



# 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

# INTERAKCE PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY S POLUTANTY STUDOVANÁ MIKROKALORIMETRICKÝMI TECHNIKAMI

INTERACTIONS OF SOIL ORGANIC MATTER WITH POLLUTANTS STUDIED BY MICROCALORIMETRIC  
TECHNIQUES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Viktória Macuráková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1400/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Viktória Macuráková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Interakce půdní organické hmoty s polutanty studovaná mikrokolorimetrickými technikami

### Zadání diplomové práce:

- 1) vypracovat literární rešerši na téma interakce půdní organické hmoty s polutanty
- 2) provést izolace organické hmoty z různých typů půd
- 3) modifikovat vyizolované komponenty methylací
- 4) optimalizovat mikrokolorimetrické metody pro studium interakcí půdní organická hmota – polutant
- 5) prostudovat interakce vybraných systémů
- 6) diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

-----  
Bc. Viktória Macuráková  
student(ka)

-----  
Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Táto diplomová práca sa zaoberala štúdiom interakcií pôdnej organickej hmoty, konkrétne humínových kyselín so znečisťujúcou látkou, kde sa použil tenzid Septonex. Humínové kyseliny boli v rámci práce izolované z dvoch rôznych pôd, a to černoze a kambize. Teoretická časť práce popisuje vznik humínových kyselín ako takých, ich možné interakcie s látkami a charakterizáciu tenzidov. Experimentálna časť je venovaná charakteristike humínových kyselín pomocou elementárnej analýzy, termogravimetrie a následne najdôležitejšej časti diplomovej práce a to sledovaniu interakcií pomocou izotermálnej titračnej kalorimetrie. Pri meraniach sa zistilo, že najlepšiu interakciu s povrchovo aktívnou látkou mala vzorka izolovanej černoze pri koncentrácii tenzidu  $0,075 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

## **ABSTRACT**

This diploma thesis dealt with the study of interactions of soil organic matter, specifically humic acids with a pollutant, where the surfactant Septonex was used. Humic acids were isolated from two different soils in the work, namely black earth and cambium. The theoretical part describes the formation of humic acids as such, their possible interactions with substances and the characterization of surfactants. The experimental part is devoted to the characteristics of humic acids using elemental analysis, thermogravimetry and then the most important part of the thesis, namely the monitoring of interactions using isothermal titration calorimetry. The experiment showed that the sample of isolated black earth at the surfactant concentration of  $0,075 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  had the best interaction with the surfactant.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

humínové látky, tenzid, izotermálna titračná kalorimetria

## **KEY WORDS**

humic matters, tensid, isothermal titration calorimetry

MACURÁKOVÁ, V. Interakce půdní organické hmoty s polutanty studovaná mikrokolorimetrickými technikami. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. 50 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Bc. Viktória Macuráková

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som rada poďakovala všetkým, ktorí mi podali pomocnú ruku pri vypracovaní tejto práce: Ing. Jiří Smilek, Ph.D., Ing. Jitka Krouská, Ph.D., Ing. Michal Kalina, Ph.D., Ing. Vojtěch Enev, Ph.D., Ing. Petr Sedláček, Ph.D. a samozrejme vďaka patrí aj pani laborantkám. Z celého srdca sa chcem poďakovať aj svojej rodine a blízkym, ktorí mi dodávali energiu na dokončenie štúdia.

## OBSAH

OBSAH .....	5
1 ÚVOD.....	7
2 CIEĽ PRÁCE .....	8
3 TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
3.1 Humínové látky .....	9
3.1.1 Vznik humínových látok .....	9
3.1.2 Delenie .....	11
3.1.3 Štruktúra .....	12
3.2 Príprava humínových kyselín .....	14
3.3 Interakcie HL.....	15
3.3.1 Druhy väzieb .....	15
3.3.2 Väzbové možnosti .....	17
3.3.3 Interakcie HK s iónotvornými organickými zlúčeninami .....	20
3.4 Modifikácia HK.....	24
3.5 Metódy analýzy interakcií HL so zlúčeninami.....	25
3.5.1 Izotermálna titračná kalorimetria .....	25
4 SUČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	26
4.1 Izotermálna titračná kalorimetria a humínové kyseliny .....	26
4.2 Humínové kyseliny interagujúce s tenzidmi .....	26
5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	29
5.1 Použité chemikálie.....	29
5.2 Použité prístroje.....	29
5.3 Vzorky a ich príprava .....	29
5.3.1 Lokalita odberu pôdy .....	29
5.3.2 Príprava humínových kyselín.....	30
5.3.3 Selektívna metylácia humínových kyselín.....	30
5.4 Charakterizácia humínových kyselín a tenzidov .....	30
5.4.1 Elementárna analýza a termogravimetria .....	30
5.4.2 Stanovenie obsahu kyslých funkčných skupín.....	31
5.4.3 Izotermálna titračná kalorimetria .....	31
6 VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	32

6.1	Charakterizácia humínových kyselín .....	32
6.1.1	Elementárna analýza a stanovenie obsahu popola pomocou termogravimetrie.	32
6.1.2	Stanovenie obsahu kyslých funkčných skupín.....	32
6.2	Interakcia humínových kyselín s tenzidmi .....	35
7	ZÁVER.....	42
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	43
9	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....	49
9.1	Zoznam použitých skratiek.....	49
9.2	Zoznam použitých symbolov .....	50

# 1 ÚVOD

S rozmáhajúcim sa priemyslom a poľnohospodárskou výrobou je dôležité starať sa aj o naše životné prostredie. Nadmerné používanie pesticídov a látok ktoré znečisťujú okolie sa neustále zvyšuje, preto je potrebné tieto látky eliminovať a predchádzať ich prítomnosti nielen v ovzduší, ale aj v povrchových, podzemných vodách a predovšetkým v pôde. Jedným s riešením ako odstrániť tento problém môžu predstavovať humínové kyseliny. Humínové kyseliny sú prírodné látky, ktoré patria ku skupine organických zlúčenín hneď až čiernej farby, ktoré vznikajú rozkladom rastlinných zvyškov. Vďaka svojej chemickej štruktúre, ktorá obsahuje veľké množstvo funkčných skupín dokážu interagovať so znečisťujúcimi látkami ako sú kovy, farbivá, pesticídy či tenzidy. Vedecká spoločnosť sa vo veľkej miere snaží objasniť tieto interakcie aj napriek tomu, že presnú štruktúru humínových kyselín úplne nepoznáme.

## **2 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom tejto diplomovej práce bolo spracovať literárnu rešerš na tému interakcie pôdnej organickej hmoty študovanú mikrokolorimetrickými metódami a organickú hmotu bolo v rámci práce nutné izolovať z rôznych typov pôd. Na základe rešerše bolo cieľom modifikovať tieto vyizolované komponenty pomocou metylácie. Sériou meraní sa mala v práci optimalizovať mikrokolorimetrická metóda, pomocou ktorej sa študovala interakcia pôdna organická hmota-polutant. Úmyslom štúdia interakcií týchto systémov bolo vyvodiť logické závery.



## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

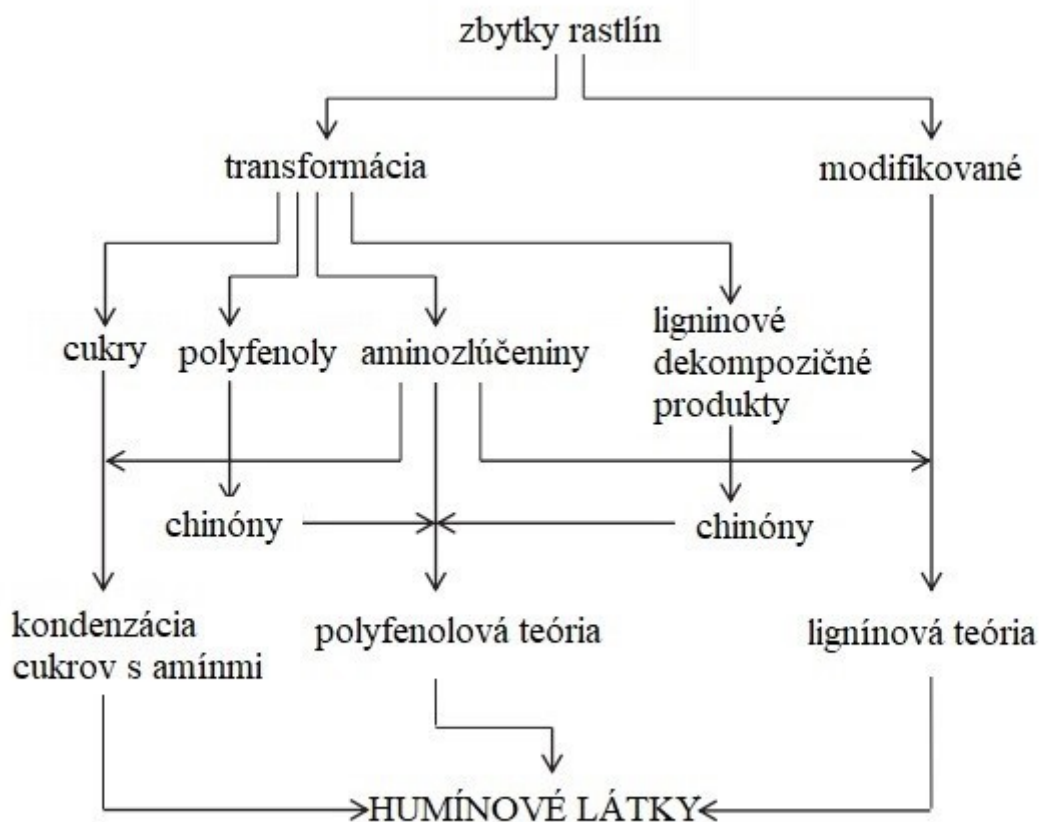
### 3.1 Humínové látky

Humínové látky definujeme ako zmes amorfných, polydisperzných zlúčenín žltej až hnedočiernej farby. Sú heterogénnou skupinou prírodných organických molekúl s komplikovanou štruktúrou a tvoria neoddeliteľnú súčasť pôdnej a vodnej organickej hmoty [1]. Dlhú dobu sa predpokladá, že humínové látky (HL) majú štruktúru makromolekuly, no nikdy tento model nebol jednoznačne potvrdený [2]. Piccolo s kolegami na základe analýzy HK pomocou nízkotlakovej a vysokotlakovej vylučovacej chromatografie so Sephadexom zistili, že veľké molekulové hmotnosti sú iba domnelé a miesto makromolekulovej štruktúry zvažujú so samospájaním makromolekulových združení heterogénnych molekúl. Podľa tejto teórie, by konformácia humínovej kyseliny mala byť stabilizovaná slabými disperznými silami ako napríklad van der Waalsove väzby alebo vodíkové väzby. V dnešnej dobe už máme mnoho dôkazov, že humusové látky netvoria kovalentne viazané makromolekulové reťazce, ale že matrica HL je intermolekulárne vytváraná zosieťovaním menších jednotiek cez vodíkové mostíky. Iná hypotéza je tvorba humo-nano-trubicových membrán. Nanotrubicice sa môžu vytvárať rozkladom rastlinných a živočíšnych tkanív. Práve to, môže viesť k tvorbe nanočastíc, ktoré sa spolu zoskupujú. Uhlíkové nanotrubicice a nanotrubicové membrány, ktoré vznikli prítomnosťou peptidov a amfifilných nanovláken, sú nevyhnutné pri tvorbe HL samosporiadaním. Takéto štruktúry sú prítomné napríklad v HK extrahovanej z lignínu [3]. Humínové zlúčeniny sú hydrofilné, kyslé a majú veľkú molekulovú hmotnosť, dosahujúcu hodnoty v rozmedzí 200 až 200 000 Daltonov [1].

HL majú väčšinou aromatický charakter a aromatické jadrá sú medzi sebou pospájané alifatickými, často cyklickými reťazcami. Svojou povahou sa HL zaraďujú do skupín polyfenolov a polykarboxylových kyselín. Najviac typické funkčné skupiny, ktoré sa nachádzajú v štruktúre sú karboxylové a hydroxylové, ďalej karbonylové a metoxylové. Tieto skupiny sa môžu viazať na aromatických jadrách alebo sú viazané na postranných reťazcoch. Humínové látky sú tvorené prevažne uhlíkom, ďalej kyslíkom, vodíkom, dusíkom a inými stopovými prvkami ako síra, fosfor [4].

#### 3.1.1 Vznik humínových látok

Proces vzniku HL sa nazýva humifikácia a zahŕňa veľké množstvo biochemických reakcií. Teória vzniku nie je úplne objasnená, ale všetky sa zhodujú v zdroji materiálu, ktorý tvoria prevažne rastliny a z časti aj iné organizmy. Humifikačné teórie môžeme rozdeliť do troch hlavných skupín: ligninová, polyfenolová a melanoidinová teória. Vedci sa domnievajú, že všetky tieto teórie existujú vedľa seba a v závislosti na podmienkach sa môžu aj prestupovať [4]. Podrobná schéma jednotlivých dráh vzniku humínových zlúčenín je na Obr. 1.



Obr. 1: Prehľad teórií vzniku humínových látok [5]

Teórie humifikácie [3] [4] [6] [7]:

- Polyfenolová teória

Inak nazývaná aj fenol-proteínová prípadne fenolautooxidačná teória. V tejto teórii sú dôležitými komponentmi pri syntéze jadra humusovej molekuly fenoly, chinóny a aminokyseliny. V jednej z ciest tvorby HL podľa tejto teórie hrá kľúčovú úlohu lignín. Dochádza k uvoľneniu fenolových aldehydov a kyselín z lignínu pôsobením mikroorganizmov, ktoré sa enzymaticky premenia na chinóny. Následne sa chinóny polymerizujú v alebo bez prítomnosti aminozlúčenín za tvorby humínových makromolekúl. Druhou možnosťou je syntéza polyfenolov z nelignínového zdroja, čo môže byť napríklad celulóza. Polyfenoly sú enzymaticky oxidované na fenoly, ktoré sú konvertované na HL.

- Melanoidinová teória

Teória známa aj ako sacharidovo-amínová, resp. Maillardova reakcia. Táto teória patrí medzi najstaršie. Podľa tejto teórie redukujúce cukry a aminokyseliny, ktoré vznikli ako produkty mikrobiálneho metabolizmu, podliehajú neenzymatickej polymerizácii, pričom vznikajú hnedé, dusík obsahujúce polyméry. Počiatočná reakcia cukor-amínovej kondenzácie spočíva v pridaní amínu do aldehydovej skupiny cukru za vzniku N-substitovaných glykozamínov. Z nich následne vznikajú aminodeoxyketózy a dochádza k strate vody a fragmentácii molekúl.

- Lignínová teória

Ligníno-proteínová teória predpokladá, že jednotky lignínu vstupujú do reakcií s aminokyselinami a vytvárajú jadro molekuly humusovej látky. S jadrom sa spájajú ďalšie organické látky, napr. polysacharidy, ktoré vytvárajú okolo jadra uhl'ovodíkové reťazce. Pri modifikácii lignínu dochádza k postupnej strate metoxylových funkčných skupín spojená s oxidáciou postranných reťazcov za vzniku karboxylových skupín. Podľa tejto teórie, najmenšia v súčasnosti známa HL je fulvokyselina, ktorá sa ďalšou polymerizáciou premieňa na humínovú kyselinu a jej ďalšou polymerizáciou vzniká humín a nakoniec kerogén, čo je vlastne tuhá organická hmota, ktorá vznikla v pôde niekoľko kilometrov pod povrchom po teplotnej premene.

### 3.1.2 Delenie

Humínové látky možno rozdeliť podľa chemických a fyzikálno-chemických vlastností na humusové kyseliny (humínové kyseliny, fulvokyseliny, humatomelanové kyseliny), humíny a humusové uhlie (ktoré vzniká z humínov pri extrémnych podmienkach karbonizáciou). Všetky tieto skupiny sú si štruktúrne podobné, no líšia sa molekulovou hmotnosťou, obsahom funkčných skupín, kyslosťou a rozpustnosťou v niektorých rozpúšťadlách. Humíny a humusové uhlie sú vo vode nerozpustné, humínovým a fulvínovým kyselinám sa budeme bližšie venovať v nasledujúcich riadkoch. Väčšina vedcov rozlišuje len tri skupiny humínových látok a to: humínové kyseliny (HK), fulvokyseliny (FK) a humíny. Porovnanie chemických a fyzikálnych vlastností môžeme vidieť na Obr. 2 [4].



Obr. 2: Chemické vlastnosti humínových látok podľa Stevenson (1982) [8]

Humínové kyseliny sú rozpustné v zásadách a nerozpustné v kyselinách a ich farba môže byť tmavohnedá až čierna [4]. Tvoria najkvalitnejšiu zložku humusových látok. Ich základnou jednotkou sú aromatické mikrojadrá fenolického alebo chinoidného typu, na ktoré sa prostredníctvom mostíkov typu (-O-, -NH-, -N-, -S-, -CH<sub>2</sub>-) napájajú v bočných reťazcoch funkčné skupiny. V jadre sa môžu nachádzať benzén, furán, naftalén, antracén, pyridín a iné.

Funkčné skupiny sa môžu vyskytovať v tvare:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  [1] [4]. Humínové kyseliny sa môžu ešte deliť na ďalšie 3 skupiny: sivé humínové kyseliny, hnedé humínové kyseliny a hymatomelánové kyseliny. Práve tieto posledné spomenuté sú rozpustné v etanole a predpokladá sa, že obsahujú polysacharidové zložky spojené esterickými väzbami [3].

Fulvokyseliny, a taktiež aj ich soli (fulváty), sa v pôde najčastejšie vyskytujú v adsorbovanej forme. Podľa klasickej makromolekulovej teórie sú FK koloidné polydisperzné amorfné humusové látky. Ich charakteristické sfarbenie je žlté (fulvus=žltý), sú menej kondenzované ako humínové kyseliny, sú rozpustné vo vode, kyselinách aj zásadách. Sú charakteristické najmä pre kyslé pôdy. Fulvokyseliny majú v porovnaní s humínovými kyselinami nižšiu molekulovú hmotnosť, obsahujú menej aromatických štruktúr, viac alifatických postranných reťazcov a majú viac homogénnu štruktúru [4].

### 3.1.3 Štruktúra

Fulvokyseliny a humínové kyseliny sa líšia aj elementárnym zložením, ktoré je zhrnuté v Tab. 1 [9]. Základnými stavebnými prvkami HL sú uhlík a kyslík, zvyškový obsah predstavujú vodík, dusík, síra (3,5 hm.%), fosfor (3 hm.%) [8].

Tab. 1: Prvkové zloženie humínových a fulvinových kyselín [9]

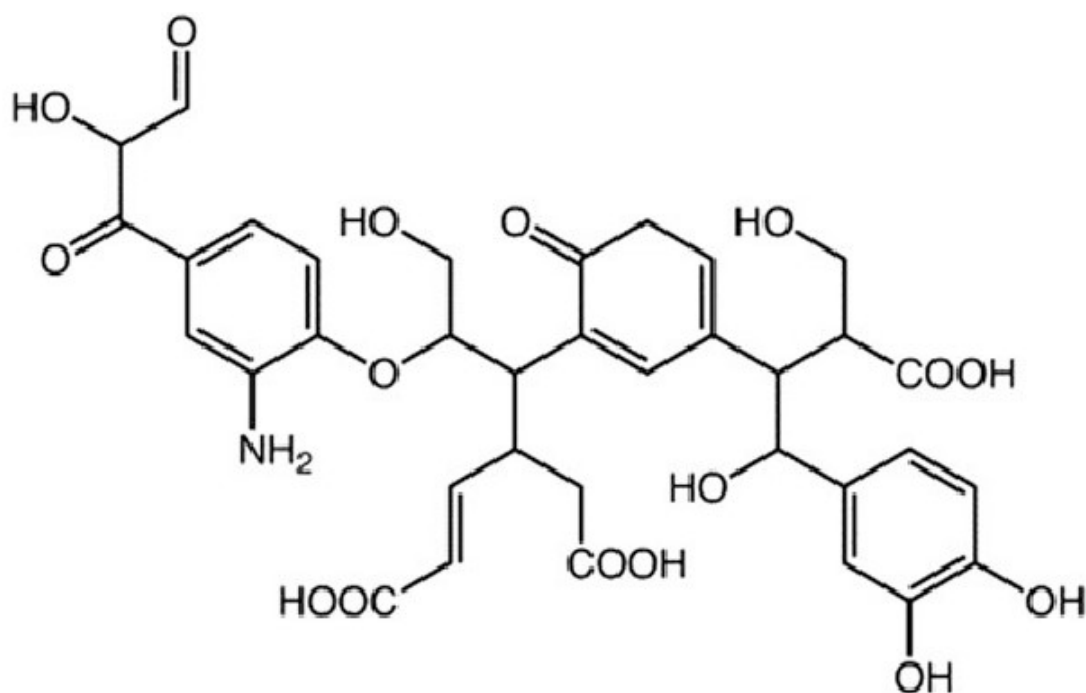
Prvkové zloženie [hm. %]	Humínové kyseliny	Fulvinové kyseliny
uhlík	53,8-58,7	40,7-50,6
kyslík	32,8-38,3	39,7-49,8
vodík	3,3-6,2	3,8-7,0
dusík	0,8-4,3	0,9-3,3

Obsah funkčných skupín nám dáva lepšiu predstavu o štruktúre molekuly a o ich chemických, fyzikálnych a biologických vlastnostiach. Najväčšie zastúpenie majú zväčša karboxylové kyseliny, ktoré dávajú HL kyslosť a taktiež sú to miesta absorpcie a výmeny katiónov. Priemerné zastúpenie funkčných skupín v humínových látkach udáva Tab. 2 [10].

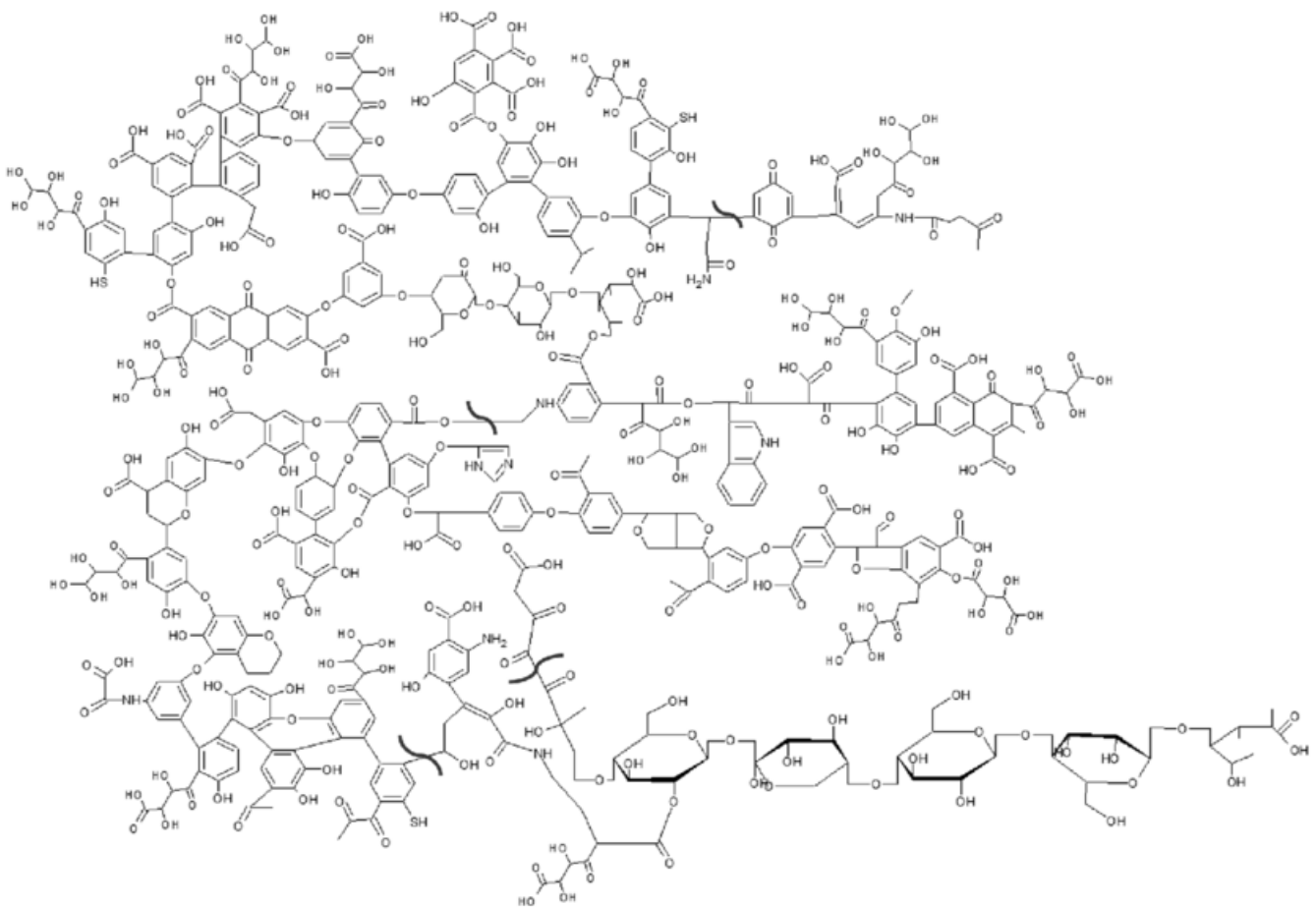
Tab. 2: Priemerné zastúpenie funkčných skupín v HK a FK [10]

Funkčné skupiny		Humínové kyseliny [mmol/g]	Fulvinové kyseliny [mmol/g]
Karboxylová (-COOH)		4,4	2,1
Hydroxylová	Alkoholová (-OH)	3,3	3,9
	Fenolová -OH(-R)	1,9	4,0
Keto (-C=O)		1,2	1,4
Metoxylová (-O-CH <sub>3</sub> )		0,3	0,4

Štúdium štruktúry HK sa vedci venujú už niekoľko desaťročí a počas tohto obdobia už vytvorili mnoho rôznych teórií, no štruktúra ešte nebola úplne objasnená. Jedným z prvých modelov HK bol podľa Steelinka (*Obr. 3*). Štruktúra modelu bola založená na monomérnych jednotkách lignínu [11]. Na *Obr. 4* môžeme vidieť naznačenie hypotetickej štruktúry leonarditu.



Obr. 3: Hypotetická štruktúra HK podľa Steelinka [11]



Obr. 4: Hypotetická primárna štruktúra leonarditu [12]

### 3.2 Príprava humínových kyselín

Najviac používanými extrakčnými metódami vzniká materiál, ktorý neobsahuje organické nečistoty. Pri extrakcii sú HK rozpúšťané rôznymi rozpúšťadlami, ktoré sú uvedené nižšie, najčastejšie NaOH, pomocou ktorých sa postupne vylučujú zrazeniny následným okyslením roztoku pomocou koncentrovanej HCl na pH=2. Metódy, extrakčné činidlá, ktoré sa využívajú sú schopné odseparovať celé spektrum látok a teda sú univerzálne pre všetky typy pôdnej hmoty [13] [14]:

- Alkalická extrakcia

Pri tejto metóde sa pôda zmieša so zriedeným roztokom hydroxidu sodného ( $0,1-0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). IHSS (International Humic Substances Society) vyvinula metódu, pomocou ktorej je možné extrahovať humínové látky z rôznych typov pôd. V predpríprave sa odporúčajú IHSS okysliť vzorku  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  HCl na pár hodín (1-3 hodiny). Vďaka tomuto sa odstránia z roztoku  $\text{Ca}^{2+}$  a iné katióny. Následne sa vzorka premyje destilovanou vodou, pokiaľ sa neodstránia chloridy. Samotná extrakcia teda vo väčšine prípadov prebieha  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH v rôznom pomere k pôde. Po niekoľkých hodinách pretrepávania sa pomocou centrifugácie alebo dekantácie

oddeli roztok tmavohnedej farby, v ktorom sú rozpustené humusové látky od anorganickej časti pôdy. Tento roztok sa následne okyslí niekoľkými kvapkami HCl do pH 2-1, čo spôsobí vyzrážanie HK a FK ostanú v roztoku. Anorganickú časť je možné opäť podrobiť opakovanej extrakcii. Surová HK sa opäť rozpustí v NaOH, opäť sa vyzráža a čistí zmesou zriedenej kyseliny chlorovodíkovej a fluorovodíkovej, aby sa odstránili posledné zvyšky anorganických zložiek (popoloviny, oxid kremičitý). Po niekoľko hodinovom trepaní HK so zmesou HCl-HF sa roztok premyje destilovanou vodou, kým sa neodstránia chloridy. Následne je možné vyčistenú HK získať vymrazovaním alebo sušením do 50 °C [3]. Platí, že čím použijeme väčšie množstvo alkalického činidla a čím je dĺžka extrakcie väčšia, tým sa zvýši výťažnosť reakcie. Má to ale aj nevýhodu, konkrétne môže dochádzať ku chemickým zmenám (napr. oxidácii), ktoré je možné minimalizovať prítomnosťou inertného plynu N<sub>2</sub> pri extrakcii. Čas extrakcie sa zvyšuje aj s hodnotou organickej hmoty extrahovanej z pôdy.

- Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a iné neutrálne soli

Použitím tejto metódy dochádza k inaktivácii katiónov (napr. Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>) reakčnými činidlami ako je pyrofosforečnan sodný, oxalacetát amónny a soli slabých organických kyselín. Tieto činidlá inaktivujú katióny tým že vytvárajú nerozpustné zrazeniny alebo rozpustné komplexy čo vedie k solubilizácii organickej hmoty.

- Kyselina mravčia

Výskumy pôdnej organickej hmoty preukázali, že vďaka kyseline mravčej s prídavkom LiF, LiBr alebo HBF<sub>4</sub>, je možné extrahovať až 55 % organických látok z minerálnych pôd a 80 % organických látok z organických kompostov V práci sa zistilo, že kyselina mravčia s prídavkom acetylacetónu je najefektívnejšia v pôdach, kde je veľké množstvo organickej hmoty len čiastočne humifikované [15].

- Organické cheláty

Tieto chelatačné činidlá sa veľmi nepoužívajú, patria medzi neefektívne na extrakciu organických látok z pôdy, pretože organické zlúčeniny schopné tvoriť chelátové komplexy s iónmi kovov uvoľňujú organickú látku do rozpustných foriem.

### 3.3 Interakcie HL

V pôdnom prostredí tvoria humínové kyseliny aj organominerálne komplexy, pričom sorpcia HK závisí na druhu ílovitého minerálu, ale samozrejme aj na chemickej štruktúre HK (funkčné skupiny, stupeň humifikácie, stupeň polymerizácie, stupeň oxidácie). Za najdôležitejšie mechanizmy väzobného procesu HK sa považujú iónovovýmenné reakcie [1]. Vedci, konkrétne Hayes a Malcolm zistili [16], že údaje katiónovej výmennej kapacity humínových látok sa zvyšujú priamo úmerne s pH hodnotou vodného média .

#### 3.3.1 Druhy väzieb

Z hľadiska využiteľnosti humínových látok napríklad v oblasti ochrany životného prostredia, je dôležité vedieť princíp väzbových interakcií týchto látok s kontaminujúcimi látkami, ktoré

sa nachádzajú v prostredí. Približnú predstavu o možných väzbových interakciách môžeme odvodiť zo známych informácií o štruktúre a z niektorých ďalších vlastností humínových látok. Podľa informácií ktoré máme, môžeme predpokladať niekoľko typov väzbových interakcií medzi HL a cudzorodými látkami [17] [18]:

- Iónová väzba

Ide o pôsobenie elektrostatických síl medzi funkčnými skupinami a iónmi, ktoré sa nachádzajú v roztoku. Ak zvažíme iónovú väzbu, môžeme HL pokladať za ionexy, ktoré v niektorých prípadoch majú porovnateľné vlastnosti ako syntetické ionexy. Vznik elektrostatickej väzby u HL teda môžeme predpokladať v prípade alkalických kovov a amoniaku [17].

- Koordinačná väzba

Tento typ interakcie je najdôležitejším typom väzby medzi makromolekulovými matricami HL a iónmi kovov, ktoré sú schopné túto väzbu vytvoriť. Konkrétne môže ísť o toxické kovy, ktoré sa nachádzajú v podzemných alebo odpadových vodách. Väzba je tvorená prevažne karboxylovými a fenolickými skupinami v štruktúre HL a je ovplyvnená hodnotou pH (v slabom prostredí sa na tejto väzbe podieľajú karboxylové kyseliny, v zásaditom prostredí sa zúčastňujú aj fenolické skupiny). Stabilita komplexov, ktoré vznikajú stúpa s rastúcim pH a to najmä u iónov (napr.  $\text{Cu}^{2+}$ ), ktoré tvoria silne karboxylát-fenolické komplexy [17] [18].

- Kovalentná väzba

U HL ide prevažne o interakcie medzi nejakým kontaminantom, napríklad zmesou polyaromatických uhl'ovodíkov a HL. Môže ísť napríklad o reakcie, ktoré prebiehajú bez využitia enzýmov alebo reakcie s využitím biokatalyzátorov. Možnosť vzniku kovalentnej väzby medzi štruktúrou HL a kontaminantom je z predpokladom pre jeho imobilizáciu. K trvalej fixácii dochádza vznikom kovalentnej väzby. Dôležité ale je, aby sme vedeli či je proces vzniku väzby reverzibilná alebo ireverzibilná [17].

- Vodíkové mostíky

Relatívne slabá väzba, ktorá vzniká na základe prítomnosti niektorých funkčných skupín, napr. amidová, laktámová či nitrilová. Tieto väzby sa aj napriek nízkej väzbovej energii môžu podieľať na väzbách medzi humínovými látkami a kontaminantmi. Vodíkové mostíky boli dokázané pre iminoskupiny v molekulách herbicídov [19]. Väzba je taktiež interakcia dipól-dipól, pričom atóm vodíka slúži ako most medzi dvoma elektronegatívnymi atómami. Jeden z nich je viazaný kovalentnou väzbou, druhý zase elektrostatickými silami. Adsorpcia aniónového herbicídu na HK je pripisovaná práve vodíkovej väzbe [19].

- Hydrofóbne interakcie

Táto väzba je najviac predpokladaná interakcia HL s hydrofóbnymi a alifatickými kontaminantmi. Tieto interakcie vznikajú pri kontakte nepolárnych skupín (alkylových), ktoré nesú molekuly nachádzajúce sa vo vodnom roztoku. Výskyt týchto interakcií sa predpokladá aj

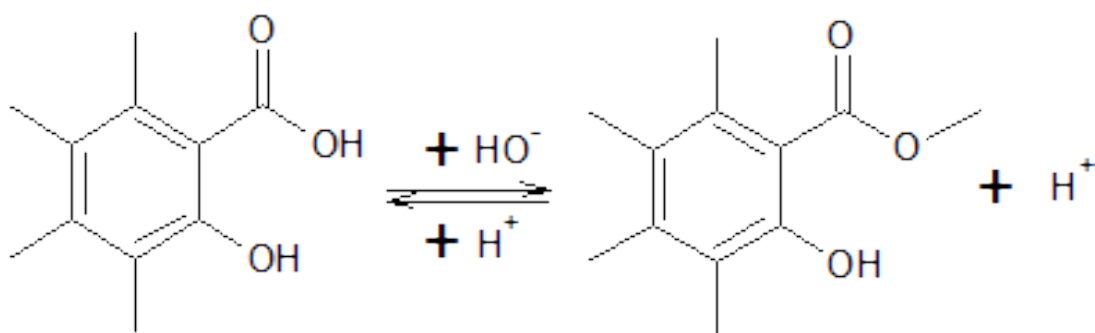


v prípade dôležitej skupiny S-triazínových herbicídnych látok [17]. Triazíny sú Lewisove zásady so štruktúrou heterocyklu s tromi atómami dusíka, ktorý môže byť donorom elektrónového páru na tvorbu kovalentnej väzby [20]. Medzi ne patrí aj atrazín, ktorý sa radí medzi selektívny pesticíd a slúži na ničenie burín v kukurici, chmeľu a cukrovej trstine, pretože je schopný zastaviť fotosyntézu [21].

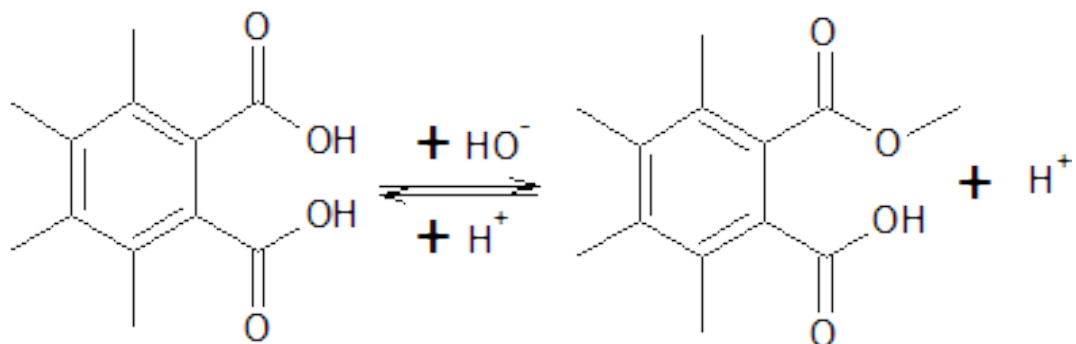
### 3.3.2 Väzbové možnosti

Humínové kyseliny zobrazujú komplexný systém s karboxylovými a fenolickými skupinami, ktoré patria medzi najdôležitejšie funkčné skupiny a zúčastňujú sa interakcií so zlúčeninami prechodných prvkov.

Na interakciu s iónmi prechodných prvkov sú dvojfunkčné chelačné miesta najviac dôležité. V humínových kyselinách sú to salicylové typy (*Obr. 5*) alebo dikarboxylové typy (*Obr. 6*) [18]:



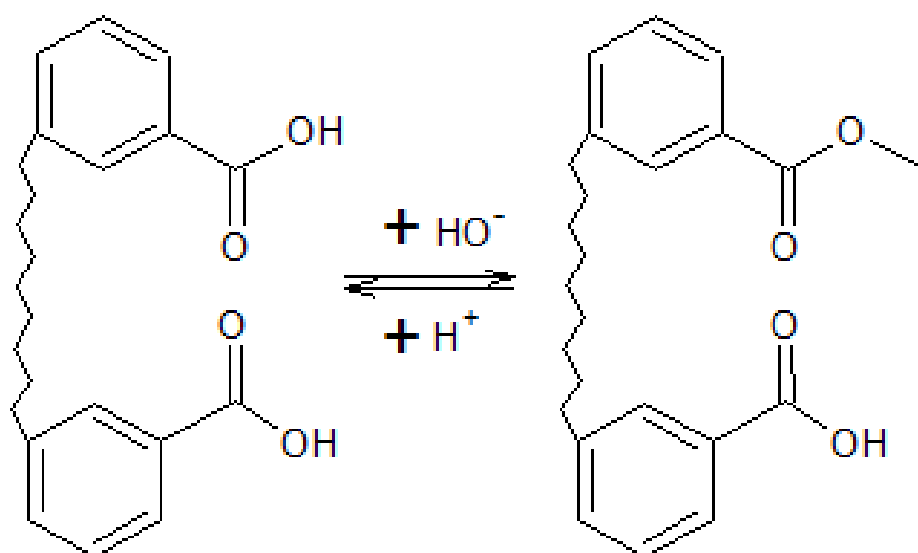
*Obr. 5: Salicylový typ*



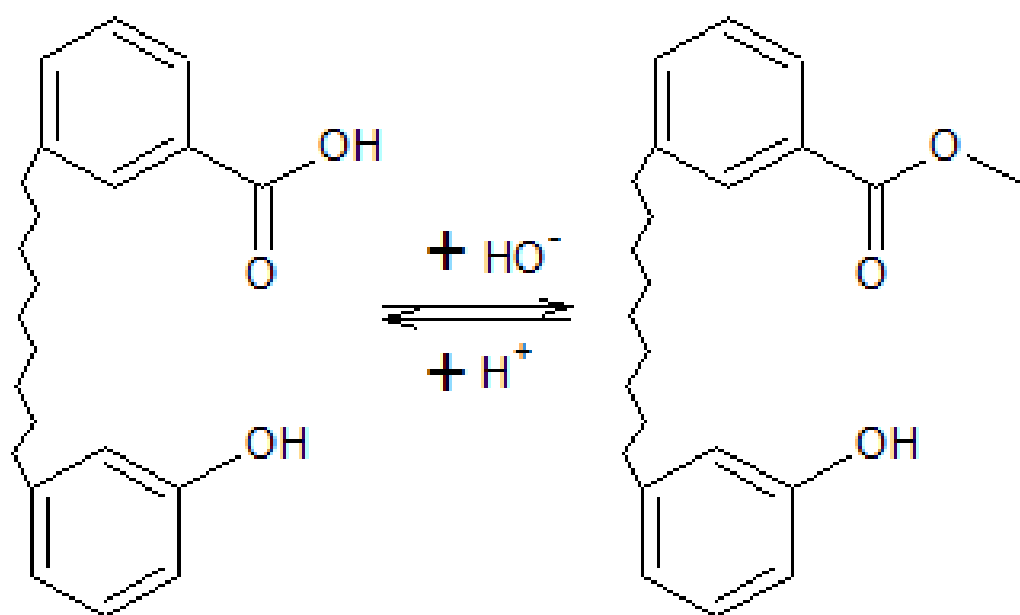
*Obr. 6: Dikarboxylový typ*

Ďalšou možnosťou sú dvojfunkčne viazané typy kam radíme [18]:

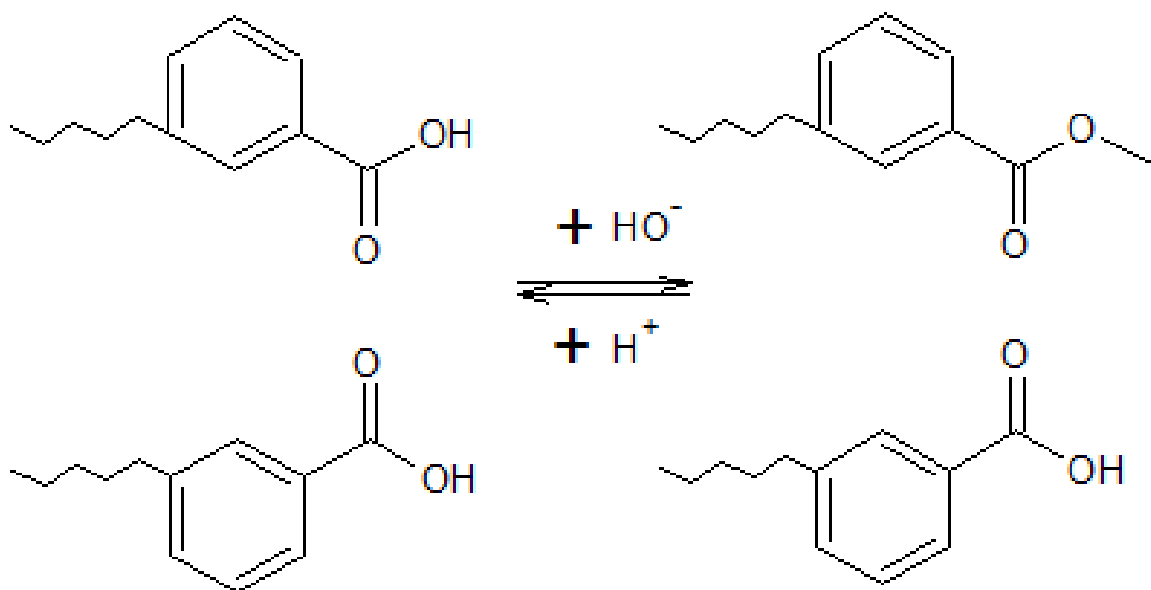
- 1) 2 karboxylové skupiny na rozdielnom jadre rovnakej makromolekuly (*Obr. 7*)
- 2) karboxylové alebo fenolické skupina na rozdielnom jadre rovnakej makromolekuly (*Obr. 8*)
- 3) 2 karboxylové skupiny na rôznych polymérnych makromolekulách (*Obr. 9*)
- 4) karboxylové a fenolické skupiny na rôznych polymérnych makromolekulách (*Obr. 10*)



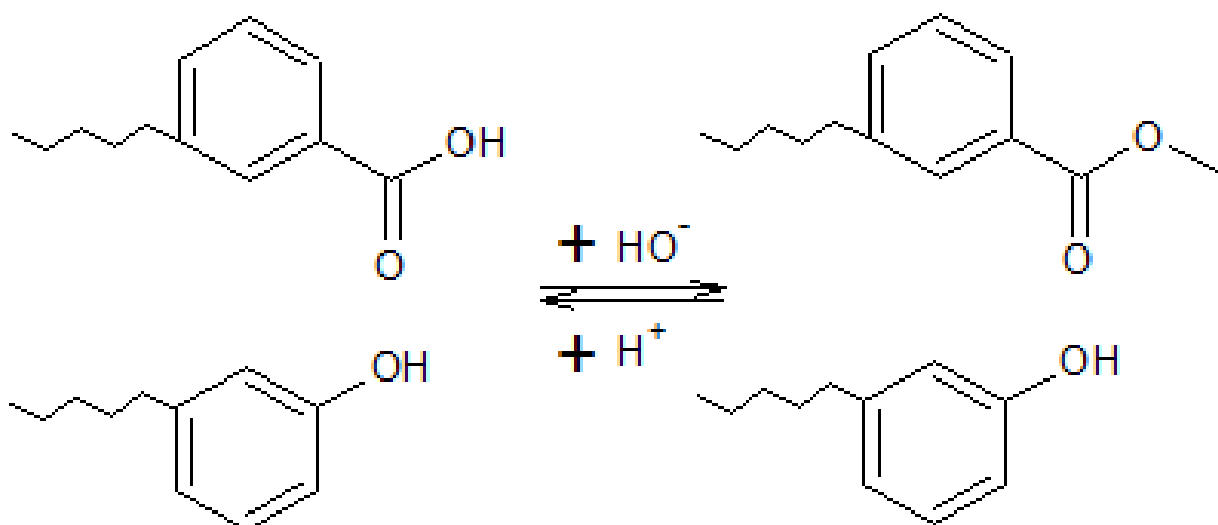
Obr. 7: 2 karboxylové skupiny na rozdielnom jadre rovnakej makromolekuly



Obr. 8: Karboxylové alebo fenolické skupiny na rozdielnom jadre rovnakej molekuly



Obr. 9: 2 karboxylové skupiny na rôznych polymérnych makromolekulách



Obr. 10: Karboxylové alebo fenolické skupiny na rôznych polymérnych makromolekulách

Z výsledkov merania rôznych komplexov prechodných prvkov, ktoré boli uskutočnené pomocou elektrónovej paramagnetickej rezonancie nám vyplýva [18]:

- 1) prechodné prvky sa k humínovým kyselinám viažu silnou kovalentnou väzbou
- 2) prevažne sa práve kyslíkové atómy karboxylových a fenolických skupín podieľajú na týchto väzbách

- 3) nachádza sa tu veľké množstvo väzbových miest s rôznou silou, ktoré sa postupne zaplňujú a vďaka nim sa prednostne odstraňujú nežiadúce prechodné prvky z humínových kyselín
- 4) so zvyšujúcim sa pH, vzrastá aj pravdepodobnosť vzniku väzieb prechodných prvkov s humínovými kyselinami

### 3.3.3 Interakcie HK s iónotvornými organickými zlúčeninami

Polutant môže byť plynná, kvapalná alebo tuhá chemická látka, ktorá má pri istých koncentráciách a dĺžke pôsobenia škodlivý vplyv na živé organizmy. Môžeme ich rozdeliť na primárne, kam patria polutanty, ktoré boli vypustené priamo do životného prostredia a na sekundárne, ktoré vznikajú v životnom prostredí pôsobením fyzikálnych dejov a chemickými reakciami sa vytvárajú v atmosfére reakciou primárnych polutantov [22]. Tým, že HK sú schopné viazať polárne i nepolárne zlúčeniny, majú veľký potenciál pre remediáciu pôdy. Pôda je schopná eliminovať kontaminanty interakciou s anorganickými pôdnymi zložkami a humínovými kyselinami. Takýto spôsob odstraňovania kontaminantov väzbou na HK v pôde sa využíva predovšetkým na ich prvotné odstránenie z veľmi znečistených lokalít [17]. Medzi polutanty, ktoré sú obsiahnuté či už vo vodnom prostredí alebo pedosfére patria napríklad detergenty a pesticídy, ktoré sú bližšie opísané v nasledujúcich častiach tejto kapitoly.

#### Tenzidy

Sú to organické látky, ktoré sú schopné hromadiť sa pri nízkej koncentrácii na fázovom rozhraní a tým znižuje medzifázovú energiu sústavy, teda povrchové napätie čo je sila, pôsobiaca v povrchu kvapaliny na jednotku dĺžky. Vďaka tomu sa používajú hlavne v čistiaciach a pracích prostriedkoch, sú súčasťou rôznych emulzných, penotvorných, zmáčacích a zmäkčovacích prostriedkov. Molekula tenzidu je charakteristická svojou polárne-nepolárnou stavbou tzn. skladá sa z hydrofilnej a hydrofóbnej časti [23]. Štruktúra tenzidu je znázornená na *Obr. 11*.



*Obr. 11: Molekula tenzidu- hydrofilná časť ("hlava"), hydrofóbna časť ("chvost")*

Snáď najvýznamnejšie využitie tenzidov je v ich vodných roztokoch. Hydrofilné skupiny majú silnú afinitu k vode a naopak platí, že hydrofóbne skupiny majú afinitu k vode slabú. Hydrofóbnu skupinu tvorí v prevažnej väčšine prípadov dlhý uhl'ovodíkový reťazec, no môžu ho tvoriť aj fluorované alebo oxidované uhl'ovodíky alebo siloxánové reťazce. Hydrofilná skupina je iónová alebo vysoko polárna skupina a môže prispievať k rozpustnosti vo vode.

Konkrétne to môžu byť napríklad tieto skupiny:  $-O-$ ,  $-COO-$ ,  $-SO_2NH-$ ,  $-CONH-$ ,  $-OH$ , polyetylén glykolové, polyglukózy, atď. [23] [24].

Poznáme viacero druhov tenzidov:

- Anionické

Táto skupina tenzidov patrí medzi najviac rozšírenú. Najstarším a najviac využívaným tenzidom je mydlo, tj. sodná soľ vyšších karboxylových kyselín ( $C_{10} - C_{22}$ ). Vo vodnom prostredí disociujú molekuly na záporne nabitý organický ión a vďaka tomu dochádza k sorpcii nečistôt, ktoré majú väčšinou slabý kladný náboj. Dobrou vlastnosťou tejto skupiny tenzidov je, že znižujú oxidačnú schopnosť mikroorganizmov a pri vyšších koncentráciách znižujú činnosť nitrifikačných baktérií. Najaktívnejšie sú v alkalickom a neutrálnom prostredí, naopak v kyslom prostredí sú nestále [25]. Využívajú sa ako základný tenzid detergentov, tzn. práškové pracie prostriedky, kvapalné umývacie a pracie prostriedky. Uplatnenie si našli aj v rôznych kozmetických výrobkoch, šampónoch, tekutých mydlách a kúpeľových penách [23].

- Kationické

Medzi kationové tenzidy patria obzvlášť kvartérne amóniové soli, napríklad chloridy alebo metosulfáty. Vo vodnom prostredí nesie ión hydrofóbnej časti molekuly kladný náboj a vďaka tomu sa nevedia uplatniť v detergenčných procesoch. Protión je väčšinou anorganický (halogén). Kationické tenzidy sa nachádzajú v avivážnych prípravkoch a okrem avivážneho efektu vykazujú aj mikrobicídny účinok. Oproti anionickým tenzidom majú horšiu biologickú rozložiteľnosť. Najaktívnejšie sú v kyslom a neutrálnom prostredí, v alkalickom prostredí sú nestále [23] [26].

- Amfotérne

Obsahujú v nedisociovateľnej časti molekuly kation aj anión a práve týmto zložením sú unikátne. Ich vlastnosti im umožňujú kombináciu s kationickými a anionickými tenzidmi. Vo všeobecnosti majú tieto tenzidy dobré detergenčné vlastnosti [23]. Sú relatívne stále v kyslom a výborne v zásaditom prostredí. Využívajú sa pri výrobe vlasových či telových šampónov, tekutých mydiel, pien do kúpeľa, no využitie nájdu aj v obore konzervovania a reštaurovania [26].

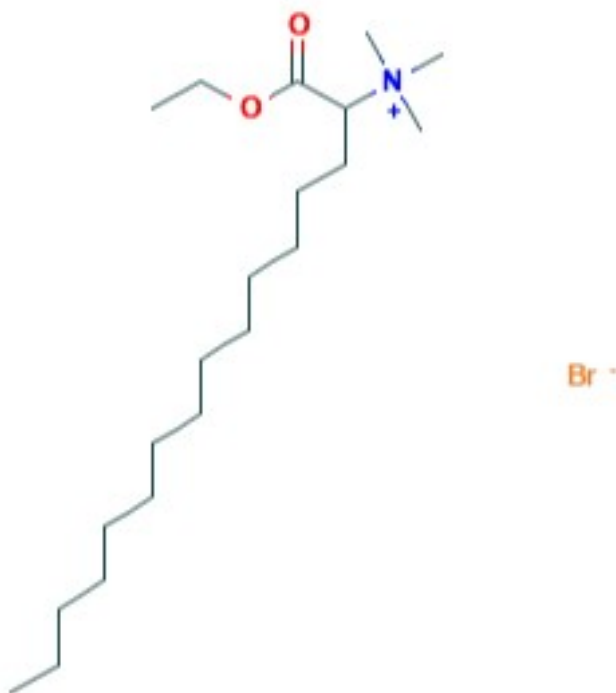
- Neionové

Tieto tenzidy obsahujú hydrofilné skupiny, ktoré vo vode nedisociujú. Sú viazané priamo alebo cez ďalšie funkčné skupiny na hydrofilnú časť molekuly. Rozpúšťajú sa vo vode kvôli ich hydratačným vlastnostiam [26]. Využitie nájdu vo výrobe práškových pracie prostriedkov, v textilnom priemysle ako antistatický a apretačný prostriedok či v kozmetike ako emulgátor [23].

## Štruktúra vybraného tenzidu

V tejto práci sme na štúdium vlastností HK použili PAL, ktorá sa radí medzi kationaktívne tenzidy. Konkrétne sa použil Septonex (karbethodecínium-bromid), ktorý je zobrazený na

*Obr. 12.* Je to kvartérna amóniová zlúčenina, ktorá má dezinfekčné a antiseptické účinky. Vyskytuje sa vo forme bieleho až slabo žltého kryštalického prášku, ktorý sa rozpúšťa vo vode a organických rozpúšťadlách. V súčasnosti sa Septonex využíva vo farmaceutickom priemysle, napríklad pri príprave oftalmologických prípravkov, ušných kvapiek či kožných sprejov [27].



*Obr. 12: Štruktúra Septonexu [28]*

## Pesticídy

Pesticídy sú biologicky aktívne látky, ktoré môžu byť syntetického, prírodného alebo mikrobiálneho charakteru. Keďže sa používajú k vyhubeniu či potlačeniu rôznych druhov škodcov, využitie majú najmä v poľnohospodárstve, lesníctve alebo sa využívajú k ochrane uskladnených plodín a výrobkov. Pesticídy sa delia na prípravky podľa druhu aplikácie a to na prípravky proti škodcom, proti parazitickým hubám a proti burine [29].

Pri interakcii pesticídov s HK dochádza k vzniku viacerých druhov väzbových mechanizmov [30]:

- Iónová väzba medzi  $-\text{COOH}$  a fenolovou  $-\text{OH}$  skupinou humínových kyselín a protonovaným dusíkom herbicídu
- Vodíková väzba medzi funkčnými skupinami HK a herbicídu

- Väzby, ktoré prenášajú náboj medzi donormi a akceptormi elektónov

Efektivitu adsorpcie hydrofóbných pesticídov z vodných roztokov je možné zvýšiť napríklad modifikáciou HK pomocou polystyrénu [31]. Skupina čínskych vedcov tak zmenila HK, čo spôsobilo, že obsahovali menej karboxylových a fenolových skupín a tým sa znížila aj polarita. Pri nemoifikovaných HK interagovali polárne funkčné skupiny s okolitým vodným roztokom za tvorby filmu, vďaka čomu nebola adsorpcia pesticídov taká efektívna. Zistilo sa teda, že adsorpcia hydrofóbných pesticídov bola efektívnejšia pri HK s modifikáciou, pri ktorej sa film na povrchu nevytváral.

Katióny bipyridínu, ako je napríklad paraquat (PQ), patria medzi najznámejšie zložky ionizovateľných herbicídov, keďže sa vo veľkom množstve používajú v poľnohospodárstve a sú široko rozptýlené v pôde a vode. Paraquat je aplikovaný ako jeho dichlórna alebo dibrómná soľ, ktorá po rozpustení vo vode uvoľňuje organický kation PQ<sup>2+</sup>, ktorý môže byť absorbovaný na povrch pôdy dvomi možnosťami. Jednou je nahradenie anorganického katiónu, druhou možnosťou je iónovo interakčný mechanizmus s negatívne nabitými miestami na povrchu pôdy v ktorom bude rozhodovať elektrostatický účinok. PQ sa adsorbuje na humínových látkach a stupeň adsorpcie sa zvyšuje so zvyšujúcim sa pH ako dôsledok ionizácie kyslých skupín v organickej látke. PQ vykazuje afinitu pre oxidy železa a ílovité materiály [32].

Pri štúdiu interakcií bipyridínových a triazinových skupín herbicídov s HK sa pomocou FT-IR spektroskopie dokázalo, že pri adsorpcii je možné sledovať viac väzbových mechanizmov. Čo sa týka bipyridínu, merania ukázali tvorbu iónovej väzby medzi COO<sup>-</sup> skupinami HK a kladným nábojom herbicídov, ale aj tvorbu  $\pi$ - $\pi$  väzieb medzi akceptormi a donormi elektrónov. Pri triazíne sa pozorovala iónová väzba medzi COOH skupinami humínovej kyseliny a protonovanými dusíkmi herbicídu a taktiež ešte vodíková väzba medzi kyslíkatými skupinami kyseliny a aminoskupinami prípadne heterocyklickými dusíkmi herbicídu [30].

Fenoxyalkánové kyseliny (ako kyselina 4-chlor-2-metylfenoxyoctová; MCPA) a ich deriváty predstavujú veľkú skupinu herbicídov, ktoré sa v poľnohospodárstve používajú vo veľkej miere. Tento typ organického pesticídu má karboxylovú skupinu, ktorá zodpovedá za interakcie so zložkami pôdy. Molekula MCPA obsahuje aj fenolickú lipofilnú štruktúru, čo umožňuje pokladať tento herbicíd za vzorový pre štúdium mechanizmov adsorpcie a desorpcie v pôde. Reaktivita povrchu pôdy závisí od počtu a typu dostupných funkčných skupín, takže ionizácia kyslej skupiny je zosilnená blízkym vyťahujúcim substituentom. Tím vedcov z Talianska, pod vedením profesora Piccolo, skúmal interakciu herbicídu glyfosát s čistým komplexom železo- humínová kyselina pomocou adsopčných izoterm pri rôznych časoch miešania. Bolo zistené, že pri nízkej koncentrácii je glyfosát absorbovaný mechanizmom výmeny ligandu, ktoré zahŕňajú fosfonoskupinu a sféru hydratácie železa v komplexe HK, no pri vyššej koncentrácii môže byť glyfosát viazaný mechanizmom vodíkových väzieb na sorbedové molekuly [33].

### 3.4 Modifikácia HK

Vlastnosti HK ako napríklad ich nízka mechanická pevnosť, úplná rozpustnosť v alkalických roztokoch, či ich vysoká polydisperzita bráni ich využitiu v rôznych odvetviach. Vhodná úprava môže zvýšiť ich reaktivitu, tepelnú a chemickú odolnosť prípadne môže ovplyvniť ich rozpustnosť. Humínové kyseliny môžeme modifikovať napríklad pomocou formaldehydu [34] prípadne močoviny [35]. Jednou z možností ako zistiť vplyv funkčných skupín na celkovú reaktivitu predstavuje ich selektívna metylácia. Tento spôsob nám pomôže vylúčiť vplyv niektorých funkčných skupín v štruktúre humínových kyselín na ich reaktivitu a na druhú stranu overiť vplyv iných funkčných skupín. V štúdiu [36] je popísaná trojstupňová metylácia. V prvom kroku dochádza k metylácii karboxylovej kyseliny diazometánom v dimetylformamid; druhým krokom sú hydroxylové skupiny metylované metyljodidom a dimetylsulfinylkarbaniómom v dimetylformamide. Následne sa hydrolyzované kyslé skupiny metylovali diazometánom. Týmto postupom vznikol produkt, ktorý bol úplne rozpustný v metylén-chloride, pričom sa dosiahol vysoký stupeň metylácie, no touto technikou sa identifikovali iba malé časti molekuly, čo je nevýhodné. Zistilo sa, že rýchlosť metylácie s diazometánom je možné regulovať pomocou dusíka. V práci [37] autor uvádza, že použitie diazometánu ako činidla je najvhodnejší na metyláciu humínových kyselín, ktoré boli extrahované z pôdy s neutrálnym pH a pre kyslé pôdy sa ukázala ako najlepšia metylácia pomocou dimetylsulfánu.

Ďalším z možných spôsobov metylácie je pomocou 2-pyrolidonu [38]. V tomto prípade sa humínová kyselina najprv rozpustí v pyrolidone a metyluje sa pridaním diazometánu v dietyléteri a etanole do roztoku. Pri tomto experimente vedci zistili, že rýchlosť metylácie funkčných skupín humínovej kyseliny bude závisieť od sterickeho efektu v molekulách a môže byť spôsobená dvoma typmi. Do úvahy pripadá buď prítomnosťou objemných skupín v molekule, ktoré blokujú prístup metylačného činidla k funkčným skupinám alebo agregácia molekúl. V inej štúdiu [39] sa ako najatraktívnejšia a najúčinnější metóda považuje esterifikácia pomocou metanol-tiochloridu. Táto metóda má vysokú selektivitu a tým je vhodná pre heterogénnu humínovú makromolekulu. Výsledky štúdie ukázali, že bolo zablokovaných až 92 % karboxylových skupín a iba 2 % fenolových skupín.

Od dôb kedy sa začali humínové kyseliny prvýkrát skúmať, prešlo už viac ako 50 rokov a výskum značne pokročil. Okrem činidiel ako dimetylsulfát [40], trimetoxymetán [41] a tých, ktoré sú spomínané vyššie, sa používa aj trimetylsilyldiazometán v metáne (TMS-DM), ktorý môžeme pokladať za vhodnú náhradu za diazometán, ktorý je toxický a výbušný [42]. V tejto práci sme si ako činidlo na metyláciu vybrali práve TMS-DM, ktorý je komerčne dostupný a používa sa k metylácii karboxylových skupín aj fenolov vďaka jeho schopnosti selektívne obsadiť karboxylové funkčné skupiny [43]. Dôležitou vlastnosťou HK je ich interakcia s kovmi, kde sa najviac do reakcie zapájajú karboxylové a fenolické skupiny. Avšak, keď sa tieto skupiny zablokujú, modifikovaná vzorka sa môže využiť pri štúdiu vplyvu týchto blokovaných skupín na reaktivitu a transportné vlastnosti humínových látok [44]. Bližšie informácie k postupu metylácie a charakterizácie materiálu ktorý vznikol je popísaný v publikáciách [45] [46].

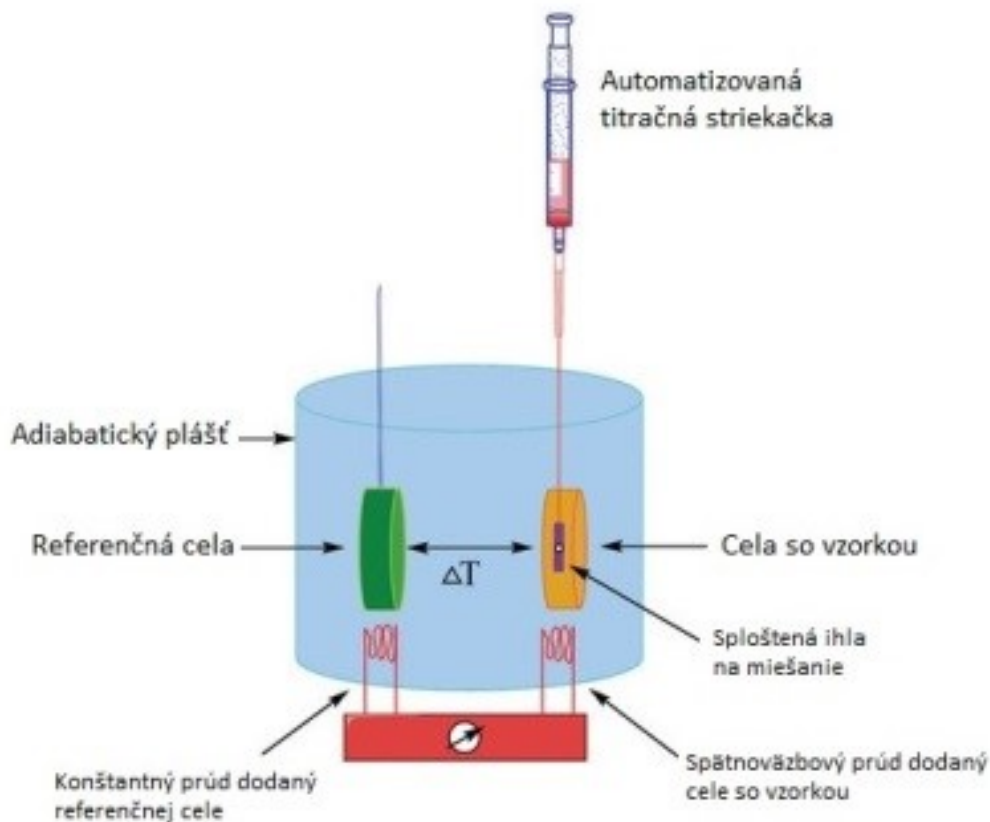


### 3.5 Metódy analýzy interakcií HL so zlúčeninami

#### 3.5.1 Izotermálna titračná kalorimetria

Izotermálna titračná kalorimetria sa využíva v kvantitatívnych štúdiách rôznych biomolekulových interakcií a funguje na priamom meraní tepla, ktoré sa uvoľní alebo absorbuje počas molekulárneho viazania. Je jedinou technikou, ktorá môže určiť všetky väzbové parametre v jednom experimente. Pri tejto metóde nie je potrebná žiadna modifikácia či už fluorescenčnými značkami alebo prostredníctvom imobilizácie [47]. Touto metódou môžeme stanovovať vzorky rôznych skupenstiev (kvapalné, pevné, gélové) a vplyv na meranie nemá sfarbenie či zákal vzorky. Využitie má v biotechnológii a uplatní sa aj v ostatných odvetviach chémie [48].

Metodika merania umožňuje stanovenie väzbovej afinity, stechiometrie, entropie a entalpie väzbovej reakcie v roztoku. Keď dôjde k väzbe, teplo sa uvoľní alebo absorbuje a práve toto sa meria pomocou citlivého kalorimetra počas postupnej titrácie ligandu do vzorky obsahujúcej biomolekulu. V kalorimetri sa nachádzajú dve cely, ktoré je možné vidieť aj na *Obr. 13* [49]. Jedna z nich obsahuje vodu a pôsobí ako referenčná, v druhej cele sa nachádza vzorka. Metóda funguje na princípe kompenzácie tepla a meraný signál je veľkosť energie potrebnej k udržaniu konštantného teplotného rozdielu medzi celou so vzorkou a referenčnou celou. Táto metóda môže objasniť mechanizmy, ktoré sú základom molekulových interakcií [47].



Obr. 13: Popis kalorimetra [49]

## 4 SUČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 4.1 Izotermálna titračná kalorimetria a humínové kyseliny

V jednom výskume [50] bola študovaná interakcia purifikovanej huminovej kyseliny (PAHA) s proteínom lyzozým (LSZ) pomocou izotermálnej titračnej kalorimetrie zmiešaním týchto dvoch zložiek v rôznych pomeroch. Termogramy izotermálnej titrácie lyzozýmu a HK poukazujú na to, že pridanie humínovej kyseliny k lyzozýmu je exotermické. Tým pádom je táto väzba energeticky priaznivá. Závery tejto štúdie, že afinita pre komplexáciu PAHA a LSZ je vysoká, komplexy ľahko agregujú v prítomnosti nejakej soli a že hydrofóbne interakcie zohrávajú dôležitú úlohu, sa očakávajú aj pri iných HK-katiónových proteínových systémov. Z tohto dôvodu keď sa v systémoch životného prostredia nachádzajú aj HK a katiónové proteíny, vytvoria sa komplexy, ktoré sa ľahko agregujú. Interakcia medzi komplexmi a minerálnymi povrchmi môže viesť k adsorpčným javom, ktoré sa líšia od javov, keď je prítomný len proteín alebo HK. Napríklad HK sotva adsorbuje na oxide kremičitom, ale predbežné pokusy ukazujú, že HK sa ľahko viaže na oxid kremičitý pokrytý LSZ.

Ďalšia študovaná interakcia bola väzba protónu a medi na pôdu a huminovú kyselinu na báze lignitu (HK) [51] a to sa skúmalo kombináciou rôznych techník vrátane izotermálnej titračnej kalorimetrie (ITC). Získané poznatky ukázali, že väzba medi na deprotonizované miesta s karboxylovým typom bola riadená entropicky a deprotonizované miesta s fenolovým typom entropiou aj entalpiou. Entropicky riadená reakcia je dej pri  $\Delta H > 0$  a  $\Delta S > 0$ , pričom dej je samovoľný a prebieha nad kritickou teplotou  $T > T_c$ , keď platí  $|\Delta H| < |T\Delta S|$ . Zistilo sa, že väzba medi na HK je vo veľkej miere závisí od lokálneho typu a koordinačného prostredia, ale termodynamická väzbovosť mechanizmu pre väzbu medi na špecifické typy lokality sú boli podobné pre rôzne HK. Táto štúdia nám poskytuje predstavu o univerzálnej povahe termodynamických údajov špecifických pre daný typ lokality a ponúka tak možnosť kvantitatívne určiť väzbové štruktúry iónov ťažkých kovov na humínové látky.

### 4.2 Humínové kyseliny interagujúce s tenzidmi

Humínové kyseliny vykazujú povrchovú aktivitu vo vodnom roztoku a pri vysokých koncentráciách vytvárajú agregácie podobné micelám. Jedným z publikovaných výskumov [52] poukazujú na to, že povrchová aktivita a agregácia sa zvyšuje pri nízkom pH. Práve povrchová aktivita má veľký vplyv na fyzikálne a chemické vlastnosti pôd. HK sa správajú ako slabé polyelektrolyty a majú schopnosť interagovať s rôznymi molekulami a práve interakcia medzi polyelektrolytom a povrchovo aktívnymi látkami vo vodnom roztoku je otázkou viacerých štúdií. Pri nich sa zistilo, že už len malé pridanie katiónového tenzidu do vodných roztokov aniónového polyelektrolytu vyvolá zníženie povrchovej aktivity. V tejto štúdií bola sledovaná povrchová aktivita vodného roztoku HK a katiónového tenzidu CnTAB o rôznom počte uhlíkov ( $n=12, 14, 16$ ). Táto štúdia pod vedením Terashima et al. poukázala na znižovanie povrchovej aktivity vodného roztoku HK so zvyšujúcim pH, kde inflexný bod bol okolo  $\text{pH}=5,5$ . Preto v tejto štúdií použili  $\text{pH}=6$ , aby vyhodnotili účinok katiónového tenzidu na povrchovú aktivitu HK. Zistili, že pri pridaní veľmi malého množstva CTAB k vodnému roztoku HK spôsobil prudký pokles povrchovej aktivity. Povrchové aktivity ako HK, tak aj CTAB sa znižovali v poradí  $\text{C}_{12}\text{TAB} > \text{C}_{14}\text{TAB} > \text{C}_{16}\text{TAB}$  a tvar kriviek zmeny povrchovej

aktivity bol skoro nezávislý od pridanej PAL. V štúdií sa zistilo, že zníženie povrchového napätia vody je omnoho vyššie vo vodnom roztoku zmesi HK/CTAB ako v roztokoch čistých zložiek. Taktiež povrchová plocha jednej molekuly v zmesi HK/CTAB je väčšia ako plocha, ktorú zaberá len CTAB bez HK. Jej veľkosť závisí od dĺžky alkylového reťazca povrchovo aktívnej látky. V tomto prípade sa hodnota plochy zvyšovala s klesajúcou dĺžkou reťazca.

V práci [53] vedci sa pokúsili charakterizovať interakciu HK s PAL pomocou ITC, vďaka čomu chceli získať informácie o základnej štruktúre HK. Kationové PAL interagujú s HK elektrostaticky a hydrofóbne. V tomto experimente sa ako PAL použil monohydrát hexadecylpyridinium chlorid, ktorý sa v praxi využil napríklad pri odstraňovaní oleja zo znečistenej vody prípadne pri odstraňovaní jedla a minerálnych olejov zo znečistenej vody [54].

Rovnaké zistenie dosiahli aj vedci Shang a Rice z USA [55], kde skúmali komplexy, ktoré sa vytvorili pri interakcii HK a kationovou PAL, konkrétne s CTAB pomocou röntgenového rozptylu s malým uhlom (SAXS). Zistili, že molekuly HK sú v alkalickom prostredí flexibilné a nevykazujú kryštalické ani husté domény. HK však spôsobila deformáciu kryštálov vytvorených z CTAB prostredníctvom elektrostatickej interakcie medzi hlavnými skupinami CTAB a vedľajšími skupinami HK.

V minulosti bola skúmaná väzbovosť PAL na humínové kyseliny rôznym spôsobom. Jedným z možných príkladov môžeme uviesť analýzu pomocou detektora náboja častíc a poly-DADMAC (polydialyldimetylamonium chlorid), ktorý sa radí medzi silné kationové elektrolyty, a využíva sa na stanovenie náboja vzoriek humínových látok. V práci [56] použili ako tenzidy dodecyl pyridín chlorid (DPC) a cetylpyridín chlorid (CPC) v spojení s 5 druhmi humínových látok. Výsledky meraní ukazujú a potvrdzujú, že väzba kationovej povrchovo aktívnej látky na humínovú látku je spôsobená elektrostatickými a hydrofóbnymi väzbami a existencia humínových látok vo vodnom prostredí môže byť vo veľkej miere ovplyvnená PAL.

Ďalšou prácou v ktorej sa zaoberali interakciou tenzidu s HK bola [57]. V práci boli skúmané sorpčné kapacity a mechanizmy dvoch rôznych HK a pôd s dodecylbenzén sulfónovou kyselinou (DBSA). Zistilo sa, že sorpčná kapacita samotných HK bola vyššia ako kapacita pôdy. HK sa ukázali aj ako účinný sorbent na zníženie koncentrácie DBSA v prostredí. Údaje o sorpcii ukázali, že k sorpcii došlo hlavne na C=C, C-O a aromatických funkčných skupinách. Okrem tohto faktu, výsledky naznačujú že sorpčný mechanizmus spočíva hlavne z tvorby vodíkových väzieb, hydrofóbných interakcií a mechanizmu donor-akceptor.

Subbiah a Mishra [58] skúmali vo svojej práci vlastnosti komplexov HK-tenzid pomocou fluorescenčnej spektroskopie s excitačne emisnou maticou (EEMF) a pomocou synchronnej fluorescenčnej spektroskopie (SFS). V štúdií boli použité rôzne druhy tenzidov, anionický – SDS (dodecylsulfát sodný), kationický CTAB a ako neionický bol použitý Triton X-100 (TX-100). Skúmané komplexy boli premeriavané pomocou metódy SFS pri vlnovej dĺžke 200-500 nm a metódou EEMF v oblasti 250-600 nm. V EEMF spektrách HK identifikovali dve fluorescenčné maximá. Po pridaní anionického tenzidu SDS sa dokázalo, že interakcia HK a SDS je veľmi slabá. Podobné výsledky sa dosiahli aj pri neionickom tenzide. Naopak, ak sa k humínovej kyseline pridalo CTAB, v komplexe nastala úplná strata intenzity fluorescencie,

čo môže byť zapríčinené agregáciou. So zvyšujúcou sa koncentráciou CTAB boli identifikované 2 fluorescenčné maximá. Výsledky tejto práce dokázali, že HK sú vo veľkej miere ovplyvňované prítomnosťou kationických tenzidov a ako vhodnú metódu pre ich štúdium môžeme pokladať fluorescenčné meranie pri vlnovej dĺžke 460/540.

Iná štúdia [59] sa zaoberala väzbou kationický tenzidu CTAB a neionogénnych nonylfenol ethoxylátov (NPE) na prírodnú humínovú látku (HL). U neiónového tenzidu sa nezaznamenal rozdiel vo fluorescenčných spektrách HL, takže nedošlo k pozorovanej interakcii medzi NPE a HL. Ak sa pridal kationický tenzid CTAB, zmeny už boli pozorovateľné čo znamená, že došlo k vzniku väzieb.

V ďalšom výskume [60] sa skúmala aj možnosť interakcie aniónovej PAL (SDS) a dvoch kationických PAL (dodecyl- a cetylpyridinium chlorid, DPC, CPC) na purifikovanú humínovú kyselinu. Interakcie boli skúmané pri hodnotách pH 5, 7 a 10 pri iónovej sile  $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zistilo sa, že pri tejto iónovej sile nenastala žiadna významná väzba medzi SDS a PAHA. Naopak pri DPC a CPC došlo k silnej väzbe. Komplexy kationických PAL sa s PAHA zrážajú, akonáhle dôjde k dosiahnutiu bodu neutralizácie náboja. Výsledkom tejto práce je, že HK sú vo veľkej miere ovplyvnené nízkymi koncentraciami kationických PAL vo vodnom systéme životného prostredia.

## 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1 Použité chemikálie

- Destilovaná voda
- Milli-Q voda
- Pôda – kambizem (Banín), černozem modálna (Hrušovany nad Jevišovkou)
- Hydroxid sodný, p.a., Penta s.r.o.
- Kyselina fluorovodíková 38-40% p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Penta s.r.o.
- Pyrofosfát sodný  $\geq 99\%$  p.a., Sigma-Aldrich
- Septonex (karbethodecínium-bromid)
- Trimetylsilyl ( $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v metanole, Sigma-Aldrich

### 5.2 Použité prístroje

- Centrifúga Hettich (Rotina 46 R)
- Trepáčka laboratórna (Kavalier LT-2)
- Miešačka preklopná
- Miešačka magnetická (Cimarec i Poly)
- pH meter (Mettler Toledo)
- Automatický titrátor Titrando 888 + Stirrer 801 Metrohm
- Mikrokolorimeter (TAM III, TA Instruments)
- Analytické váhy (Scaltec)
- Rotačný odparovač Heidolph (Laborota 4000)
- Lyofilizátor (VirTis BenchTop K)
- Elementárna analýza (EA3000, EuroVector)
- Termogravimetria (Q5000, TA Instruments)
- Infračervená spektrofotometria s Fourierovou transformáciou (Nicolet iS50, Thermo Scientific<sup>TM</sup>)

### 5.3 Vzorky a ich príprava

#### 5.3.1 Lokalita odberu pôdy

Použité typy pôd sme mali zo zdrojov dostupných v okolí. Vzorky pôdy kambizeme sme mali z okolia Březovej nad Svitavou, konkrétne z obce Banín. GPS súradnice obce sú  $49^{\circ} 66, 56125' \text{ N}$ ,  $16^{\circ} 46, 19247' \text{ E}$ . Obec sa nachádza približne 56 km od Brna v Pardubickom kraji a okrese Svitavy. Kambizeme sa vyskytujú prevažne v pohoriach v mierne suchej až chladnej horskej oblasti.

Vzorku modálnej černozeme sme mali z Hrušovan nad Jevišovkou. Toto malé mesto je situované v okrese Znojmo v Juhomoravskom kraji, približne 26 km východne od Znojma, len 5 km od česko-rakúskych hraníc a necelých 50 km juhozápadne od Brna. Pôdna sonda, z ktorej bola odobratá vzorka sa nachádza na ceste č.415 z Litobratřic do Hrušovan. Podľa GPS je lokalizovaná pomocou súradníc  $48^{\circ} 86, 49833' \text{ N}$ ,  $16^{\circ} 39, 97328' \text{ E}$ . Černozeme sa pokladajú za najúrodnejšie pôdy vďaka 2 – 5 % obsahu humusu s výskytom na nížinách a v suchých teplejších oblastiach.

### 5.3.2 Príprava humínových kyselín

Všetky humínové kyseliny boli pripravené alkalickou extrakciou [61]. Najskôr sme si navázili 200 g pôdy a následne ju zmiešali s 1 dm<sup>3</sup> 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> roztoku HCl. Suspenzia bola ponechaná na trepačke jednu hodinu, aby došlo ku dekalcinácii, pri ktorej dôjde k prečisteniu pôdy odstránením vápnika a ďalších katiónov. Zmes sa premyla približne 200 ml destilovanej vody, aby sa odstránili Cl<sup>-</sup> ióny. Takto upravená pôda sa previedla do plastovej nádoby spolu s 2 dm<sup>3</sup> extrakčného činidla 0,5 mol·dm<sup>-3</sup> NaOH a 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O a nádoba sa nechala na trepačke cez noc. Suspenzia bola následne odstredená pri podmienkach: 20 minút, 4 000 RPM, 15 °C. Pevný podiel, ktorý sme získali po odstredení sa opäť extrahoval rovnakým spôsobom. Kvapalný podiel, ktorý predstavuje roztok humínových a fulvinových kyselín, sa prefiltraval cez filtračný papier a získaný roztok sa okyslil pomocou koncentrovanej 35% HCl na pH menšie ako 2. Po približne dvoch hodinách sa humínové kyseliny vyzrážali a oddelili sme ich od roztoku fulvinových kyselín odstredení pri rovnakých nastaveniach centrifúgy (20 minút, 4 000 RPM, 15 °C). Napokon sa získané humínové kyseliny previedli do plastovej nádoby s 1 dm<sup>3</sup> 0,5 obj. % roztoku zmesi HCl a HF. Táto nádoba sa ponechala na trepačke 2 dni pri laboratórnej teplote. Suspenzia bola opäť odstredená a pevný podiel sa previedol do dialyzačných membrán (3 500 Da) a dialyzoval sa proti destilovanej vode približne 3-4 týždne za pravidelnej jej výmeny, aby sa vymyli chloridové ióny. Cez dialyzačnú membránu sa na princípe difúzie odstránia molekuly do hmotnosti 3 500 Da. Po tejto dialýze sa vzorka podrobila lyofilizácii. Pre obe vzorky pôdy sme experiment vykonali dvakrát.

### 5.3.3 Selektívna metylácia humínových kyselín

Pomocou metylácie došlo k esterifikácii karboxylových skupín a teda k zníženiu počtu reaktívnych miest v humínovej kyseline. Pri metylácii sa zmiešal 1 g HK s 4 cm<sup>3</sup> chloroformu a 2 cm<sup>3</sup> metanolu. Následne sa pridali 4 cm<sup>3</sup> roztoku TMS-DM. Po 2-hodinovom miešaní sa pridalo ďalšie množstvo TMS-DM, konkrétne 0,75 cm<sup>3</sup>. Takto metylované HK sa nechali sušiť v digestore.

## 5.4 Charakterizácia humínových kyselín a tenzidov

### 5.4.1 Elementárna analýza a termogravimetria

Medzi základnú charakteristiku HK patrí elementárne zloženie HK, teda konkrétne obsah prvkov C, H, N, S, O. Táto analýza je potrebná z dôvodu získania predstavy o ich štruktúre. K tomu, aby sme zistili elementárne zloženie nám slúžia automatické analyzátory, kde ako výsledok dostaneme údaj v atómových percentách prepočítaných z hmotnostných percent. Skúmané vzorky HK sa analyzovali pomocou prístroja EA3000, EuroVector a sú zhrnuté v kapitole 6.1.1. Čo sa týka termogravimetrie, vďaka tejto metóde sme vedeli stanoviť nespáliteľný podiel a vzdušnú vlhkosť HK. Experiment sa uskutočnil na prístroji Q5000 od TA Instruments. Meranie prebiehalo v kyslíkovej atmosfére v rozsahu teplôt od 20 °C do 900 °C. Zastúpenie vlhkosti v HK bolo stanovované pri 120 °C.

### 5.4.2 Stanovenie obsahu kyslých funkčných skupín

Na určenie celkovej kyslosti HK boli použité metódy priamej a spätnej titrácie za využitia automatického titrátoru Titrand 888. Pri príprave roztokov HK a lúhov bola používaná Milli-Q voda.

- priama

Navážilo sa 100 mg HK, ktoré sa rozpustili v 100 ml Milli-Q vode. Táto suspenzia bola ponechaná na magnetickom miešadle po dobu 24 hodín a následne sa titrovala  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztokom hydroxidu sodného. Po optimalizácii sa titračné činidlo pridávalo po  $0,05 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , celkový pridaný objem v prípade leonarditu a kambizeme bolo 50 ml, v prípade černoze 30 ml.

- spätná

Navážených 100 mg HK sa ponechalo rozpúšťať v 50 ml  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  hydroxidu sodného. Táto suspenzia sa nechala na magnetickom miešadle 24 hodín a potom sa titrovala  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  kyselinou chlorovodíkovou. Tá sa pridávala po  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Meranie sa zastavilo pri  $\text{pH}=2$ .

### 5.4.3 Izotermálna titračná kalorimetria

Do mernej cely izotermálneho kalorimetra sa opatrne vstreklo približne 200  $\mu\text{l}$  roztoku humínovej kyseliny.

*Nastavenie parametrov merania*

- Počet prídavkov: 19
- Objem prídavku: 0,4  $\mu\text{l}$  (prvý prídavok), 2  $\mu\text{l}$  (18 prídavkov)
- Interval medzi jednotlivými prídavkami: 150 sekúnd
- Konštantná teplota titrácie: 25 °C
- Celkový dávkaný objem titračného roztoku: 36,4  $\mu\text{l}$
- Čas merania: 48 minút

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 6.1 Charakterizácia humínových kyselín

Na experimenty tejto práce sa použili vzorky izolovanej humínovej kyseliny z černoze, kambize a štandard humínovej kyseliny IHSS Leonardit.

#### 6.1.1 Elementárna analýza a stanovenie obsahu popola pomocou termogravimetrie

Elementárna analýza pomáha určiť prvkové zastúpenie, konkrétne uhlík, vodík, dusík, síru a kyslík. Percentuálne zastúpenie je zobrazené v *Tab. 3*. Vďaka termogravimetrickému stanoveniu je možné zistiť množstvo nespáliteľného podielu vrátane vlhkosti materiálu, výsledky z tohto merania sú taktiež zapísané v *Tab. 3*.

*Tab. 3: Elementárna analýza vybraných látok vrátane stanovenia vlhkosti a popola*

DRUH HK	C [at.%]	H [at.%]	N [at.%]	S [at.%]	O [at.%]	Popol [hm. %]	Vlhkosť [hm.%]
HK černoze	33,6	47,9	2,8	0	15,7	7,4	4,7
mHK černoze	31,9	50,2	2,3	0	13,8	7,4	4,7
HK kambize	31,7	53,9	2,7	0	11,6	2,7	4,5
mHK kambize	28,2	55,4	2,5	0	9,8	2,7	4,5

Ak si porovnáme humínové kyseliny pred a po metylácii tak si môžeme všimnúť rôzne zmeny. V štruktúre modifikovaných humínových kyselín došlo k nárastu množstva vodíka a zároveň k zníženiu zastúpenia kyslíka. Z toho môžeme usúdiť, že pri metylácii došlo k selektívnej blokácii, t.j. dôjde k zmene z tvaru  $-\text{COOH}$  na  $-\text{OOCCH}_3$ .

#### 6.1.2 Stanovenie obsahu kyslých funkčných skupín

Humínové látky sa vyskytujú v prírode ako negatívne nabité makromolekuly a ich záporný náboj je daný prítomnosťou prevažne karboxylových a hydroxylových skupín [4].

Celková kyslosť sa určila zo spotreby odmerného roztoku, jeho koncentrácie a navážky podľa (1):

$$\text{celková kyslosť} = \frac{\Delta V \cdot c \cdot 1000}{m}, \quad (1)$$

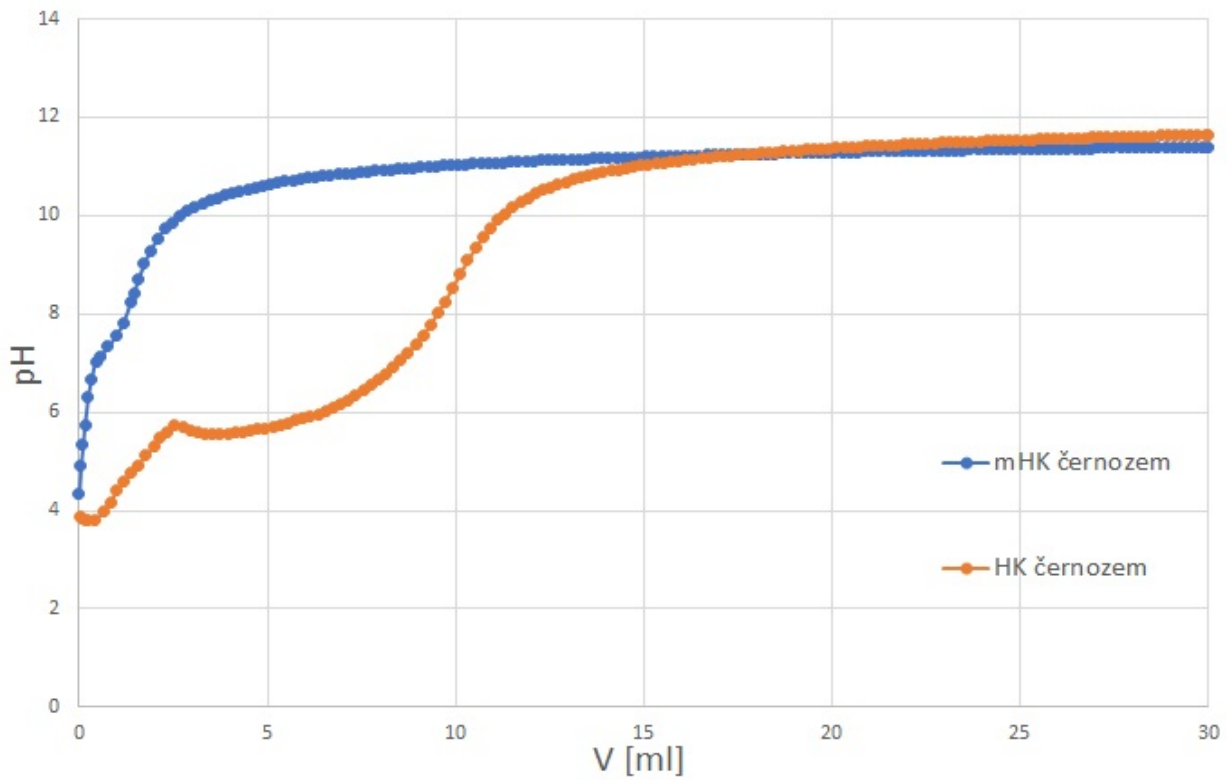
kde  $\Delta V$  je rozdiel spotreby titračného činidla pre titráciu (rozdiel prvého a posledného EP) v  $\text{dm}^3$ ,  $c$  je molárna koncentrácia kyseliny v  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $m$  návažok HK v g.



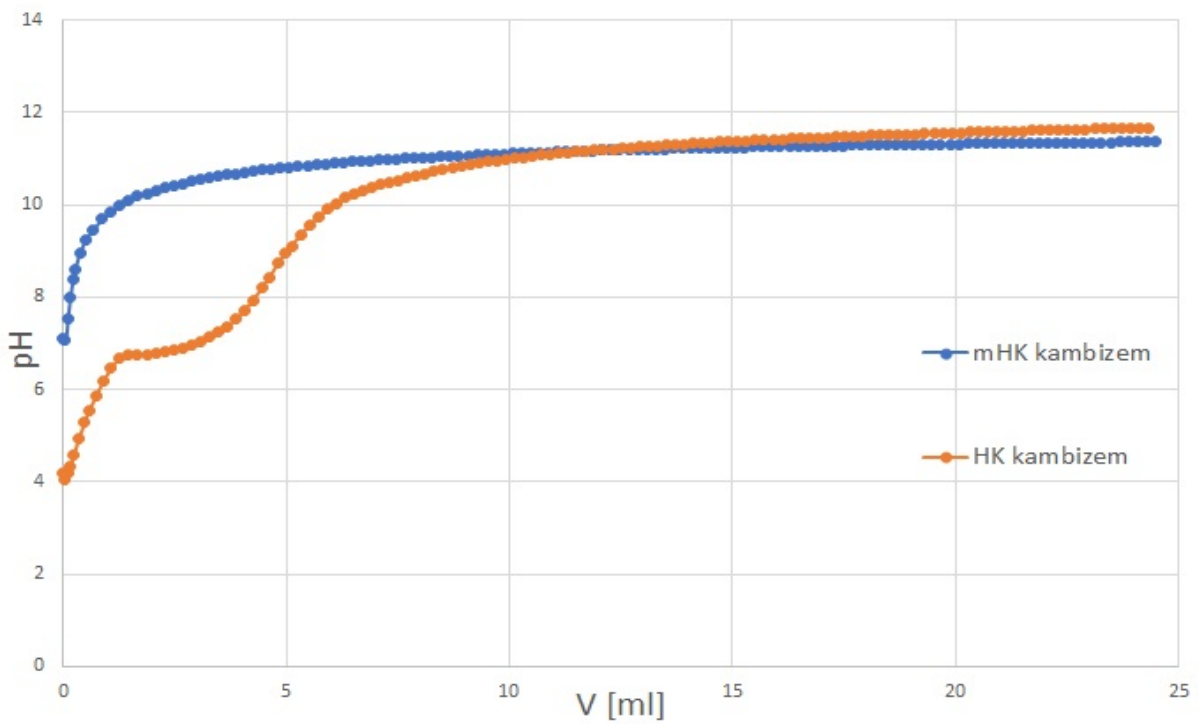
Ako môžeme vidieť v *Tab. 4*, najviac kyslých funkčných skupín, čiže najvyšší obsah –COOH skupín obsahuje Leonardit. Na *Obr. 14* a *Obr. 15* priamej titrácie, pri vzorkách HK sme získali typický tvar titračnej krivky s inflexnými bodmi. Titračná krivka metylovanej humínovej kyseliny nemá klasický esovitý tvar a jej pH prudko narastá už po prvých prídavkoch NaOH. Celková kyslosť priamej titrácie pri metylovaných vzorkách je blízka nule z čoho môžeme usúdiť, že pri úprave došlo k úplnej metylácii karboxylových skupín vzoriek.

*Tab. 4: Vypočítané hodnoty celkovej kyslosti humínových kyselín*

<b>Druh HK</b>	<b>Priama titrácia [mmol·g<sup>-1</sup>]</b>	<b>Spätná titrácia [mmol·g<sup>-1</sup>]</b>
HK Leonardit	8,11	29,81
HK kambizem	2,75	10,24
mHK kambizem	0	7,01
HK černozem	4,22	13,34
mHK černozem	0,73	4,50



Obr. 14: Porovnanie titračnej krivky metylovanej a pôvodnej vzorky HK černozem pri priamej titrácii



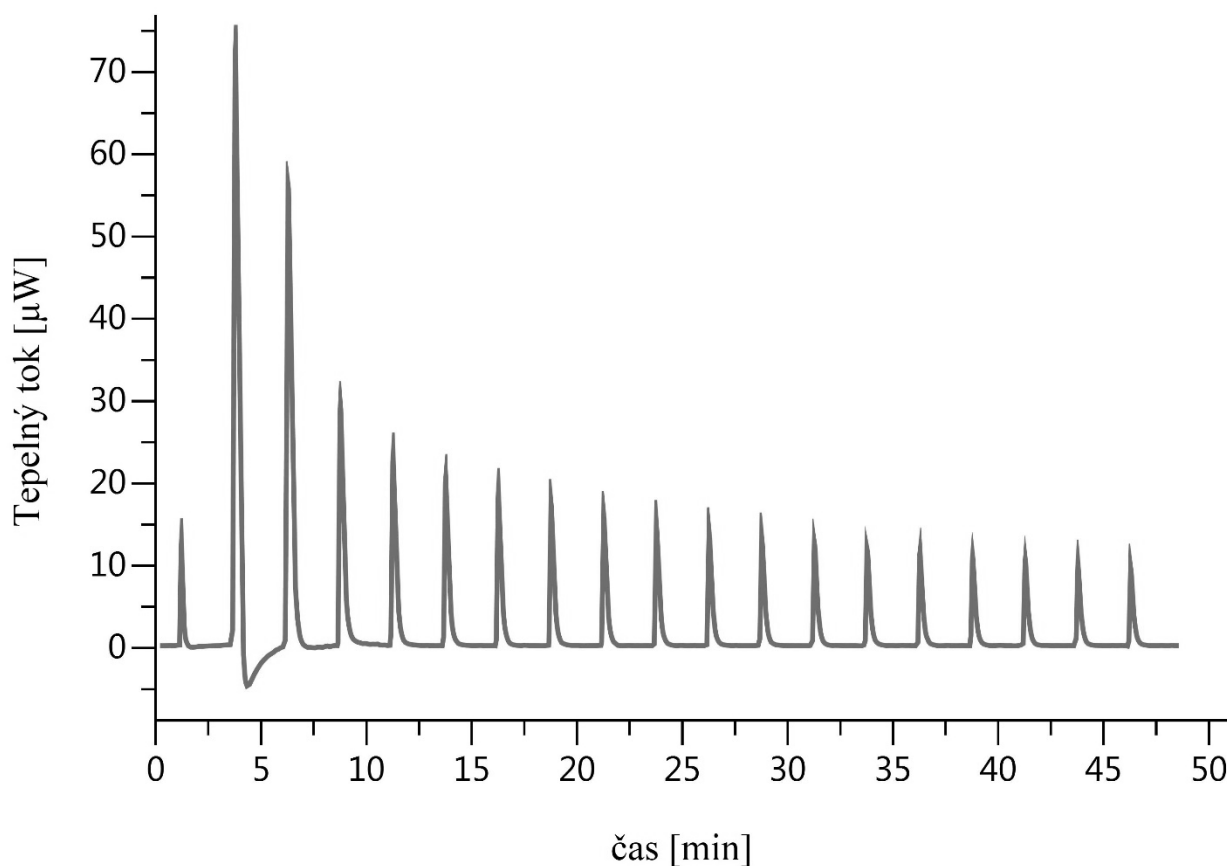
Obr. 15: Porovnanie titračnej krivky metylovanej a pôvodnej vzorky HK kambizem pri priamej titrácii

## 6.2 Interakcia humínových kyselín s tenzidmi

Výsledkom merania pomocou izotermálneho titračného kalorimetra je závislosť tepelného toku na čase, jedná sa o takzvanú kalorimetrickú titračnú krivku. Píky krivky sa následne dajú integrovať a získame závislosť zmeny väzbovej entalpie  $\Delta H$  na koncentrácii titračného roztoku.

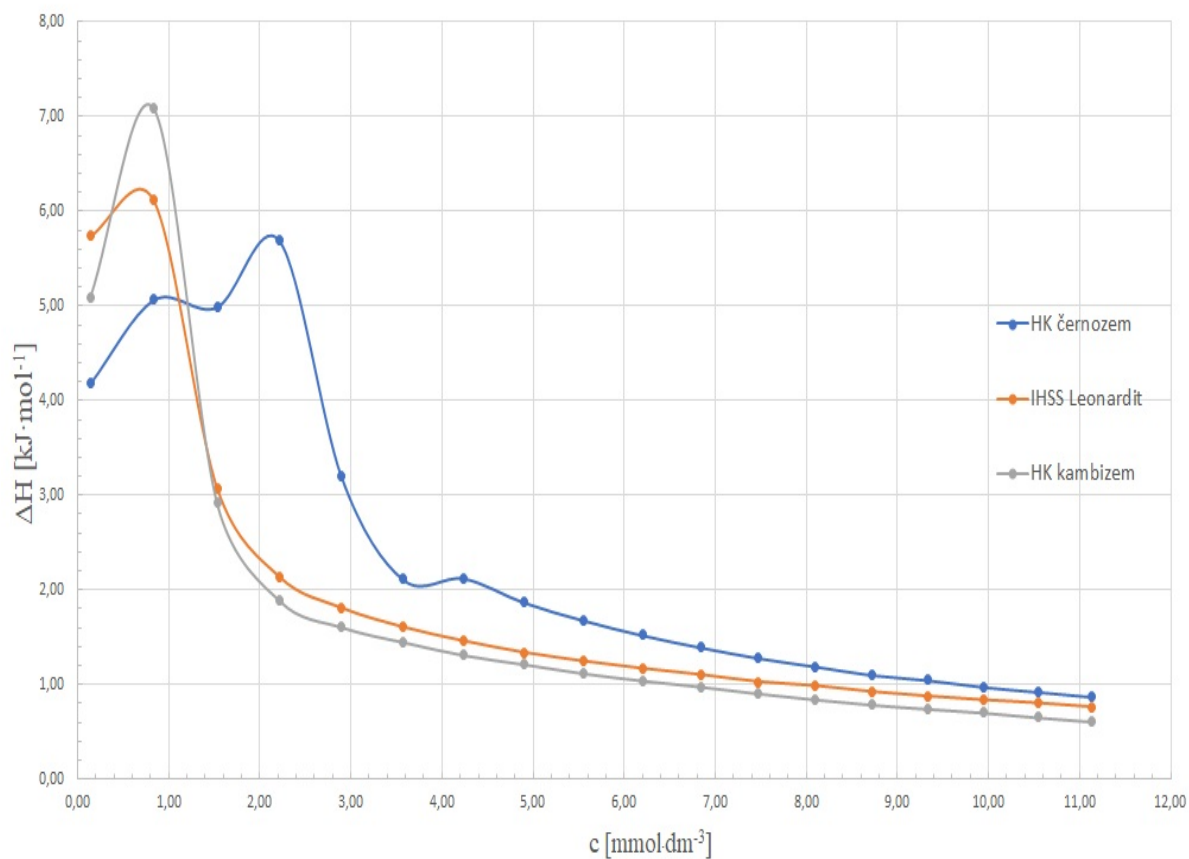
V súčasnej dobe existuje stále málo štúdií, ktoré by sa zaoberali interakciou HK s tenzidmi pomocou ITC, preto sme si na meranie zvolili 3 rôzne koncentrácie Septonexu a pozorovali správanie humínovej kyseliny. Konkrétne sme použili tieto tri koncentrácie  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Pri meraní sme v mernej cele použili roztok HK s koncentráciou  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a ako východziu meranú vzorku sme zvolili Septonex s koncentráciou  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Na *Obr. 16* je znázornený vzorový priebeh titrácie Septonexu do štandardnej vzorky IHSS Leonarditu. Je z neho zrejmé, že priebeh titrácie bol prevažne endotermický a s časom sa znižovala jeho interakcia s vybraným tenzidom Septonexom.



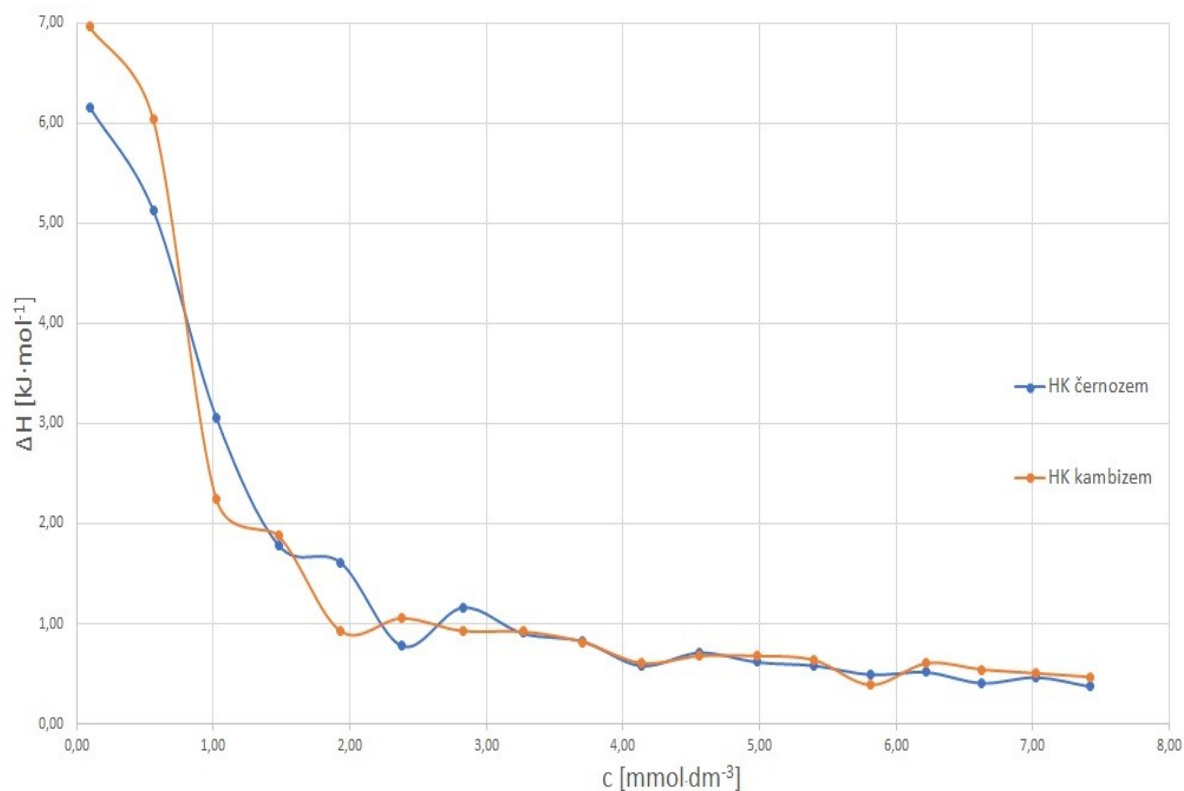
*Obr. 16: Titrácia Septonexu ( $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) do Leonarditu*

Následne sme porovnávali priebeh titrácie Septonexom ( $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) s našimi tromi vzorkami HK (Obr. 17): IHSS Leonarditom, HK černoze a HK kambizem. Pri HK z černoze pozorujeme krivku esovitého tvaru s inflexnými bodmi a táto vzorka interaguje s tenzidom najlepšie.



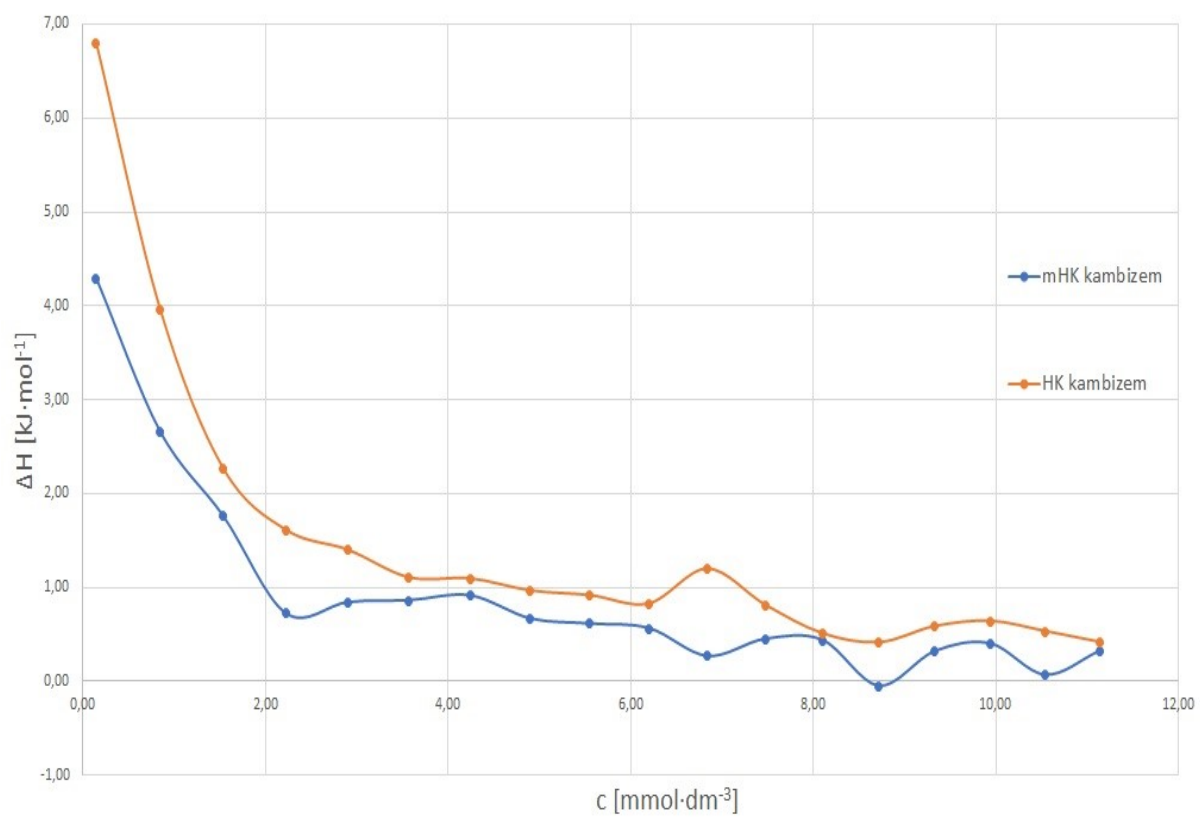
Obr. 17: Titrácia HK černoze, IHSS Leonarditu a HK kambizeme Septonexom  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Pre porovnanie charakteru signálu sme použili na titráciu vyizolovaných humínových kyselín z černoze a kambize aj Septonex s koncentráciou  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 18). Ani v jednom prípade sme nezaznamenali typickú titračnú krivku, signály pred integráciou mali striedavý charakter endotermického a exotermického signálu, no vzorka HK izolovanej z kambize mala signál o niečo silnejší.



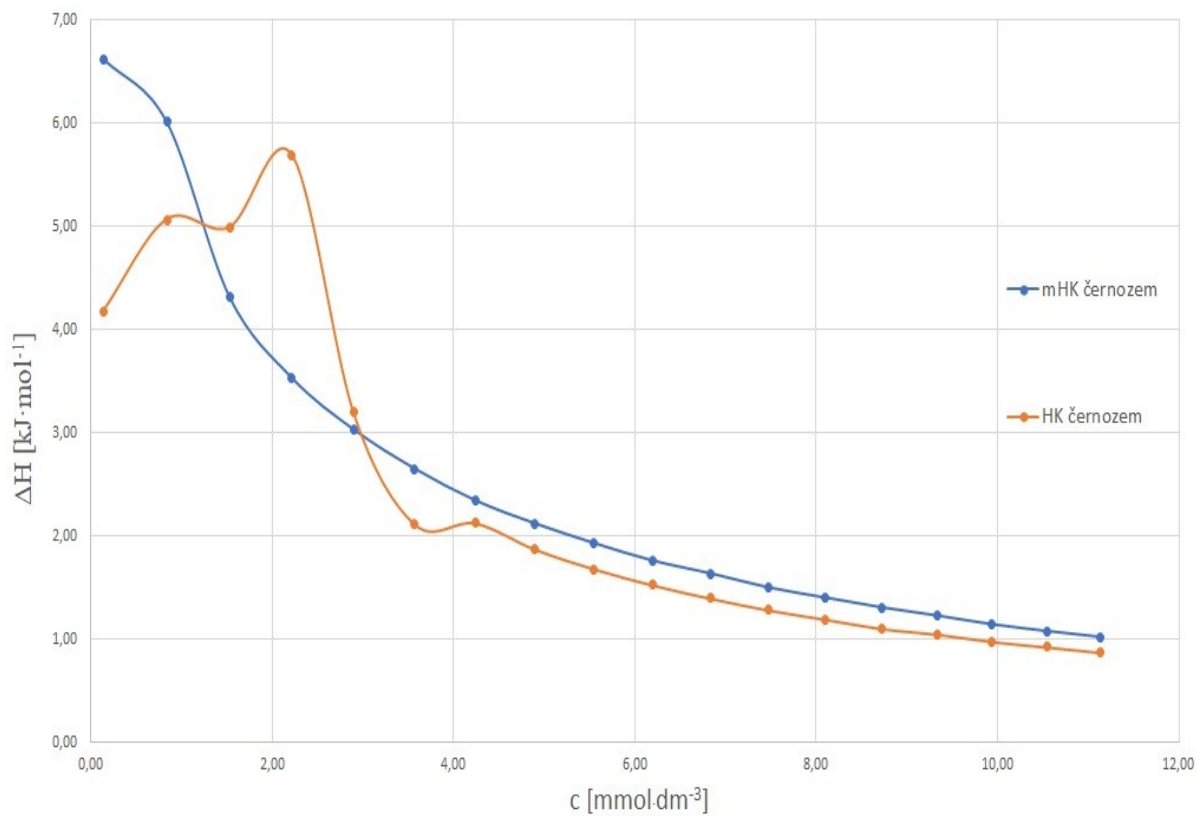
Obr. 18: Titrácia HK černoze a HK kambize Septonexom  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Pri meraní vzorky kambizeme môžeme vidieť (Obr. 19), že väzbová entalpia je o mnoho vyššia pri vzorke pôvodnej HK. Je to zo zrejmého dôvodu, že pri upravenej vzorke HK kambizeme došlo k selektívnej blokácii funkčných skupín.



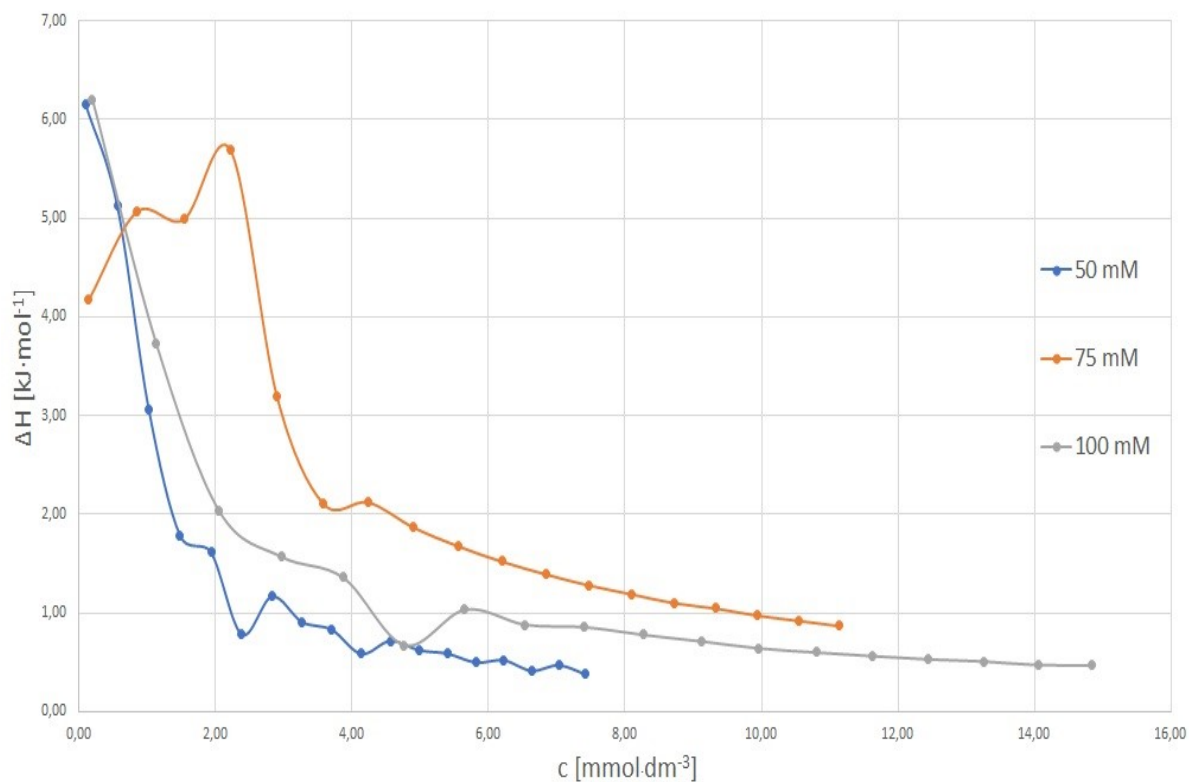
Obr. 19: Titrácia HK kambizem (pôvodnej a upravenej) Septonexom  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Titraciu HK černoze (pôvodnej a metylovej) pomocou nami optimálnej koncentrácie Septonexu s koncentráciou  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  je zobrazená na *Obr. 20*. Na ňom môžeme vidieť, že v prípade mHK černoze dochádza k nižšej interakcii s tenzidom ako pri pôvodnej vzorke HK, opäť vďaka selektívnej blokácii karboxylových skupín.



*Obr. 20: Titracia HK černoze (pôvodnej a upravenej) Septonexom  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$*

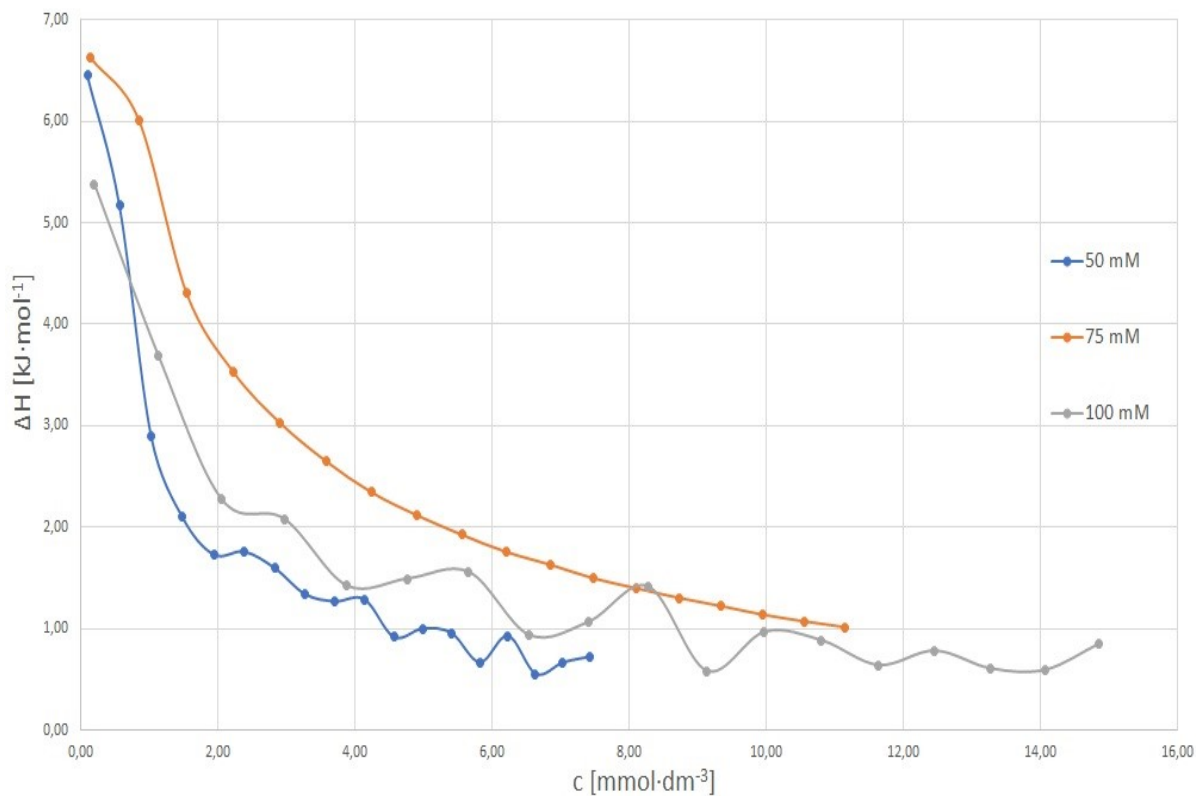
Na Obr. 21 môžeme vidieť priebeh titrácie černozeme Septonexom, ktorý mal rôznu koncentráciu. Ako najlepšie javiaci je Septonex s koncentráciou  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , kde pozorujeme po integrácii titračnú krivku s typickým esovitým tvarom. Pri zvyšných koncentráciách došlo k rýchlemu poklesu väzbovej entalpie.



Obr. 21: Titrácia HK černozom Septonexom  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



V prípade metylovanej vzorky černoze (Obr. 22) sme nezaznamenali typický tvar titračnej krivky z čoho vieme usúdiť správnu metyláciu HK izolovanej z černoze. Chaotický tvar kriviek pri použití Septonexu s koncentraciou  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  bol spôsobený nestálym signálom, kedy sa pri titrácii striedal endotermický a exotermický charakter signálu.



Obr. 22: Titrácia upravenej HK černoze Septonexom  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $0,075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

## 7 ZÁVER

Táto diplomová práca je zameraná na štúdium pôdnej organickej hmoty a jej interakcii s polutantmi pomocou mikrokolorimetrických metód. Prvým cieľom práce bola izolácia organickej hmoty z rôznych typov pôd. Následne sme vyizolované humínové kyseliny podrobili metylácii, aby sme mohli izotermálnou titračnou kalorimetriou preštudovať interakciu pôvodnou aj upravenej humínovej kyseliny.

V experimentálnej časti sa alkalickou extrakčnou metódou izolovali z černoze a kambize humínové kyseliny, pričom časť sme podrobili selektívnej metylácii pomocou TMS-DM. Následne sa elementárnou analýzou stanovilo prvkové zloženie oboch druhov humínových kyselín a vďaka termogravimetrii sme určili obsah popola v pôvodných aj metylovaných HK.

Celkovú kyslosť sme stanovili priamou a spätnou titráciou. Výsledky nám ukázali, že celková kyslosť metylovanej humínovej kyseliny bola nulová (u vzorky HK izolovanej z kambize), prípadne približná nule (pri vzorke HK izolovanej z černoze), z čoho môžeme konštatovať, že vzorky boli upravené metyláciou správne.

Interakcie humínových kyselín s polutantmi, či už pôvodných alebo metylovaných boli študované izotermálnou titračnou kalorimetriou, kde sme ako polutant použili kationaktívny tenzid Septonex. V práci sme porovnávali rôzne koncentrácie Septonexu s izolovanou humínovou kyselinou. Charakter reakcie medzi nimi môžeme označiť ako endotermický, to znamená že sa teplo v priebehu reakcie zúžitkovalo.

Sledovaním nameraných výsledkov môžeme usúdiť, že najlepšia interakcia tenzidu so vzorkami bola pri izolovanej HK z černoze, pričom najoptimálnejšia koncentrácia tenzidu sa nám javila  $0,075 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pri meraní sa nám potvrdil predpoklad, že HK by mali mať vyššiu schopnosť interakcie ako ich metylované verzie, to znamená že pri interakciách hraje veľmi dôležitú úlohu selektívna blokácia karboxylových skupín.

Vďaka rozvíjajúcim sa znalostiam vedeckej obce zistiť interakcie HK s polutantmi, majú humínové kyseliny veľkú budúcnosť k zvýšeniu ochrany životného prostredia.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, **102**(4), 262-268.
- [2] PICCOLO, Alessandro. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*. Elsevier, 2002, , 57-134. *Advances in Agronomy*.
- [3] TOBIAŠOVÁ, Erika, Gabriela BARANČÍKOVÁ a Erika GÖMÖRYOVÁ. *Pôdna organická hmota*. Prvé. Nitra: Vydavateľstvo SPU v Nitre, 2016. ISBN 9788055215839.
- [4] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahom huminových látok. *Chemické listy*. 2010, **104**(11), 1015-1022.
- [5] GHABBOUR, Elham a Geoffrey DAVIES. *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 08-540-4799-9.
- [6] VANLOON, Gary a Stephen DUFFY. *Environmental chemistry: a global perspective*. 3rd. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN 01-985-6440-6.
- [7] HENDRICKS, David. *Water treatment unit processes: physical and chemical*. 1st. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. ISBN 978-082-4706-951.
- [8] *The Value of Humic Substances in the Carbon Lifecycle of Crops: Humic Acids, Fulvic Acids, and Beyond*. 2016.
- [9] STEVENSON, F. *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [10] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie*. 1.vyd. Brno: VUTIUM, 1998. ISBN 80-214-1167-8.
- [11] TAN, Kim. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, 2003. ISBN 08-247-4272-9.

- [12] ERRO, J., O. URRUTIA, R. BAIGORRI, M. FUENTES, A. ZAMARREÑO a J. GARCIA-MINA. Incorporation of humic-derived active molecules into compound NPK granulated fertilizers: main technical difficulties and potential solutions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2016, **3**(1).
- [13] UHLÍŘ, Zdeněk a Jaromír SOCHA. *Agrochemie*. 2. opr. vyd. Pardubice: VŠCHT, 1992. ISBN 80-851-1351-1.
- [14] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Structure and Properties of Natural Humic Substances of the Oxyhumolite Type. *Chemické listy*. 2005, **99**(10), 711-717.
- [15] JONES, M. a J. PARSONS. THE EFFECT OF SOIL FACTORS ON THE EXTRACTION OF SOIL ORGANIC MATTER BY ANHYDROUS FORMIC ACID. *Journal of Soil Science*. 1972, **23**(2), 119-127.
- [16] CLAPP, C. *Humic substances and chemical contaminants: proceedings of a workshop and symposium cosponsored by the International Humic Substances Society, Divisions S-2, S-1, S-3, S-4, and S-11 of the Soil Science Society of America, and Division A-5 of the American Society of Agronomy, Anaheim, California, 26-27 October 1997*. Madison, WI: Soil Science Society of America, 2001. ISBN 08-911-8837-1.
- [17] SKOKANOVÁ, a DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, **102**(5), 338-345.
- [18] KLUČÁKOVÁ, Martina a et AL. Structure and properties of humic and fulvic acids. I. Properties and reactivity of humic acids and fulvic acids. *Journal of Polymer Materials*. 2000, **17**(4), 337-256.
- [19] *Environmental Separation of Heavy Metals: Engineering Processes*. 1st. CRC Press, 2019, 396 s.
- [20] AULD, Bruce, Elizabeth MEAD a Richard MEDD. *Weeds: An Illustrated Botanical Guide to the Weeds of Australia*. Elsevier, 1987, 255 s.
- [21] Atrazín. *Arnika*.
- [22] *Abionozologie pro rostnolekáře: Poškození rostlin polutanty v ovzduší*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

- [23] BLAŽEJ, Anton. *Tenzidy*. 1.vyd. Bratislava: Alfa, 1977.
- [24] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, **99**(7), 421-427.
- [25] TOGNER, Milan. *Sborník restaurátorských prací 2-3*. Praha, 1986.
- [26] BAREŠ, Milan. *Chemie a technologie tensidů a detergentů*. 1.vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1982.
- [27] *Český lékopis: Carbethopendecinii bromidum*. Praha, 1997.
- [28] *Carbaethopendecine Bromide: Open chemistry database*. Pub Chem.
- [29] ZBÍROVSKÝ, Miroslav a Petr ŠVEC. *Speciální organické výrobky*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 1989. ISBN 80-708-0034-8.
- [30] SENESI, N., V. D'ORAZIO a T.M. MIANO. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*. 1995, 66(3-4), 273-283. DOI: 10.1016/0016-7061(94)00083-M.
- [31] YANG, Chengjian, Qingru ZENG, Yang YANG, Ruiyang XIAO, Yunzhong WANG a Hui SHI. The synthesis of humic acids graft copolymer and its adsorption for organic pesticides. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2014, 20(3), 1133-1139. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.07.001.
- [32] ARCE, Florencio, Ana C., Rocio LOPEZ, Dora GONDAR, Juan ANTELO a Sarah FIOL. Interactions Between Ionic Pesticides and Model Systems for Soil Fractions. *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. InTech, 2011. DOI: 10.5772/17021. ISBN 978-953-307-458-0.
- [33] PICCOLO, A., G. CELANO a G. PIETRAMELLARA. Adsorption of the herbicide glyphosate on a metal-humic acid complex. *Science of The Total Environment*. 1992, 123-124, 77-82. DOI: 10.1016/0048-9697(92)90134-E.
- [34] RYABOVA, I. a G. MUSTAFINA. Modification of Coal Humic Acids with Formaldehyde. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2003, **76**(2), 261-263.

- [35] TONG, Ya-jun a Zhang XIANG-LIN. *Study on humic acid modified urea formaldehyde resin by infrared spectroscopy and thermogravimetry*. In: . China, 2010.
- [36] WERSHAW, R. a D. PINCKNEY. Methylation of Humic Acid Fractions. *Science* 1978, 199(4331), 906-907. DOI: 10.1126/science.199.4331.906.
- [37] SCHNITZER, M. The methylation of humic substances. *Soil Science*. 1974, 117, 94-102.
- [38] WERSHAW, R.L., J.D. PINCKNEY a S.E. BOOKER. Pyrrolidone- a new solvent for the methylation of humic acid. *Jour. Research U.S. Geol. Survey* [online]. Denver, Colo., 1975, 3(1), 123-126.
- [39] ANDJELKOVIC, T., J. PEROVIC, M. PURENOVIC, S. BLAGOJEVIC, R. NIKOLIC, D. ANDJELKOVIC a A. BOJIC. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, **31**(3), 39-46.
- [40] KURAN, P, P JANOS, L MADRONOVA, J NOVAK a J KOZLER. Determination of OH groups in humic acids using methylation with dimethylsulfate. *Talanta*]. 2008, 76(4), 960-963. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.04.039.
- [41] GARDEA-TORRESDEY, J.L., L. TANG a J.M. SALVADOR. Copper adsorption by esterified and unesterified fractions of Sphagnum peat moss and its different humic substances. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 1996, 48(1-3), 191-206. DOI: 10.1016/0304-3894(95)00156-5.
- [42] PARK, Yeonhwa, Karen ALBRIGHT, Zu CAI a Michael PARIZA. Comparison of Methylation Procedures for Conjugated Linoleic Acid and Artifact Formation by Commercial (Trimethylsilyl)diazomethane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(3), 1158-1164. DOI: 10.1021/jf001209z.
- [43] *(Trimethylsilyl)diazomethane solution* [Sigma aldrich].
- [44] CLEMOW, L.M, G FAVAS, W.R JACKSON, M MARSHALL, A.F PATTI a P.J REDLICH. Humic acids and methylated humic acids as models for reactions of brown coal with CO/H<sub>2</sub>O and with H<sub>2</sub>. *Fuel*. 1999, **78**(5), 567-572.

- [45] KLUČÁKOVÁ, Martina, Michal KALINA, Petr SEDLÁČEK a Laurent GRASSET. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. *Journal of Soils and Sediments*. 2014, **14**(2), 368-376.
- [46] KALINA, Michal, Martina KLUČÁKOVÁ a Petr SEDLÁČEK. Utilization of fractional extraction for characterization of the interactions between humic acids and metals. *Geoderma*. 2013, **207-208**, 92-98.
- [47] Isothermal Titration Calorimetry. *In: Malvern Panalytical*.
- [48] BOUCHEMAL, Kawthar. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discovery Today*. 2008, 13(21-22), 960-972. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.06.004.
- [49] SONG, Chengcheng, Shaocun ZHANG a He HUANG. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Frontiers in MICROBIOLOGY*. 2015, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01049.
- [50] TAN, Wen, Luuk KOOPAL a Willem NORDE. Interaction between Humic Acid and Lysozyme, Studied by Dynamic Light Scattering and Isothermal Titration Calorimetry 2009, 43(3), 591-596. DOI: 10.1021/es802387u.
- [51] XU, Jinling, Luuk KOOPAL, Linchuan FANG, Juan XIONG a Wenfeng TAN. Proton and Copper Binding to Humic Acids Analyzed by XAFS Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry. 2018, 52(7), 4099-4107. DOI: 10.1021/acs.est.7b06281.
- [52] GAMBOA, C. a A.F. OLEA. Association of cationic surfactants to humic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006, 278(1-3), 241-245. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.026.
- [53] VERGÜTZ, Leonardus, Luis SILVA, Roberto NOVAIS, Maria SILVA, Aparecida MAGESTE a Ivo SILVA. Thermodynamic Characterization of Humic Acid-surfactant Interaction: *New Insights* into the Characteristics and Structure of Humic Acids. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2015, **39**(6), 1633-1642.
- [54] Hexadecylpyridinium chloride monohydrate.

- [55] SHANG, Chao a James RICE. Investigation of humate-cetyltrimethylammonium complexes by small-angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007, 305(1), 57-61.
- [56] ISHIGURO, Munehide, Wenfeng TAN a Luuk KOOPAL. Binding of cationic surfactants to humic substances. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, 306(1-3), 29-39.
- [57] ZHAO, Nan, Yizhong LV, Guixue SONG a Jing ZHANG. Sorption behavior of dodecylbenzene sulfonic acid on humic acids from Mollisol and Alluvial soils. *Environmental Earth Sciences*. 2016, 75(4).
- [58] SUBBIAH, Deepa a Ashok MISHRA. Humic acid-cetyltrimethylammonium bromide interaction: a fluorimetric study. *Luminescence*. 2009, 24(2), 84-89. DOI: 10.1002/bio.1069.
- [59] JUNG, A.-V., C. FROCHOT a J.-L. BERSILLON. Fluorescence spectroscopy as a specific tool for the interaction study of two surfactants with natural and synthetic organic compounds. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015(481), 567-576.
- [60] KOOPAL, Luuk K., Tanya P. GOLOUB a Thomas A. DAVIS. Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, 275(2), 360-367. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.02.061.
- [61] SWIFT, Roger. Organic Matter Characterization In: SPARKS, D.L. *Methods of Soil Analysis: Part 3: Chemical Methods*. Soil Sci. Soc. Am. Book Series, 1996, s. 1018-1020.



## 9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

### 9.1 Zoznam použitých skratiek

at.%	atómové percentá
CTAB	cetyl trimetylamonium bromid
CPC	cetylpyridín chlorid
Da	Dalton
DADMAC	polydialyldimetylamonium chlorid
DPC	dodecyl pyridín chlorid
DTGS	deuterizovaný triglycerínsulfán
EEMF	fluorescenčná spektroskopia s excitačne emisnou maticou
EP	ekvivalentný bod
FK	fulvinová kyselina
FT-IR	infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
hm.%	hmotnostné percentá
ITC	izotermálna titračná kalorimetria
LSZ	lyzozým
MCPA	kyselina (4-chlor-2-metylfenoxy) octová
PAHA	purifikovaná Aldrich humínová kyselina
PAL	povrchovo aktívna látka
POH	pôdna organická hmota
PQ	paraquat
SAXS	röntgenový rozptyl malých uhlov
SDS	dodecylsulfát sodný
SFS	synchronna fluorescenčná spektroskopia

TGS	triglycínsulfát
TMS-DM	trimetylsilyldiazometán

## 9.2 Zoznam použitých symbolov

$c$	molárna koncentrácia	$[\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}]$
$m$	hmotnosť	$[\text{kg}]$
$T_c$	teplota	$[\text{°C}]$
$\Delta H$	reakčná entalpia	$[\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}]$
$\Delta S$	reakčná entropia	$[\text{J}\cdot\text{K}^{-1}]$
$T$	teplota	$[\text{°C}]$
$\Delta T$	rozdiel teplôt	$[\text{°C}]$
$\Delta V$	rozdiel spotreby titračného činidla	$[\text{dm}^3]$