal nejvyšší hmotnostní úbytek až při 349° C, což jen potvrzuje vše výše uvedené.

Po uplynutí třech týdnů byly na TG křivce vzorků při spálení v atmosféře vzduchu opět viditelné dva píky, přičemž ostrý a výrazný byl pouze pík při teplotě 480° C. Při teplotě cca 321° C byl stále pozorovatelný pík, tvarem i intenzitou srovnatelný se vzorky inkubovanými v půdě po dobu dvou týdnů, avšak s tím rozdílem, že došlo opět k posunutí jeho maxima k vyšším teplotám, což svědčí o odbourání dalšího množství labilnějších složek zeleného čaje. Při spalování vzorků v dusíkové atmosféře byl opět dominantní pík při 348° C.

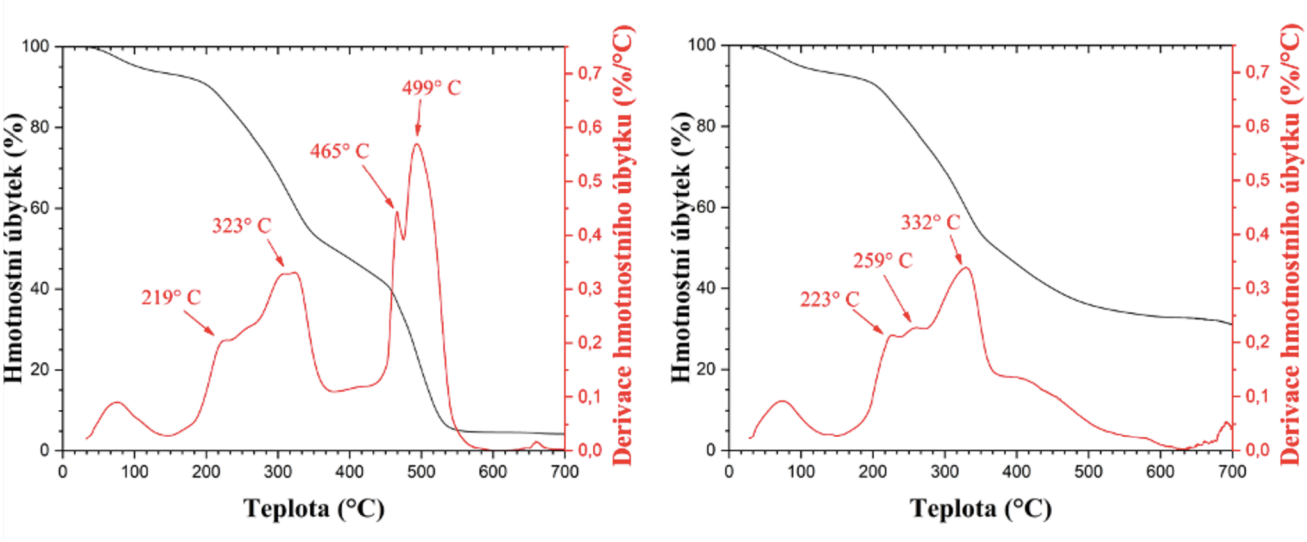
Na TG křivkách vzorků v atmosféře vzduchu, které byly ponechány v půdním prostředí celkem čtyři týdny, byly pozorovatelné dva výraznější píky, oproti předchozím vzorkům však byly méně intenzivní a rovněž podstatně širší. Jednalo se o teploty 324° C a 495° C. I v případě vzorků po čtyřech týdnech je možné pozorovat trend s posunem hodnoty maxima prvního píku k vyšším teplotám. Naopak v inertní atmosféře nastal nejvyšší hmotnostní úbytek vzorků dříve, a to při teplotách ~ 335° C.

Po inkubaci vzorků po dobu dvou měsíců byly při spálení v oxidační atmosféře detekovány dva stejně intenzivní a oproti předchozím vzorkům i poměrně široké píky, a to při 324° C a 482° C. V atmosféře dusíku byl pozorován opět nejvyšší hmotnostní úbytek při cca 335° C.

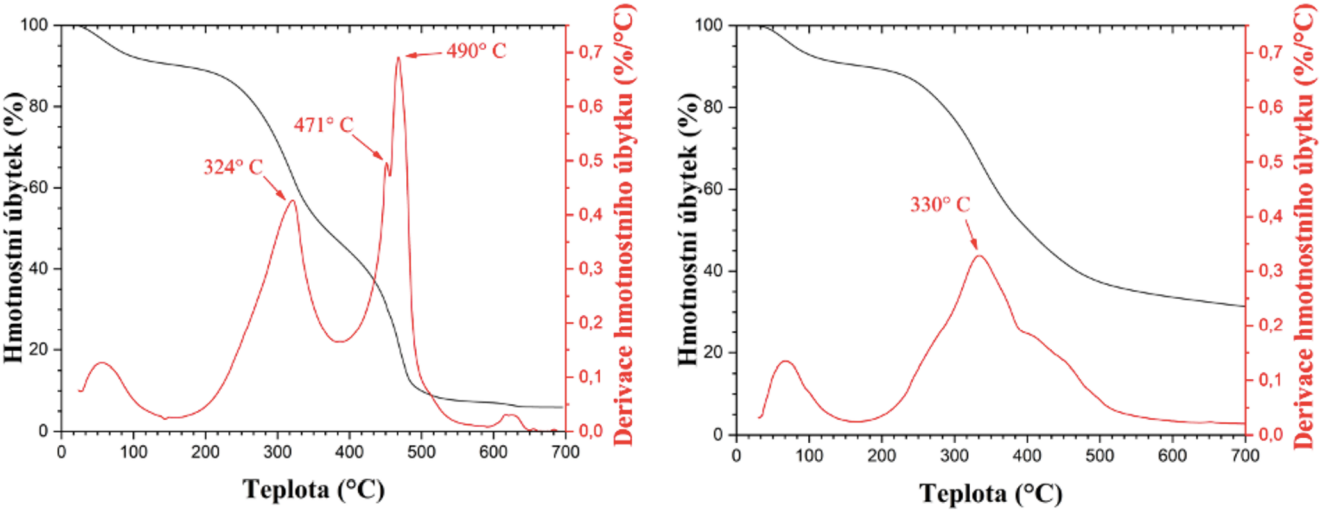
Data získaná pomocí TG pro vzorky inkubované v půdě po dobu třech měsíců bohužel zcela nekorelují s ostatními daty, protože jak již bylo zmiňováno výše, v důsledku ztráty vzorků

musel být experiment pro tento časový interval zopakován, přičemž pak probíhal za odlišných klimatických podmínek.

Pro vzorky ponechané v půdě nejdelší dobu, tedy šest měsíců, byly viditelné dva píky, a to první s maximem při teplotě 324° C a poté pík s maximy při 471° C a 490° C. Přítomnost dvou ostrých maxim na druhém píku může souviset s tvorbou stabilnějších, aromatických struktur, jejichž přítomnost byla prokázána charakteristickými absorpčními pásy ve FT-IR spektru. Ze všech studovaných vzorků došlo v inertní atmosféře k nejvyššímu úbytku hmotnosti při nejnižších teplotách, a to již při 330,1° C.



Obrázek 13 - TG křivka pro vzorek původního materiálu čaje v oxidační a inertní atmosféře



Obrázek 14 - TG křivka pro vzorek po 6 měsících v půdě v oxidační a inertní atmosféře

4.2.2 Elementární analýza

Na první pohled je patrné, že spolu s dobou inkubace dochází ve vzorcích k poklesu obsahu uhlíku, a především kyslíku za současného nárůstu celkového množství vodíku a dusíku. Tento pozorovaný jev je spojen s odbouráváním labilního hydrolyzovatelného a degradaci snadno

podléhajícího materiálu jako jsou jednoduché cukry a proteiny, což bylo potvrzeno i na měřených FT-IR spektrech, kde byl zřejmý pokles signálu odpovídajícímu valenční symetrické vibraci C–O vazby obsažené v polysacharidických jednotkách. Za pokles obsahu kyslíku v inkubovaných vzorcích bude odpovědné pravděpodobně také odbourávání a přeměna polyfenolických látek (viz. Tabulka 11). Nárůst obsahu dusíku ve složení studovaných vzorků nejspíše souvisí i s postupnou humifikací degradovaného organického materiálu, kdy meziprodukty rozkladu postupně reagují s dusíkatými sloučeninami obsaženými v půdě za vzniku huminových struktur. Mnozí autoři zabývající se výzkumem složení HL dávají ve spojitost obsah dusíku s mikrobiální činností během humifikačního procesu.

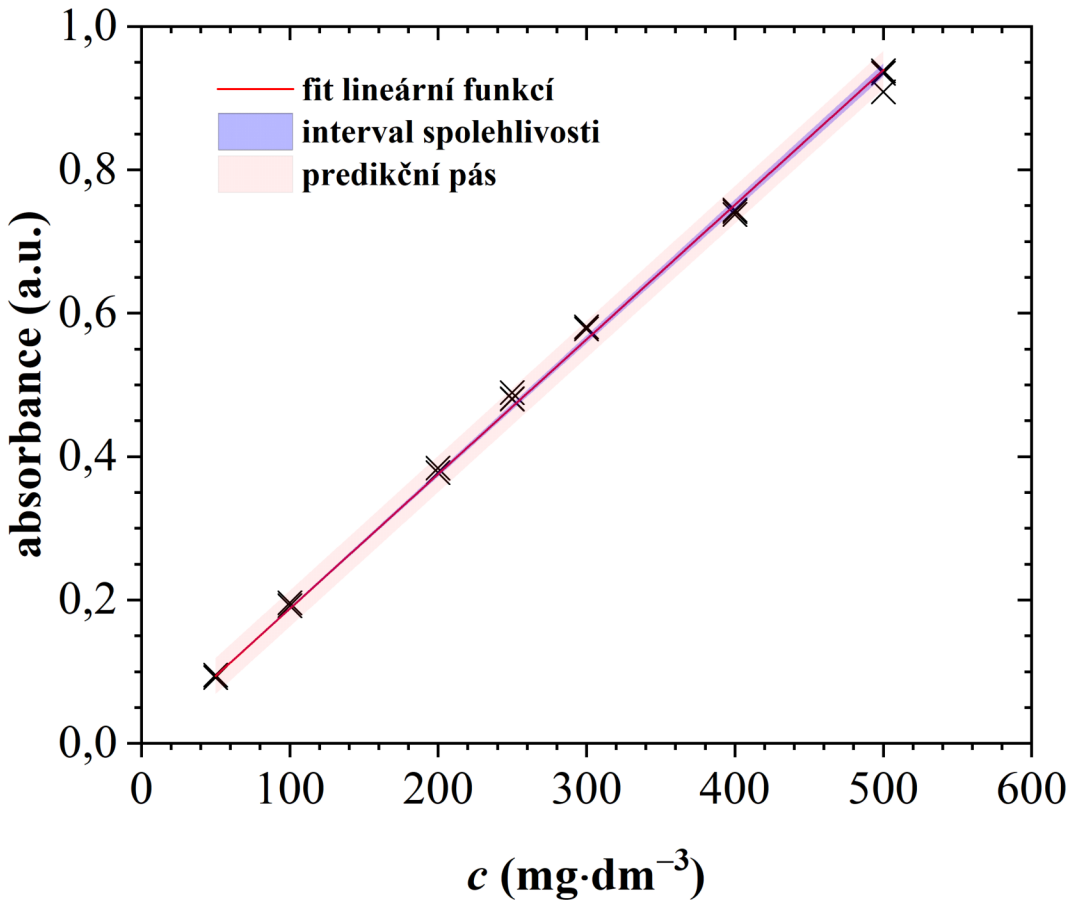
Tabulka 10 – Elementární složení inkubovaných vzorků čaje, obsah popela a celkové vlhkosti

Vzorek	Elementární složení v at.%					popel (hm. %)	vlhkost (hm. %)
	C	H	N	O	S		
originál	24,23±0,44	61,14±0,73	1,34±0,03	13,30±0,27	0	6,63±0,12	4,31±0,38
1 týden	26,06±0,40	61,01±0,76	2,04±0,07	10,89±0,63	0	4,62±0,31	5,09±0,45
2 týdny	26,24±0,99	62,94±0,55	1,93±0,07	8,89±0,80	0	4,39±0,23	5,58±0,73
3 týdny	25,89±0,50	63,33±0,69	2,06±0,09	8,71±1,28	0	4,47±0,16	5,07±0,78
1 měsíc	26,76±0,15	62,66±0,18	2,56±0,07	8,06±0,20	0	5,85±0,34	7,93±1,14
2 měsíce	26,35±0,46	63,32±0,61	2,52±0,02	7,81±0,13	0	5,82±0,03	7,09±0,28
3 měsíce	24,56±0,51	63,24±1,01	2,00±0,17	10,20±0,55	0	6,33±0,18	11,59±0,24
6 měsíců	25,99±0,98	65,78±1,31	2,64±0,13	5,67±2,07	0	6,66±0,30	9,42±0,01

Obsah popela byl stanoven v úzkém rozmezí 4–6 hm. %. Obecně vypovídá obsah popela o přítomnosti anorganických příměsí jako je vápník, hořčík, křemík či hliník. Pozorovaný nepatrný nárůst v obsahu popela inkubovaných vzorků (nejvýznamnější pro vzorek inkubovaný po dobu 3 a 6 měsíců) by mohl vypovídat o interakcích mezi těmito anorganickými látkami obsaženými v půdě a postupně vznikajícími huminovými strukturami. Vlhkost vzorků se pohybovala v rozmezí 5–12 hm. %, kdy nejvyšší obsah sorbované vlhkosti byl stanoven pro vzorek po 3 měsících inkubace v půdě, nicméně vzhledem k odlišným klimatickým podmínkám při uložení tohoto vzorku do půdy není srovnání s ostatními získanými daty zcela na místě. Vlhkost je z velké části sorbována prostřednictvím kyselých funkčních skupin, kam z pravidla řadíme –COOH a –OH fenolické skupiny. Při vyhodnocování FT-IR spekter byly lokalizovány pásy (1450–1440 cm^{-1} a 1240–1230 cm^{-1}) odpovídající charakteristickým vibracím v karboxylových skupinách, přičemž intenzita tohoto signálu i šířky těchto lokalizovaných pásů byly nejvyšší právě pro vzorek inkubovaný po dobu 6 měsíců.

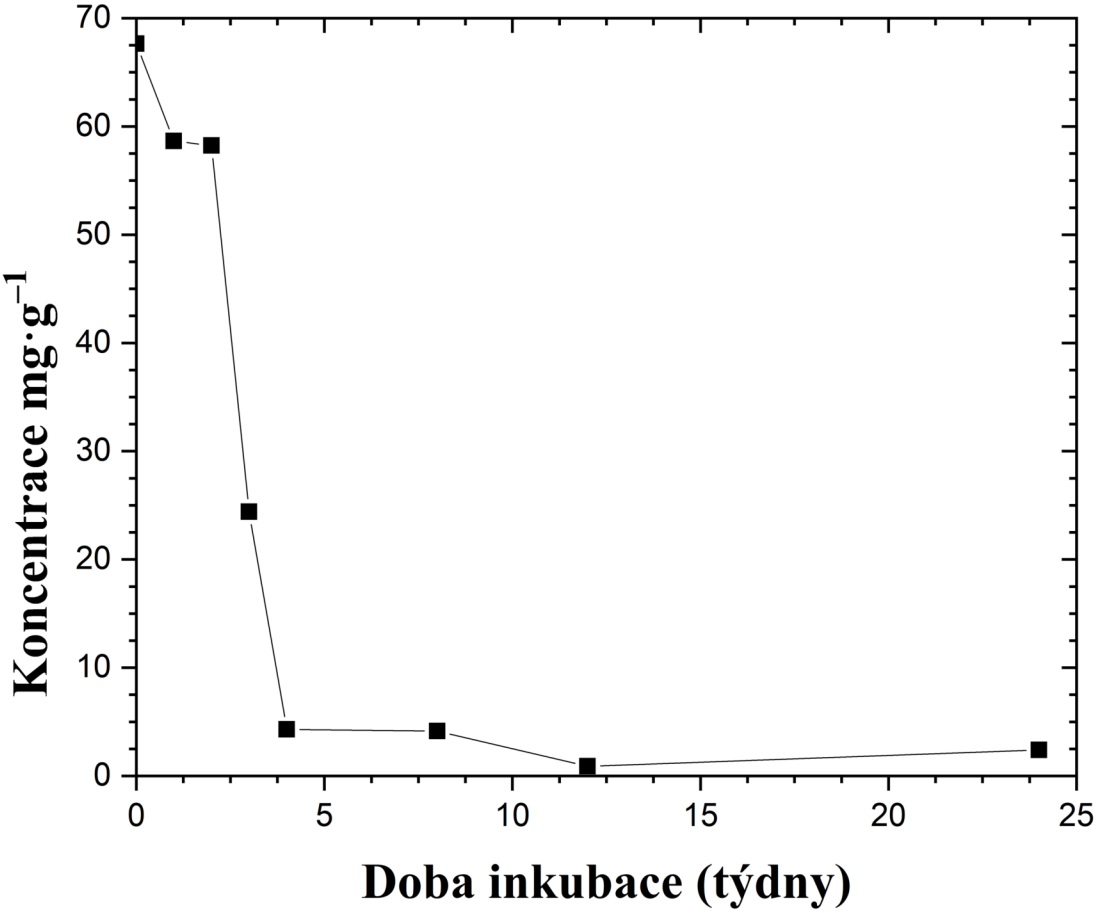
4.2.3 Stanovení celkového obsahu vodou extrahovatelných polyfenolů

Celkový obsah vodou extrahovatelných polyfenolických látek ve vzorcích byl stanoven za použití molekulové absorpční spektrometrie metodou Foulin-Ciocaulteova činidla. Pro kvantitativní stanovení obsahu polyfenolů byla sestrojena kalibrační křivka kyseliny gallové, která je zobrazena na Obrázek 15. Jak je patrné, závislost absorbance na koncentraci byla v daném rozsahu měření lineární.



Obrázek 15 - Kalibrační křivka kyseliny gallové

Získané výsledky kvantitativního stanovení obsahu polyfenolických látek obsažených ve vzorcích v půdě inkubovaného zeleného čaje jsou zobrazeny v Tabulka 11 a na Obrázek 16.



Obrázek 16 – Graf znázorňující závislost koncentrace polyfenolických látek ve vzorcích na době odběru vzorku z půdy

Tabulka 11 – Stanovení celkového množství polyfenolických látek v jednotlivých vzorcích

Vzorek	**Původní**	**1 týden**	**2 týdny**	**3 týdny**
c (mg·g^{-1})	67,6	58,6	58,2	24,4

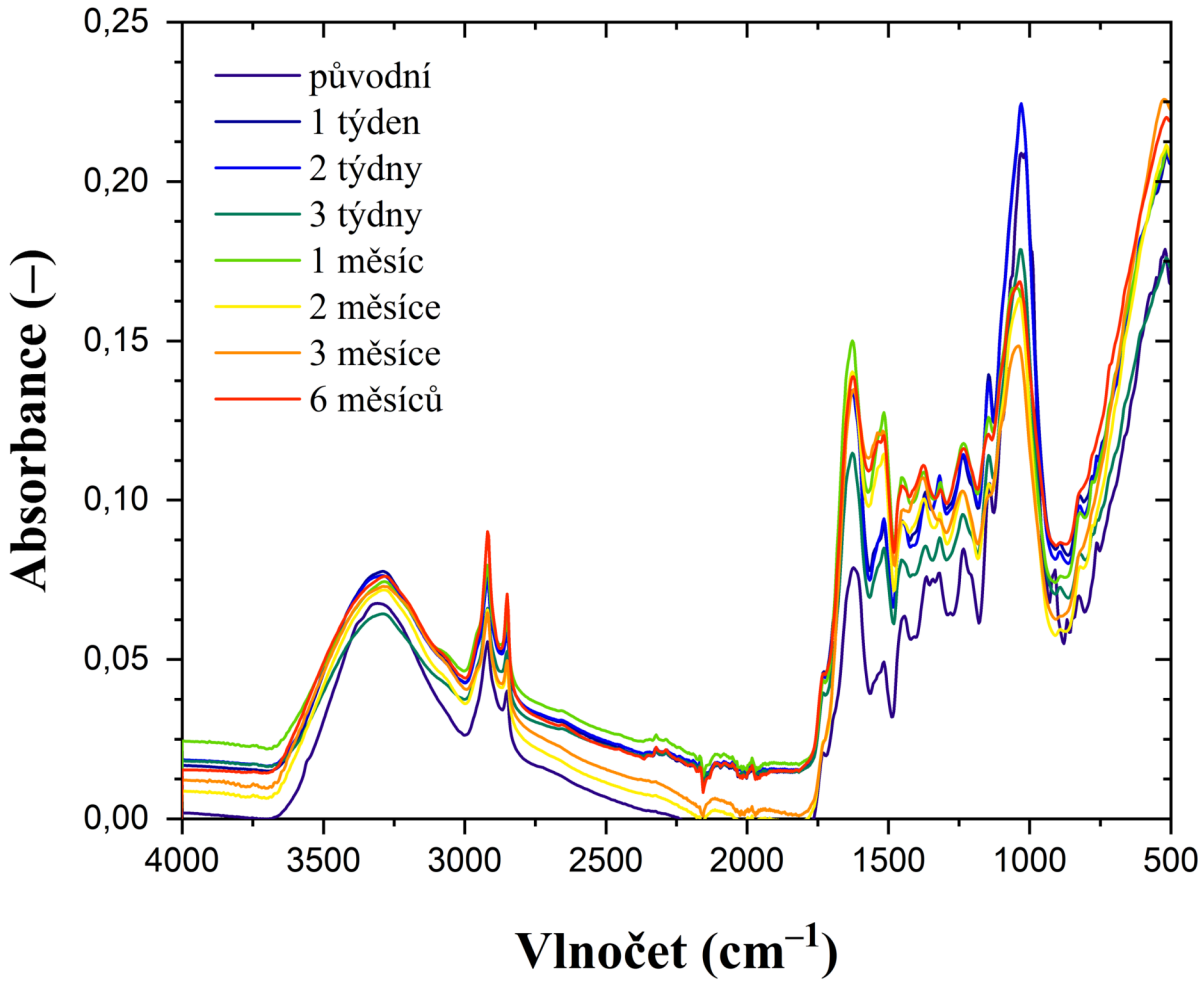
Vzorek	**1 měsíc**	**2 měsíce**	**3 měsíce**	**6 měsíců**
c (mg·g^{-1})	4,3	4,1	0,9	2,3

Z vyhodnocených dat je patrné, že k nejvyššímu úbytku koncentrace polyfenolických látek ve vzorcích došlo po uplynutí 3 týdnů. Po inkubaci vzorků v půdě delší než 1 měsíc již nedocházelo k žádným znatelnějším úbytkům v koncentraci polyfenolických látek, přesto nedošlo k úplnému poklesu na absorbanci příslušných vzorků. Můžeme se tedy domnívat, že určité zbytkové množství polyfenolů již dále nepodléhalo žádným degradačním procesům, což je v souladu se základním principem humifikace, a to že nikdy nedojde k úplné degradaci veškerého výchozího materiálu, ale že určité procento výchozích složek podléhá mineralizaci. Vzhledem k tomu, že jako studovaný degradovaný materiál byl použit zelený čaj, stojí za zvážení i možná inhibice mikrobiální činnosti zapříčiněná právě přítomností polyfenolických látek. S. Tang a spol. ve své práci prokázali, že epigallokatechin gallát (EGCG), tedy v zeleném

čaji nejhojněji obsažený zástupce polyfenolů, může ovlivnit v půdě procesy nitrifikace a denitrifikace, což jsou procesy velmi citlivé na působení vnějších vlivů. Je důležité zmínit, že to jsou právě tyto procesy, které nesou převážnou část odpovědnosti za distribuci dusíku v půdě a tím rozhodují i o využití dusíku rostlinami. Mimo to má přítomnost EGCG vliv i na diverzitu půdních bakterií. Bylo prokázáno, že přídavkem EGCG do půdy došlo po 2 týdnech ke zvýšení diverzity bakteriální komunity, obecně jsou totiž flavonoidy schopny stimulovat růst určitých druhů bakterií. K návratu do původního stavu došlo po uplynutí 1 měsíce, kdy byla převážná část ECGC již spotřebována [46].

4.2.4 FT-IR spektroskopie organického materiálu čaje

Naměřená FT-IR spektra vzorků jsou zobrazena na Obrázek 17. Jednotlivé píky a absorpční pásy byly popsány a interpretovány na základě vybrané odborné literatury [48][51][52].



Obrázek 17 – FT-IR spektra vzorků čaje

U všech měřených vzorků si můžeme povšimnout širokého absorpčního pásu v oblasti vlnočtů 3600–3000 cm^{-1}, který je připisován valenčním vibracím OH– skupin. Jedná se především o skupiny alkoholové a fenolické, ale jejich signál může překrývat i vibrace NH– vazeb přítomných v primárních aminech, které nebývají tak intenzivní, protože NH– vazby nejsou

schopné tvořit tak silné vodíkové vazby. Právě příspěvek intra a intermolekulárních vodíkových vazeb je pravděpodobně odpovědný i za šířku tohoto pásu. Příspěvek na intenzitě tohoto pásu má také vibrace N–H vazeb v sekundárních amidech, způsobující ostřejší vrchol pásu při vlnočtu ~ 3250 cm^{-1}. Tento absorpční pás je primárně spjat s bílkovinnými strukturami tvořící zelený čaj anebo vzniklých dusíkatých sloučenin během dekompozice OM čaje vlivem aktivity půdních mikroorganismů. Za zmínku stojí fakt, že intenzita tohoto píku rostla zároveň s dobou inkubace vzorků v půdě. Na všech měřených spektrech je možné identifikovat také dublet ostrých absorpčních pásů při 2930 a 2860 cm^{-1}, za který jsou odpovědné asymetrické a symetrické valenční vibrace v methylenových skupinách. Tato skutečnost byla u všech studovaných vzorků potvrzena rovněž méně výrazným absorpčním pásem viditelným při vlnočtu ~ 1450 cm^{-1}. Stejně jako v předchozím případě, i zde platí, že spolu s dobou inkubace vzorku v půdě docházelo k nárůstu na intenzitě signálu.

V rozmezí 1620–1580 cm^{-1} je možné identifikovat velmi výrazný absorpční pás, který je přiřazován valenční vibraci C=C vazeb v aromatických strukturách a také valenční vibraci C=O vazby přítomné v sekundárních amidech. Šířka i intenzita tohoto absorpčního pásu narůstá opět s dobou inkubace vzorku.

O přítomnosti karboxylových funkčních skupin ve studovaných vzorcích svědčí absorpční pás v oblasti vlnočtů 1450–1440 cm^{-1} odpovídající deformační vibraci C–O–H vazby. Tato hypotéza byla rovněž potvrzena absorpčním pásem viditelným v oblasti ~ 1240–1230 cm^{-1}, který vzniká v důsledku valenční symetrické vibrace C–O vazeb v –COOH skupinách.

V oblasti vlnočtů 1358–1319 cm^{-1} je možné vypozorovat tři méně výrazné píky, a to pouze u vzorku původního, neinkubovaného materiálu čaje. V literatuře jsou tyto píky přiřazovány valenčním symetrickým vibracím C–N vazeb v sekundárních amidech (amid III).

Velmi výrazný a ostrý pás se nachází také při vlnočtu přibližně 1030 cm^{-1}. Tento pík bývá přisuzován valenční symetrické vibraci C–O vazeb nacházejících se v primárních alkoholech a polysacharidech. Někteří autoři tento pík identifikují také jako důsledek valenční symetrické vibrace C–O vazeb přítomných v aminokyselinách. Nejintenzivnější signál vykazují původní vzorek čaje spolu se vzorky inkubovanými po krátkou dobu (tj. 1 a 2 týdny), poté je možné pozorovat výrazný úbytek na signálu tohoto píku. Je tedy možné konstatovat, že se bude jednat právě primárně o signál způsobený absorpcí v polysacharidických jednotkách a aminokyselinách, které jsou při inkubaci v půdě postupně degradovány a spotřebovávány. Intenzita tohoto píku však zcela nevymizela ani po uplynutí 6 měsíců, přestože se jedná o labilní hydrolyzovatelnou část vzorku. Můžeme tedy předpokládat, že část této polysacharidické frakce se v půdě stabilizovala a již dále nepodléhala degradačním reakcím.

Za zmínku stojí v neposlední řadě rovněž oblast v rozmezí vlnočtů 900–750 cm^{-1}, ve které je možné dle některých autorů zabývajících se analýzou látek obsažených v zeleném čaji identifikovat pásy odpovídající deformačním vějířovým vibracím aromatických OH– skupin obsažených v katechinech. Tyto méně výrazné píky byly pozorovatelné u původního vzorku zeleného čaje, a to v oblastech 900, 879, 840 a 775 cm^{-1}. U inkubovaných vzorků tyto píky detekovány nebyly, kromě oblasti odpovídající ~ 840 cm^{-1}. Tento pík však dle dostupné

literatury nemusí souviset jen s deformační vibrací v OH– vazbách, ale také s deformací CH– vazeb v aromatických strukturách.

Obecně můžeme na základě výše uvedených poznatků říct, že celkově je FTIR spektrum původního vzorku zeleného čaje bohaté na polyfenolické látky, karboxylové kyseliny, polysacharidy, aminokyseliny a bílkoviny, přičemž píky odpovídající těmto funkčním skupinám postupně s dobou inkubace vzorků v půdě ztrácí na intenzitě za současného nárůstu signálu odpovídajícímu aromatickým strukturám. Nejvýznamnější rozdíl mezi jednotlivými FT-IR spektry představoval úbytek intenzity pásu odpovídajícímu valenční symetrické vibraci v polysacharidech.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studovat rozklad organického materiálu v půdním prostředí a charakterizovat změny v jeho složení za pomoci vybraných termálních a spektrometrických metod. Za účelem studia degradace organického materiálu byla na základě provedených literárních rešerší zvolena tzv. *tea bag* metoda, kde slouží jako studovaný degradovaný organický materiál zelený čaj, čímž je zajištěna reprodukovatelnost měření a možnost relevantního srovnávání výsledků získaných během různých experimentů na různorodých stanovištích a za různých podmínek. Fyzikálně-chemické charakterizaci byl podroben rovněž vzorek půdy, ve které probíhaly experimenty s dekompozicí organického materiálu. Dekompozice organického materiálu je totiž proces úzce závislý na podmínkách v okolním prostředí – a to jak na klimatických faktorech, tak i na jeho chemickém složení, protože zásadní vliv na rychlost a průběh dekompozice má rovněž obsah dusíku.

Bylo zjištěno, že půdní vzorek obsahoval v přepočtu na sušinu celkem 1,13 hm. % HL, přičemž nejvyšší podíl tvořily HK a HU, zatímco FK byly zastoupeny pouze v minoritním množství, což jsou hodnoty korespondující s výsledky izolací HL z terestriálních matric. Z půdy izolované HK a FK pak vykazovaly vysokou čistotu, v případě vzorku FK se jednalo o obsah popela necelých 6 hm. %, zatímco vzorek HK obsahoval díky zvoleným purifikačním krokům pouze 1 hm. % anorganických příměsí. Čistota izolovaných HK a FK byla mimo jiné potvrzena i při vyhodnocování FT-IR spekter, kdy nebyly lokalizovány žádné absorpční pásy, které by mohly odpovídat nežádoucím složkám a kontaminantům. Pomocí elementární a termogravimetrické analýzy byl potvrzen kyselejší charakter FK a po vyhodnocení UV-Vis spekter bylo rovněž potvrzeno, že vzorek FK je tvořen převážně alifatickými fragmenty o nižší molekulové hmotnosti, zatímco vzorek HK se skládá spíše z aromatických struktur. Oproti tomu vzorky půdy a izolovaného HU byly charakteristické vysokým obsahem popela a s tím související silnou mineralizací, přítomnost anorganických složek ve studovaných vzorcích byla rovněž potvrzena ve FT-IR spektrech, a to zejména v oblasti vlnočtů kolem 780 cm^{-1}, 694 cm^{-1}, 525 cm^{-1} a 467 cm^{-1}, což odpovídá ostrým absorpčním pásům svědčících o přítomnosti Si–O–Si a Si–O–Al vazeb v hlinitokřemičitanech.

Změny ve složení během průběhu degradace organického materiálu zeleného čaje byly sledovány za pomoci metod TG, EA, UV/Vis spektroskopie za použití metody Foulin-Ciocaulteova činidla a FT-IR spektroskopie. Pomocí UV/Vis spektroskopie byl stanovován celkový obsah vodou extrahovatelných polyfenolických látek v jednotlivých vzorcích. Bylo zjištěno, že k nejvyššímu úbytku polyfenolů ve vzorcích došlo při inkubaci v půdě po dobu třech týdnů. Po uplynutí této doby již nedocházelo k tak velkým úbytkům na koncentraci těchto látek, zároveň však nedošlo ani k úplnému poklesu na koncentraci, z čehož je možné si vyvodit závěr, že určitá minoritní část polyfenolických látek se v půdě nejspíše stabilizovala. Tento předpoklad je v dobrém souladu s obecně přijímanou definicí humifikace, a to že nikdy nedojde k degradaci veškerého množství vstupního materiálu, ale že určité procento se stabilizuje a již dále nepodléhá žádným degradačním reakcím. Tyto výsledky jsou rovněž v dobré shodě se závěry získanými pomocí TG. Na získaných termogravimetrických křivkách byla velmi dobře viditelná změna intenzity a tvaru píků příslušících jednotlivým složkám a zároveň posun hodnot

maxim těchto píků souvisejících s termální degradací příslušných organických složek materiálu (původního a inkubovaného) zeleného čaje. Velmi výrazná změna byla také pozorována na FT-IR spektrech, kde spektrům původního vzorku organického materiálu čaje dominovaly píky příslušející funkčním skupinám vyskytujícím se v polysacharidech, polyfenolických látkách, aminokyselinách a bílkovinách, které se zvyšující se dobou inkubace vzorků v půdě ztrácely postupně na intenzitě za současného nárůstu píků svědčících o přítomnosti aromatických struktur.

Je možné konstatovat, že v této diplomové práci zvolená metoda studia dekompozice organického materiálu v půdě poskytuje relevantní informace o průběhu probíhajících rozkladných procesů a nabízí se díky své univerzálnosti, reprodukovatelnosti a dostupnosti jako vhodná možnost charakterizace procesů probíhajících v půdě.

6. ZDROJE

[1] PAVLŮ, Lenka, 2018. *Základy pedologie a ochrany půdy*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2876-1.

[2] JEŘÁBKOVÁ, Julie, 2018. *Proč je důležitá organická hmota v půdě*. CZ Biom [online]. Praha: České sdružení pro biomasu, 2019 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: https://biom.cz/cz/odborne-clanky/proc-je-dulezita-organicka-hmota-v-pude

[3] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX, 2001. *Půdoznalství*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-80-7157-559-7.

[4] ŠARAPATKA, Bořivoj, 2014. *Pedologie a ochrana půdy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3736-1.

[5] VRBA, Vladimír a Ludvík HULEŠ, 2018. *Humus - půda - rostlina* (3) Humus a rostlina: Rozpustné humusové látky v ekosystému [online]. Praha: České sdružení pro biomasu, 2006 [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: https://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-3-humus-a-rostlina-rozpustne-humusove-latky-v-ekosystemu

[6] O huminových látkách, © 2019. *INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS)* [online]. www.ihss-cz.cz [cit. 2019-3-3]. Dostupné z: http://www.ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html

[7] SCHNITZER, M. a S. U. KHAN, 1978. Soil organic matter. Vol. 8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. ISBN 0-444-41610-2.

[8] TYL, Pavel, Martin RIMNAC, Roman ŠPÁNEK a Július ŠTULLER, 2012. *Design of an ontology for humin substances*. New York, New York, USA: ACM Press, 2012, 387-. ISBN 9781450313063. Dostupné z: doi:10.1145/2428736.2428806

[9] WEBER, Jerzy. The formation of humic substances. *Soil humic substances* [online]. Agricultural University of Wroclav [cit. 2020-11-16]. Dostupné z: http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm

[10] FEDOTOV, G. N. a S. A. SHOBA, 2015. On the nature of humic substances. *Eurasian Soil Science*. **48**(12), 1292-1299. ISSN 1064-2293. Dostupné z: doi:10.1134/S1064229315120066

[11] Huminové látky, © 2019. *Agropress* [online]. Agropress.cz – Zemědělství, živočišná výroba, články, reportáže a rozhovory, 5.8.2015 [cit. 2019-5-19]. Dostupné z: http://www.agropress.cz/huminove-latky/

[12] STEVENSON, F. J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley. ISBN 04-715-9474-1.

[13] MAILLARD, L. C, 1916. Synthesis of humus-like substances by the interaction of amino acids and reducing sugars. *Annali di Chimica Applicata*. (5), 258–317. ISSN 0365-1037.

[14] GHABBOUR, Elham A. a Geoffrey DAVIES, c2001. *Humic substances: structures, models and functions*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. Special publication (Royal Society of Chemistry (Great Britain)), no. 273. ISBN 08-540-4811-1.

[15] AL-FAIYZ, Yasair S.S., 2017. CPMAS 13 C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. Arabian Journal of Chemistry. 10, S839-S853. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2012.12.018

[16] NOVÁK, František, Martina ŠESTAUBEROVÁ a Richard HRABAL, 2015. Structural features of lignohumic acids. *Journal of Molecular Structure*. **1093**, 179-185. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2015.03.054

[17] MACCARTHY, Patrick, 2001. THE PRINCIPLES OF HUMIC SUBSTANCES. *Soil Science*. **166**(11), 738-751. ISSN 0038-075X. Dostupné z: doi:10.1097/00010694-200111000-00003

[18] JOKIC, A, M.C WANG, C LIU, A.I FRENKEL a P.M HUANG, 2004. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature. *Organic Geochemistry*. **35**(6), 747-762. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2004.01.021

[19] PICCOLO, Alessandro, 2002. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*. Elsevier, 2002, 57-134. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007936. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7

[20] VANĚK, Václav, Daniela PAVLÍKOVÁ, Jiří BALÍK a Pavel TLUSTOŠ, 2021. DUSÍK V PŮDĚ A JEHO PŘEMĚNY. *Agrární www portál* [online]. © Copyright AGRIS, 27.11.1997 [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: http://www.agris.cz/clanek/118806

[21] FEDOTOV, G. N. a S. A. SHOBA, 2013. Fractal clusters of supermolecules of humus substances in soils. Doklady Biological Sciences. 448(1), 35-38. ISSN 0012-4966. Dostupné z: doi:10.1134/S0012496613010092

[22] BAIGORRI, Roberto, Marta FUENTES, Gustavo GONZÁLEZ-GAITANO a Jose Ma GARCÍA-MINA, 2007. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 302(1-3), 301-306. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2007.02.048

[23] AYE, Than Than a Lin Lin TUN, 2019. A Study on the Adsorption Isotherms of Humic Acid and Modified Humic Acids. *International Journal of Scientific and Research Publications (IJSRP)*. **9**(7). ISSN 2250-3153. Dostupné z: doi:10.29322/IJSRP.9.07.2019.p9145

[24] HAVELCOVÁ, Martina, Jiří MIZERA, Vladimír MACHOVIČ, Oldřich PŘIBYL, Lenka BORECKÁ a Ivana KRAUSOVÁ, 2011. SORBENTY NA BÁZI HUMINOVÝCH LÁTEK A CHITOSANU. *Chemické listy*. **105**, 913-917. ISSN 1213-7103.

[25] KHAN, Naghma a Hasan MUKHTAR, 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*. **81**(7), 519-533. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.06.011

[26] ANANDH BABU, Pon a Dongmin LIU, 2008. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry*. **15**(18), 1840-1850. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986708785132979

[27] ROBB, Christina. S., Susan E. GELDART, John A. SEELENBINDER a Phyllis R. BROWN, 2007. *ANALYSIS OF GREEN TEA CONSTITUENTS BY HPLC-FTIR*. **25**(5), 787-801. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-120003036

[28] GRAHAM, Harold N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*. **21**(3), 334-350. ISSN 00917435. Dostupné z: doi:10.1016/0091-7435(92)90041-F

[29] SENTHILKUMAR, S.R. a Sivakumar THIRUMAL, 2014/01/01. Green tea (Camellia sinensis) mediated synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **6**, 461-465.

[30] TIWARI, Neha, Neelam NEGI a Raushani RAJ, 2017. Physico-Chemical and Mycofloral properties of compost. *Journal of Environment and Bio-Sciences*. (31), 375-377. ISSN 0976-3384. Dostupné z: doi:10.13140/RG.2.2.22678.70725

[31] D'HOSE, Tommy, Mathias COUGNON, Alex DE VLIEGHER, Erik VAN BOCKSTAELE a Dirk REHEUL, 2012. Influence of farm compost on soil quality and crop yields. *Archives of Agronomy and Soil Science*. **58**(sup1), S71-S75. ISSN 0365-0340. Dostupné z: doi:10.1080/03650340.2012.692876

[32] SPACCINI, Riccardo a Alessandro PICCOLO, 2020. Amendments with humified compost effectively sequester organic carbon in agricultural soils. *Land degradation and development*. ISSN 1085-3278. Dostupné z: doi:10.1002/ldr.3524

[33] MOORE, T. R., 1984. Litter Decomposition in a Subarctic Spruce-Lichen Woodland, Eastern Canada. *Ecology*. **65**(1), 299-308. ISSN 00129658. Dostupné z: doi:10.2307/1939482

[34] KEUSKAMP, Joost A., Bas J. J. DINGEMANS, Taru LEHTINEN, Judith M. SARNEEL, Mariet M. HEFTING a Helene MULLER-LANDAU, 2013. Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*. **4**(11), 1070-1075. ISSN 2041210X. Dostupné z: doi:10.1111/2041-210X.12097

[35] DUDDIGAN, Sarah, Liz J. SHAW, Paul D. ALEXANDER a Chris D. COLLINS, 2020. Chemical Underpinning of the Tea Bag Index: An Examination of the Decomposition of Tea Leaves. *Applied and Environmental Soil Science*. **2020**, 1-8. ISSN 1687-7667. Dostupné z: doi:10.1155/2020/6085180

[36] MACDONALD, Erin, Martin BRUMMELL, Aneta BIENIADA, et al., 2018/04/06. Using the Tea Bag Index to characterize decomposition rates in restored peatlands. *Boreal Environment Research*. **23**, 221-235.

[37] HUNTER, W. R., A. WILLIAMSON a J. M. SARNAEEL, 2019. *Using the Tea Bag Index to unravel how interactions between an antibiotic (Trimethoprim) and endocrine disruptor (17a-estradiol) affect aquatic microbial activity*. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1101/809426

[38] BECKER, Joscha N. a Yakov KUZYAKOV, 2018. *Teatime on Mount Kilimanjaro: Assessing climate and land-use effects on litter decomposition and stabilization using the Tea Bag Index*. **29**(8), 2321-2329. ISSN 10853278. Dostupné z: doi:10.1002/ldr.2982

[39] ELUMEEVA, Tatiana G., Vladimir G. ONIPCHENKO, Asem A. AKHMETZHANOVA, Mikhail I. MAKAROV a Joost A. KEUSKAMP, 2018. Stabilization versus decomposition in alpine ecosystems of the Northwestern Caucasus: The results of a tea bag burial experiment. *Journal of Mountain Science*. **15**(8), 1633-1641. ISSN 1672-6316. Dostupné z: doi:10.1007/s11629-018-4960-z

[40] WANG, Bin a Steven D. ALLISON, 2019. Emergent properties of organic matter decomposition by soil enzymes. *Soil Biology and Biochemistry*. **136**. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2019.107522

[41] CHEN, Jie, Baohua GU, Eugene J. LEBOEUF, Hongjun PAN a Sheng DAI, 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*. **48**(1), 59-68. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00041-3

[42] HELAL, Aly A., G.A. MURAD a A.A. HELAL, 2011. Characterization of different humic materials by various analytical techniques. *Arabian Journal of Chemistry*. **4**(1), 51-54. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.018

[43] FUENTES, Marta, Gustavo GONZÁLEZ-GAITANO a José Ma GARCÍA-MINA, 2006. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*. **37**(12), 1949-1959. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2006.07.024

[44] FERGUSON, Lloyd, 1965. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products (Scott, A. I.). *Journal of Chemical Education*. **42**(1). ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed042pA62

[45] DICK, Deborah P., Antonio S. MANGRICH, Sonia M. C. MENEZES a Betania F. PEREIRA, 2002. Chemical and Spectroscopical Characterization of Humic Acids from two South Brazilian Coals of Different Ranks. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **13**(2), 177-182. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532002000200008

[46] TANG, Sheng, Qingxu MA, Jipeng LUO, et al., 2021. The inhibition effect of tea polyphenols on soil nitrification is greater than denitrification in tea garden soil. *Science of The Total Environment*. **778**. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146328

[47] POLAT, Sevgi, Esin APAYDIN-VAROL a Ayşe PÜTÜN, 2013/06/20. TGA-FTIR study on the thermal decomposition of tea waste. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science: ICOEST Conf. 2013 (Part 2)*. (2), 420-429. ISSN 2147-3781.

[48] *IR Spectrum Table & Chart* [online], 2021. Darmstadt, Germany: Merck [cit. 2021-4-16]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html

[49] MEMÈ, Lucia, Valentina NOTARSTEFANO, Francesco SAMPALMIERI, Giulia ORILISI a Vincenzo QUINZI, 2021. ATR-FTIR Analysis of Orthodontic Invisalign® Aligners Subjected to Various In Vitro Aging Treatments. *Materials*. **14**(4). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14040818

[50] STEVENSON, F.J. a K.M. GOH, 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **35**(5), 471-483. ISSN 00167037. Dostupné z: doi:10.1016/0016-7037(71)90044-5

[51] LI, Xiaoli, Chanjun SUN, Liubin LUO a Yong HE, 2015. Determination of tea polyphenols content by infrared spectroscopy coupled with iPLS and random frog techniques. *Computers and Electronics in Agriculture*. **112**, 28-35. ISSN 01681699. Dostupné z: doi:10.1016/j.compag.2015.01.005

[52] MA ZHILIANG, 马志良, 杨万勤 YANG WANQIN, 吴福忠 WU FUZHONG a 谭波 TAN BO, 2018. The polyphenol degradation characteristics of leaf litter at different rainy stages in a subtropical evergreen broad-leaved forest in the Sichuan Basin, China. *Acta Ecologica Sinica*. **38**(9). ISSN 1000-0933. Dostupné z: doi:10.5846/stxb201703180461

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam použitých zkratek

DLD	*dynamic light scattering*
EA	elementární analýza
ECGC	epigallokatechin gallát
FK	fulvinová kyselina
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HK	huminová kyselina
HL	huminová látka
HS	humic substance
HU	humin
TG	termogravimetrická analýza
UV-Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

Seznam použitých symbolů

At. %	elementární složení v atomových procentech
E_2/E_4	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm
E_4/E_6	poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm
E_{ET}/E_{Bz}	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 a 220 nm
HM. %	elementární složení v hmotnostních procentech

PŘÍLOHY

Příloha 1 - Ukázka uložení čajových pytlíků do půdního prostředí