



**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

**VLIV APLIKACE LIGNITU NA DISTRIBUCI ORGANICKÉHO  
UHLÍKU V PŮDĚ**

INFLUENCE OF THE APPLICATION OF LIGNITE ON THE DISTRIBUTION OF ORGANIC CARBON IN SOIL

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. David Širůček**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1370/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Bc. David Širůček**  
Studijní program: Spotřební chemie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Vliv aplikace lignitu na distribuci organického uhlíku v půdě

### Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na téma studium stability organické hmoty v přírodních systémech (zaměřit se zejména na půdu).
- 2) Sumarizovat jednotlivé metodiky využitelné pro frakcionaci organické hmoty ve vybraných vzorcích přírodních organických matric.
- 3) Definovat a optimalizovat vhodnou metodiku frakcionace organické hmoty na vybraných vzorcích organické hmoty.
- 4) Využít výše optimalizovanou metodiku pro posouzení změn v distribuci organické hmoty v půdě po aplikaci podpůrné půdní látky.

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2019:

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

-----  
Bc. David Širůček  
student(ka)

-----  
Ing. Michal Kalina, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 31.1.2019

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

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci metodiky sekvenční chemické frakcionace na humeomika, aby byla využitelná k určení obsahu a distribuce organické hmoty a organických prvků v půdě. Následně je takto optimalizovaná metodika využita k posouzení vlivu aplikace lignitu jakožto půdní podpůrné látky na tyto sledované půdní charakteristiky. K těmto účelům byly tři zdrojové matrice organické hmoty (lignit, půda a roční odběr půdy po aplikaci lignitu) frakcionovány metodou sekvenční chemické analýzy. Souběžně byly tyto vzorky podrobeny klasické alkalické extrakci, kterou byl získán tzv. extrahovatelný podíl organické hmoty (NOM). Jednotlivé frakce z chemické sekvenční frakcionace a rovněž vzorky NOM byly charakterizovány metodami elementární analýzy (určení zastoupení organický prvků), termogravimetrie (obsah popela, organické hmoty a vlhkosti) a FTIR spektrometrie (strukturní analýza).

Výsledky získané z velké škály dat ze všech vyizolovaných frakcí humeomik a NOM ukázaly, že metodika sekvenční chemické frakcionace poskytuje vyšší výtěžky organické hmoty v porovnání s klasickou alkalickou extrakcí. Další nespornou výhodou je rovněž fakt, že získané frakce rozdělené podle rozpustnosti a síly vazby na půdní anorganiku je možné lépe charakterizovat fyzikálně-chemickými metodami, což poskytuje detailnější informaci o půdní organické hmotě. Z výsledků práce rovněž vyplývá, že aby lignit jako podpůrná látka mohl znatelně ovlivnit vlastnosti půdy, bylo by zapotřebí delšího časového horizontu pro vykonání více odběrů, a také opakování jednotlivých frakcionací.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

půda, lignit, organická hmota a její distribuce, aplikace podpůrné látky, humeomika, sekvenční chemická frakcionace, elementární analýza, termogravimetrická analýza, FTIR spektrometrie

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is focused on optimization of sequential chemical fractionation method to humeomics in order to be useful for determination of organic matter content and distribution and also organic elements in soil. Subsequently, the optimized method is used to assess the effect of lignite application as soil support on these soil characteristics. For these purposes, there were three source matrices of organic matter (lignite, soil and annual soil extraction after lignite application) fractionated by sequential chemical analysis. In parallel, these samples were also fractionated by classic alkaline extraction to obtain the so-called extractable fraction of organic matter (NOM). Individual fractions from sequential chemical fractionation as well as NOM samples were characterized by methods of elemental analysis (determination of organic elements), thermogravimetry (contents of ash, organic matter and moisture) and FTIR spektrometry (structural analysis).

The results obtained from a large range of data from all humeomics fractions and NOM fractions showed that the method of sequential chemical fractionation gives higher yields of organic matter compared to classic alkaline extraction. Another indisputable advantage is the fact that the obtained fractions divided according to solubility and strenght of binding to soil inorganics can be better characterized by physical-chemical methods, which provides more detailed information about soil organic matter. The results of the work also show that in order for lignite as a support substance to significantly affect soil properties, a longer time, multiple sampling and repetition of individual fractionations would be needed.

## **KEY WORDS**

soil, lignite, organic matter and its distribution, application of supporting substances, humeomics, sequential chemical fractionation, elementary analysis, thermogravimetric analysis, FTIR spektrometry

ŠIRŮČEK, David. *Vliv aplikace lignitu na distribuci organického uhlíku v půdě*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113671>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Bc. David Širůček

*Na tomto místě bych velmi rád poděkoval mému vedoucímu Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., za veškerou pomoc, věnovaný čas a poskytnutí rad, ať už v laboratoři, nebo při sepisování této práce. Dále bych rád poděkoval paní Leoně Kubikové a Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za trpělivost a ochotu při měření velké spousty vzorků, kterými mnou byli zavaleni. Hlavní poděkování ale patří celé mé rodině, která mě po všechny roky studia podporovala a poskytovala skvělé zázemí.*

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Půda a půdní organická hmota .....	9
2.2	Složení půdy.....	10
2.2.1	Mínérální podíl půdy a mineralizace .....	11
2.2.2	Organický podíl půdy .....	11
2.2.3	Půdní organismy .....	12
2.2.4	Fyzikální a chemické vlastnosti.....	13
2.2.5	Huminové látky .....	16
2.3	Lignit a lignitická organická hmota .....	20
2.3.1	Vznik lignitu .....	21
2.3.2	Složení lignitu.....	22
2.3.3	Struktura lignitu .....	24
2.4	Metody frakcionace.....	25
2.4.1	Fyzikální frakcionace .....	25
2.4.2	Chemická frakcionace .....	26
3	Současný stav řešené problematiky .....	30
3.1	Frakcionace a metody charakterizace .....	30
3.2	Aplikace podpůrných látek do půd .....	32
4	Experimentální část .....	35
4.1	Použité materiály .....	35
4.2	Použité chemikálie .....	35
4.3	Použité přístroje .....	35
4.4	Postup sekvenční chemické frakcionace na humeomika .....	35
4.4.1	Frakcionace I .....	36
4.4.2	Frakcionace II.....	37
4.4.3	Frakcionace III.....	38
4.4.4	Frakcionace IV .....	40
4.4.5	Izolace RES OM.....	40
4.4.6	Izolace NOM .....	41

4.4.7	Snižování obsahu jódu a chlóru ve vzorcích .....	41
4.5	Nastavení přístrojů .....	41
4.5.1	Elementární analýza .....	41
4.5.2	Termogravimetrická analýza .....	41
4.5.3	FTIR spektrometrie .....	42
5	Výsledky a diskuze .....	43
5.1	Sekvenční chemická frakcionace na humeomika .....	43
5.2	Vliv aplikace lignitu na distribuci organické hmoty v půdě .....	50
5.3	Struktura organické hmoty obsažené v jednotlivých frakcích humeomik .....	62
5.3.1	Frakcionace I .....	63
5.3.2	Frakcionace II .....	65
5.3.3	Frakcionace IV .....	67
5.3.4	NOM extrakce .....	68
5.3.5	ResOM extrakce .....	69
6	Závěr .....	70
7	Použitá literatura .....	71
8	Seznam zkratk .....	78

# 1 ÚVOD

Půdy jsou složeny z minerálních a organických částic různých rozměrů, které jsou uspořádány v půdní matrici. Toto uspořádání znamená, že asi 50 % veškerého objemu je obsazeno těmito částicemi a zbylých 50 % objemu je pórovitý prostor, který obsahuje vodu a vzduch a slouží jako soustava kanálků pro transport právě těchto látek. Půdní organická hmota (SOM) je jednou z půdních složek sestávající ze tří základních typů – žijící organismy (červi, hmyz, mikroorganismy), odumřelé mikroorganismy a nakonec hmota vzniklá z organických zbytků rostlin, živočichů a humus. Rozkladem prvních dvou typů vznikají živiny pro rostliny (dusík, draslík, fosfor).

Hlavní reaktivní částí organické hmoty půdy, a také vědecky nejvýznamnější složkou jsou bezesporu huminové látky – všudypřítomné přírodní látky vznikající chemickou a biologickou degradací rostlin a živočišných zbytků. Jsou v ekosystémech klíčové, protože regulují globální cykly uhlíku a dusíku, růst rostlin a mikroorganismů, transport antropogenních sloučenin a těžkých kovů a stabilizaci půdní struktury. Dodnes ale nejsou vyvíjeny žádné technologie pro řízení aktivity huminových látek, kvůli jejich velké molekulární složitosti. Existuje řada analytických technik pro jejich charakterizaci, nicméně ani jedna z těchto technik nebyla samotná shledána jako dostatečná k objasnění strukturní složitosti huminových molekul.

Obecně se HL považují za supramolekulární asociace heterogenních, relativně malých molekul, které jsou drženy pohromadě slabými nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní síly. Komplexnost huminové molekuly může být redukována postupnou destrukcí intramolekulárních interakcí, které tyto komplexní suprastruktury stabilizují, a tak mohou být izolovány jednotlivé frakce huminových látek (organické hmoty). Tyto jednotlivé frakce organické hmoty získané ze sekvenční frakcionace se nazývají humeomika. Jedná se o postupnou separaci molekul od huminových suprastruktur řízeným štěpením intermolekulárních vazeb. Struktura takto získaných frakcí „obdobných“ typů molekul s výrazně nižší heterogenitou v porovnání s původní matricí mohou být následně charakterizovány pomocí kombinace několika pokročilých analytických metod.

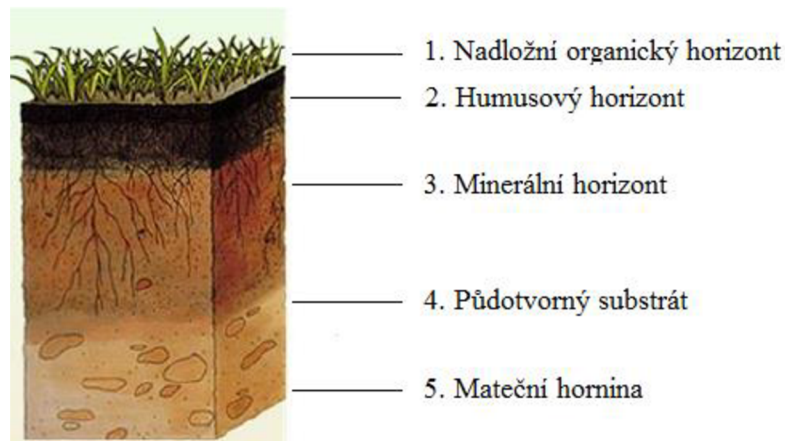
V posledních letech jsou kladeny zvyšující se nároky na výnosy zemědělských plodin, což s sebou přináší rovněž zvýšené nároky na úrodnost půdy. Z těchto důvodů se často využívají pro zvýšení úrodnosti různé látky, které se uměle přidávají. Nejčastěji jsou to hnojiva. V poslední době se ovšem výzkumy rovněž zaměřují na aplikaci alternativních podpůrných látek do půd za účelem nejenom zvýšení úrodnosti, ale rovněž vylepšení fyzikálně chemických vlastností půdy a zvýšení obsahu a stabilizace půdní organické hmoty. Mezi látky, které se hojně využívají pro aplikaci, patří například lignitový popílek (celosvětově generovaný ve velkém množství z tepelných elektráren, ale manipulace s ním a jeho likvidace představuje hrozbu), biouhel, sádra a přímo směs různých huminových kyselin.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

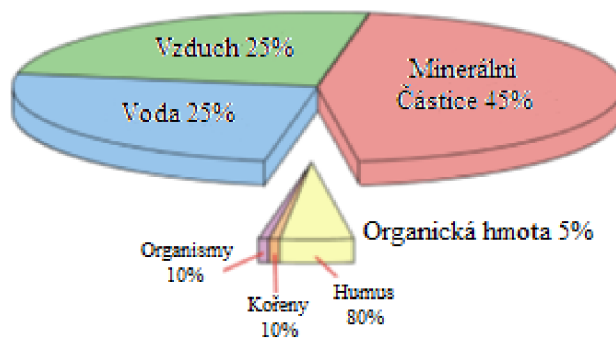
### 2.1 Půda a půdní organická hmota

Definic půdy existuje mnoho, jednou z nich je například definice ruského pedologa Dokučajeva, který ji definoval takto: „Půda je povrchová vrstva hornin, které jsou přeměněné působením vody, vzduchu a organismů. Je to samostatný přírodně-historický útvar se stále měnícími se vlastnostmi působením hornin, klimatu, rostlinných a živočišných organismů, reliéfu, nadmořské výšky a věku“. Dále například český pedolog Novák definuje půdu jako „každou zemitou povrchovou vrstvu země, která je svojí úrodností schopná stát se stanovištěm rostlin anebo kterou je možné pro tento účel přizpůsobit“ [1]. Hornina, ze které půda vzniká, se nazývá mateční hornina. Půdotvorný jev je proces zahrnující všechny děje probíhající při vzniku půdy, tedy postupnou přeměnou látek, jako jsou horniny, jejich zvětraliny a sedimenty. Tento proces probíhá na různých místech zemského povrchu různě, protože jej ovlivňují klimatičtí činitelé a v důsledku toho se tvoří půdy s odlišnými vlastnostmi (různé půdní typy). Soubor všech půd na planetě Zemi se nazývá pedosféra [2].



Obr. 1 – Půdní reliéf [3]

Půdy jsou složeny z minerálních a organických částic různých rozměrů, které jsou uspořádány v půdní matici. Toto uspořádání znamená, že asi 50 % veškerého objemu je obsazeno těmito částicemi a zbylých 50 % objemu je pórovitý prostor, který obsahuje vodu a vzduch a slouží jako soustava kanálků pro transport právě těchto látek. Souhrnně je tak tvořen třífázový systém složený z pevných látek, kapaliny a plynu. Pórovitý prostor je důležitý pro růst rostlin, tedy zejména jejich kořenů, které pro jejich správný růst vyžadují půdní prostředí bez inhibitorů. Tři nejdůležitější faktory, které jsou pro rostlinný růst důležité, jsou voda, která je převážně vypařována z listů, výživné látky a kyslík pro respiraci. Využití půd je značně ovlivněno určitými fyzikálními vlastnostmi, které zahrnují její texturu, strukturu, konzistenci, pórovitost, hustotu, barvu a teplotu [4].

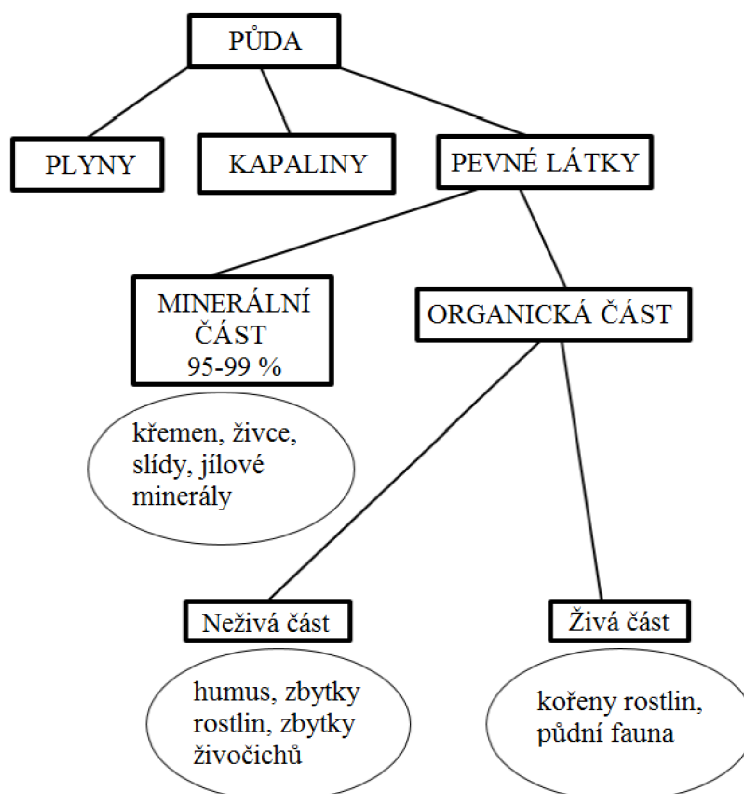


Obr. 2 – Procentuální zastoupení složek půdy [5]

Půdní organická hmota (SOM) je jednou z půdních složek sestávající ze tří základních typů – žijící organismy (červi, hmyz, mikroorganismy), odumřelé mikroorganismy a nakonec hmota vzniklá z organických zbytků rostlin, živočichů a humus. Rozkladem prvních dvou typů vznikají živiny pro rostliny (dusík, draslík, fosfor). Humus má vliv spíše na půdní strukturu, orbu a iontově výměnnou kapacitu půdy. SOM se především skládá z atomů C, H, O, N, P a S, má schopnost zadržovat vodu v půdě, ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti a také půdotvorné procesy. [6,7].

## 2.2 Složení půdy

Analýzou pomocí TGA je možné určit spalitelný podíl – organické hmota a popeloviny. Charakterizací pomocí EA lze složit atomární složení. Převážnou část budou tvořit atomy uhlíku (cca 45 hm. %), kyslíku (cca 42 hm. %), vodíku (cca 6 hm. %) a dusíku (cca 1,5 hm. %). Právě obsah organického uhlíku je ukazatelem kvality půdy. Z hlediska všeobecné charakterizace materiálového složení je možné půdu definovat jako heterogenní, vícesložkový systém, skládající se z pevné, kapalné a plynné fáze [8]. Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1, přibližně 50 % objemu připadá na pórovitý prostor, ve kterém se nachází kapalné a plynné látky. Minerální podíl půdy (95–99 %) charakterizuje složení půdy (minerální, chemické) a organický podíl (1–5 %) tvoří živé organické látky a neživé organické látky (humus, odumřelé zbytky rostlin a živočichů, produkty humifikace, cukry, apod.) [1].



Obr. 3 – Složení půd [1]

### 2.2.1 Minerální podíl půdy a mineralizace

Minerální podíl půdy je zformovaný z různých hornin, které se nachází v povrchové části zemské kůry. Jde o zrna různé velikosti (prach, písek, šterk, koloidní disperze, koloidní jíl, molekulární disperze, rozpuštěné soli, disociované ionty) a různého stupně disperzity. Tyto částice/zrna jsou zbytky mateční horniny a také primárního a sekundárního půdotvorného procesu. Velikost zrn ovlivňuje poměr obsahu vody a vzduchu v půdě, poměr kapilárních a nekapilárních pórů, ale také na fyzikální, chemické a biochemické procesy. Čím jsou zrna menší, tím se zvětšuje povrchová plocha, vzájemné přitažlivé síly mezi částicemi, a také roste soudržnost a přilnavost půdy [9].

Minerály v půdě vznikají za vhodných podmínek procesem zvaným mineralizace – rozklad půdní organické hmoty. Tímto procesem jsou organické látky rozloženy na plyny, především na sloučeniny uhlíku a dusíku a zároveň na významné živiny, které se objevují ve formě minerálů (např.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , atd.). Tento proces je částečně podmíněn aktivitou mikroorganismů v půdě, které dokáží produkovat enzymy, hydrolázy a oxidoreduktázy, kterými jsou organické molekuly hydrolyzované na menší molekuly a následně oxidované na plyny. Celkově má minerální frakce vliv na stabilitu SOM, především na zpomalení uvolňování uhlíku během rozkladu [10,11,12].

### 2.2.2 Organický podíl půdy

Půdní organická hmota je největším světovým zásobníkem uhlíku a zdrojem energie. Jak již bylo řečeno, skládá se především z atomů C, H, O, N, P a S, má schopnost zadržovat vodu, ovlivňuje půdotvorné procesy a fyzikální a chemické vlastnosti půdy. Právě z chemického

hlediska je zajímavé zadržování živin a polutantů, půdní reakce a tvorba komplexů. Obsah organické hmoty v jednotlivých ekosystémech závisí na rovnováze mezi čistou primární produkcí a rychlostí dekompozice, také jej ovlivňuje působení abiotických faktorů, například teplota a vlhkost [7,13].

Z půdních parametrů se dlouhodobě sleduje obsah půdního uhlíku, jelikož je to jeden z nejdůležitějších faktorů úrodnosti půdy. Organický podíl představuje jen nepatrnou část půdy, obvykle nepřesahuje 5 %. Tento podíl zabezpečuje biochemické procesy vývoje půd, existenci půdních organismů a formování půdní úrodnosti. Tvoří jej dvě složky, a to živé rostlinné a živočišné složky a neživá organická hmota. Obě tyto složky se vzájemně ovlivňují, živé organismy jsou zdrojem látek pro neživou organickou hmotu a naopak. Nicméně se běžně stává, že se termínem půdní organická hmota označuje jen mrtvá organická frakce tvořená chemickým a biologickým rozkladem rostlinných zbytků v různém stupni rozkladu. Je to rostlinný materiál, ve kterém je viditelná struktura, ale i úplně rozložený materiál, kde už nejsou ani známky po struktuře materiálu, ze kterého rozklad pochází. Kvantita a kvalita SOM je důležitým faktorem pro určování kvality půd [14,15].

### ***Objemová hmotnost půdy***

Různé druhy a typy půd nereagují stejně na způsob využívání, obrábění, nebo pěstování. Jejich reakce se odvíjí od jejich vlastností, zrnitosti, mineralogickém složení a také obsahu humusu. Objemová hmotnost je hlavním indikátorem jednoho z významných degradačních procesů, který ovlivňuje nejen produkční funkci půdy, ale i degradační procesy půdy a krajiny. Výsledkem je hodnota působení více faktorů, ty se dají ale rozdělit do dvou hlavních kategorií – míra odolnosti půdy vůči stlačení (závislost na vlhkosti půdy, textuře, obsahu půdní organické hmoty, obsahu vápníku, atd.) a míra zátěže na půdu prostřednictvím mechanických a dopravních prostředků (intenzita tlaku na půdu). Hodnoty objemové hmotnosti půdy jsou důležité například pro výpočet pórovitosti, zásoby půdní vody a množství látek v půdě (organická hmota a živiny) [16,17].

### **2.2.3 Půdní organismy**

Dalším faktorem ovlivňujícím stabilitu SOM jsou mikroorganismy a živočichové v půdě. Svoji činností rozkládají půdní organickou hmotu a zároveň produkují sloučeniny, které mohou půdní hmotu stabilizovat. Ve vrchní vrstvě do hloubky cca 20 cm se nachází největší podíl organické hmoty. Vyskytuje se tu cca 80 % celkového počtu půdních organismů. Mikroorganismy získávají energii a uhlík díky rozkladu SOM [18]. Mezi půdní organismy patří bakterie, houby, řasy a prvoci. V 1 g půdy je  $10^8$ – $10^9$  bakterií,  $10^5$ – $10^6$  hub,  $10^4$ – $10^5$  prvoků a  $10^3$ – $10^4$  eukaryotických řas. Množství mikroorganismů a jejich druhová skladba je v každé půdě jiná, ale existují i základní charakteristiky, které jsou pro většinu půd společné. Například, že s hloubkou klesá počet mikroorganismů, přičemž nejvíce se jich nachází v povrchovém horizontu, což souvisí s množstvím dostupných živin. Dále platí, že bakterie jsou nejčastěji vázané na pevné částice (prach, zbytky původní horniny). Bakterie jsou důležité při transformaci látek a dekompozici organického materiálu. Mezi běžné zástupce patří i aktinomycety, jejichž úlohou je rozklad některých rezistentních sloučenin (celulóza, chitin). Houby se podílejí na procesu tvorby humusu a při stabilizaci půdních

agregátů. Ve srovnání s bakteriemi mají houby obecně vyšší toleranci k aciditě, a proto se uplatňují zejména při dekompozici organické hmoty v kyselějších půdách [19,20].

K zachování vlastní fyzické celistvosti potřebují tyto organismy značné množství energie a využívají k tomu aktivní i pasivní způsoby stabilizace. Aktivní stabilizace je zajišťována neustálou opravou organismu, pasivní stabilizace je zajištěna obsahem stabilizujících, repelentních a antibiotických sloučenin v organismu, jako jsou lignin, kutin nebo tanin [21].

## 2.2.4 Fyzikální a chemické vlastnosti

### *Textura půdy*

Fyzikální a chemické zvětrávání hornin a minerálů vede k rozdílné velikosti částic v půdě – štěrk, písek, bahno a velmi malé částice jílu. Distribuce velikosti částic určuje hrubost/jemnost zeminy, a tím i její strukturu. Texturou je myšlen relativní poměr písku, bahna a jílu v půdě [4,22].

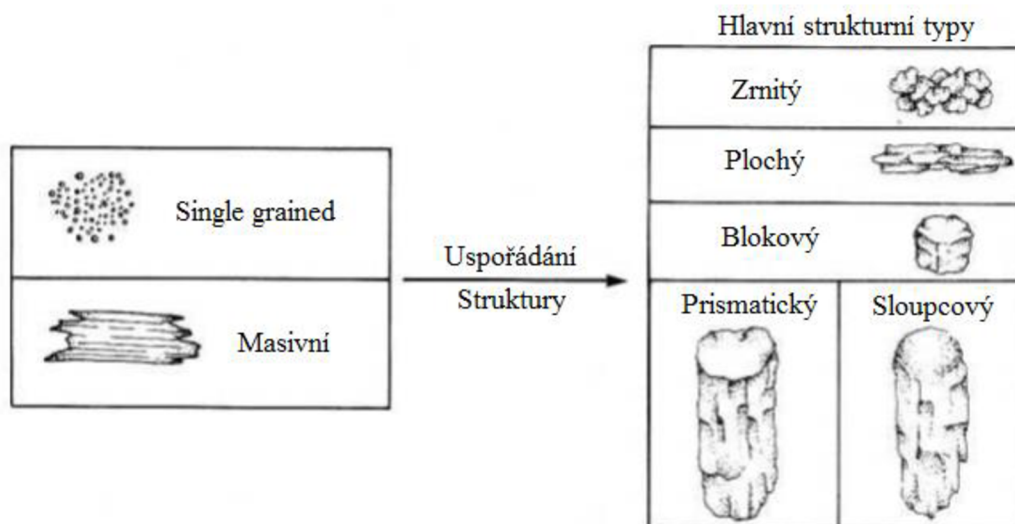
Tab. 1 – Charakteristika částic půdy [4]

Částice	Průměr [mm]	Počet částic na gram	Povrch částic na gram [cm <sup>2</sup> ]
Velmi hrubý písek	2,00–1,00	90	11
Hrubý písek	1,00–0,50	720	23
Středně hrubý písek	0,50–0,25	5 700	45
Jemný písek	0,25–0,10	46 000	91
Velmi jemný písek	0,10–0,05	722 000	227
Naplaveniny (bahno)	0,05–0,002	5 776 000	454
Jíl (hlína)	<0,002	90 260 853 000	8 000 000

### *Struktura půdy*

Textura půdy je vztažena na velikost částic půdy, zatímco struktura se používá s ohledem na uspořádání těchto částic. Písek, bahno a jílovité částice jsou typicky uspořádány do sekundárních částic – agregátů. Velikost a tvar těchto agregátů určuje strukturu půdy. Spolu s texturou je důležitá pro pochopení vlivu vody, vzduchu a snadnosti penetrace kořenů do půdy. Makroskopické uspořádání většiny agregátů vede k existenci vnitřních prostorů, které jsou mnohem větší, než prostory mezi jednotlivými pískovými a jílovými částicemi. Pokud je v půdě nedostatek vody, vede to ke vzniku trhlin mezi jednotlivými agregáty a umožňuje snadnější pohyb vody. Když v půdě dostatek vody, jíl expanduje, tyto trhliny mezi agregáty se uzavrou a půda se stává méně propustnou [4,22].

Klasifikace probíhá na základě tvaru. Existují 4 základní konstrukční typy – sféroidní, ploché, blokové a prismatické. Tyto tvary umožňují vznik zrnitých, plochých, blokových a hranolových typů struktury. Pro vznik struktury existují dvě podmínky, tou první je množství písku, kdy s větším množstvím roste zrnitost a nespojitost (označovány jako „single grained“). Druhou podmínkou je množství jílu, kdy půdy s jejich větším obsahem bývají velmi masivní a spojité [4,22].



Obr. 4 – Strukturální typy půd [4]

### **Konzistence půdy, hustota a pórovitost**

Konzistencí je myšlena odolnost půdy před deformací, nebo prasknutím. Je určena kohezními a adhezními vlastnostmi půdní masy. Zatímco struktura se zabývá tvarem a rozlišitelností přírodních půdních agregátů, konzistence se zabývá pevností a povahou působících sil mezi písčitémi a jílovitými částicemi. Je důležitá pro obdělávání a transport živin. Písčité půdy mají minimální adhezivitu a kohezivitu, tak se písek snadno deformuje a například pro těžkou techniku obdělávající tuto půdu je velmi snadné uvíznout. Jílovité půdy se zase s obsahem vody stávají lepivými, proto se při popisu konzistence uvažuje obsah vody v půdě. [4,22].

S konzistencí také souvisí hustota a pórovitost. Protože je půda složena z minerálních a organických částic různého složení a hustoty, není snadné hustotu definovat. Organické materiály mají hustoty v rozmezí  $2,56\text{--}2,76\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  a křemen jako minerální materiál má hustotu  $2,65\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Většina minerálních půd se skládá převážně z minerálů a jen malým množstvím organické hmoty, tudíž se jako průměrná hustota uvažuje  $2,65\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Dále se ještě uvažuje sypaná hustota, která je definována jako hmotnost na jednotku objemu půdy vysušené v peci [4,22].

Jak již bylo řečeno na začátku této kapitoly, objem pórů zabírá přibližně 50 % objemu půdy. Prostory těchto pórů se liší svojí velikostí a právě velikost pórovitých prostorů může být stejně důležitá jako celkové množství pórů. Písčité půdy mají menší poróznost než jílovité půdy, ale zkušenost nám říká, že voda se pohybuje mnohem rychleji přes písčitou půdu. Vysvětlení tohoto paradoxu spočívá právě v rozdílné velikosti pórů v obou druzích půd. Písek obsahuje převážně makropóry, které obvykle nemohou zadržovat vodu proti gravitaci. Póry, které jsou dostatečně malé pro udržení vody proti gravitaci, zůstávají po namočení půdy (děšť, zavlažování) vyplněné vodou a jsou nazývány jako kapilární, nebo mikropóry. Protože písky obsahují malý objem mikropórů, nejsou schopné v sobě zadržet velký objem vody, ale mají schopnost rychleji transportovat vodu [4,22].

S pórovitostí půdy také souvisí vzdušná kapacita půdy, což je schopnost půdy jímat vzduch do půdních pórů. Tento obsah vzduchu v pórech představuje „provzdušněnost“ půdy. Absolutní vzdušná kapacita představuje objem pórů, které zůstávají zaplněné vzduchem

při maximálním nasycení kapilárních pórů vodou. Hodnoty vzdušné kapacity se u zemědělských půd pohybují v rozmezí 10–20 % a u orných půd jsou tyto hodnoty zpravidla menší než 5 %. Minimální vzdušná kapacita, tj. nejmenší množství vzduchu v pórech je pro nevhodnější pro dýchání kořenů a půdní mikroorganismy. Maximální vzdušná kapacita se prakticky rovná pórovitosti a nachází se v absolutně suché půdě [4,22].

### ***Teplota půdy***

Pod bodem mrazu je velmi omezená biologická aktivita, mikroorganismy a chemické procesy jsou na teplotě závislé. Za nižších teplot se voda se půdou nepohybuje jako tekutina a pod bodem mrazu se již nepohybuje vůbec. Půdní horizont chladnější než 5 °C působí negativně na prodlužování a růst kořenů. Střídavé zmrazování a rozmrazování půd vede k expanzi a kontrakci půd, a to ovlivňuje zvětrávání skal, tvorbu struktur a růst kořenů rostlin. Tepelná bilance půdy se skládá z příjmu a ztráty tepelné energie. Přijaté sluneční záření na povrchu půdy se částečně odrazí zpět do atmosféry a částečně je absorbováno půdním povrchem. Ze slunečního záření je asi 34 % odraženo zpět do vesmíru, 19 % je absorbováno atmosférou a zbylých 47 % dopadá na zemský povrch. Tepelné ztráty půdy jsou způsobeny odpařováním vody, vyzařením zpět do atmosféry a ohříváním vzduchu nad půdou. Během dne a léta zisky energie překračují ztráty, ale během noci a zimy je to naopak. Množství tepla potřebné ke zvýšení teploty půdy silně souvisí s obsahem vody. Zvýšení teploty jednoho gramu půdy o 1 °C je třeba 0,2 kalorie tepelné energie, zatímco pro vodu je to 1,0 kalorie. Z důvodu toho, že více písčité půdy zachovávají méně vody, tak se tyto půdy rychleji zahřívají a umožňují po zimě dřívější výsadbu, než je tomu u jemně texturované půdy [4,22].

Ve studených oblastech je průměrná celoroční teplota nižší než 0 °C a množství (hloubka) zmrzlé půdy v zimě může překročit množství rozmrzlé půdy v létě. V důsledku toho se vrstva trvale zmrzlé půdy nazývá permafrost. Povrchová vrstva, která se v létě rozmrazuje a v zimě zamrzne, se nazývá aktivní vrstva a ta je využívána pouze rostlinami. Tání zmrzlé půdy v létě vede ke zvýšení vlhkosti v půdě (i bez atmosférických srážek), a tato vlhkost v půdě zůstává, protože permafrost brání pohybu vody směrem dolů kvůli gravitaci [4,22].

### ***pH půdy***

pH je velmi důležitý faktor pro rozpustnost látek (živin) v půdě, jejich využitelnost živými organismy, přístupnost živin, adsorpci a desorpci kationtů, biochemické reakce, strukturu půdy a tím i fyzikální vlastnosti. Zvýšená kyselost půdy snižuje rozpustnost mnohých látek (např. sloučeniny Ca, Mg, K, Na) mnohdy až pod životní minimum rostlin. Dále také kyselost zhoršuje i životní podmínky pro půdní organismy, protože většina z nich potřebuje pro svůj život a rozvoj neutrální prostředí [2,22].

Tab. 2 – Hodnocení kyselosti půd [2]

pH	Hodnocení	pH	Hodnocení
<3,5	extrémně kyselá	6,6–7,3	neutrální
3,5–4,4	velmi silně kyselá	7,4–7,8	slabě alkalická
4,5–5,0	velmi kyselá	7,9–8,4	středně alkalická
5,1–5,7	silně kyselá	8,5–9,0	silně alkalická
5,8–6,5	slabě kyselá	>9,0	velmi silně alkalická

### 2.2.5 Huminové látky

Huminové látky představují na Zemi největší a nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Vznikají rozkladem a přeměnou zbytků z rostlinné a bakteriální biomasy, čemuž se říká humifikace. Nejdůležitějšími látkami, které se účastní humifikace, jsou lignin, polysacharidy, melanin, lipidy, nukleové kyseliny aj. Jen v půdních uhlíkatých sloučeninách je vázáno přibližně 3,3krát více uhlíku než v atmosféře a 4,5krát více než v živých organismech [23]. Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika desítek až stovek tisíců Daltonů. Ve vodných roztocích se vyskytují jako samostatné molekuly, ale mnohem častěji jsou vzájemně spojeny slabými vazebnými interakcemi do supramolekulárních struktur [24]. HL zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi – určují kvalitu půd, vod a také složení atmosféry [23].

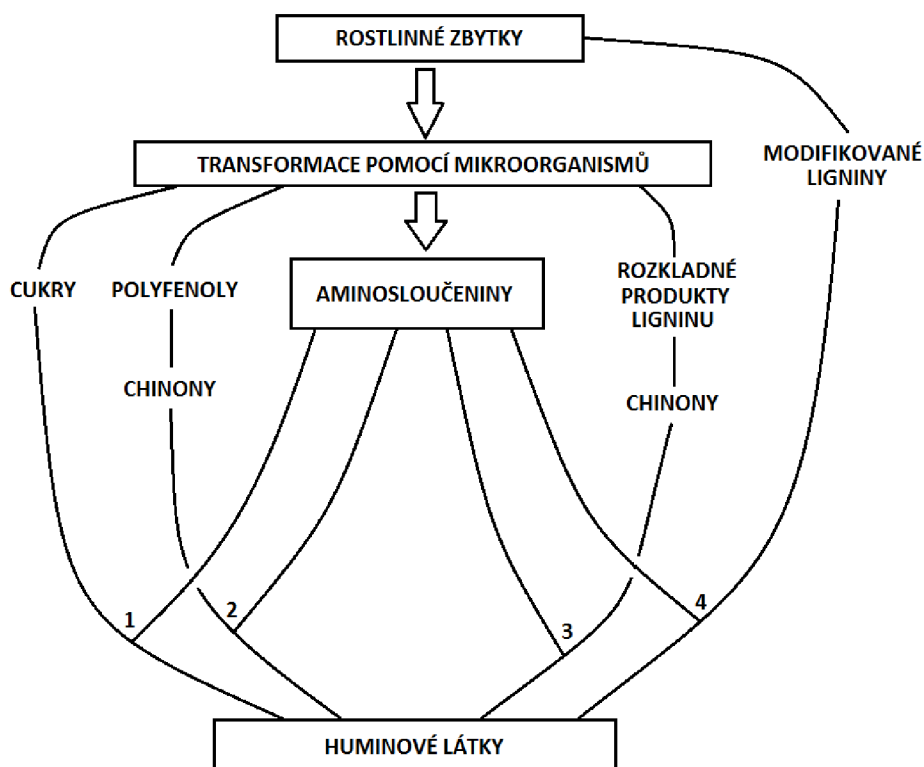
Tab. 3 – Obsah huminových látek ve vybraných přírodních materiálech [25]

Přírodní zdroj	Obsah huminových kyselin a fulvokyselin [hm. %]
Leonardit/lignit	40–85
Černá rašelina	10–40
Sapropelová rašelina	10–20
Hnědé uhlí	10–30
Hnůj	5–15
Kompost	2–5
Půda	1–5
Černé uhlí	0–1

Existuje několik teorií, které popisují jednotlivé předpokládané mechanismy vzniku HL. Lignin-proteinová teorie uvažuje lignin jako hlavní zdroj HL (Obr. 5, cesta č. 4). Polyfenolová teorie zahrnuje polyfenoly a chinony, které jsou získány buď z ligninu (Obr. 5, cesta č. 3), nebo jsou syntetizovány mikroorganismy (Obr. 5, cesta č. 2). Poslední cestou je kondenzace cukry s aminy, které vznikají jako produkty mikrobiálního metabolismu (Obr. 5, cesta č. 1) [26]. Je pravděpodobné, že výše uvedené mechanismy vzniku HL existují vedle sebe a mohou se v závislosti na podmínkách, při jakých děje probíhají, různě prolínat [24].

Obecně se procesu vzniku HL říká humifikace a tento proces zahrnuje velké množství následných biochemických reakcí [27].

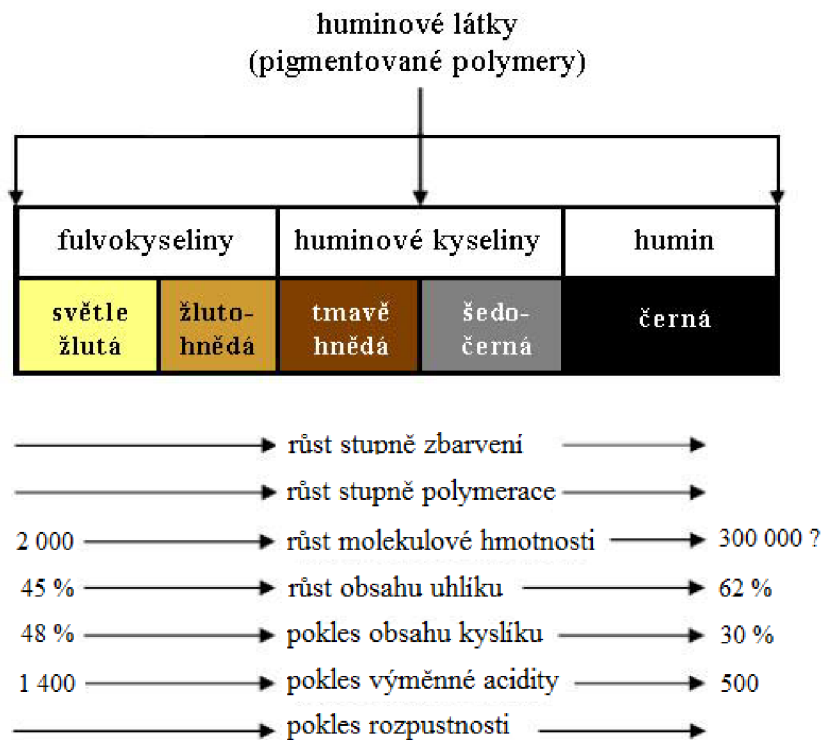




Obr. 5 – Vznik huminových látek [26]

### Dělení huminových látek

Huminové látky představují heterogenní polydisperzní směs látek, jejichž molekulové hmotnosti se pohybují přibližně v rozmezí od 2 000 do 200 000 Da. Obecně lze huminové látky rozdělit na tři základní frakce – huminové kyseliny, fulvokyseliny a huminy [28].



Obr. 6 - Dělení huminových látek [29]

**Huminové kyseliny** – představují frakci HL, která není rozpustná v kyselých a neutrálních roztocích, ale je rozpustná při vyšších hodnotách pH. Tyto kyseliny mohou být získány alkalickým loužením vzorku půdy, nebo obecně vzorku organické hmoty, a následným okyselením výluhu [28].

Tab. 4 – Běžné elementární složení HK [30]

Prvek	Obsah [hm. %]
C	52–62
H	2,8–5,8
O	31–39
N	1,7–4,9

Elementární složení (Tab. 4) je závislé na zdroji huminových látek, chemickém složení organických zbytků a podmínkách humifikace. Jsou to látky tmavé barvy a hromadí se většinou na místě vzniku. Charakteristické jsou svojí dobrou rozpustností v louhu a roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Základní složkou je aromatické jádro fenolického nebo chinoidního typu a dalších cyklických i nocyklických dusíkatých sloučenin. Obecně jsou HK považovány za nejhodnotnější produkt humifikačních procesů v půdě, výrazně ovlivňují vlastnosti půdy jako je úrodnost, kationtově výměnná kapacita, texturu a strukturu půd, atd. V nasyceném stavu jsou stále a vysoce odolné vůči mineralizaci [30].

**Fulvokyseliny** – jsou to látky žluté až hnědé barvy, které jsou díky své poměrně malé velikosti molekuly vysoce mobilní (zejména v půdním profilu). Na rozdíl od huminových kyselin jsou charakteristické dobrou rozpustností ve vodě a minerálních kyselinách, ale také v loužích i v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Od HK se liší jednodušší stavbou makromolekuly i celkovým složením, které je pro přehlednost uvedeno v Tab. 5 [30].

Tab. 5 – Běžné elementární složení fulvokyselin [30]

Prvek	Obsah [hm. %]
C	40–52
H	4–6
O	40–48
N	2–6

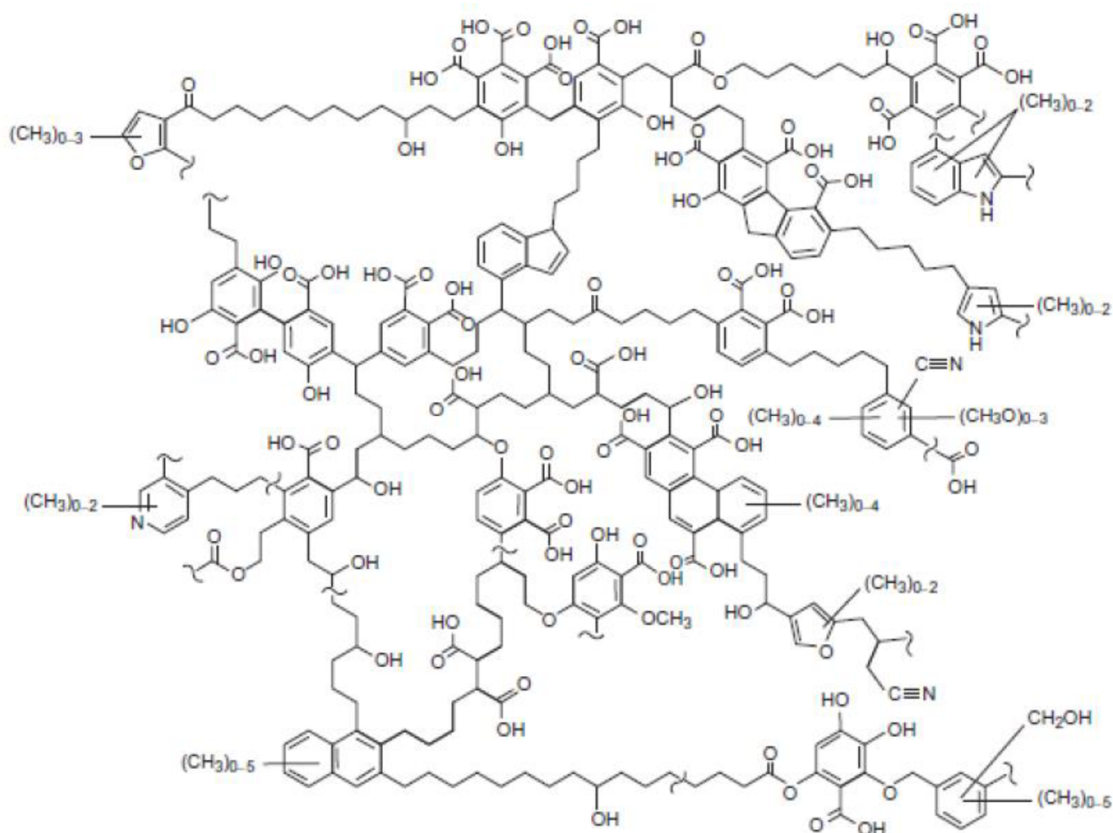
Kyselý charakter FK je dán hlavně přítomností karboxylových funkčních skupin. Výměnná kapacita vodíku kyselých funkčních skupin FK má hodnotu 600–900 mmol/100 g fulvokyseliny. Molekulová hmotnost těchto látek se pohybuje v rozmezí od 200 do 50 000 Da. V důsledku silně kyselé reakce a dobré rozpustnosti ve vodě jsou velmi agresivní na minerální část půdy, kterou zároveň ochuzují o živiny [30].

**Huminy** – jedná se pravděpodobně o silně karbonizovanou organickou hmotu, pevně vázanou na minerální podíl půdy, a proto se nedá získat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi z dekalcinované půdy. Barevně se jeví jako černé. Často jsou charakterizovány jako nerozpustné formy huminových kyselin. Humusové uhlí se vyskytuje v půdním humusu jako nejstarší složka produktů humifikace. Podle Najmra je humusové uhlí tmavá, zuhelnatělá,

na uhlík a dusík bohatá hmota, která nepeptizuje, nerozpouští se, nehydrolyzuje, nezúčastňuje se půdotvorného procesu, a proto ztratila funkci pravého humusu [30].

### **Struktura a vlastnosti HL**

Struktura huminových kyselin a celkově huminových látek je velmi složitá. Stanovení opravdové molekulové hmotnosti je centrálním problémem výzkumu HL. Molekulová hmotnost určuje konformační strukturu (velikost a tvar) a dokonce i jejich reaktivitu. Řada názorů různých autorů (Clapp, De Nobili, Stevenson, Swift, atd.) opakovaně prokázala, že není prakticky žádná shoda mezi hodnotami molekulových hmotností HK získaných různými metodami. Zde je ovšem vždy nutno brát v potaz vysokou heterogenitu huminových kyselin a rovněž způsob stabilizace jejich struktury. Z toho je zřejmé, že rozdíly ve stanovených molekulových hmotnostech huminových kyselin ze značné míry souvisí právě se špatně zvolenou metodou stanovení [31]. Znalost jejich strukturního složení je ale nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálně-chemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí. Vůbec první návrhy struktury byly předloženy Stevensonem a Harworthem v 70. letech minulého století. Předpokládalo se, že ve strukturní síti jsou primárně zabudovány polyaromatické uhlovodíky. V následujících dvou desetiletích došlo k řadě objevů ve struktuře, a to zejména díky pokrokům v oblastech instrumentální analýzy. Tyto objevy objasnily, že ve struktuře jsou zabudovány aromatické a hydroaromatické di-, tri- a tetra- kyseliny [28].



Obr. 7 – 2D struktura podle Schnitzera a Schultena [32]

Na téma struktury huminových kyselin bylo v minulosti provedeno mnoho výzkumů a byla publikována celá řada prací, nicméně dodnes stále neexistuje žádné univerzálně platné řešení.

Dřívější studie, založené na studiu chování HL v roztocích, navrhovaly, že tyto látky jsou tvořeny z komplexních směsí různých makromolekul, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou kvalitativně podobné. Nedávné studie, založené na vysokotlaké velikostně vylučovací chromatografii indikují, že HK jsou tvořeny supramolekulárními strukturami, které vznikají z relativně malých molekul propojených slabými ne vazebnými interakcemi [33]. Mezi nejvýznamnější práce shrnující problematiku výzkumu struktury huminových kyselin patří v poslední době bezesporu práce Piccola a kol. Tento autor sám k výzkumu použil velikostně vylučovací chromatografii. Výsledky jeho experimentů, stejně jako výsledky ostatních autorů [33-37], ukazují, že HK nelze chápat jako polymery, ale spíše mohou být interpretovány jako volně vázané huminové supramolekulární asociáty. V tomto konceptu si lze huminové kyseliny představit jako relativně malé molekuly různého původu, které se samovolně organizují do supramolekulárních struktur. Tyto huminové suprastruktury nejsou propojeny kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány slabými ne vazebnými interakcemi, jako jsou hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  vazby a CH-  $\pi$  vazby. Dále se také při nízkých hodnotách pH uplatňují vodíkové můstky. Hydrofilní a hydrofobní domény k sobě mohou přiléhat a ve vodě vytváří velké molekulární asociace. Intermolekulární síly určují konformační strukturu a složitost nekovalentních interakcí kontroluje jejich reaktivitu v životním prostředí. Pro posouzení konceptu supramolekulárních asociací musí být klasická definice jak HK, tak FK přehodnocena. Fulvinové kyseliny mohou být považovány za sdružení malých hydrofilních molekul, které obsahují dostatečné množství kyselých funkčních skupin, aby se zachovaly fulvinové shluky dispergované v roztoku při jakékoli hodnotě pH. Huminové kyseliny budou tedy převážně hydrofobní sloučeniny (polymethylenové řetězce, mastné kyseliny, steroidní sloučeniny), které jsou stabilizovány při neutrálním pH hydrofobními disperzními silami (van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  vazby, CH-  $\pi$  vazby). Jejich supramolekulární struktury progresivně rostou do větších velikostí tím víc, čím víc se dále formují intermolekulární vodíkové vazby při nižších hodnotách pH, dokud nedojde ke koagulaci [38].

### 2.3 Lignit a lignitická organická hmota

Lignit je velmi rozšířený přírodní materiál, který je často označován jako „mladší“ hnědé uhlí a představuje nejméně kvalitní a prouhelněný typ uhlí. Je to měkký, hnědý a hořlavý kámen vytvořený sedimentací z přírodní stlačené rašeliny, tedy z převážně rostlinných zbytků. Je považován za nejnižší stupeň uhlí, vzhledem k jeho nízké výhřevnosti a vysokému obsahu vody a kyslíku. Obsah uhlíku se pohybuje okolo 60–70 %. Lignit má vysoký obsah těkavých látek, který umožňuje snazší přeměnu na plynné a kapalné ropné produkty než vyšší uhlí [39].

Vzhledem k nízkému energetickému obsahu a typicky vysokému obsahu vlhkosti je hnědé uhlí neefektivní pro přepravu a ve srovnání s vyššími třídami uhlí s ním není obchodováno ve větších mírách. Proto je často spalován v elektrárnách blízko dolů. Ekologické využití lignitu lze nalézt při kultivaci a distribuci biologických kontrolních mikroorganismů, které potlačují choroby rostlin způsobené mikroby. Uhlík v lignitu obohacuje organickou hmotu v půdě, zatímco biologické kontrolní mikroorganismy poskytují alternativu k chemickým pesticidům. Tedy i přes fakt, že výhřevnost lignitu je nízká a obsahuje velké množství vody,

využívá se lignit primárně jako palivo. Pravděpodobně nejzajímavějším způsobem využití lignitu je jeho využití jako zdroje huminových kyselin, které běžně tvoří 10–80 % z celkové organické hmoty. Další možné využití lignitu je k výrobě koksu, jako redukčního činidla v hutním průmyslu, nebo při výrobě fosforu [39,40,41].

### 2.3.1 Vznik lignitu

Proces vzniku lignitu lze rozdělit na dvě fáze – biochemické a geochemické. Nejdříve probíhá fáze biochemická, pro tu je důležitým faktorem aktivita rozkladných organismů. Při této fázi dochází nejprve k hromadění rostlinného materiálu a později k jeho rozkladu. Tento proces probíhá na rozhraní atmosféry s litosférou, nebo hydrosférou, nebo také v hydrosféře a v prvních metrech sedimentární litosféry. V této fázi rozeznáváme dva typy reakcí, a to biochemické a chemické. Biochemické reakce probíhají formou oxidace nekromasy rozkladnými organismy. Heterotrofní organismy což jsou houby, plísňe a aerobní bakterie za přístupu kyslíku a autotrofní organismy, což jsou anaerobní bakterie rozkládající nekromasu za nepřístupu kyslíku. Chemické reakce probíhají formou oxidace, redukce a hydrolýzou a probíhají bez účasti organismů. Rostlina se poté, co odumře, stává součástí nekromasy a začne se rozkládat. Během tohoto rozkladu vznikají z plynných produktů především methan, sulfan, amoniak a oxid uhličitý. Zbylé produkty jsou tekuté, nebo pevné látky bohaté na vodík. Podle intenzity přístupu vzdušného kyslíku rozeznáváme: tlení, trouchnivění, rašelinění a hnití. Všechny tyto procesy se dějí před překrytím rozkládající se nekromasy sedimentem. Tlení vzniká při neomezeném přístupu vzduchu, který vede k dokonalému okysličování, přičemž se rozkládají ústrojné zbytky organismů. Tzv. trouchnivění nastává za menšího přístupu vzduchu a za spoluúčasti vody. Pro nedokonalý přístup vzduchu nedochází k úplnému rozkladu, ale zůstává pevný zbytek, který nazýváme trouch. Hnití probíhá na dně lagun, vnitrokontinentálních jezer, mořských pánví a zálivů, tedy v hydrosféře. Přístup vzdušného kyslíku je velmi omezen až zcela uzavřen. Rozkladnými organismy jsou pouze anaerobní bakterie. U rašelinění (humifikaci) je přístup vzdušného kyslíku omezen, nemůže se však stát, že by jeho přísun nebyl žádný. Toto omezení kyslíku probíhá kombinací biologických, chemických a geologických faktorů. Biologická ochrana spočívá v omezení života mikroorganismů vytvořením pro ně jedovatých látek. Chemická ochrana znamená ztrátu vody dehydratací koloidů, což způsobí smrt rozkladných mikroorganismů. A nakonec geologická ochrana, která znamená omezení přístupu vzdušného kyslíku (zalitím vodou, překrytím nánosem sedimentů). Jakmile přestanou existovat podmínky vhodné pro existenci rozkladných organismů, ukončí se rozkladné procesy a tím i biochemická fáze. Výsledným produktem rašelinění je rašelina, která je definována jako organická, hydrofilní, koloidní substance vytvářená rašeliněním a obsahující kolísavý podíl těl a částí vyšších rostlin do různého stupně rozložených rašeliněním, dále minerální příměs a více než 75% vody [39,42].



Obr. 8 – Rozložení bažin a rašelinišť na zeměkouli [39]

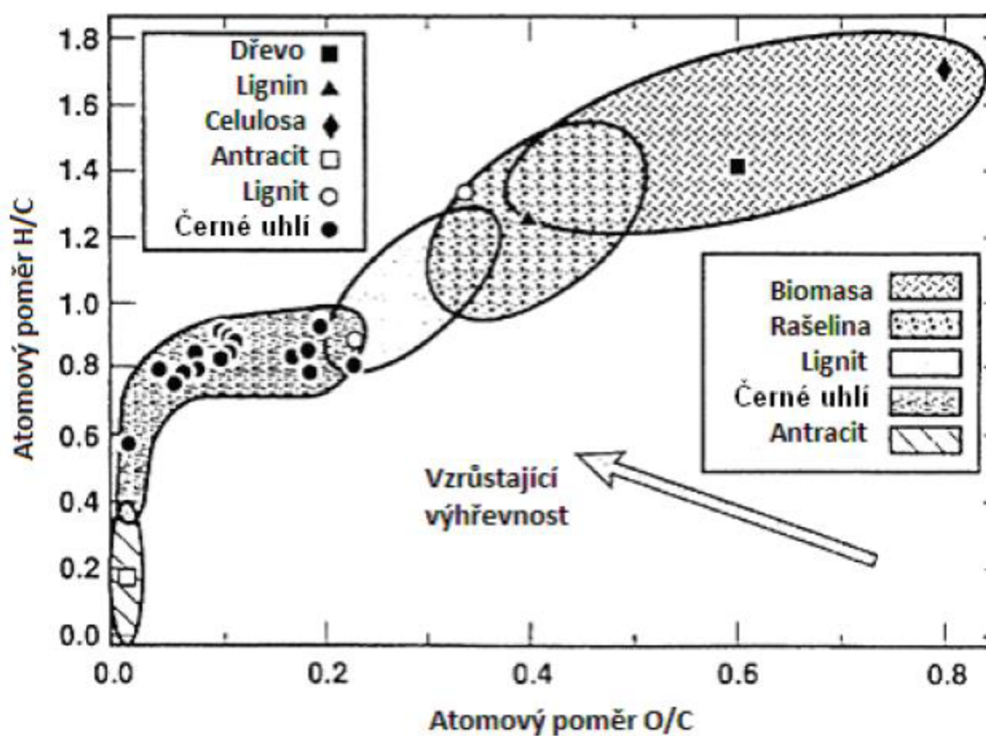
Následuje geochemická fáze, kdy už se vytváří fosilní paliva. Je to složitý geochemický proces, při kterém je nejdůležitější prouhelňování. Při tomto procesu vzniká z vrstev rašeliny hnědouhelná, černouhelná a antracitová sloj. Pro tuto fázi jsou nejdůležitějšími faktory teplota, tlak a čas. Se vzrůstající teplotou se mění chemická a strukturní stavba organické hmoty. Tlak hraje důležitou roli v ovlivňování objemu plynné fáze, tím se mění intenzita reakcí při prouhelňování. Vliv a význam časového faktoru je již menší. Spíše ukazuje, že až na výjimky se více prouhelňovaná uhlí objevují jen ve starších geologických formacích. Při procesu prouhelňování vzniká methan, který se uvolňuje. K pevným fázím řadíme rašelinu a uhlí, které je různě prouhelňované. Podle stupně prouhelňování ho nazýváme lignitem, hnědým uhlím, černým uhlím a antracitem [39,42].

### 2.3.2 Složení lignitu

Z hlediska elementárního složení je ve struktuře lignitu zastoupen zejména uhlík, vodík, dusík a síra, jejichž obsah se u jednotlivých druhů uhlí mění. Síra a dusík jsou přítomny pouze v malém množství a změna v procentuálním obsahu těchto prvků je málo významná. Nicméně prvkové složení vyjádřené hmotnostními procenty není dostačující k pochopení struktury a stavby organické hmoty uhlí [43].

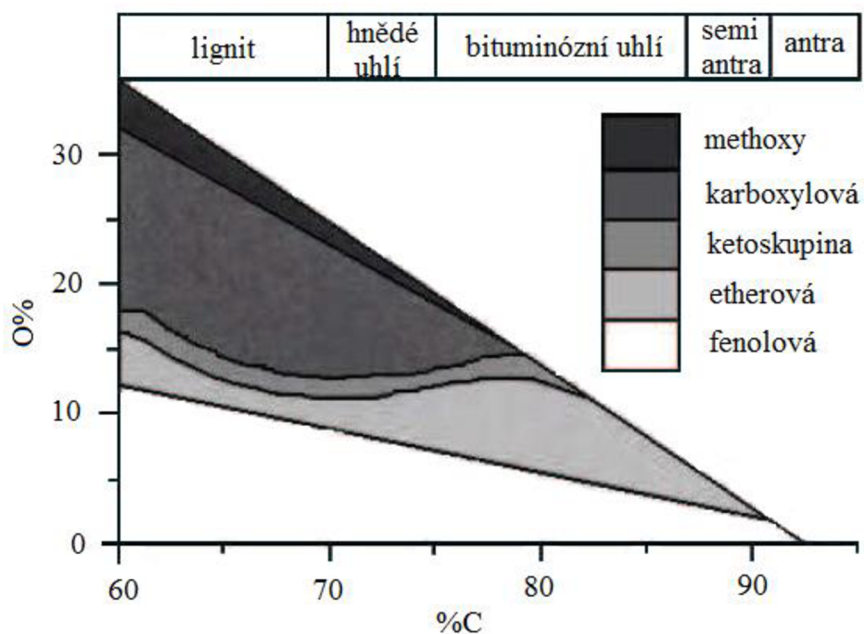
Tab. 6 – Prvkové složení jednotlivých druhů uhlí [44]

Druh uhlí	Obsah C [hm. %]	Obsah H [hm. %]	Obsah O [hm. %]	Obsah N [hm. %]
Rašelina	50–60	4,5–6,0	33–40	0,9–3,5
Lignit	<65	<6	19–33	<1
Hnědé uhlí	65–69	<6	10–19	<1
Černé uhlí	69–92	<5	10–2	<1
Antracit	86–98	<3	<2	<1



Obr. 9 – Van Kreveleniv diagram pro různé uhlikaté materiály [45]

Měnící se elementární složení se odráží v atomovém poměru H/C, který se snižuje s postupujícím prouhelněním, viz Obr. 9. Kyslík se vyskytuje zejména v karboxylových, karbonylových, hydroxylových a methoxylových funkčních skupinách, ale jak je patrné z Obr. 10, distribuce těchto skupin se s druhem uhlí mění [46].



Obr. 10 – Změna kyslíkatých funkčních skupin v závislosti na obsahu uhlíku [46]

Co se týče dusíku, jeho většina se vyskytuje ve formě pyrrolu (převažuje) a pyridinu, kdy celkový obsah dusíku roste do zhruba 85 hm. % uhlíku a dále se již nezvyšuje. Také se může vyskytovat kvartérní dusík, který vzniká interakcí pyridinu s karboxylovou nebo

karbonylovou skupinou, nicméně množství kvartérního dusíku bude jen malé [47,48]. Síra se v uhlí vyskytuje v organické i anorganické formě, kdy z anorganické formy převažuje pyrit, v menším množství pak i jiné sulfidy, nebo sírany. Organická síra se vyskytuje ve formách thiolů, sulfidů, disulfidů, thiofenů a benzothiofenů. Se zvyšujícím prouhelněním se zvyšuje podíl aromatické síry hlavně ve formě thiofenu. Nicméně je třeba si uvědomit, že i přes všechny zobecnění, může mít uhlí stejného druhu odlišnou distribuci sirných skupin [49,50].

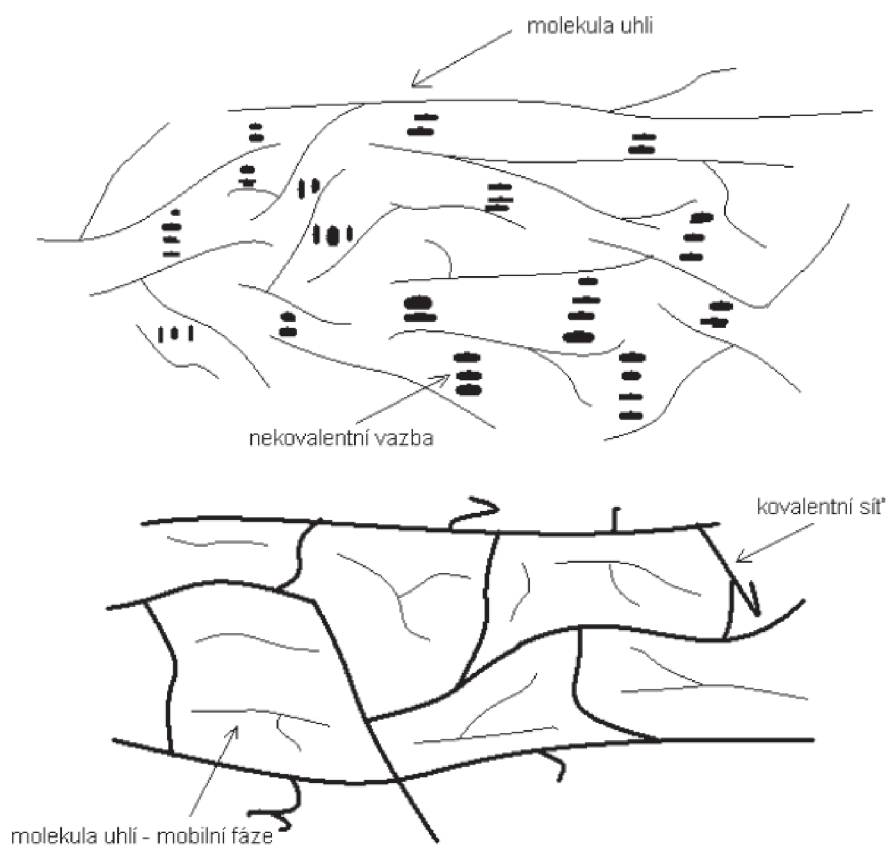
### 2.3.3 Struktura lignitu

Existuje více než 134 modelů uhlí na molekulární úrovni. Prvním modelem lignitu byl model od Wendera roku 1976 a sestával pouze z 92 atomů se sumárním vzorcem  $C_{42}H_{40}O_{10}$ . Tento model obsahoval aromatické kruhy, síťování alifatickými řetězci a různé kyslíkaté funkční skupiny. Následoval Philipův model se sumárním vzorcem  $C_{115}H_{125}O_{17}NS$ , který byl založený na řetězci benzofuranových jednotek s aromatickými a alifatickými řetězci. V tomto modelu byly poprvé zmíněny heteroatomy dusíku (indol) a síry (thiol) a vodíkové můstky. Další model byl od Wolfruma se sumárním vzorcem  $C_{227}H_{183}O_{35}N_4S_3CaFeAl$ , který nově obsahoval kondenzované aromáty a hydroaromáty, heteroatomy vyskytující se ve více formách (amidy, aminy, indoly, thioly, thiofeny, thioethery) a koordinační vazby kovů k polárním funkčním skupinám, nicméně neobsahoval dlouhé alifatické řetězce, ani esterové vazby [51].

Následovaly další pokusy o vytvoření strukturních modelů, ale až v 90. letech se díky rozvoji počítačové techniky obnovil zájem o toto téma, jelikož bylo možné zobrazovat modely ve 3D. Kumagai vytvořil model, který nově obsahoval i vodu a umožňoval vypočítat relativní energii struktury. Tento model byl založen na monomerní jednotce se sumárním vzorcem  $C_{21}H_{20}O_7$  a šlo o periodickou buňku skládající se z jednoho tetrameru a jednoho pentameru. Následoval model autora Vu založený na 11-merech z degradovaných podjednotek ligninu a tento model ukazoval, že zejména kvůli vodíkovým interakcím je podstatně snížena difúze molekul vody v okolí lignitu ve srovnání se samotnou vodou [51].

Všechny tyto zmíněné modely byly kritizovány pro jejich nepřesnost v pohledu na uhlí. Tudíž se jako novým zdrojem struktury začala brát makromolekulární chemie. Na uhlí se začalo nahlížet jako na látku z příčně vázaných makromolekulárních látek díky analogii nerozpustnosti uhlí a zesíťovaných makromolekul. Tyto makromolekulární látky jsou tvořeny aromatickými a hydroaromatickými klastry spojenými etherickými vazbami a methylenovými skupinami. Kromě této fáze obsahuje uhlí ještě jednu, mobilní (molekulová), která je uzavřena v molekulární struktuře – označení modelu jako dvoufázového. Tato mobilní fáze obsahuje kyslíkaté fenolické sloučeniny, pyridin, pyrrol, alifatické a aromatické uhlovodíky [52,53].





Obr. 11 – Dvoufázový fyzikální model [53]

## 2.4 Metody frakcionace

Frakce organické hmoty jsou definovány na základě různých fyzikálních, nebo chemických parametrů. Mezi fyzikální patří například velikost, nebo hustota částic a mezi chemické například oxidovatelnost, reaktivnost, prvkové složení apod. Frakcionační techniky jsou založené na řadě fyzikálních, chemických, nebo také biologických separačních kroků. Chemické metody bývají obvykle destruktivní, kdežto fyzikální nedestruktivní [54,55].

### 2.4.1 Fyzikální frakcionace

Tyto metody zahrnují celou řadu postupů – prosévání, ultrazvuková, mechanická a chemická dispergace, nebo separace usazováním částic rozdílné hustoty. Separace na základě velikosti částic se provádí přes síta o různých velikostech ok, buď za sucha, nebo za mokra (pod proudem vody). Tím dochází k separaci částic do několika tříd různých velikostí částic. Mezi největší částice budou patřit například částice písku a mezi ty nejmenší jílové částice, nebo stabilní agregáty. V každé separované frakci bude určitý podíl organické hmoty, částice písku budou obsahovat hrubou nekomplexovanou hmotu, agregáty a jílové částice budou mít OM asociovanou na povrchu (např. pojivový materiál), nebo vázanou ve svých pórech. Množství této organické hmoty je možné následně kvantifikovat [54,55].

#### *Hustotní frakcionace*

Organická hmota podléhající humifikaci je během ní současně asociována na minerální částice půdy, a tak získává mnohem větší hustotu v porovnání s čerstvou nehumifikovanou organickou hmotou. Separace je založena na dispergaci studovaného vzorku s roztokem, čímž

dojde k separaci na lehkou a těžkou frakci. Použitý roztok by měl mít hustotu 1,6–2,2 g·cm<sup>-3</sup>, takže lehká frakce, s hustotou menší než zvoleného roztoku, se bude vznášet na hladině, kdežto těžká frakce bude klesat ke dnu. Součástí této metody je také disperzní krok, kterým je narušena stabilita půdních agregátů u dna, aby došlo k uvolnění SOM, a ta vyplave na povrch. Tím dostáváme dvě lehké frakce, které jsou tvořeny úlomky rostlinného odpadu, živočišných zbytků, semeny, pylem a uhlím a liší se pouze intenzitou interakce a půdní maticí. Stupeň separace a výtěžky závisí na intenzitě disperze a na hustotě použitého roztoku. Spolu se zvyšováním hustoty rozpouštědla zpravidla roste i výtěžnost [56,57].

Nicméně je třeba také zdůraznit nedostatky, mezi které patří i fakt, že v lehké frakci jsou separovány i částičky uhlí, které je samo o sobě vlastně stabilní organickou hmotou a touto separací je zařazeno mezi labilní OM. Další nevýhodou je, že hustota separačních roztoků je ovlivněna teplotou, nebo některými chemickými vlastnostmi (pH), čímž se může ovlivnit například intenzita extrakce huminových látek. Některé roztoky (polydungatan sodný) je zase obtížné po separaci vymýt ze vzorků. V neposlední řadě také dochází k nedostatečné disperzi mikroagregátů, protože je v nich přirozeně vázaná voda a vzduch, a to snižuje jejich hustotu [56,57].

### ***Prosívání***

Využívají se standardizované metody, které na půdní agregáty působí stejnými disperzními silami, jako na ně působí v přirozeném prostředí. Těmi jsou například větrná eroze a zaplavení půdní vodou. Vítr přenáší volné částice půdy a ty při dopadu na půdní agregáty je mechanicky rozrušují. To se laboratorně testuje prosíváním za sucha, kdy se využívají rotační sítě, které rozdělují vzorek do několika velikostních tříd a tím se hodnotí množství agregátů odlišně odolných proti silám, které je rozrušují. Voda způsobuje bobtnání agregátů, rozpouštění látek držících látku pohromadě a laboratorně se využívá prosívání pod vodou. U této metody se využívá držáku, ve kterém je ukotveno síto, na jehož povrchu je umístěn vzorek půdy. Síto je ponořeno pod vodu tak, aby byl vzorek ponořen, ale vrchní okraj síta byl stále nad hladinou. Síto je potom v pravidelných intervalech vynořováno a ponořováno [54,58].

Až na primární částice je míra desintegrace rozrušených půdních agregátů hodnocena jako množství hmoty složené z částic v určitém velikostním rozmezí. Nejčastější velikosti pórů sít jsou 2 000, 250 a 53 μm a na jejich površích dochází k zachytávání částic odpovídající velikosti [54,58].

### **2.4.2 Chemická frakcionace**

Tento druh frakcionace zahrnuje širokou škálu metod, používá se mnoho způsobů a chemických činidel. Můžeme zařadit oxidaci na mokré cestě, UV zářením, hydrolýzu, extrakci horkou a studenou vodou, roztokem soli, organickými rozpouštědly, destrukci minerální složky půdy a termickou analýzu [59].

### ***Oxidační metody***

Jednou z nejrozšířenějších a nejvyužívanějších metod je Stevensonova alkalická extrakce s využitím extrakčního činidla NaOH a Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, kdy dochází v extrakci huminových

a fulvinových kyselin do roztoku a humíny zůstávají součástí pevného zbytku vzorku. Následně je roztok okyselen pomocí koncentrované HCl na  $\text{pH} \approx 2$  nebo menší a tím dojde k vysrážení huminových kyselin a ty se od roztoku fulvinových kyselin oddělí centrifugací. Nevýhodou této metody je ovšem rozpouštění čerstvého organického odpadu a oxidace organických sloučenin při kontaktu se vzduchem [60].

Velmi často používanou metodou je oddělení biochemicky stabilizované organické hmoty pomocí kyselé hydrolýzy, kdy se na předem fyzikálně separované frakce vzorku aplikují různé kyseliny za různých reakčních podmínek. Pomocí 6M HCl a refluxu jsou ze vzorku odstraněny všechny rozložitelné organické sloučeniny (bílkoviny, polysacharidy, nukleové kyseliny) a zůstanou pouze stabilnější aromatické sloučeniny s dlouhými řetězci. Nicméně lignin je chemicky odolný vůči kyselé hydrolýze, a proto může zkreslovat výsledky chemické separace. Jednou z možností, jak přítomnosti ligninu zabránit je využití frakce o rozměrech menších než 53  $\mu\text{m}$ . Touto metodou lze oddělit pouze 35–66 % organického uhlíku [61].

Další skupina reakcí je založena na oxidacích, například pomocí 6% NaClO. Tato sloučenina je šetrnější ke struktuře minerálního podílu půdy, který zůstává prakticky nezměněn. Hlavním rozdílem oproti HCl je, že dochází k oddělení asi 63–91 % organického uhlíku [62].

Z dalších využívaných sloučenin je KMnO<sub>4</sub>. Množství oxidovaného organického uhlíku se pohybuje okolo 13–28 %. Výhodou je, že rychleji než AK a cukry reagují látky obsahující glykolové skupiny. Další využitelnou látkou je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zoxidovaný organický uhlík se pohybuje okolo 25–58 %. Posledním činidlem, které zmíním, je Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, které má podobnou výťažnost jako NaClO [63].

Používá se také UV fotooxidace (vysoká účinnost UV oxidace, okolo 70 %), která využívá skutečnosti, že při ozařování vzorku UV zářením se z organických látek uvolňují volné radikály a současně dochází k ionizaci atomů kyslíku v okolí vzorku a tyto radikály spolu pak vzájemně interagují. Kvůli faktu, že životnost kyslíkových radikálů je asi jen 2  $\mu\text{s}$ , je velmi omezená jejich difúze v pórech a fotooxidace je možná pouze na povrchu těchto látek. Tím je možno oxidovat pouze látky bezprostředně přístupné pro mikroorganismy, zatímco pro ně fyzicky nedostupné organické látky zůstávají nedotčeny (například metabolické látky pro mikroorganismy jako peptidy) [63].

### ***Hydrolytické metody***

Hydrolýza roztoků těchto látek probíhá roztoky minerálních kyselin (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o různých koncentracích. Využívá principu, že organické látky, v závislosti na struktuře a chemickém složení, podléhají kyselé hydrolýze. Například pro hydrolýzu hemicelulózy stačí použít 2% HCl, ale pro krystalickou celulózu je třeba minimálně 80% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. I metabolické procesy vyžadují rozštěpení substrátu kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou, takže látka, která bude vyžadovat ke svému rozštěpení silnější kyselinu, bude i hůře metabolizovatelná. Enzymatické hydrolýzy mají složitější mechanismus, také to ale závisí na organismu, jelikož ty disponují rozsáhlou škálou enzymů. V realitě se uplatňují vedle hydrolýz i oxidace, proto je použití jen jedné minerální kyseliny k celkovému hodnocení organické hmoty nedostačující [64].

Princip tkví v tom, že se na vzorek půdy nechá působit minerální kyselina za určitých podmínek – čas, teplota, příp. tlak. Poté se supernatant obsahující hydrolyzované látky oddělí od zbytku půdy (centrifugace) a v tomto zbytku se stanoví obsah uhlíku. Dřívější metody využívaly pouze kombinaci roztoků HCl a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, takže se vzorek rozdělil pouze na dvě frakce – hydrolyzovatelnou a nehydrolyzovatelnou. V dnešní době se více využívají vícestupňové metody, kde se frakce stupňují zvyšováním koncentrace kyseliny, nebo zvýšením teploty reakce, prodloužením reakčního času, apod. Hydrolýza se vyznačuje reakční nespecifitou, jelikož hydrolyzuje i organickou hmotu stabilizovanou nejen vlastní chemickou odolností, a na druhou stranu ponechává ve vzorku látky snadno hydrolyzovatelné za normálních podmínek. Kyselá hydrolýza nerozděluje OM na funkčně homogenní frakce, pokud ale předchází některá z metod fyzikální frakcionace, dokáže být velmi přínosnou metodou [64,65].

### ***Extrakční metody***

Jednou z nejjednodušších extrakčních metod je extrakce vodou. Ta se dělí na dvě hlavní podskupiny, a to extrakce horkou a studenou vodou. Při extrakci studenou vodou je obsah rozpuštěného organického uhlíku nižší. Tato frakce může obsahovat nízkomolekulární látky i koloidní částice, v podstatě se jedná o veškeré organické látky menší než 0,45 μm. Stabilita tohoto uhlíku, extrahovaného z materiálu o nízkém stupni humifikace je nízká (stabilita uhlíku vůči mineralizaci cca týdny až měsíce), kdežto z materiálu o vysokém stupni humifikace vykazuje vysokou stabilitu a nízkou rozložitelnost s odhadovanou dobou rezistence organického uhlíku v desítkách let. Více se ale setkáváme s extrakcí horkou vodou, právě tato vyšší teplota výrazně ovlivňuje vlastnosti extraktu, často bývá označena za metody hydrolytickou. Právě určení tohoto uhlíku se využívá jako stanovení potenciálně mikrobiálně dostupné OM a tato frakce by měla obsahovat snadno rozložitelné organické látky. Obsah tohoto uhlíku je asi 1–5 % a je asi 18 krát vyšší než u extrakce studenou vodou. Nejčastěji se využívá teploty varu destilované vody, ale pro snadnější uvolnění organických látek se někdy do roztoku přidávají soli, jako MgSO<sub>4</sub> [63,66].

Další z extrakčních metod, která se řadí k jedné z nejstarších, patří extrakce pomocí NaOH a Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Tato extrakce už z organické matrice dokáže uvolnit i stabilnější frakce – huminové a fulvinové kyseliny, příp. huminy. I když se řadí mezi velmi staré metody, je i dnes stále široce využívána a extrahuje značné množství organické hmoty. Právě huminové látky se řadí mezi ty chemicky stabilní a jen velmi těžce přístupné. Pokud k extrakci využijeme pouze NaOH, jsou v OM stabilizující vodíkové vazby nahrazeny sodnými ionty, což způsobí vyšší rozpustnost extrahovaných složek, a také přeskupení některých vazeb. Vazby s vícevalentními kationty však mohou být narušeny pouze pyrofosfátem sodným. Naopak využití pouze pyrofosfátu je doporučováno k získání frakce OM vázané na jílové minerály vazbami s vícevalentními kationty a stabilizované tvorbou chelátových komplexů bez odstranění Fe a Al z původních matic v minerálech. Samotným hydroxidem sodným je extrahováno až 80 % organického uhlíku, zato pyrofosfátem pouze něco okolo 30 %. Současně je postihnuto více stabilizačních mechanismů OM, tudíž je vhodné ji spojit s další frakcionační metodou [31,60].

Existují ale také pokusy o extrakci organickými rozpouštědly, jako n-hexanem, jelikož by alkany a VMK obsažené v OM jím mohly být extrahovány. Dále je zase chloroform doporučován pro extrakci mastných kyselin, vyšších alkoholů, vosků a esterů. Takové látky tvoří asi 25 % v OM u povrchového horizontu. Samotné tuky se podílí na mnoha stabilizačních procesech, například agregují snadněji rozložitelné látky, a tak je chrání před rozkladem [67,68].

### ***Metody využívající destrukci minerální složky půdy***

Jedním z nejvyužívanějších činidel se využívá kyselina fluorovodíková, ta má schopnost rozpouštět hydratované křemičité materiály a komplexní sloučeniny Fe a Al. Z hlubších půdních horizontů lze takto extrahovat až 80 % OM. Rozpuštěné množství však silně závisí na půdním typu, například silný organický povlak na jílových materiálech u některých druhů půd neumožňuje kontakt HF s minerály uvnitř, a tím brání extrakci. Je doporučováno před aplikací HF odstranit ze vzorku volnou OM, jinak by tato volná OM byla po extrakci přítomná v HF extraktu. Předpokládá se, že tento podíl organické hmoty rozpuštěný v HF obsahuje hydrofilní látky rozpustné ve vodě, které jsou před rozkladem chráněny adsorpcí v minerální fázi půdy [60,69].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Frakcionace a metody charakterizace

Hlavní reaktivní částí organické hmoty půdy, a také vědecky nejvýznamnější složkou jsou bezesporu huminové látky – všudypřítomné přírodní látky vznikající chemickou a biologickou degradací rostlin a živočišných zbytků. Jsou v ekosystémech klíčové, protože regulují globální cykly uhlíku a dusíku, růst rostlin a mikroorganismů, transport antropogenních sloučenin a těžkých kovů a stabilizaci půdní struktury. Dodnes ale nejsou vyvíjeny žádné technologie pro řízení aktivity HL, kvůli jejich velké molekulární složitosti. Existuje několik analytických technik pro jejich charakterizaci, jako jsou oxidační a redukční reakce, UV a fluorescenční spektroskopie,  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie, vysokoúčinná SEC (HPSEC), plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI/MS), sorpce na pevných materiálech a další. Nicméně ani jedna z těchto technik nebyla samotná shledána jako dostatečná k objasnění strukturní složitosti huminových molekul. Obecně se HL považují za supramolekulární asociace heterogenních, relativně malých molekul, které jsou drženy pohromadě slabými nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní síly. Komplexnost huminové molekuly může být redukována postupnou destrukcí intramolekulárních interakcí, které tyto komplexní suprastruktury stabilizují, a tak mohou být izolovány jednotlivé frakce huminových látek (organické hmoty). Jejich strukturální identifikace pak může být zprostředkována kombinací několika pokročilých analytických metod [70].

V literatuře [70] navrhovali Piccolo a Nebbioso postupnou chemickou frakcionaci pro odstranění molekul z komplexních huminových matic, která je využita a optimalizována v této práci, a také aplikaci moderních analytických metod k určení jejich chemické struktury. Tento přístup je možné nazvat jako sekvenční chemickou frakcionaci na tzv. „humeomika“, analogicky k moderním termínům popisujícím geny, transkripty, proteiny a technologie mapování metabolitů. Nicméně zatímco biomolekuly jsou syntetizovány v živých buňkách ze specifických prekurzorů, aby sloužily pouze k definovaným buněčným funkcím, huminové látky jsou tvořeny entropicky řízeným rozpadem mrtvé organické hmoty a zahrnují širší ekologické a environmentální funkce. Frakcionace na humeomika tedy může být popsána jako postupná separace molekul od huminových suprastruktur řízeným štěpením intermolekulárních vazeb. Takto získané frakce „obdobných“ typů molekul s výrazně nižší heterogenitou v porovnání s původní maticí jsou následně charakterizovány pomocí pokročilých analytických metod (zejména NMR a chromatografie).

Frakcionace na humeomika v literatuře [70] a v této práci začíná extrakcí organickými rozpouštědly volných nebo nevázaných huminových molekul spojené s huminovou suprastrukturou pouze slabými disperzními interakcemi bez porušení jakékoli kovalentní vazby. Následují dva kroky zahrnující štěpení kovalentních vazeb mezi slabě vázanými estery (transesterifikace slabým roztokem  $\text{BF}_3$  v MeOH) a silně vázanými estery (solvolýza alkalickým roztokem KOH v MeOH). Takto uvolněné molekuly, získané štěpením esterových vazeb, mohou být dále frakcionovány pomocí L/L extrakce (kapalina/kapalina). Nakonec jsou silné etherické a glykosidické vazby štěpeny působením kyseliny jodovodíkové a následuje

protonace organického etheru a nukleofilní substituce jodidem s alkoholem, který slouží jako dobře odstupující skupina.

Autoři v těchto pracích [70,71] využili GC/MS a LC/MS v závislosti na rozpustnosti získaných frakcí molekul ve vodě, další strukturní informace byly získány pomocí NMR spektroskopie, přičemž autoři nebrali v úvahu frakce AQU3 a ORG4, jelikož výtěžky byly tak malé, že pro instrumentální analýzu nebyly využitelné. Výzkum ukázal, že ve všech frakcích byly převážně přítomny nasycené n-alkanové kyseliny. Jejich přítomnost ve všech oddělených frakcích podtrhuje jejich úlohu při formování a stabilizování huminových supramolekulárních asociací. Zatímco část nasycených kyselin je volně vázána v huminové matici (jak ukazuje kvalitativní podobnost ORG1 frakce a původní OM), většina n-alkanových kyselin se podílí na esterových vazbách a odděleny jsou pouze hydrolyzou (ORG2, ORG3 a AQU2). Nenasycené alkanové kyseliny byly také získány ve vodorozpustné frakci AQU2 ve větším množství, než by dovozovala jejich rozpustnost ve vodě, což je způsobeno agregací s hydrofilními látkami, které zvyšují jejich rozpustnost ve vodném prostředí. Velkou část nenasycených kyselin našli ve frakci AQU4. Hydroxylové kyseliny a n-alkoholy byly také v různých množstvích přítomny ve všech separovaných frakcích. Největší množství hydroxylsloučenin bylo nalezeno v ORG1 a ORG2 frakcích, zatímco di- a trihydroxy substituované kyseliny byly významně zastoupeny jak ve frakcích ORG2, tak ORG3, proto jsou tyto kyseliny více zahrnuty v esterických vazbách a hrají větší roli při stabilizaci huminových suprastruktur. Polyhydroxylované sloučeniny jako karbohydráty, aminocukry a jejich deriváty jsou nejvíce zastoupeny v AQU2 frakci a tím je způsobena vysoká hygroskopicitata této frakce. Dále byly v ORG2 a ORG3 frakcích převážně detekovány aromatické struktury. V organických frakcích byly také nalezeny lineární cukry a steroidy, ty se nejvíce objevovaly v ORG2 a ORG3 frakcích, což ukazuje, že jsou pevně vázané v matici.

V literatuře [72,73] autoři použili HPSEC na frakcionaci již frakcionované půdní huminové kyseliny (humeomika). HK a její tři velikostní frakce byly nejdříve extrahovány a frakce nekovalentně vázaných organorozpustných sloučenin (ORG1), slabě estericky vázaných organorozpustných látek (ORG2), ve vodě rozpustných složek (AQU2), silně vázaných organických složek rozpustných v esterech (ORG3) a finálních nerozpuštěných zbytků (AQU4). Bylo prokázáno, že analytické výtěžky identifikovaných sloučenin v ORG nebo AQU extraktech ze všech třech velikostních frakcí byly vždy větší, než pro nefrakcionovanou HK. To bylo podle autorů způsobeno slabší konformační stabilitou huminové suprastruktury získané frakcionací HPSEC, čímž byla umožněna lepší separace a identifikace jednotlivých huminových molekul. Dále zjistili, že hydrofobní sloučeniny byly převážně distribuovány ve frakci s největší velikostí částic, zatímco hydrofilní složky byly eluovány ve frakci s nejmenší velikostí částic. Také sloučeniny s lineárními řetězci nebo aromatickými kruhy sdružené v pravidelných strukturách byly hojnější v první frakci, kdežto nepravidelně tvarované sloučeniny, které brání asociacím větších velikostí, až ve frakci následující.

Jiný způsob separace byl využit v literatuře [74] od Zhanga a kol., kteří ve snaze snížit kompoziční a strukturní heterogenitu huminových kyselin a docílit lepšího využití zdrojů HK

využili k separaci extrakční činidla o různých pH. Takto separovali HK ze zvětralého uhlí do sedmi frakcí úpravou pH (3–10) extrakčního činidla. Výsledky ukázaly, že 90,31% frakcí HK byly obsaženy v roztocích s nižším pH (3–7). Kompoziční a strukturní charakteristiky těchto frakcí byly stanoveny pomocí EA, UV-VIS, FTIR a  $^{13}\text{C}$  NMR a prokázaly významné rozdíly mezi frakcemi huminových kyselin. Celková koncentrace obsahu kyselých a karboxylových skupin se snižovala s rostoucím pH. Frakce získané z extrakčních roztoků o pH 3–4 však měly relativně nižší aromaticitu, ale vyšší obsah protonovaného uhlíku. Zato frakce z roztoků o pH 6–7 měly aromaticitu nejvyšší a obsahovaly největší množství vazeb  $\text{COO/N-C=O}$ .

Autorka článku [75] rozdělila huminový vzorek izolovaný z lignitu do několika frakcí dvěma různými způsoby. První byl rozpuštěním v pufrch upravených na různé pH a druhý byl následným rozpuštěním v pufrch se zvyšujícími se hodnotami pH. Tím bylo zjištěno, že extrahované huminové frakce jsou bohaté na karboxylové kyseliny ve srovnání se zbytkovými skupinami. Zvyšování pH použitých pufrů způsobilo snížení pevnosti a disociační schopnosti funkčních skupin v extrahovaných frakcích.

V literatuře [76] využili autoři také rozdělení do několika frakcí rozpouštěním v pufrch s různými hodnotami pH a rozpuštěním v pufrch upravených na různé pH a charakterizovali získané huminové frakce s ohledem na jejich složení, strukturu, velikost částic a náboj. Pomocí FTIR a UV-VIS zjistili, že frakce získané následným rozpouštěním byly více heterogenní, než frakce připravené sekvenční extrakcí. Frakce získané při nižších hodnotách pH obsahovaly vyšší množství aromatických a karboxylových skupin, zatímco ty, které byly extrahovány při vyšších hodnotách pH, byly bohaté na alifatické nebo peptidové skupiny. Frakce extrahované při neutrálním pH měly určité specifické vlastnosti. Disociace také závisí na chemické struktuře molekul. Slabší karboxylové skupiny by se tak mohly disociovat v méně kyselých roztocích a tak by mohlo být rozpuštěno více aromatických frakcí. Bylo tak zjištěno, že huminové frakce se chovají jako aniontové heterogenní ligandy s mnoha karboxylovými a fenolickými skupinami o různé síle. Vlastnosti a chování ve vodných roztocích mohou být ovlivněny dvěma hlavními procesy – disociací kyselých funkčních skupin a rozpadem huminových agregátů na menší molekulární asociace nebo huminové molekuly.

### **3.2 Aplikace podpůrných látek do půd**

Popílek je celosvětově generovaný ve velkém množství z tepelných elektráren. Manipulace s ním a jeho likvidace představuje hrozbu, proto se v poslední době dostalo velké pozornosti využití poléťavého popílku jako zdroje pro úpravu půdy a zlepšení její kvality. Společná aplikace biouhlu s popílkem může tedy zvýšit kvalitu půdy a produktivitu plodin. Autoři článku [77] aplikovali biouhel a popílek z lignitu a sledovali účinky na půdní živiny, biologické vlastnosti a výnos kukuřice. Odebírali vzorky půdy ve třech různých stupních pěstování kukuřice a analyzovali je na obsah organického uhlíku, dalších biogenních prvků (N, P, K), půdních enzymů, pH a mikrobiální biomasu. Takto provedená změna kyselé půdy, po aplikaci lignitového popílku a biouhlí, zlepšila sledované parametry kvality půdy, jako je pH, elektrická vodivost, obsah enzymu dehydrogenázy a alkalické fosfatázy, a také obsah organického uhlíku z mikrobiální biomasy. Stejně tak se třikrát zvýšila také produktivita



kukuřičného zrna. Co se ale snížilo, byl obsah těžkých kovů obsažených v půdě (Zn, Ni, Co, Cu, Cd a Pb) v důsledku povrchové adsorpce a srážení způsobeného zvýšením pH půdy.

V literatuře [78] zkoumali, zda aplikace huminových kyselin pocházející z lignitu a sádry vzniklé odsiřováním spalin (angl. flue gas desulfurization - FGD) má vliv na obsah organických látek v půdě a také na její fyzikální vlastnosti. Předchozí studie již prokázaly zvýšení vyluhování solí a zvýšenou produkci plodin, po aplikaci FGD sádry a lignitických HK. Experimentální část této práce probíhala na písčité jílovité hlíně. Vzorky půdy byly odebrány v ročních intervalech po dobu pěti let a analyzovány na půdní organické látky, ve vodě stabilní agregáty (metoda mokrého prosévání), sypnou hustotu, retenční kapacitu vody, celkovou pórovitost a mikroporéznost. Po uplynutí pětiletého intervalu bylo prokázáno, že jak obsah půdní organické hmoty, tak fyzikální vlastnosti byly významně pozitivně ovlivněny, pouze objemová hustota byla oproti žádaným změnám snížena.

Autoři článku [79] zkoumali dlouhodobé terénní pokusy aplikace lignitového popílku (angl. lignite fly ash – LFA) na podzemnici olejnou, kukuřici a konopí. Ještě před vysetím byl popílek aplikován v různých dávkách s a bez organického odpadu z cukrovarnictví, který byl používán jako doplněk a zdroj živin. Při všech ošetřeních byla také aplikována chemická hnojiva se sádrou, huminovými kyselinami a biofertilizátory. Při jednorázových i opakovaných aplikacích popílku se výnos plodin výrazně zvýšil, a také se zlepšila kvalita půdy a obsah živin v produktech. Nejvyšší dávka popílku vykazovala nejlepší reziduální účinky ve smyslu zvýšení výnosů následných plodin. Nicméně bylo také pozorováno určité zvýšení obsahu stopových a těžkých kovů, a také úrovně  $\gamma$ -emitorů v půdě i plodinách, ale stále v rámci přípustných limitů. LFA popílek se tak chová jako vynikající modifikátor struktury půdy, zdroj základních živin pro rostliny a činidlo pro zlepšení úrodnosti půdy a výnos plodin. Kromě zvýšení obsahu organické hmoty v půdě také tato úprava imobilizovala toxickou stopu a těžké kovy. Jedná se tedy o další práci potvrzující využití popílku ve velkém měřítku ke zvyšování úrodnosti půdy a produktivity, bez nepříznivých účinků na půdu nebo plodiny, což by mohlo napomoci vyřešení problému hromadného odstraňování popílku způsobem šetrným k životnímu prostředí.

Další výzkum [80] opět zkoumal biouhel jako vhodný materiál pro úpravu vlastností půdy a zvýšení výnosu plodin. Přímou byla zkoumána aplikace biouhlu v různých rychlostech na půdní vlastnosti, hojnost a složení půdních společenstev. Ukázalo se, že aplikace biouhlu a N-hnojiv výrazně zvýšila výnos plodin, což souvisí se zvýšeným obsahem živin. Výskyt genů nirK a nirS významně vzrostl o 4 %. Složení nirK genu bylo ovlivněno hlavně změnami v půdním  $\text{NO}_3^-$ , dusíku, pH a dostupném fosforu. Zjištění ukazuje, že přidávání biouhlu do regenerované půdy z poklesu těžby uhlí v kombinaci s N-hnojivy může významně zlepšit výnos plodin a úrodnost půdy.

V literatuře [81] byly zkoumány účinky aplikace produktu obsahujícího lignitické huminové kyseliny na půdy se středněhrubou a hrubou texturou po dobu tří let. Práce se snažila posoudit, zda tento produkt může nahradit použití hnoje s ohledem na jeho účinky na půdní vlastnosti a výnosy zeleniny. Na půdy byly aplikovány jak lignitické huminové kyseliny v jedné dávce a ve dvojité dávce, tak samotný hnůj. Vliv aplikace zákona na půdní vlastnosti spolu s výtěžkem testovaných rostlin byl hodnocen po každém vegetačním období.

Výsledky ukázaly, že po aplikaci huminových kyselin v obou půdách došlo ke zlepšení téměř všech půdních parametrů, jako jsou vlastnosti sorpčního komplexu, kvalita organické hmoty, aktivita enzymu dehydrogenázy, a také ke zvýšení produkce zeleniny. V půdě s hrubou texturou byly biomasy kořenů a výhonků vyšší než 3–4-násobné (zvláště po aplikaci dvojitě dávky) oproti kontrolnímu vzorku s hnojem, zatímco v půdě se středněhrubou texturou byl tento rozdíl asi 2,5-násobný pro biomasy výhonků a kořenů. Organický uhlík a uhlíky vázané na obsah huminových kyselin zůstaly významně vyšší, než u kontrolního vzorku po třetím vegetačním období, zatímco dehydrogenázová aktivita byla viditelná hlavně po prvním vegetačním období. Byly také vypočítány indexy kvality půdy, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány po dvojnásobné dávce huminové kyseliny a zejména u hrubě texturované půdy.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité materiály

V této práci byly celkem využity tři zdrojové matrice organické hmoty:

- Půda (lokalita Hodonín-Pánov)
- Lignit (jihomoravský)
- Roční odběr půdy po aplikaci lignitu (lokalita Hodonín-Pánov)

Každý z těchto vzorků organických matric posloužil jako výchozí materiál pro studium vlivu aplikace lignitu na distribuci organické hmoty v půdě. Pro tyto účely byla v práci využita metoda sekvenční chemické frakcionace na humeomika (postup viz kapitola 4.4). Výchozí vzorky lignitu a půdy byly využity zejména jako srovnávací vzorky, na jejichž základě budou posuzovány rozdíly v distribuci organické hmoty v půdě před a po aplikaci lignitu jakožto modelové půdní podpůrné látky. Pro každý z těchto tří vzorků byly provedeny tři opakování sekvenční chemické frakcionace.

### 4.2 Použité chemikálie

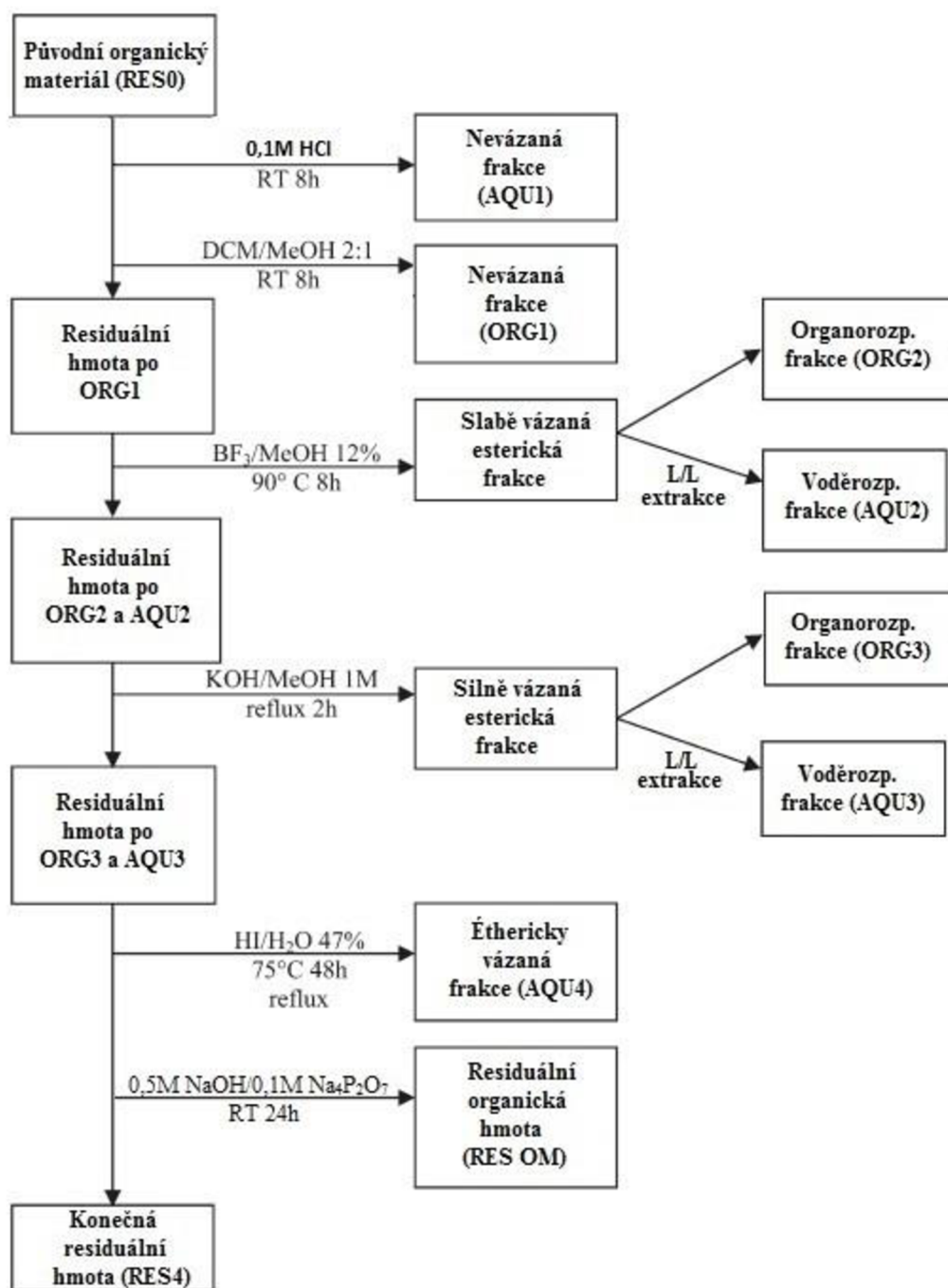
- Hydroxid sodný,  $\geq 98\%$  p.a., Penta s.r.o.
- Methanol HPLC,  $\geq 99,9\%$  p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Dichlórmetan (DCM),  $\geq 99,92\%$  p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina jodovodíková 57% p.a., Sigma-Aldrich
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Penta s.r.o.
- Pyrofosfát sodný,  $\geq 99\%$  p.a., Sigma-Aldrich
- Chloroform,  $\geq 99,8\%$  p.a., Honeywell
- Síran sodný,  $\geq 99\%$  p.a., Penta s.r.o.
- Diethylether,  $\geq 99,9\%$  p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Hydroxid draselný,  $\geq 89,6\%$  p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Aceton,  $\geq 99,94\%$  p.a., Lach-Ner s.r.o.
- Pentahydrát thiosíranu sodného,  $\geq 99,5\%$  p.a., Penta s.r.o.
- Fluorid boritý – roztok s methanolem 50%, Sigma-Aldrich
- Hydrogenuhličitan sodný,  $\geq 99,5\%$  p.a., Penta s.r.o.
- Destilovaná voda
- MQ voda

### 4.3 Použité přístroje

- Třepačka (Heidolph Vibramax 100)
- pH metr (Mettler Toledo)
- CHNS/O elementární analyzátor (Euro EA3000, EuroVector)
- Termický analyzátor (TGA Q5000, TA Instrument)
- FTIR spektrometr (Nicolet iS50)
- Digitální ohřívač (Heidolph MR Hei-Standard)

### 4.4 Postup sekvenční chemické frakcionace na humeomika

Souhrnné schéma znázorňující celkový proces, použitá činidla a označení jednotlivých získaných frakcí z původního organického materiálu je znázorněn na Obr. 12.



Obr. 12 – Obecné schéma sekvenční chemické frakcionace na humeomika

#### 4.4.1 Frakcionace I

##### *Separace frakce AQU1*

Prvním krokem bylo vysušení celkem 400 g organického materiálu v sušárně za teploty 45 °C po dobu 24 hodin, aby se odpařila veškerá voda.

Z vysušené zdrojové matrice bylo třikrát odebráno 50 g materiálu. Ten byl převeden do tří Erlenmeyerových baněk a do každé z nich bylo přidáno 150 ml 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> HCl. Následně byly baňky překryty dvojitou vrstvou parafilmu a ponechány přes noc na třepače.

Následující den byly vzorky za sníženého tlaku přefiltrovány přes filtrační papír. Filtráty byly převedeny do plastových kádinek, překryty buničinou, zmraženy v mrazáku a následně byla v lyofilizátoru odpařena veškerá voda → **AQU1**. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

#### ***Separace frakce ORG1***

Vysušený materiál po separaci AQU1 byl opět v Erlenmeyerových baňkách přelit 150 ml roztoku (100 ml DCM a 50 ml MeOH). Všechny baňky byly překryty dvojitou vrstvou alobalu a ponechány na třepačce přes noc.

Další den byly vzorky za sníženého tlaku přefiltrovány přes filtrační papír, sediment byl ještě promyt 100 ml roztoku (50 ml DCM a 50 ml MeOH) a přefiltrován. Filtrát byl přelit do filtračních baněk se zábrusem a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační odparce při 50 °C. Zbytek po odpaření byl za pomoci čistého DCM (jen malé množství postačující na rozpuštění frakce za stěn filtračních baněk) převeden do předem zvážených vialek, ty byly překryty buničinou a ponechány v digestoři do odpaření DCM → **ORG1**. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

#### **4.4.2 Frakcionace II**

Vysušený pevný materiál po separaci ORG1 byl převeden do vysokotlakých uzavíratelných teflonových nádobek (Obr. 13) a do každé bylo přidáno 50 ml 12% roztoku fluoridu boritého v methanolu (vzniklý zředěním původního 50% roztoku). Nádobky byly pevně uzavřeny, sevřeny v kovovém stojánku a umístěny na 8 hodin do sušárny na 85 °C.



Obr. 13 – Teflonové vysokotlaké nádoby

Po 8 hodinách byly nádoby vyjmuty ze sušárny, nechány vychladnout a po vychladnutí do nich bylo přidáno dalších 50 ml 12% roztoku fluoridu boritého v methanolu. Uzavřené nádoby ve stojánku byly na dalších 8 hodin umístěny do sušárny na 85 °C.

Po uplynutí potřebné doby a po vychladnutí roztoku v nádobkách byly vzorky zfiltrovány za běžného tlaku přes filtrační papír (dvakrát) a pevný podíl byl promyt celkem 70 ml MeOH. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

### ***L/L extrakce***

K filtrátům byla přidána ultračistá destilovaná voda o stejném objemu jako filtrátu (170 ml, poměr 1:1) a vše bylo převedeno do dělicí nálevky (pokud je příliš velký objem roztoku, dá se snížit obsah methanolu na rotační odparce). Následně bylo do nálevky přidáno 25 ml chloroformu a s nálevkou bylo třepáno (upouštět tlak kohoutem nálevky). Jelikož je chloroform nemísitelný s vodou, a také má vyšší hustotu, zůstal po vytřepávání naspod nálevky a byl kohoutem vypuštěn do připravené kádinky. Vytřepávání bylo opakováno, dokud neměl chloroform po vytřepávání světlou barvu (celkově opakováno asi čtyřikrát – 100 ml chloroformu). Takto byla oddělena organická frakce.

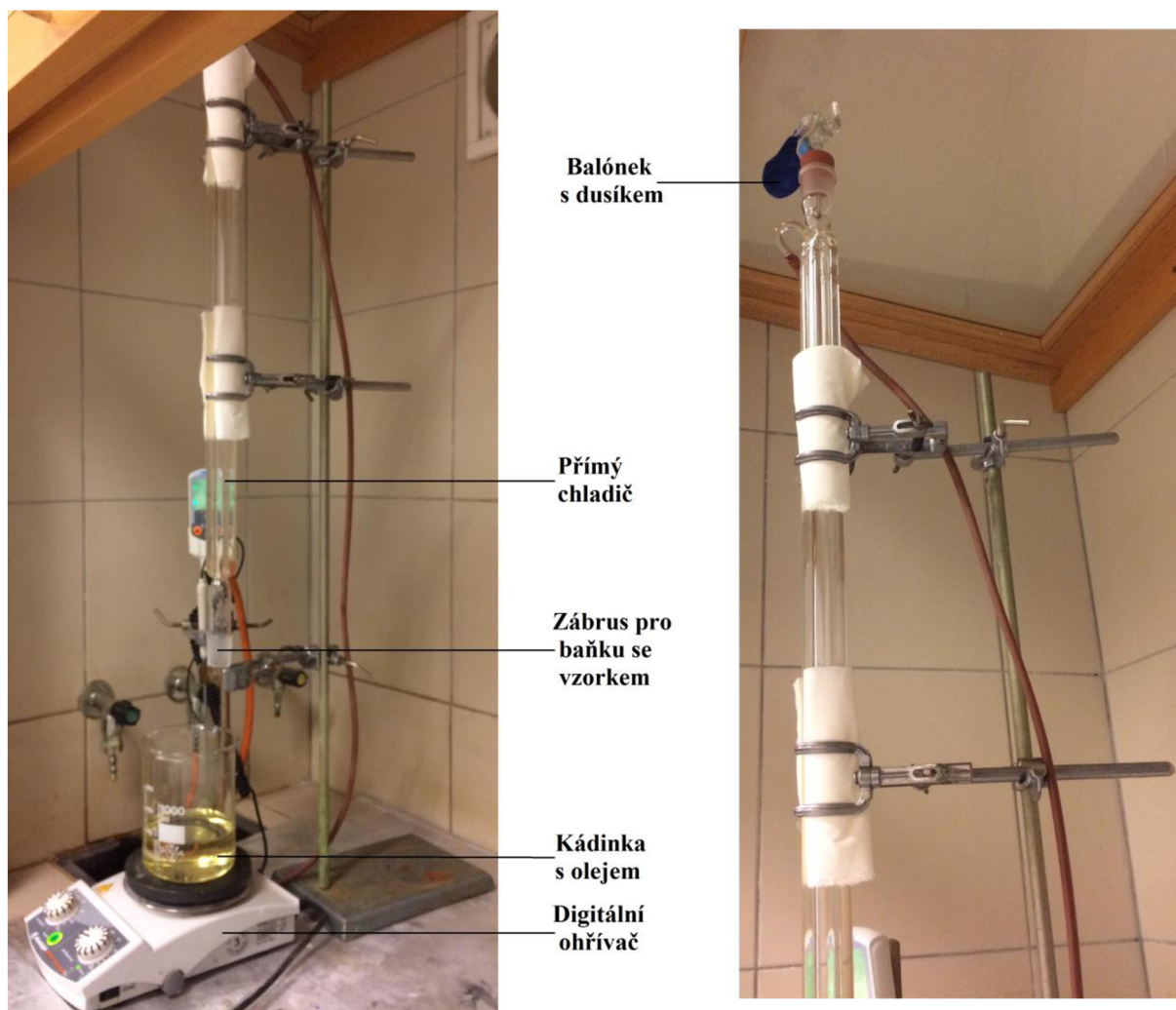
Z nálevky byla dále odpipetována vodná frakce (seshora), která byla rovnou filtrována za běžného tlaku přes filtrační papír do připravených kádinek. V nálevce ještě po separaci zůstaly drobné usazeniny, tudíž bylo do nálevky ještě přidáno 25 ml MeOH, ve kterém se usazeniny ještě částečně rozpustily. Tento objem MeOH byl ještě zfiltrován přes filtrační papír a přidán k objemu organické frakce.

Do kádinek obsahujících organickou frakci byly přidány zhruba tři lžičky bezvodého síranu sodného (promícháno), který na sebe navázal zbylou vodu obsaženou v organické frakci, a všechny roztoky byly za sníženého tlaku zfiltrovány přes filtrační papír. Odfiltrovaný síran sodný byl ještě propláchnut 60 ml chloroformu. Výsledný roztok by měl být čirý, pokud je stále zakalený, je třeba přidat další síran sodný a zbavit se obsažené vody. Takto připravené čiré roztoky byly odpařeny na rotační odparce při 50 °C. Zbytek po odpaření byl za pomoci čistého chloroformu (jen malé množství postačující na rozpuštění frakce za stěn filtračních baněk) převeden do předem zvážených vialek, ty byly překryty buničinou a ponechány v digestoři do odpaření chloroformu → **ORG2**.

Z vodných frakcí byl na rotační odparce při 50 °C odpařen zbylý objem methanolu. Zbytek po odpaření byl převeden do dialyzačních membrán (velikost pórů 1 000 Da) a dialyzován proti destilované vodě po dobu asi tří týdnů – kontrola pomocí konduktometru. Po ukončení dialýzy byly vzorky vymrazeny a v lyofilizátoru byla odpařena veškerá voda → **AQU2**.

### **4.4.3 Frakcionace III**

Pro tuto a následující frakcionaci bylo nejdříve nutné sestavit aparaturu podle Obr. 14.



Obr. 14 – Aparatura pro frakcionaci III a IV

Vysušený pevný materiál po separaci frakcí ORG2 a AQU2 byl převeden do varných baněk. Do půdních vzorků bylo přidáno 50 ml roztoku KOH v MeOH o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , do lignitických vzorků 100 ml roztoku, jelikož lignit hodně roztok sorboval. Dále bylo přidáno magnetické míchadlo, baňka se vzorkem byla připevněna na přímý chladič (Obr. 14) a digitální ohříváč byl nastaven na vyhřátí oleje na  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ . Takto byla směs refluxována v dusíkové atmosféře po dobu 2 hodin. Po uplynutí doby byl obsah baněk přefiltrován za sníženého tlaku přes filtrační papír, zbylý sediment byl ještě propláchnut 25 ml methanolu a opět zfiltrován. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### ***L/L extrakce***

Filtráty byly nejdříve okyseleny na  $\text{pH} < 2$  pomocí koncentrované HCl a byla přidána ultračistá destilovaná voda o stejném objemu jako filtrátu (poměr 1:1) a vše bylo převedeno do dělicí nálevky (pokud je příliš velký objem roztoku, dá se snížit obsah methanolu na rotační odparce). Následně bylo do nálevky přidáno 25 ml DCM a s nálevkou bylo třepáno (upouštět tlak kohoutem nálevky). Jelikož je DCM nemísitelný s vodou, a také má vyšší hustotu, zůstal po vytřepávání naspod nálevky a byl kohoutem vypuštěn do připravené

kádinky. Vytřepávání bylo opakováno, dokud neměl DCM po vytřepávání světlou barvu (celkově opakováno asi čtyřikrát – 100 ml DCM). Takto byla oddělena organická frakce.

Z nálevky byla dále odpipetována vodná frakce (seshora), která byla rovnou filtrována za běžného tlaku přes filtrační papír do připravených kádinek. V nálevce ještě po separaci zůstaly drobné usazeniny, tudíž bylo do nálevky ještě přidáno 25 ml MeOH, ve kterém se usazeniny ještě částečně rozpustily. Tento objem MeOH byl ještě zfiltrován přes filtrační papír a přidán k objemu organické frakce.

Do kádinek obsahujících organickou frakci byly přidány zhruba tři lžičky bezvodého síranu sodného (promícháno), který na sebe navázal zbylou vodu obsaženou v organické frakci, a všechny roztoky byly za sníženého tlaku zfiltrovány přes filtrační papír. Odfiltrovaný síran sodný byl ještě propláchnut 60 ml DCM. Výsledný roztok by měl být čirý, pokud je stále zakalený, je třeba přidat další síran sodný a zbavit se obsažené vody. Takto připravené čiré roztoky byly odpařeny na rotační odparce při 50 °C. Zbytek po odpaření byl za pomoci čistého DCM (jen malé množství postačující na rozpuštění frakce za stěn filtračních baněk) převeden do předem zvážených vialek, ty byly překryty buničinou a ponechány v digestoři do odpaření DCM → **ORG3**.

Z vodných frakcí byl na rotační odparce při 50 °C odpařen zbylý objem methanolu. Zbytek po odpaření byl převeden do dialyzačních membrán (velikost pórů 1 000 Da) a dialyzován proti destilované vodě po dobu asi tří týdnů – kontrola pomocí konduktometru. Po ukončení dialýzy byly vzorky zmrazeny a v lyofilizátoru byla odpařena veškerá voda → **AQU3**.

#### **4.4.4 Frakcionace IV**

K vysušenému půdnímu materiálu po separaci frakcí ORG3 a AQU3 bylo přidáno 50 ml 47% roztoku HI ve vodě, do lignitických vzorků 100 ml roztoku (lignit hodně sorboval). Dále bylo přidáno magnetické míchadlo, baňka se vzorkem byla připevněna na přímý chladič (Obr. 14) a digitální ohříváč byl nastaven na vyhřátí oleje na 75 °C. Takto byla směs refluxována v dusíkové atmosféře po dobu 2 dnů. Po uplynutí doby byl obsah baněk přefiltrován za sníženého tlaku přes Whatman Glass Microfiber Filter, každý sediment byl ještě propláchnut 25 ml vody a opět zfiltrován. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

Všechny filtráty byly následně zneutralizovány použitím NaHCO<sub>3</sub> na pH ≈ 7 a pomocí Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> byla provedena redukce obsaženého jódu (směs se zakalila do hněda). Takto byly filtráty umístěny do dialyzačních membrán (1 000 Da) a dialyzován proti destilované vodě po dobu asi pěti týdnů (velký obsah solí) – kontrola pomocí konduktometru. Po ukončení dialýzy byly vzorky zmrazeny a v lyofilizátoru byla odpařena veškerá voda → **AQU4**.

Extrakce frakce ORG4 nebyla provedena, jelikož tato frakce již neobsahuje prakticky žádnou organickou hmotu.

#### **4.4.5 Izolace RES OM**

Pro izolaci residuální organické hmoty bylo z vysušených vzorků (po separaci frakce AQU4) odebráno 5 g organické hmoty, k nim bylo přidáno po 45 ml extrakčního 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>) a vzorky byly ponechány na třepačce přes noc.



Následující den byly vzorky za sníženého tlaku zfiltrány přes filtrační papír a každý sediment byl ještě propláchnut 25 ml vody. Filtráty byly převedeny do dialyzačních membrán (velikost pórů 1 000 Da) a dialyzovány proti destilované vodě po dobu asi dvou týdnů – kontrola pomocí konduktometru. Po ukončení dialýzy byly vzorky zmrazeny a v lyofilizátoru byla odpařena veškerá voda → **RES OM**. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

#### **4.4.6 Izolace NOM**

Souběžně s předchozím postupem byla ještě paralelně provedena běžná alkalická extrakce původní organické hmoty, každý vzorek byl opakován třikrát. Z vysušené zdrojové matrice bylo odebráno po 5 g vzorků a k nim bylo přidáno po 45 ml extrakčního činidla ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$  a  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) a vzorky byly ponechány na třepačce přes noc.

Následující den byly vzorky za sníženého tlaku zfiltrány přes filtrační papír a každý sediment byl ještě propláchnut 25 ml vody. Takto byly filtráty zfiltrány na  $\text{pH} \approx 7$  a převedeny do dialyzačních membrán (velikost pórů 1 000 Da) a dialyzovány proti destilované vodě po dobu asi dvou týdnů – kontrola pomocí konduktometru. Po ukončení dialýzy byly vzorky zmrazeny a v lyofilizátoru byla odpařena veškerá voda → **NOM**. Pevný odfiltrovaný materiál byl po několik dní ponechán v sušárně při 45 °C.

#### **4.4.7 Snížení obsahu jódu a chlóru ve vzorcích**

Všechny vzorky získané po izolaci AQU4 obsahovaly jód a kvůli elementární analýze musel být jód odstraněn. Z každého vzorku bylo odebráno definované množství materiálu (obvykle 1 g, záleželo ale na výtěžku), zalito 30 ml destilované vody a ke každému vzorku bylo přidáno potřebné množství thiosíranu sodného, aby došlo k redukci volného jódu (ověřováno pomocí roztoku škrobu). Takto připravené roztoky byly ponechány 4 hodiny na třepačce, poté převedeny do dialyzačních membrán (1 000 Da) a dialyzovány proti destilované vodě. Po ukončení dialýzy byly obsahy membrán zmrazeny a veškerá voda byla odstraněna pomocí lyofilizátoru.

Vzorky AQU1 nebyly na počátku dialyzovány, proto obsahovaly chlór a dodatečně byla dodělávána dialýza proti destilované vodě.

### **4.5 Nastavení přístrojů**

#### **4.5.1 Elementární analýza**

Elementární složení všech frakcí původních vzorků organické hmoty získaných z frakcionace na humeomika (viz kapitola 4.4) bylo zjištěno pomocí CHNS/O elementárního analyzátoru Euro EA3000. Obsah kyslíku byl manuálně dopočítán.

#### **4.5.2 Termogravimetrická analýza**

Jednotlivé frakce organické hmoty získané ze sekvenční frakcionace na humeomika byly dále charakterizovány termogravimetricky na přístroji TGA Q5000 od společnosti TA Instruments v kyslíkové atmosféře (10–700 °C). Ze získaných dat byl určen obsah nespalitelného podílu (popela) a celková vlhkost.

### 4.5.3 FTIR spektrometrie

Dále byly veškeré frakce organické hmoty získané ze sekvenční frakcionace na humeomika studovány pomocí FTIR spektrometrie za využití techniky ATR (technika zeslabeného úplného odrazu). Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě (v klimatizované místnosti) na vestavěném krystalu ATR. Spektra FTIR v ustáleném stavu byla zaznamenána v rozsahu  $4\ 000\text{--}400\ \text{cm}^{-1}$  a rozlišení  $4\ \text{cm}^{-1}$  (64 skenů). Jako pozadí měření bylo použito spektrum čistého suchého diamantového ATR krystalu v atmosféře okolního prostředí (vzduch). Sběr a zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru Omnic Series.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce je posouzení vlivu aplikace lignitu jako podpůrné látky na obsah a distribuci organické hmoty v půdě. Konvenční způsob zahrnuje klasickou alkalickou extrakci (NOM) a získaný extrakt se dále úpravou pH frakcionuje na huminové a fulvinové kyseliny, a tak se určí celková organika a poměr HK/FK.

Jak ukazují poslední studie [70–73], získá se metodou alkalické extrakce jen velmi malé množství z celkové organiky v půdě (viz Tab. 12, Tab. 13, Obr. 24 a Obr. 25). Proto se v poslední době objevují přístupy, jak chemicky modifikovat půdu (nejlépe sekvenčně), aby bylo postupně možné získat i ty silně vázané organické molekuly (např. huminy), resp. organickou hmotu vázanou na aluminosilikáty a železo v půdě. Jedním z přístupů je využit metodiku, kterou poprvé popsal Piccolo [70].

V této práci jsem se tuto metodu rozhodl aplikovat na posouzení vlivu aplikace lignitu na půdní organickou hmotu, jelikož se lignit využívá jako půdní kondicionér – podpůrná látka, která dodává do půdní matrice organickou hmotu. Navíc je lignit také stabilní a jeho pórovitá struktura vylepšuje i další fyzikálně-chemické vlastnosti půdy.

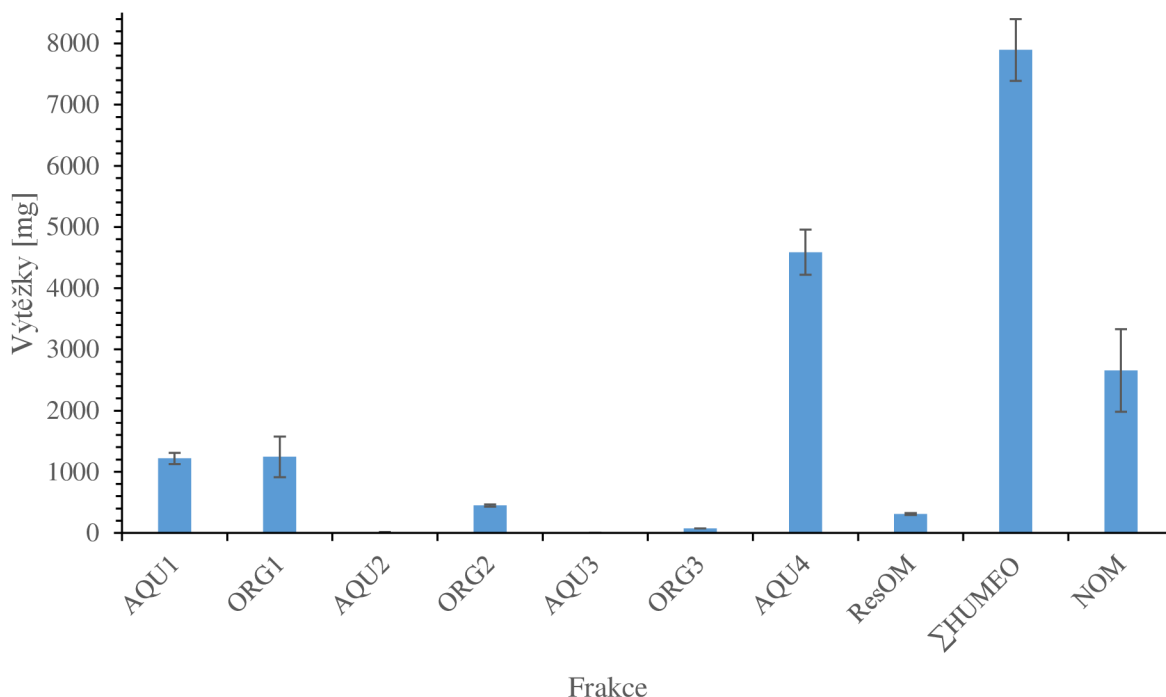
V rámci této kapitoly bude nejdříve představena metodika sekvenční chemické frakcionace, a také popsán postup zpracování výsledků (kapitola 5.1). Následně se budu věnovat vlivu lignitu na distribuci organické hmoty před a po jeho aplikaci (kapitola 5.2), a závěrem bude proveden bližší popis a charakterizace jednotlivých získaných frakcí organické hmoty (kapitola 5.3).

### 5.1 Sekvenční chemická frakcionace na humeomika

Pro posouzení vlivu aplikace lignitu na obsah a distribuci organické hmoty v půdě byla provedena sekvenční chemická frakcionace jednak na původním vzorku půdy, lignitu, který byl do půdy aplikován, a dále také na vzorku půdy získaném rok po aplikaci lignitu. V této kapitole bude tato metoda názorně představena na zdrojové matici lignitu, jelikož tato matrice obsahovala organické hmoty nejvíce.

Tab. 7 – Výtěžky jednotlivých frakcí získaných z lignitické zdrojové matrice (v 50 g zdrojové matrice).

Vzorek	$m_p$ [mg]	Vzorek	$m_p$ [mg]
Lignit AQU1	$1\,218,0 \pm 91,9$	Lignit AQU4	$4\,587,6 \pm 369,6$
Lignit ORG1	$1\,243,5 \pm 332,6$	Lignit OM po AQU4	$41\,673,0 \pm 1\,893,3$
Lignit AQU2	$12,4 \pm 2,3$	Lignit ResOM	$309,2 \pm 14,1$
Lignit ORG2	$447,5 \pm 17,9$	Lignit OM po ResOM	$35\,632,6 \pm 1\,092,9$
Lignit AQU3	$0,2 \pm 0,1$	Lignit NOM	$2\,656,0 \pm 674,1$
Lignit ORG3	$75,7 \pm 0,1$	Lignit OM po NOM	$43\,250,3 \pm 2\,002,6$



Obr. 15 – Výtěžky jednotlivých frakcí získaných z lignitické zdrojové matrice (v 50 g zdrojové matrice).

V Tab. 7 jsou uvedeny výtěžky jednotlivých frakcí (graficky znázorněné na Obr. 15), získaných z 50 g zdrojové matrice a jejich srovnání s klasickou alkalickou extrakcí (NOM). Jak je vidět, celkové množství vyizolovaných frakcí organické hmoty získaných sekvenční chemickou frakcionací je oproti klasické alkalické extrakci několikanásobně vyšší. Takto získané frakce v sobě ale obsahují určité procento solí, které byly do jednotlivých frakcí vpraveny uměle izolační procedurou z použitých extrakčních činidel, a také vlhkost, které byly zjištěny pomocí TGA (Tab. 8), a bylo třeba je přepočítat na obsah organické hmoty v původních vzorcích.

Tab. 8 – Obsah popelovin a vlhkosti v jednotlivých frakcích získaných z lignitické zdrojové matrice.

Vzorek	Popel [hm. %]	Vlhkost [hm. %]
Lignit AQU1	47,44 ± 7,35	13,15 ± 6,28
Lignit ORG1	1,09 ± 0,81	1,27 ± 0,35
Lignit AQU2	12,95 ± 1,71	7,58 ± 0,57
Lignit ORG2	5,13 ± 0,50	11,78 ± 3,30
Lignit AQU3	N/A*	N/A*
Lignit ORG3	N/A*	N/A*
Lignit AQU4	59,27 ± 0,61	10,97 ± 0,38
Lignit OM po AQU4	23,39 ± 0,84	16,87 ± 3,74
Lignit ResOM	39,18 ± 0,01	11,03 ± 0,01
Lignit OM po ResOM	38,56 ± 0,51	9,19 ± 0,37
Lignit NOM	15,48 ± 2,46	9,56 ± 0,66
Lignit OM po NOM	48,41 ± 0,74	5,86 ± 0,88

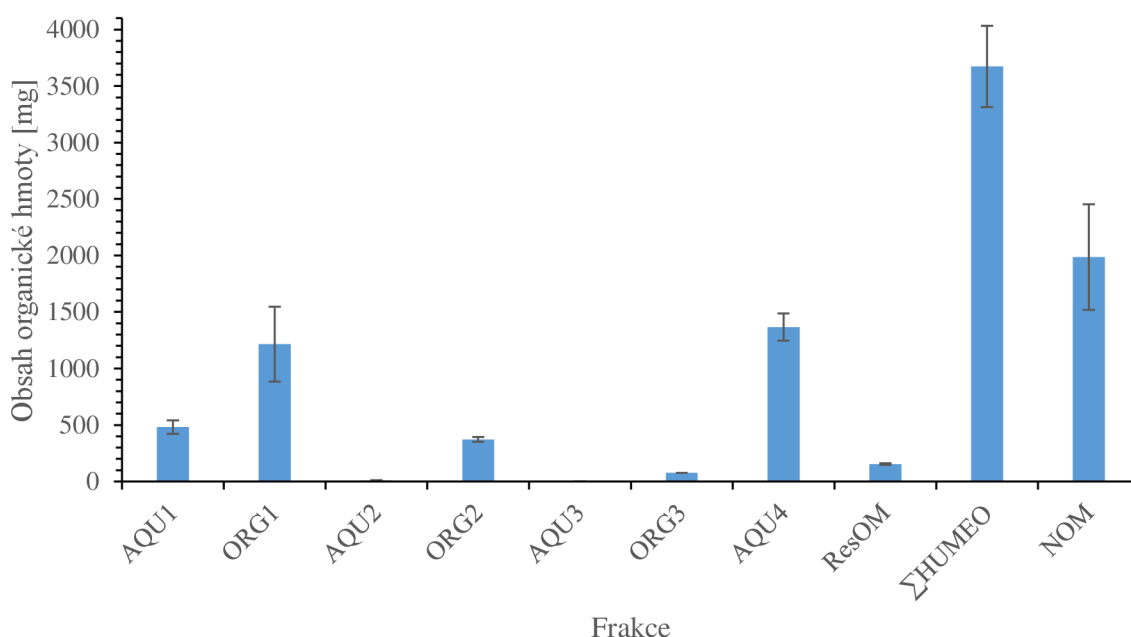
\* Z lignitu byly získány jen velmi malé výtěžky frakcí AQU3 a ORG3, které byly využity jen na elementární analýzu.

Popeloviny a vlhkost jsou uvedeny v Tab. 8. S těmito daty bylo následně možné přepočítat získané výtěžky na obsah organické hmoty (resp. organického uhlíku) v nich.

Tab. 9 – Obsah organické hmoty ve výtěžcích z lignitické zdrojové matrice.

Vzorek	m <sub>p</sub> [mg]	Vzorek	m <sub>p</sub> [mg]
Lignit AQU1	481,1 ± 59,4	Lignit AQU4	1 366,0 ± 120,6
Lignit ORG1	1 215,3 ± 332,6	Lignit OM po AQU4	24 857,7 ± 193,5
Lignit AQU2	9,9 ± 1,9	Lignit ResOM	154,0 ± 7,0
Lignit ORG2	371,8 ± 21,2	Lignit OM po ResOM	18 623,2 ± 783,2
Lignit AQU3	0,2 ± 0,1	Lignit NOM	1 985,6 ± 468,1
Lignit ORG3	75,7 ± 0,1	Lignit OM po NOM	19 776,5 ± 971,6
Celkový obsah organických látek v lignitu		34 485,0 ± 0,1	

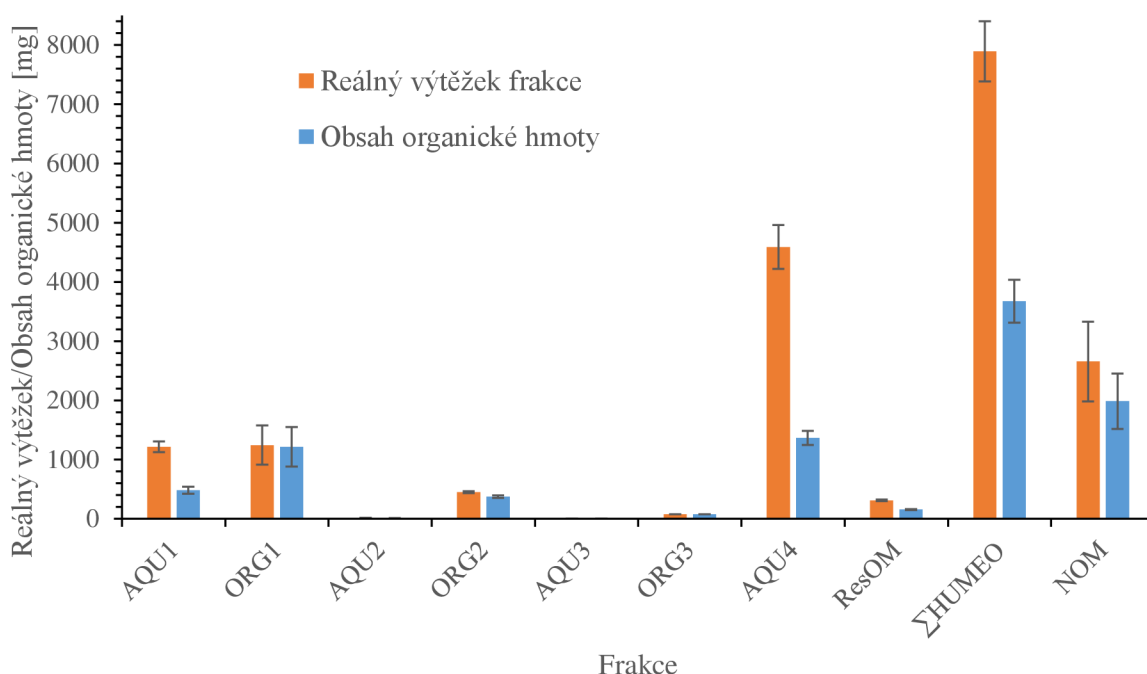
V Tab. 9 jsou uvedeny obsahy organické hmoty v jednotlivých výtěžcích (graficky znázorněné na Obr. 16). Obsahy vlhkostí asi není třeba srovnávat, i když byly všechny vzorky sušeny, určité procento vody vždy zůstane pevně vázáno uvnitř struktury. Co se ale popelovin týče, v určitých frakcích je jich poměrně velké procento.



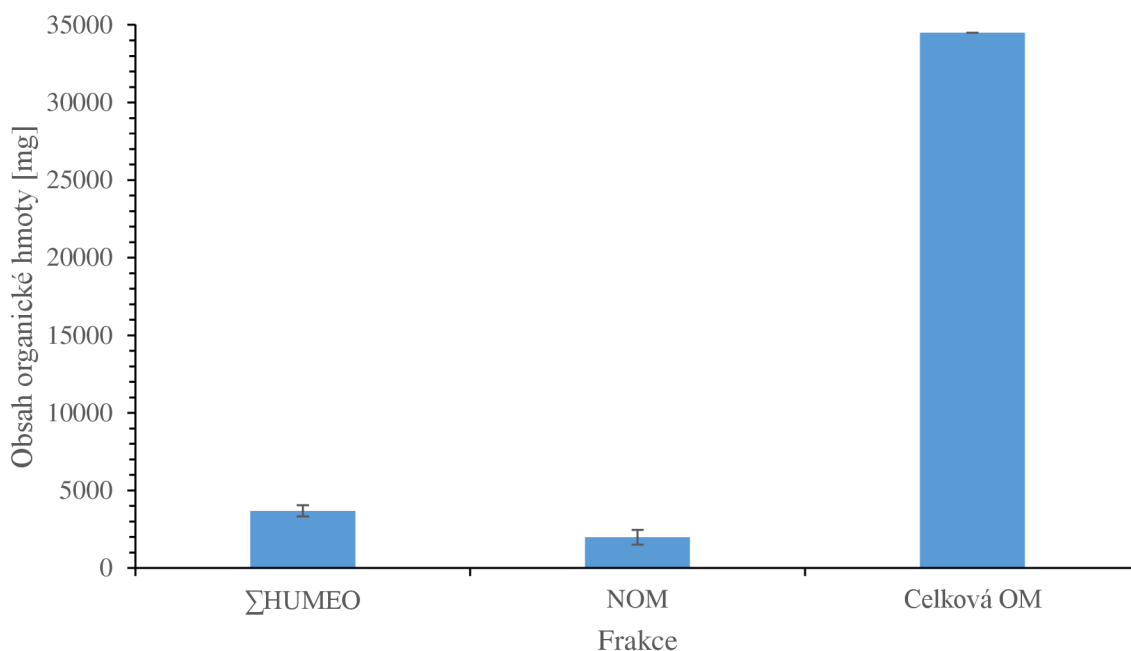
Obr. 16 – Obsah organické hmoty ve výtěžcích z lignitické zdrojové matrice.

Detailněji ze srovnání jednotlivých frakcí vyplývá, že vyšší obsah popela měly zejména frakce AQU1, AQU4, RESOM a reziduální materiály po extrakci. U frakce AQU1 je vyšší obsah popela způsoben tím, že u ní nebyla po extrakci provedena dialýza, jelikož se jedná o mobilní frakce organické hmoty reprezentované ve vodě rozpustnými relativně malými molekulami a dialýzou by se vymyla většina z organického materiálu. Frakce ORG1, AQU2 a ORG3 obsahují jen velmi málo popelovin. Na frakcích AQU3 a ORG3 nebyly popeloviny

a vlhkost zjišťovány, jelikož výtěžky těchto frakcí byly velmi nízké a primárně byla vždy zjišťována elementární analýza, po které již nezbývalo žádné množství pro TGA. Na získání frakce AQU4 byla použita kyselina jodovodíková a pro úpravu pH a redukci jódu byly použity  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , které tuto frakci „zasolili“. Zbylá frakce ResOM a frakce NOM byly obě získány alkalickou extrakcí. ResOM po vyizolování ostatních frakcí ale obsahovala více než dvojnásobek popelovin oproti NOM. Zbytky OM po AQU4, ResOM a NOM byly zasoleny hodně, což je způsobeno tím, že se jedná o původní matici, která v sobě popeloviny obecně obsahuje a podstatná část byla do matrice rovněž vpravena během izolace AQU4. U NOM je zasolení dále ještě způsobeno tím, že se před dialýzou vzorek okyseluje pomocí  $\text{HCl}$ , takže neutralizací vzniká sůl. Srovnání metody sekvenční chemické frakcionace a klasické alkalické extrakce nám ukazuje, že pomocí klasické NOM lze vyextrahovat jen asi polovinu organické hmoty oproti sekvenční chemické frakcionaci. Souhrnné srovnání obou grafů je pro ukázkou uvedeno na Obr. 17.



Obr. 17 – Porovnání reálného výtěžku a obsahu organické hmoty v jednotlivých frakcích u lignitické zdrojové matrice.



Obr. 18 – Porovnání vyextrahované organické hmoty s celkovým obsahem.

Zajímavé je porovnání obou metod extrakce organické hmoty s celkovým množstvím organické hmoty v lignitu, které je uvedeno na Obr. 18. Dokonce i metodou sekvenční chemické frakcionace bylo možné získat jen velmi malé množství organické hmoty z celkového obsahu v lignitické matici, asi jen okolo 10 %, metodou NOM jen asi okolo 5 %.

Pomocí TGA byla zjištěna distribuce organické hmoty mezi jednotlivými frakcemi a následně byly vzorky podrobeny elementární analýze, kterou byla získána hmotnostní procentuální zastoupení C, H a N, O byl následně dopočítán i s pomocí hodnot vlhkosti a popelovin uvedených v Tab. 8. Z hlediska cíle diplomové práce, což bylo posouzení vlivu aplikace lignitu na kvalitu a distribuci organické hmoty v půdě, je nejpodstatnější sledovat zastoupení organického uhlíku a dusíku. Frakce AQU1 a všechny od AQU4 až po OM po ResOM které obsahovaly velké množství chloridů resp. iodidů, vpravených do vzorků během izolační procedury musely být před provedením elementární analýzy ještě dodatkově přečištěny. K těmto účelům byla využita metodika popsána v kapitole 4.4.7. Získané promyté vzorky byly podrobeny elementární analýze, výsledky bylo nutné přepočítat podle množství vymytého materiálu dle Tab. 10.

Tab. 10 – Navážky a výtěžky frakcí, podrobených promývání (popsáno v kapitole 4.4.7.)

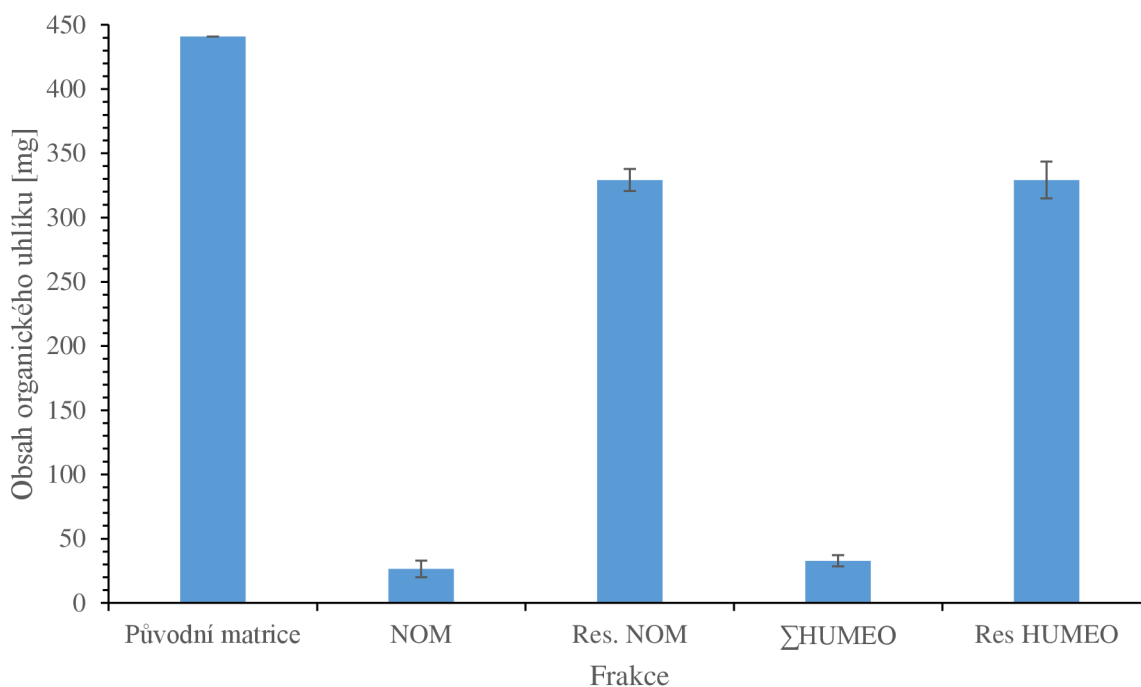
Vzorek	Navážka [g]	Výtěžek [g]
Půda AQU1	0,3950	0,0896
Lignit AQU1	1,0710	0,0131
1YP AQU1	0,3580	0,0741
Půda AQU4	1,0050	0,7715
Lignit AQU4	1,0850	0,9695
1YP AQU4	1,0470	0,9741
Půda OM po AQU4	1,0050	0,7160
Lignit OM po AQU4	1,0450	0,3816
1YP OM po AQU4	1,0200	0,7456
Půda ResOM	0,0470	0,0051
Lignit ResOM	0,0850	0,0188
1YP ResOM	0,0430	0,0060
Půda OM po ResOM	1,0840	0,8487
Lignit OM po ResOM	1,0040	0,7466
1YP OM po ResOM	1,0750	0,1225

Tab. 11 – Zastoupení základních organických prvků (C, O, N, H) získaných sekvenční chemickou frakcionací a NOM frakcionací pro lignit. Hodnoty jsou vztaženy na 1 g zdrojové matrice.

Vzorek	C [mg/1 g]	H [mg/1 g]	N [mg/1 g]	O [mg/1 g]
Lig. AQU1	5,933 ± 0,003	0,509 ± 0,076	0,311 ± 0,014	7,345 ± 0,764
Lig. ORG1	17,303 ± 4,441	2,573 ± 0,667	0,058 ± 0,013	4,372 ± 1,531
Lig. AQU2	0,106 ± 0,019	0,010 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,078 ± 0,017
Lig. ORG2	3,753 ± 0,136	0,480 ± 0,027	0,019 ± 0,004	3,185 ± 0,326
Lig. AQU3 ( $\cdot 10^{-3}$ )	1,290 ± 0,001	0,200 ± 0,001	0,320 ± 0,001	1,520 ± 0,001
Lig. ORG3	1,066 ± 0,001	0,204 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,235 ± 0,001
Lig. AQU4	0,762 ± 0,029	3,206 ± 0,147	0,153 ± 0,012	18,642 ± 0,358
Lig. OM po AQU4	341,197 ± 1,661	23,366 ± 0,399	8,282 ± 0,095	80,596 ± 27,643
Lig. ResOM	3,886 ± 0,000	0,282 ± 0,000	0,152 ± 0,000	N/A*
Lig. OM po ResOM	329,164 ± 14,316	24,517 ± 1,554	8,137 ± 0,288	43,668 ± 4,604
Lig. NOM	26,386 ± 6,483	2,344 ± 0,687	0,473 ± 0,086	10,508 ± 2,160
Lig. OM po NOM	222,434 ± 8,640	23,933 ± 1,499	0,073 ± 0,043	149,091 ± 12,608

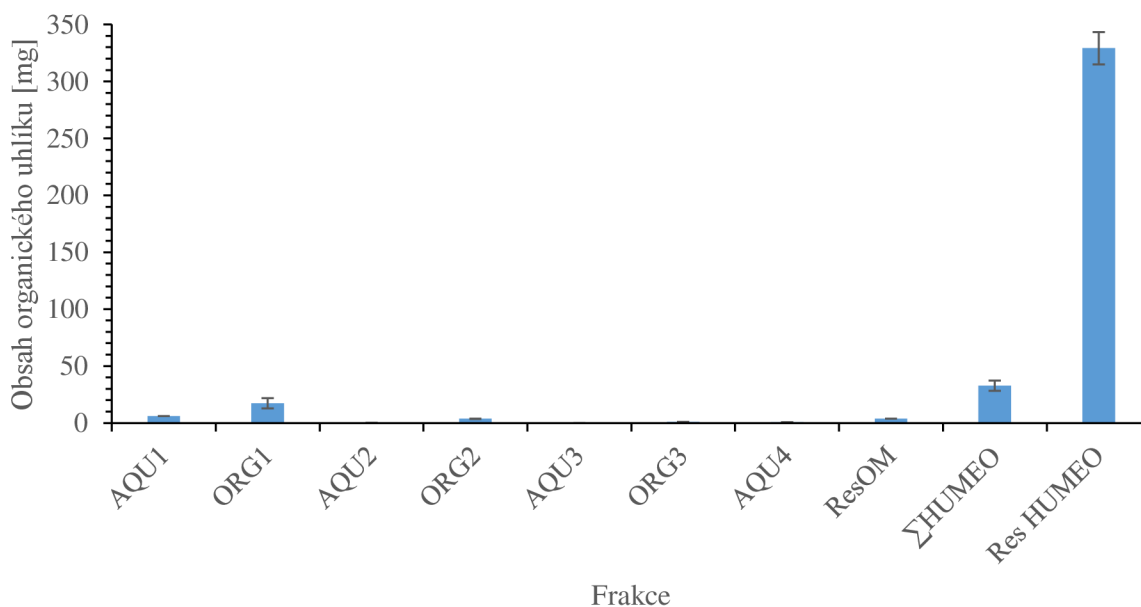
\* Nebylo možné dopočítat z důvodu nedostatečného množství vzorku pro TGA analýzu nezbytnou pro dopočet obsahu kyslíku.



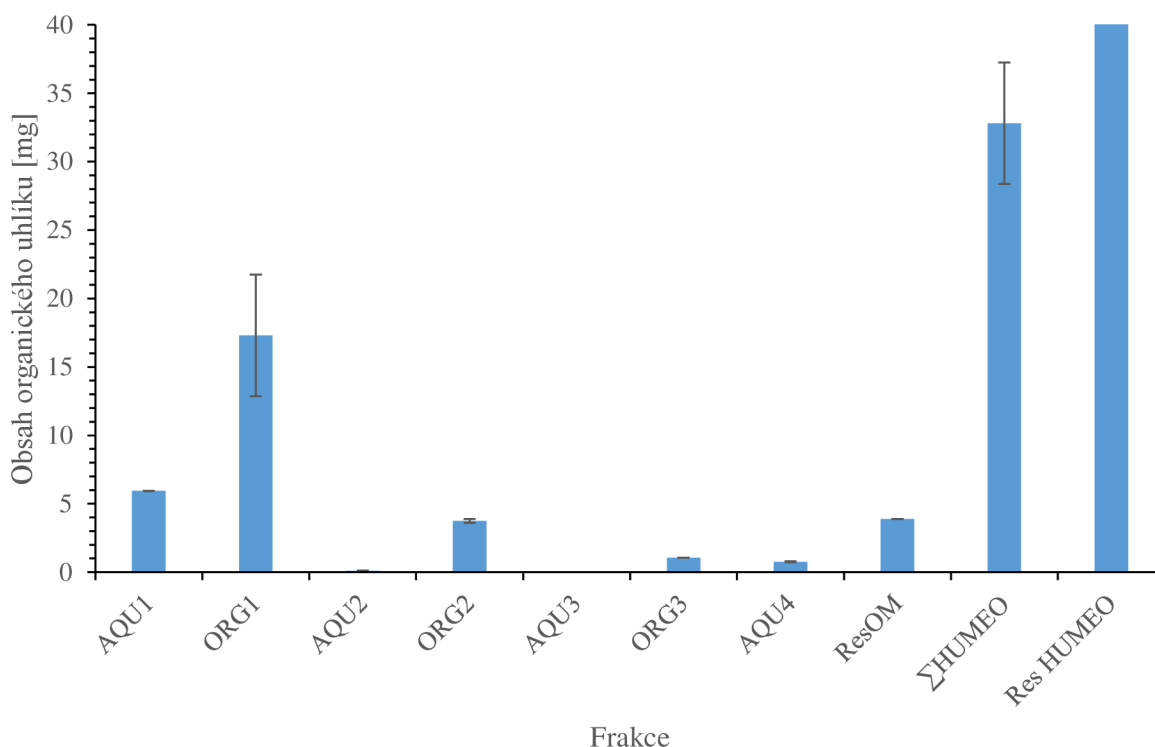


Obr. 19 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v původní matrici, organického uhlíku vyextrahovaného oběma metodami a jeho zbytku v matricích po extrakci u lignitické matrice.

Na Obr. 19 je znázorněno celkové vyextrahované množství uhlíku získaného z lignitu (určeno pomocí TGA a EA) a srovnáno se sekvenční chemickou frakcionací, klasickou alkalickou extrakcí a nevyextrahovanými zbytky po NOM a sekvenční frakcionací. Viditelně bylo sekvenční chemickou frakcionací získáno více organického uhlíku, než pomocí NOM, ale v residuích ještě organického uhlíku zbylo poměrně hodně.



Obr. 20 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v jednotlivých frakcích u lignitické matrice.



Obr. 21 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v jednotlivých frakcích u lignitické matrice. (Přibliženo)

V Tab. 11 je uvedeno zastoupení prvků v lignitické zdrojové matrici, dále pak pro názornost jsou tato data vynesena do grafické podoby (Obr. 20 a Obr. 21), kde je uvedeno srovnání zastoupení organického uhlíku ve všech frakcích. Viditelně bylo nejvíce organického uhlíku zastoupeno v ORG1 frakci a AQU1 frakci, takže velké procento organického uhlíku je zastoupeno ve frakcích, které nejsou k matrici vázány pevně, tedy frakce, které jsou mobilní a v případě aplikace lignitu do půdy by mohly být do ní převedeny, a tím by mohly představovat organický uhlík lehce dostupný pro výživu rostlin, ale na druhou stranu také náchylný pro vyplavování do nižších vrstev půdního profilu. Obecně je ale viditelné, že větší část organického uhlíku je vždy zastoupena v ORG frakcích oproti AQU frakcím.

Obecně platí, že čím se (např. v Obr. 20 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v jednotlivých frakcích u lignitické matrice.) pohybujeme ve frakcích směrem doprava (AQU1 → AQU4, resp. ORG1 → ORG3), je organický uhlík a dusík (obecně organická hmota) stále méně dostupný pro rostliny, méně mobilní v přírodě a je vázaný do složitějších rigidnějších struktur. Takto stabilizovaná organická hmota setrvává v půdě po delší časový horizont.

## 5.2 Vliv aplikace lignitu na distribuci organické hmoty v půdě

Hlavním úkolem této práce bylo využít metodiku sekvenční chemické frakcionace pro posouzení vlivu přídatku lignitu do půdy na složení a distribuci organické hmoty. Se znalostí obsahu popelovin a vlhkosti, získaných pomocí TGA, byly reálné výtěžky přepočítány na obsah organické hmoty v jednotlivých výtěžcích – Tab. 12 a Tab. 13.

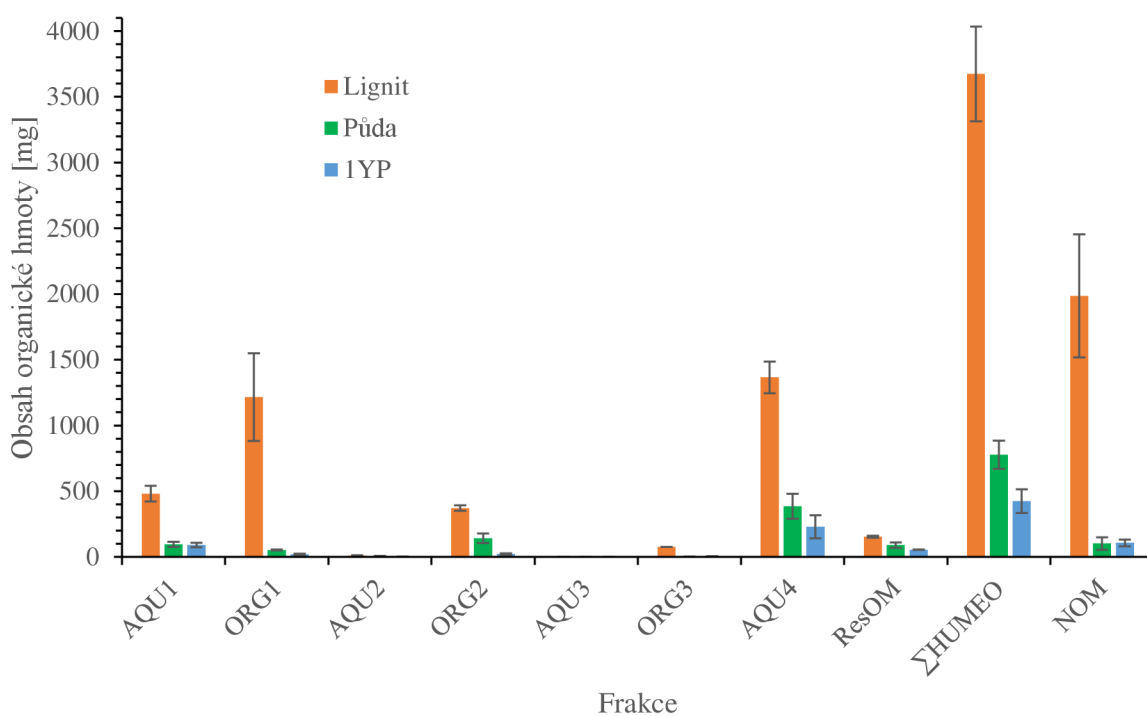
Tab. 12 – Výtěžky jednotlivých frakcí ( $m_p$ ), obsah popelovin a vlhkosti a vypočítaný obsah organické hmoty ze všech zdrojových matic ( $m_{org}$ ) – sekvenční chemická frakcionace (v 50 g zdrojové matrice).

Vzorek	$m_p$ [mg]	Popel [%]	Vlhkost [%]	$m_{org}$ [mg]
Půda AQU1	231,0 ± 45,2	38,03 ± 0,58	20,58 ± 2,60	95,6 ± 19,1
Lignit AQU1	1 218,0 ± 91,9	47,44 ± 7,35	13,15 ± 6,28	481,1 ± 59,4
1YP AQU1	176,1 ± 35,2	35,38 ± 0,63	13,35 ± 0,24	90,2 ± 17,4
Půda ORG1	61,1 ± 6,1	9,39 ± 2,13	4,39 ± 1,50	52,7 ± 4,3
Lignit ORG1	1 243,5 ± 332,6	1,09 ± 0,81	1,27 ± 0,35	1 215,3 ± 332,6
1YP ORG1	30,3 ± 9,2	28,74 ± 3,41	4,34 ± 1,35	20,1 ± 5,7
Půda AQU2	10,2 ± 0,6	33,35 ± 8,04	4,11 ± 0,60	6,4 ± 0,6
Lignit AQU2	12,4 ± 2,3	12,95 ± 1,71	7,58 ± 0,57	9,9 ± 1,9
1YP AQU2	4,4 ± 1,3	20,69 ± 2,22	4,67 ± 0,14	3,3 ± 0,9
Půda ORG2	187,8 ± 76,1	7,48 ± 2,91	14,32 ± 10,19	141,6 ± 37,1
Lignit ORG2	447,5 ± 17,9	5,13 ± 0,50	11,78 ± 3,30	371,8 ± 21,2
1YP ORG2	45,3 ± 13,9	35,40 ± 3,10	17,48 ± 2,20	21,5 ± 7,2
Půda AQU3	1,1 ± 0,1	N/A*	N/A*	1,1 ± 0,1
Lignit AQU3	0,2 ± 0,1	N/A*	N/A*	0,2 ± 0,1
1YP AQU3	0,1 ± 0,1	N/A*	N/A*	0,1 ± 0,1
Půda ORG3	4,3 ± 0,1	N/A*	N/A*	4,3 ± 0,1
Lignit ORG3	75,7 ± 0,1	N/A*	N/A*	75,7 ± 0,1
1YP ORG3	5,7 ± 0,1	N/A*	N/A*	5,7 ± 0,1
Půda AQU4	1 392,4 ± 402,9	63,28 ± 0,98	8,86 ± 3,02	385,0 ± 95,7
Lignit AQU4	4 587,6 ± 369,6	59,27 ± 0,61	10,97 ± 0,38	1 366,0 ± 120,6
1YP AQU4	839,3 ± 331,6	62,51 ± 0,65	10,19 ± 0,33	228,5 ± 87,7
Půda OM po AQU4	35 316,7 ± 2 205,1	98,03 ± 0,35	0,47 ± 0,17	527,0 ± 113,5
Lignit OM po AQU4	41 673,0 ± 1 893,3	23,39 ± 0,84	16,87 ± 3,74	24 857,7 ± 193,5
1YP OM po AQU4	37 339,9 ± 462,1	99,31 ± 0,23	0,11 ± 0,06	217,0 ± 69,5
Půda ResOM	147,6 ± 9,2	43,80 ± 0,01	7,59 ± 0,01	90,6 ± 20,5
Lignit ResOM	309,2 ± 14,1	39,18 ± 0,01	11,03 ± 0,01	154,0 ± 7,0
1YP ResOM	111,3 ± 1,4	42,05 ± 0,01	8,56 ± 0,01	55,0 ± 0,7
Půda OM po ResOM	28 619,3 ± 971,1	98,91 ± 0,37	0,24 ± 0,07	242,0 ± 85,7
Lignit OM po ResOM	35 632,6 ± 1 092,9	38,56 ± 0,51	9,19 ± 0,37	18 623,2 ± 783,2
1YP OM po ResOM	31 936,4 ± 1 162,2	99,45 ± 0,08	0,06 ± 0,06	156,8 ± 232

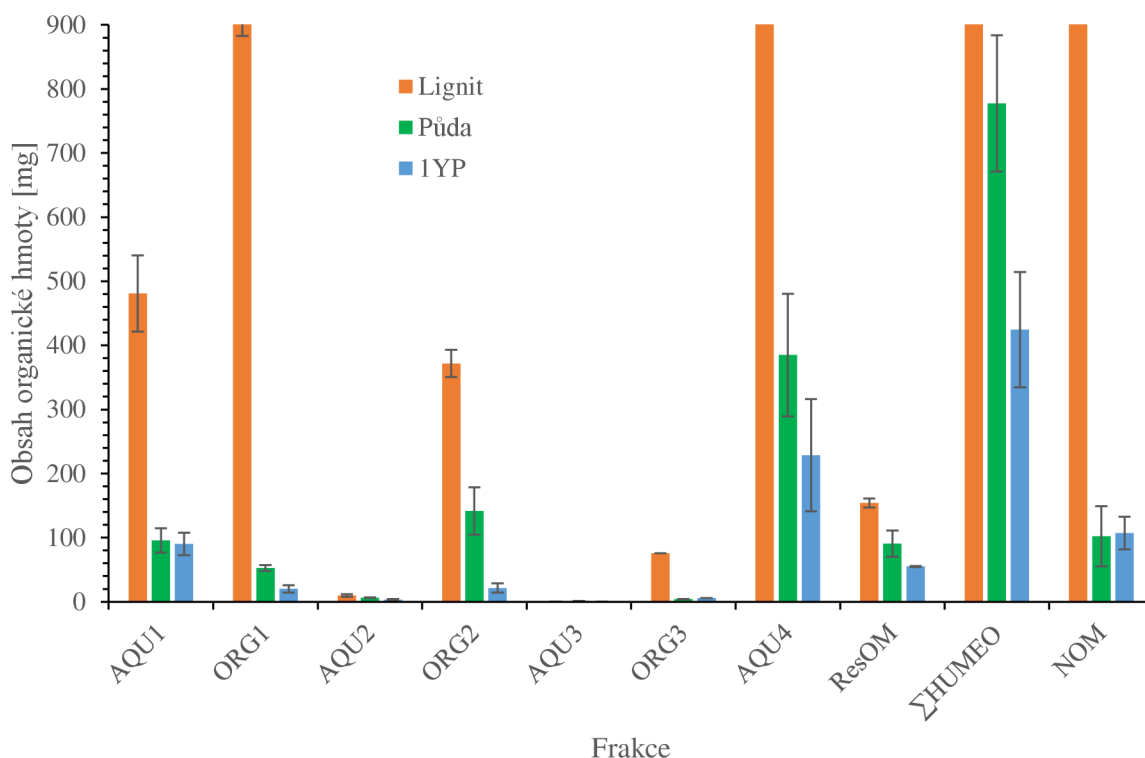
\* Ze všech zdrojových matic byly získány jen velmi malé výtěžky frakcí AQU3 a ORG3, které byly využity jen na elementární analýzu.

Tab. 13 – Výtěžky jednotlivých frakcí ( $m_p$ ), obsah popelovin a vlhkosti a vypočítaný obsah organické hmoty ze všech zdrojových matic ( $m_{org}$ ) – alkalická extrakce NOM (v 50 g zdrojové matrice).

Vzorek	$m_p$ [mg]	Popel [%]	Vlhkost [%]	$m_{org}$ [mg]
Půda NOM	241,0 ± 81,2	52,76 ± 7,06	5,64 ± 0,49	102,1 ± 47,1
Lignit NOM	2 656,0 ± 674,1	15,48 ± 2,46	9,56 ± 0,66	1 985,6 ± 468,1
1YP NOM	290,3 ± 39,1	58,40 ± 11,98	3,86 ± 0,68	107,2 ± 25,5
Půda OM po NOM	43 499,0 ± 1 016,7	95,73 ± 0,72	0,04 ± 0,02	1 837,1 ± 315,8
Lignit OM po NOM	43 250,3 ± 2 002,6	48,41 ± 0,74	5,86 ± 0,88	19 776,5 ± 971,6
1YP OM po NOM	42 510,3 ± 1 387,9	95,82 ± 0,27	0,25 ± 0,18	1 668,3 ± 87,4



Obr. 22 – Srovnání obsahu organické hmoty ve všech frakcích získaných ze všech zdrojových matic.



Obr. 23 – Srovnání obsahu organické hmoty ve všech frakcích získaných ze všech zdrojových matic. (Přibliženo)

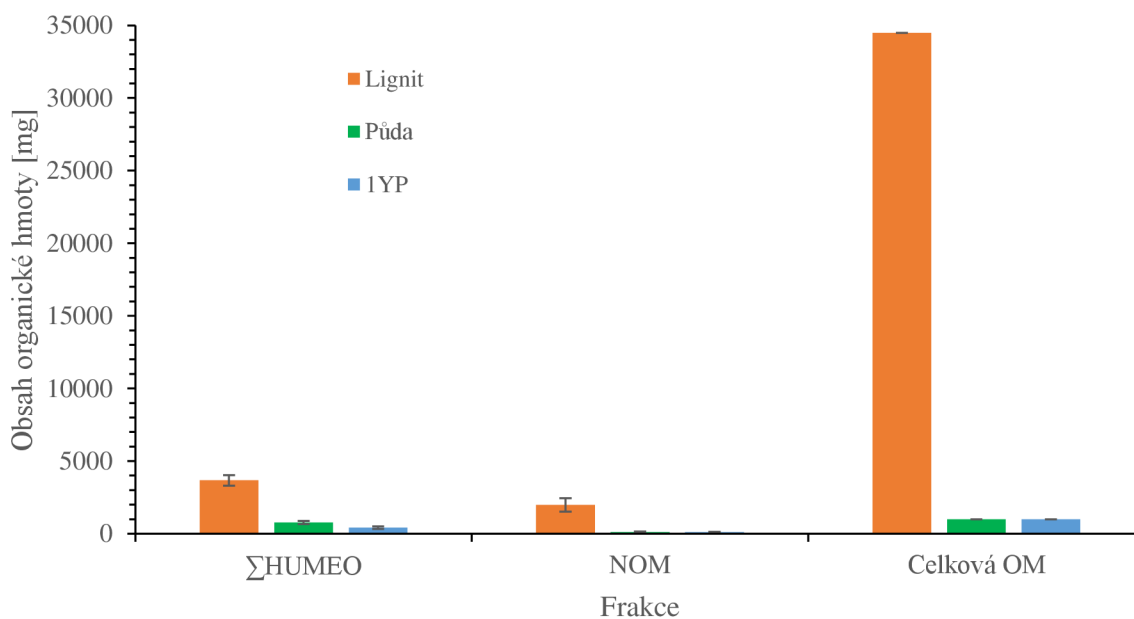
Výtěžky uvedené v Tab. 12 a Tab. 13 a souhrnná grafická znázornění na Obr. 22 a Obr. 23 ukazují obsah organické hmoty v jednotlivých frakcích v původních zdrojových maticích, a také jak se v nich po aplikaci lignitu měnila distribuce organické hmoty. Obecně je obsah organické hmoty v lignitu daleko vyšší, než v půdní matici, nicméně napříč frakcemi humeomik se rozdíl obsahu OM mezi maticemi mění. Při bližším zkoumání jednotlivých frakcí je viditelné, že obsahy organické hmoty v původní půdní matici jsou vyšší, než v ročním odběru půdy. To ale odporuje teoretickému předpokladu, že by se zastoupení organické hmoty mělo s postupem času po aplikaci podpůrné látky zvětšovat. Pokud ale porovnáme získaný obsah organické hmoty klasickou alkalickou extrakcí NOM, jsou původní vzorek a roční odběr prakticky srovnatelné. Výše pozorovaný pokles v celkovém výtěžku organické hmoty získaný na vzorku odběru půdy po jednom roce oproti výtěžku z frakcionace původního vzorku půdy před aplikací lignitu je patrně způsoben heterogenitou vzorku půdy a poměrně velkým obsahem písčitých frakcí. V případě odběru vzorků pro frakcionaci na humeomika byl patrně odebrán vzorek s nižším obsahem organické hmoty a vyšším zastoupením anorganických frakcí, což se projevilo ve výrazném poklesu celkové získané organické hmoty oproti analýze provedené na původním vzorku půdy. V případě NOM se patrně podařilo odebrat půdu o obdobném složení, což se promítlo obdobným stanoveným obsahem organické hmoty získané klasickou alkalickou extrakcí NOM. V případě využití této složité komplexní metodiky je tedy extrémně důležité dbát na to, aby byl vzorek odebírán ze stejného místa a byl před frakcionací důkladně homogenizován.

Pokud ale srovnáme NOM a sekvenční chemickou frakcionaci, je jasně viditelné, že pomocí sekvenční chemické frakcionace dokážeme vyextrahovat několikanásobně vyšší

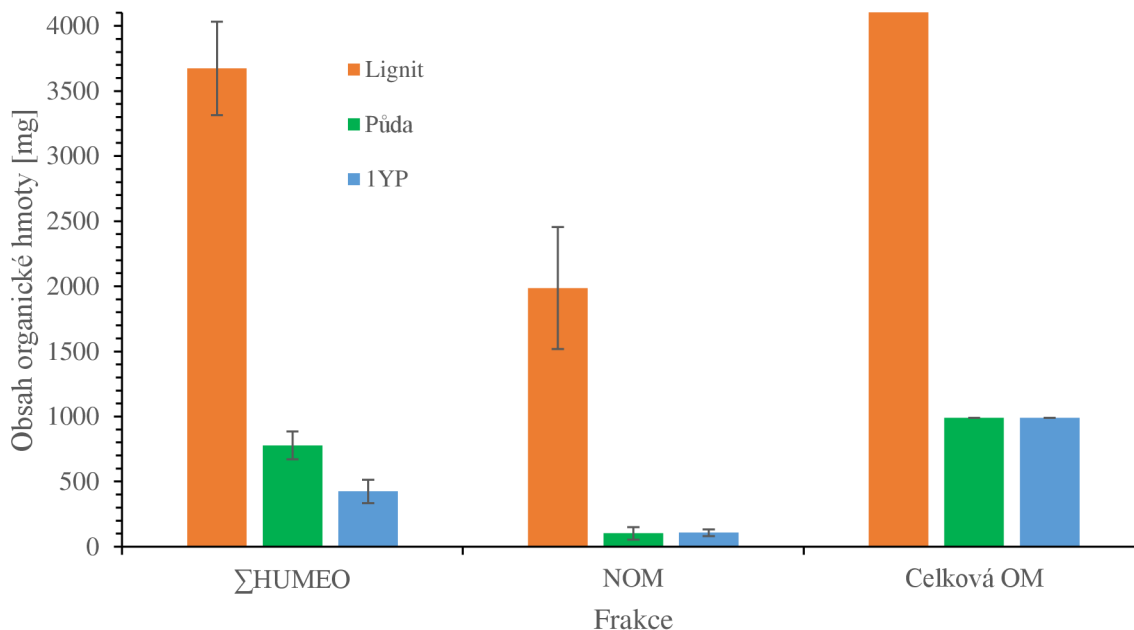
množství organické hmoty, než metodou NOM. Rozdíl v obsahu vyextrahované organické hmoty oběma metodami je ale více markantní u půdních matric, než u lignitické, což může souviset s celkovým obsahem organické hmoty v matricích – Tab. 14. Jen pro účely porovnání uvažují celkový obsah OM v matrici odběru po jednom roce stejný jako v původní půdní matrici před aplikací lignitu.

Tab. 14 – *Obsah organické hmoty ve zdrojových matricích.*

Celkový obsah organických látek v lignitu [mg]	34 485,0 ± 0,1
Celkový obsah organických látek v půdě (i 1YP) [mg]	990,0 ± 0,1



Obr. 24 – *Porovnání vyextrahované organické hmoty s celkovým obsahem.*



Obr. 25 – Porovnání vyextrahované organické hmoty s celkovým obsahem. (Přibliženo)

Podle Obr. 24 a Obr. 25 je zřejmý rozdíl mezi obsahem organické hmoty v matricích a množstvím, které se oběma metodami podařilo vyextrahovat. Nejmarkantnější rozdíl je u lignitu, kde je obsah organické hmoty oproti půdním vzorkům obrovský. I tak se ale i sekvenční chemickou frakcionací podařilo vyextrahovat jen malý zlomek organické hmoty. V případě této matrice s výrazně vysokým obsahem organické hmoty (např. lignit, leonardit, rašelina, apod.) by tedy asi bylo vhodné upravit dávkování a buď snížit navážku lignitu na stejnou dávku extrakčních činidel, nebo naopak zvýšit dávky činidel při stejné navážce lignitu. V případě obou půdních matric je také zřejmé, že se pomocí metody sekvenční chemické frakcionace podařilo vyextrahovat více organické hmoty, než metodou NOM.

Pomocí TGA byla zjištěna distribuce organické hmoty mezi jednotlivými frakcemi a následně byly vzorky podrobeny elementární analýze, kterou byla získána hmotnostní procentuální zastoupení C, H a N, O byl následně dopočítán i s pomocí hodnot vlhkosti a popelovin uvedených v Tab. 12. Z hlediska cíle diplomové práce, což bylo posouzení vlivu aplikace lignitu na kvalitu a distribuci organické hmoty v půdě, je nejpodstatnější sledovat zastoupení organického uhlíku a dusíku, což jsou organické prvky důležité pro výživu rostlin a správnou funkci půdy.

Tab. 15 – Zastoupení základních organických prvků (C, O, N, H) získaných sekvenční chemickou frakcionací u všech zdrojových matic. Hodnoty jsou vztaženy na 1 g zdrojové matrice.

Vzorek	C [mg/1g]	H [mg/1g]	N [mg/1g]	O [mg/1g]
Půda AQU1	0,432 ± 0,006	0,106 ± 0,007	0,024 ± 0,001	1,670 ± 0,116
Lig. AQU1	5,933 ± 0,003	0,509 ± 0,076	0,311 ± 0,014	7,345 ± 0,764
1YP AQU1	0,511 ± 0,001	0,203 ± 0,028	0,035 ± 0,001	1,682 ± 0,013
Půda ORG1	0,653 ± 0,054	0,101 ± 0,008	0,006 ± 0,001	0,293 ± 0,027
Lig. ORG1	17,303 ± 4,441	2,573 ± 0,667	0,058 ± 0,013	4,372 ± 1,531
1YP ORG1	0,113 ± 0,037	0,031 ± 0,007	0,004 ± 0,001	0,255 ± 0,085
Půda AQU2	0,049 ± 0,004	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,067 ± 0,015
Lig. AQU2	0,106 ± 0,019	0,010 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,078 ± 0,017
1YP AQU2	0,045 ± 0,013	0,007 ± 0,002	0,007 ± 0,002	0,007 ± 0,002
Půda ORG2	1,418 ± 0,571	0,170 ± 0,073	0,010 ± 0,005	1,235 ± 0,245
Lig. ORG2	3,753 ± 0,136	0,480 ± 0,027	0,019 ± 0,004	3,185 ± 0,326
1YP ORG2	0,268 ± 0,119	0,077 ± 0,032	0,004 ± 0,002	0,080 ± 0,033
Půda AQU3 ( $\cdot 10^{-3}$ )	5,750 ± 0,001	0,400 ± 0,001	1,470 ± 0,001	15,040 ± 0,001
Lig. AQU3 ( $\cdot 10^{-3}$ )	1,290 ± 0,001	0,200 ± 0,001	0,320 ± 0,001	1,520 ± 0,001
1YP AQU3 ( $\cdot 10^{-3}$ )	0,270 ± 0,001	0,030 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,590 ± 0,001
Půda ORG3	0,060 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,013 ± 0,001
Lig. ORG3	1,066 ± 0,001	0,204 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,235 ± 0,001
1YP ORG3	0,055 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,048 ± 0,001
Půda AQU4	0,152 ± 0,001	0,256 ± 0,027	0,009 ± 0,001	5,310 ± 0,406
Lig. AQU4	0,762 ± 0,029	3,206 ± 0,147	0,153 ± 0,012	18,642 ± 0,358
1YP AQU4	0,169 ± 0,007	0,738 ± 0,013	0,028 ± 0,003	5,528 ± 0,106
Půda OM po AQU4	3,089 ± 0,104	0,487 ± 0,014	0,174 ± 0,014	6,188 ± 2,508
Lig. OM po AQU4	341,197 ± 1,661	23,366 ± 0,399	8,282 ± 0,095	80,596 ± 27,643
1YP OM po AQU4	0,559 ± 0,090	0,643 ± 0,119	0,136 ± 0,004	2,938 ± 1,261
Půda ResOM	2,081 ± 0,001	0,082 ± 0,001	0,104 ± 0,001	0,464 ± 0,001
Lig. ResOM	3,886 ± 0,001	0,282 ± 0,001	0,152 ± 0,001	N/A
1YP ResOM	1,600 ± 0,001	0,062 ± 0,001	0,086 ± 0,001	0,323 ± 0,001
Půda OM po ResOM	1,563 ± 0,076	0,712 ± 0,066	0,163 ± 0,013	4,379 ± 3,061
Lig. OM po ResOM	329,164 ± 14,316	24,517 ± 1,554	8,137 ± 0,288	43,668 ± 4,604
1YP OM po ResOM	0,582 ± 0,027	0,900 ± 0,108	0,147 ± 0,022	2,610 ± 0,598

Frakce AQU1 a všechny od AQU4 až po OM po ResOM byly ještě dodatečně podrobeny procesu popsanému v kapitole 4.4.7, tudíž musely být hodnoty ještě přepočítány podle nových výtěžků uvedených v Tab. 10.

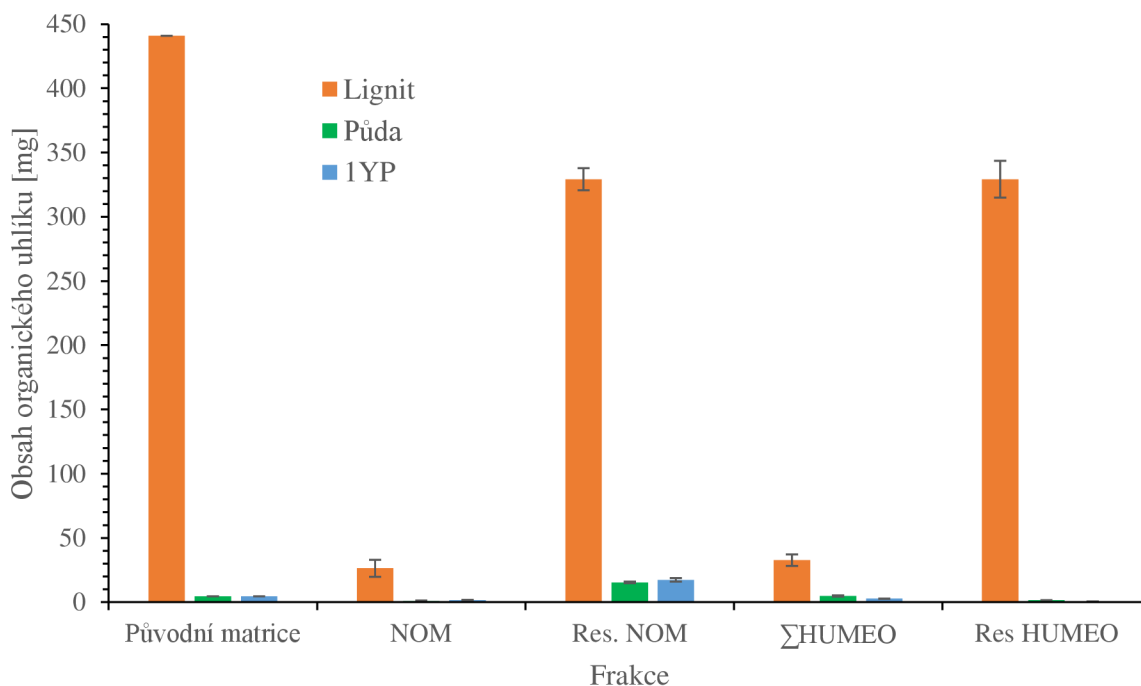


Tab. 16 – Zastoupení základních organických prvků (C, O, N, H) získaných NOM frakciami u všech zdrojových matic. Hodnoty jsou vztaženy na 1 g zdrojové matrice.

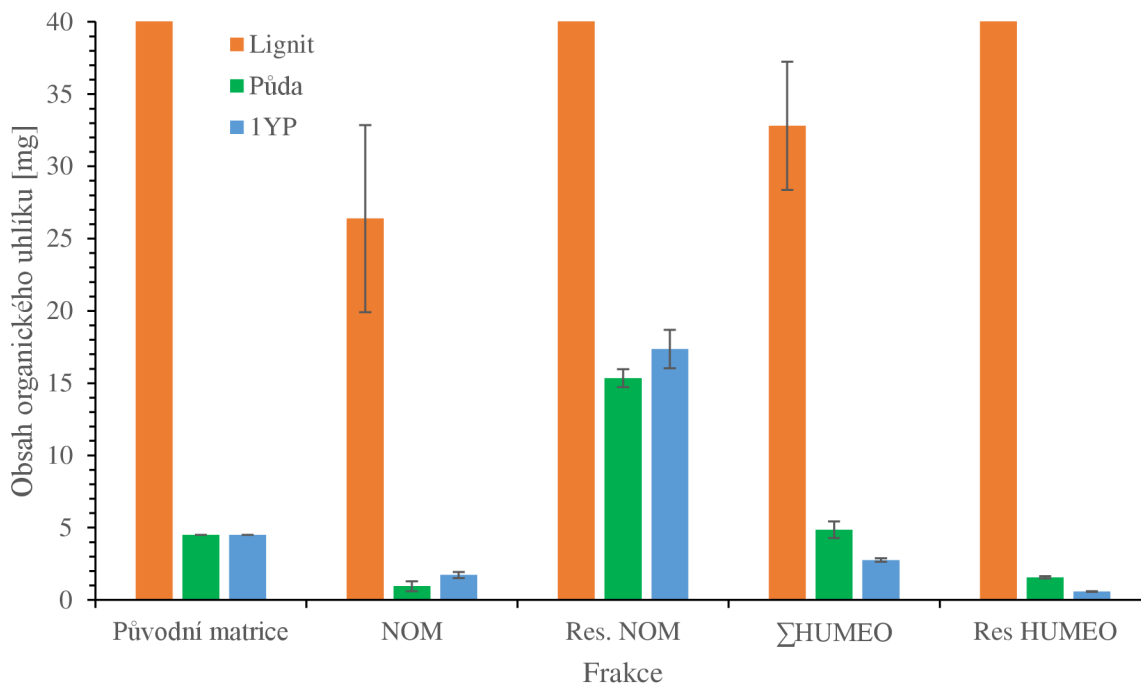
Vzorek	C [mg/1g]	H [mg/1g]	N [mg/1g]	O [mg/1g]
Půda NOM	0,953 ± 0,338	0,142 ± 0,053	0,070 ± 0,021	0,877 ± 0,553
Lignit NOM	26,386 ± 6,483	2,344 ± 0,687	0,473 ± 0,086	10,508 ± 2,160
1YP NOM	1,723 ± 0,216	0,308 ± 0,035	0,200 ± 0,024	0,000 ± 0,000
Půda OM po NOM	15,344 ± 0,616	9,132 ± 0,626	N/A	12,265 ± 5,889
Lig. OM po NOM	222,434 ± 8,640	23,933 ± 1,499	0,073 ± 0,043	149,091 ± 12,608
1YP OM po NOM	17,364 ± 1,336	10,064 ± 0,719	0,000 ± 0,000	5,938 ± 3,036

Tab. 17 – Zastoupení základních organických prvků (C, O, N, H) ve zdrojových maticích (pro vzorek 1YP uvažujeme stejné elementární zastoupení jako u půdy před modifikací).

Vzorek	C [mg/1g]	H [mg/1g]	N [mg/1g]	O [mg/1g]
Lignit	441,0 ± 0,1	45,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	223,2 ± 0,1
Půda (i 1YP)	4,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	57,0 ± 0,1

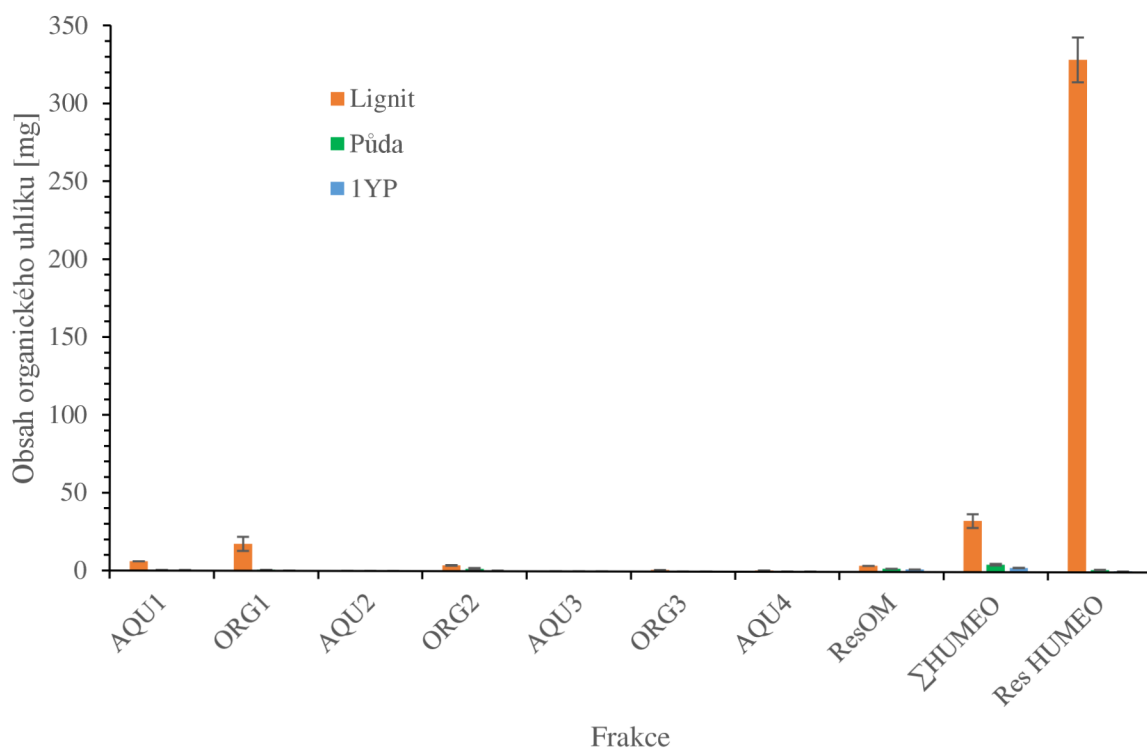


Obr. 26 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v původní matrici, organického uhlíku vyextrahovaného oběma metodami a jeho zbytku v maticích po extrakci u všech zdrojových matic.

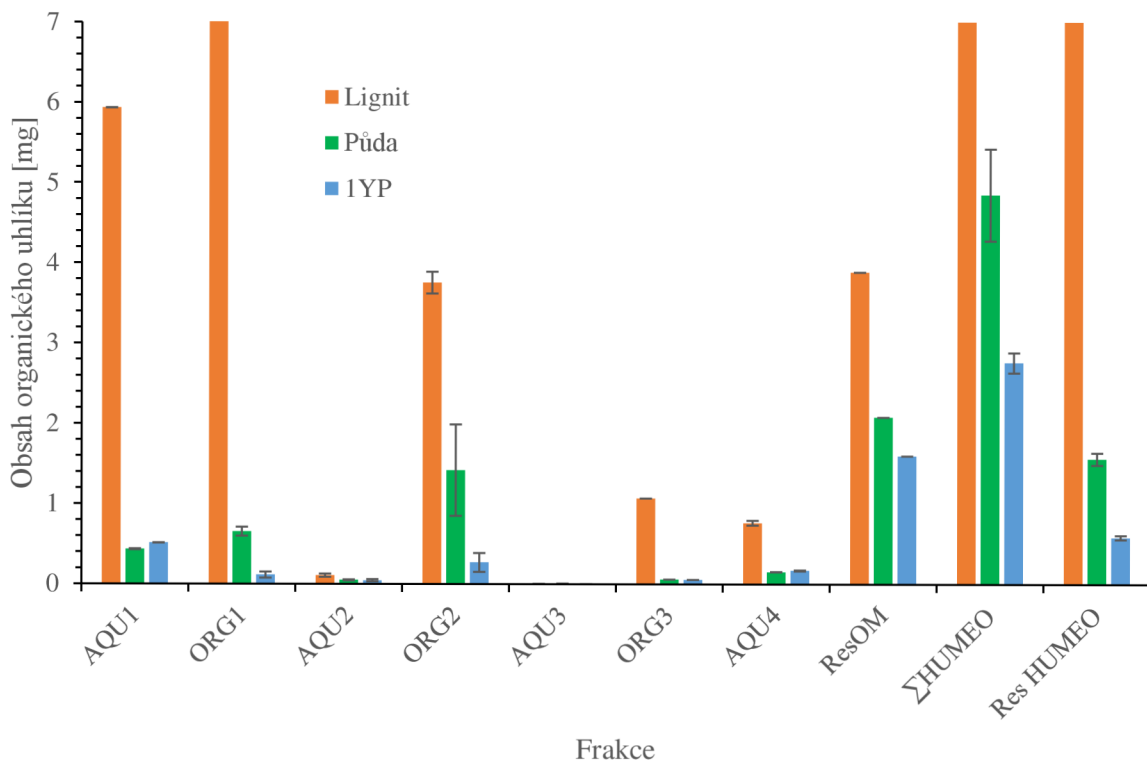


Obr. 27 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v původní matrici, organického uhlíku vyextrahovaného oběma metodami a jeho zbytku v matricích po extrakci u všech zdrojových matric. (Přibliženo)

V Tab. 15 a Tab. 16 jsou uvedena zastoupení prvků ve všech frakcích získaných elementární analýzou ze všech zdrojových matric, dále v Tab. 17 je uvedeno zastoupení prvků celkově ve zdrojových matricích. Na Obr. 26 a Obr. 27 můžeme srovnat obě využití metody v této práci. Je zřejmé, že u výtěžností organického uhlíku vysoce převyšuje metoda sekvenční chemické frakcionace. Celková organika u půdní matrice se ale nedělala na stejném odběru a vzhledem k heterogenitě původního vzorku půdy může i drobná odchylka ve stopovém množství organické hmoty způsobit významnou odchylku ve stanoveném množství organického uhlíku, což se projevilo ve výrazně nižším obsahu organického uhlíku vzhledem k součtu NOM a ResNOM, a také HUMEO a ResHUMEO.



Obr. 28 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v jednotlivých frakcích všech zdrojových matic.



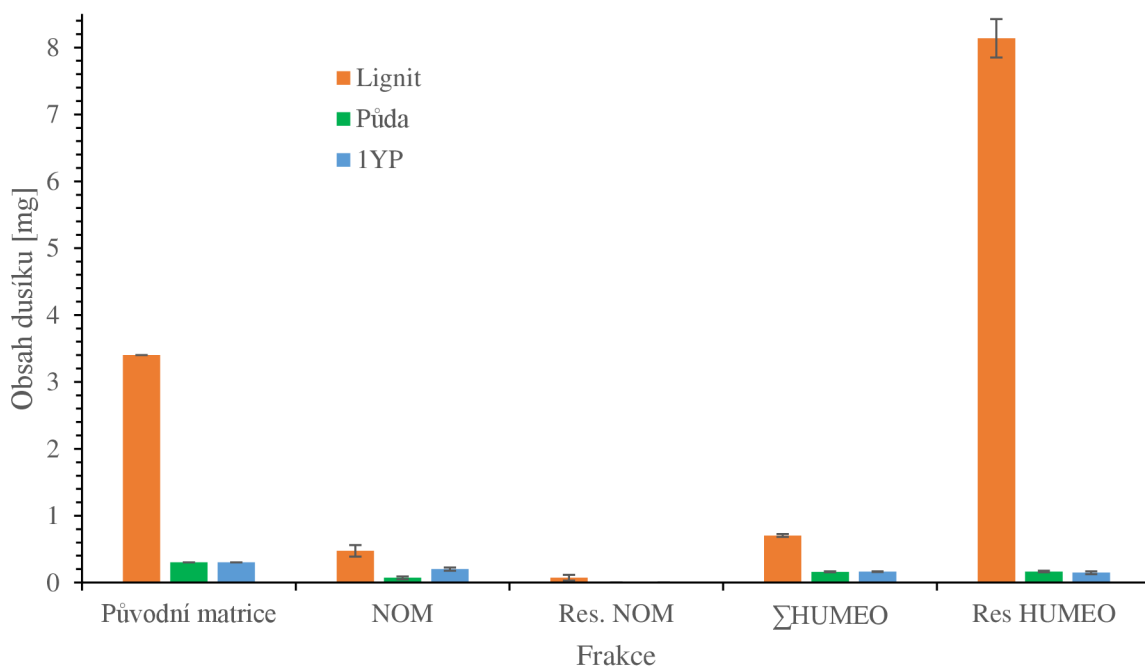
Obr. 29 – Srovnání zastoupení organického uhlíku v jednotlivých frakcích všech zdrojových matic. (Přibliženo)

Srovnání zastoupení organického uhlíku mezi jednotlivými frakcemi ukazuje, že oproti AQU frakcím je organický uhlík obecně více obsažen v ORG frakcích, zejména ORG1

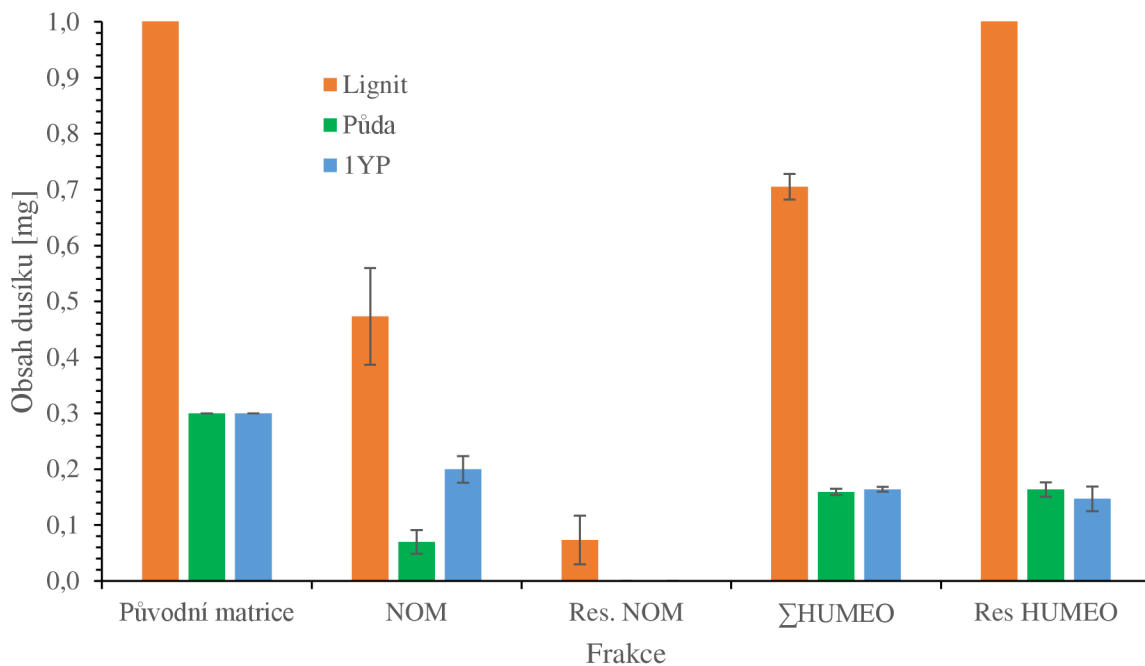
a ORG2 frakci. Celkově je ale jeho největší zastoupení v AQU1 a ORG1. Tyto frakce nejsou k matici vázány pevně, jsou mobilní a jako takové by mohly představovat organický uhlík snadno dostupný pro výživu rostlin, na druhou stranu ale také náchylný pro vyplavování do nižších vrstev půdního profilu. Srovnáním se vzorkem 1YP odebraným po roce je však zřejmé, že aplikací lignitu nedošlo k navýšení obsahu organické hmoty v půdě, což byl původní předpoklad. Výsledky tedy neukazují výrazné zlepšení obsahu a distribuce organického uhlíku v půdě po jednom roce od aplikace lignitu. Vysvětlením může být jednak to, že byla analýza 1YP vzorku provedena na odběru půdy s nižším obsahem organické hmoty oproti původnímu vzorku půdy. Druhým vysvětlením pak je to, že pro posouzení vlivu aplikace lignitu by asi bylo zapotřebí delší časový horizont, ve kterém by bylo sledováno působení lignitu na vlastnosti půdy.

Obecně platí, že čím se pohybujeme ve frakcích (např. v Obr. 28) směrem doprava (AQU1 → AQU4, resp. ORG1 → ORG3), tím je organický uhlík a dusík méně dostupný pro rostliny, méně mobilní v přírodě a je vázaný do složitějších rigidnějších struktur. Takto stabilizovaná organická hmota setrvává v půdě po delší časový horizont.

Kromě organického uhlíku je dalším sledovaným prvkem dusík, jelikož je pro výživu rostlin také významný, proto se na něj budeme dále zaměřovat.

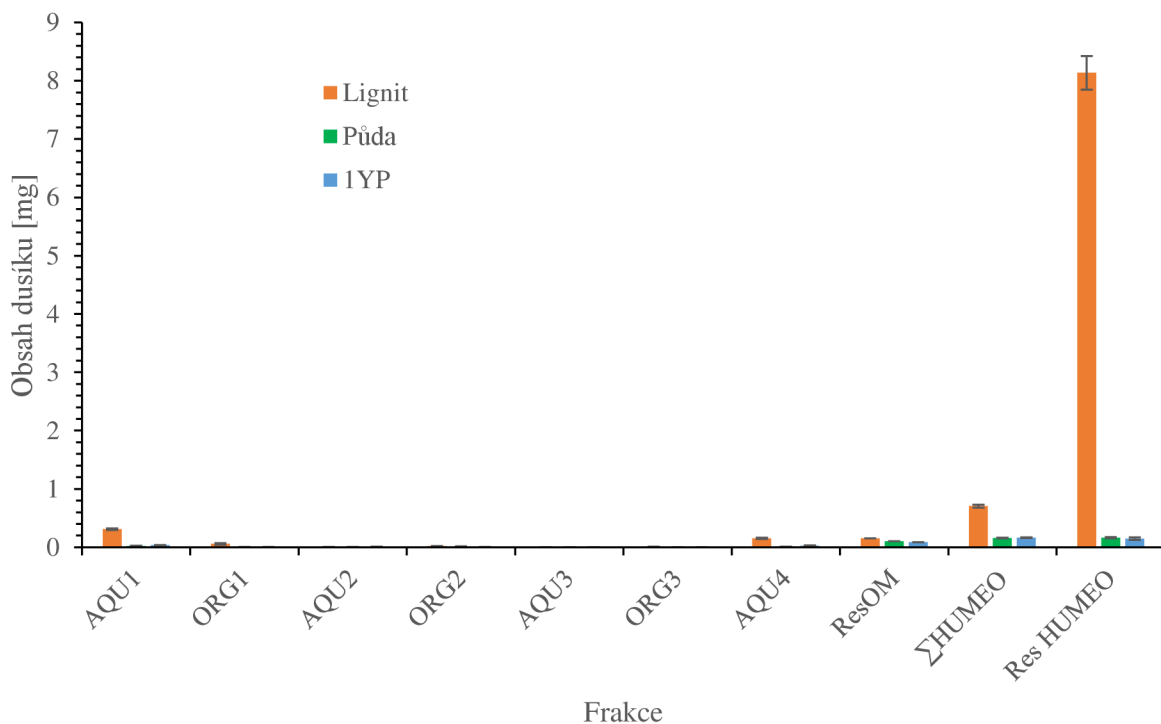


Obr. 30 – Srovnání zastoupení dusíku v původní matici, dusíku vyextrahovaného oběma metodami a jeho zbytku v maticích po extrakci u všech zdrojových matic.

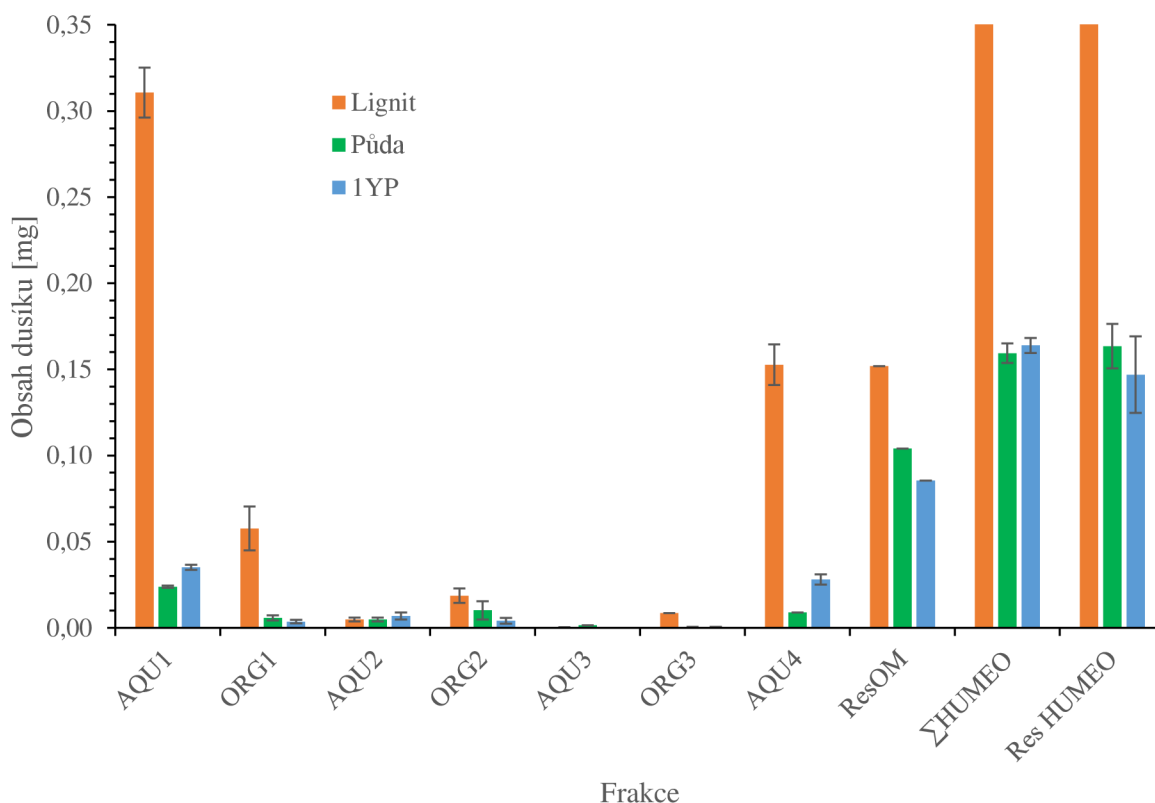


Obr. 31 – Srovnání zastoupení dusíku v původní matici, dusíku vyextrahovaného oběma metodami a jeho zbytku v maticích po extrakci u všech zdrojových matic. (Přibliženo)

Co se týče zastoupení dusíku (Obr. 30 a Obr. 31), je zřejmé, že metodou sekvenční chemické frakcionace ho bylo vyextrahováno více u původního půdního vzorku, než metodou NOM, ale u ročního odběru je vyextrahované množství prakticky stejné u obou metod. Opět se tu spíše projevila polydisperzita půdního vzorku a vliv místa odběru. Ve zbylé organické hmotě po NOM u půdních vzorků nebyl dusík elementární analýzou vůbec detekován.



Obr. 32 – Srovnání zastoupení dusíku v jednotlivých frakcích všech zdrojových matic.



Obr. 33 – Srovnání zastoupení dusíku v jednotlivých frakcích všech zdrojových matic. (Přibliženo)

Srovnání zastoupení dusíku v jednotlivých frakcích ukazuje, že dusík je nejvíce zastoupen v mobilní frakci AQU1, zde půjde zejména o vodorozpustné soli (dusičnany) a rozpustné aminosloučeniny, které se do půdy dostaly hnojením. Dále je největší zastoupení v AQU4 a ResOM frakcích, což by mohlo být představováno méně rozpustnými sloučeninami, například amidy a různé heterocykly pevně vázané do struktury matrice. V lignitu by teoreticky měly být přítomné PAH (polyaromatic hydrocarbons), neboli polyaromatické uhlovodíky, které jsou také pevně zabudovány ve struktuře.

Podobně jako u uhlíku se určitý podíl dusíku a jeho sloučenin více projevil u mobilnějších frakcí, které jsou pro rostliny snadněji dostupné, než frakce směrem doprava, které jsou naopak více stabilní a rigidnější. Ani v dusíku tedy po jednom roce není znatelný posun hmoty, v rámci směrodatné odchylky je to prakticky stejné, a tedy pro posouzení vlivu aplikace lignitu na půdu by bylo třeba delšího časového horizontu, ve kterém by bylo sledováno působení lignitu na vlastnosti půdy.

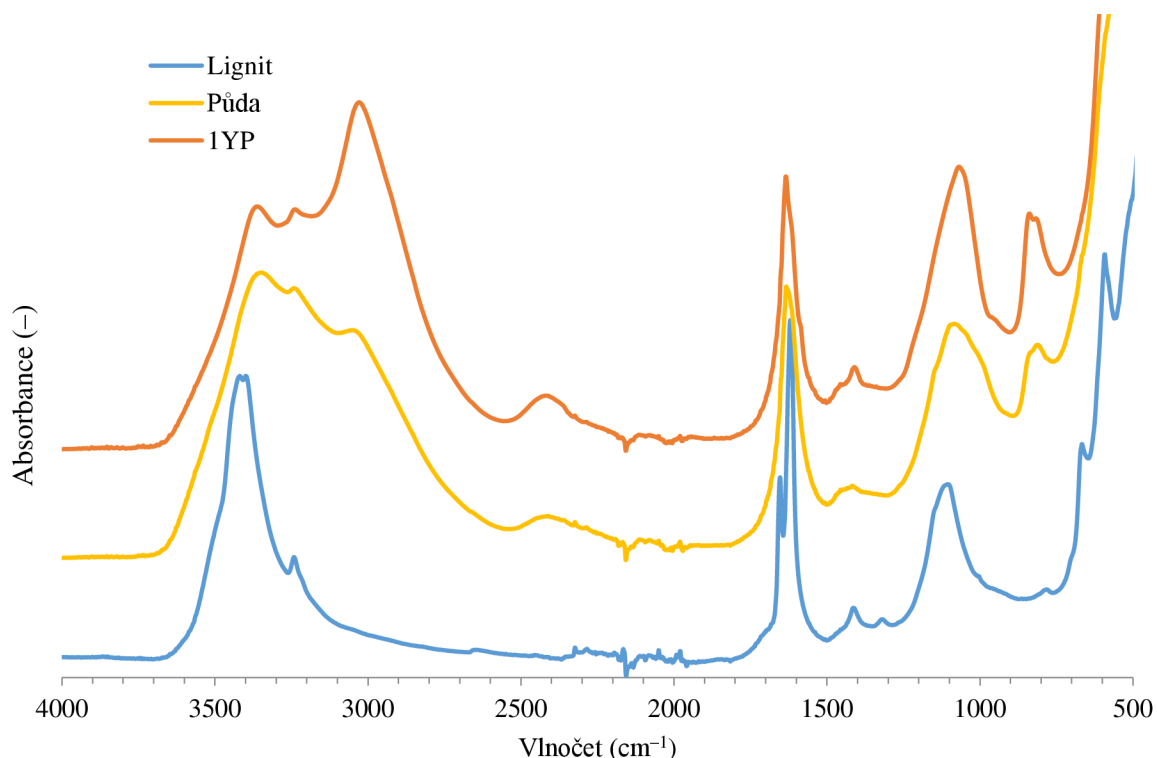
### 5.3 Struktura organické hmoty obsažené v jednotlivých frakcích humeomik

Předchozí kapitoly byly zaměřeny zejména na posouzení obsahu organické hmoty a organických elementů v půdě a v jednotlivých frakcích a dále také na studium vlivu aplikace lignitu na obsah a distribuci organiky. Pro získání komplexní informací o vlivu lignitu nebo jiné podpůrné látky na vlastnosti půdy, že je nutné ještě taky se zaměřit na ty jednotlivé frakce a chemicky je charakterizovat. K tomu, že je možné využít metody strukturní analýzy (NMR, FTIR) nebo chromatografie (GC-MS a LC-MS), kterými je možné charakterizovat frakce na molekulární úrovni. To už je ale nad rámec DP, my se zaměřili na charakterizaci

vybraných frakcí pomocí FTIR spektrometrie, čímž se snažíme alespoň trochu přiblížit, co za skupiny látek je ve frakcích a tím pádem jak jsou mobilní a dostupné pro rostliny, a jestli se tyto parametry aplikací lignitu nějak změni.

### 5.3.1 Frakcionace I

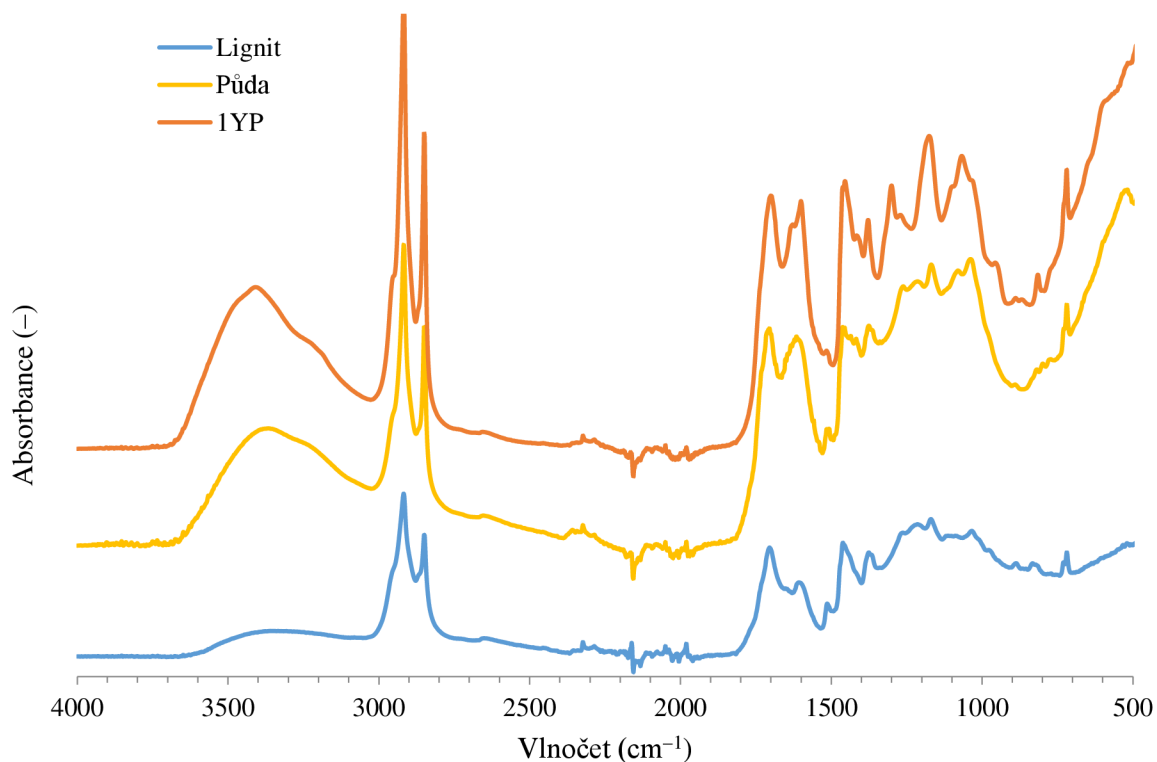
Nejdříve se zaměříme na charakterizaci mobilní frakce rozpustné ve vodě (AQU1) a v organických rozpouštědlech (ORG1).



Obr. 34 – FTIR spektrum AQU1 frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

Z FTIR spektra AQU1 frakcí na Obr. 34 si můžeme všimnout několika charakteristických píků pro AQU vzorky. V oblasti  $3\ 650\text{--}3\ 300\ \text{cm}^{-1}$  můžeme pozorovat pík, který je nejvíce markantní pro lignit a leží v oblasti, kde by se měly vyskytovat vazby N-H, ale také fenolické sloučeniny. Stejný pík nalezneme i v dalších dvou zdrojových maticích, jen je více roztažený od  $3\ 650\text{--}2\ 600\ \text{cm}^{-1}$ . Tento pík naznačuje vazby N-H, ale také alkoholové vazby O-H zesílené ve vodném prostředí do širokého pásu tvorbou vodíkových můstků. Dále od  $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$  směrem k menším vlnočtům se v této oblasti objevují i vibrace C-H vazeb v nasycených uhlovodících, ukazující na přítomnost alkanů, naopak směrem k vyšším vlnočtům se více objevují nenasycené C-H vazby. Dále v oblasti  $2\ 200\text{--}1\ 950\ \text{cm}^{-1}$  nalezneme tzv. overtóny (vyšší harmonické přechody), což jsou vibrační přechody se změnou vibračního kvantového čísla o více než jedničku. Dále si můžeme všimnout dalšího charakteristického píku v rozmezí  $1\ 750\text{--}1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ , který by měl reprezentovat aminové vazby  $\text{NH}_2$ . Následuje malý pík v rozmezí  $1\ 450\text{--}1\ 350\ \text{cm}^{-1}$ , jenž značí karbonylové C=O-H vazby. Předposlední markantní pík od  $1\ 300\text{--}950\ \text{cm}^{-1}$  by měl ukazovat na přítomnost alifatických O-H vazeb a poslední pík s maximem okolo  $800\ \text{cm}^{-1}$  by měl značit deformační přechod u aromátů.

Z toho vyplývá, že v této frakci jsou přítomné zejména aminosloučeniny a alifatické alkoholy a fenoly.

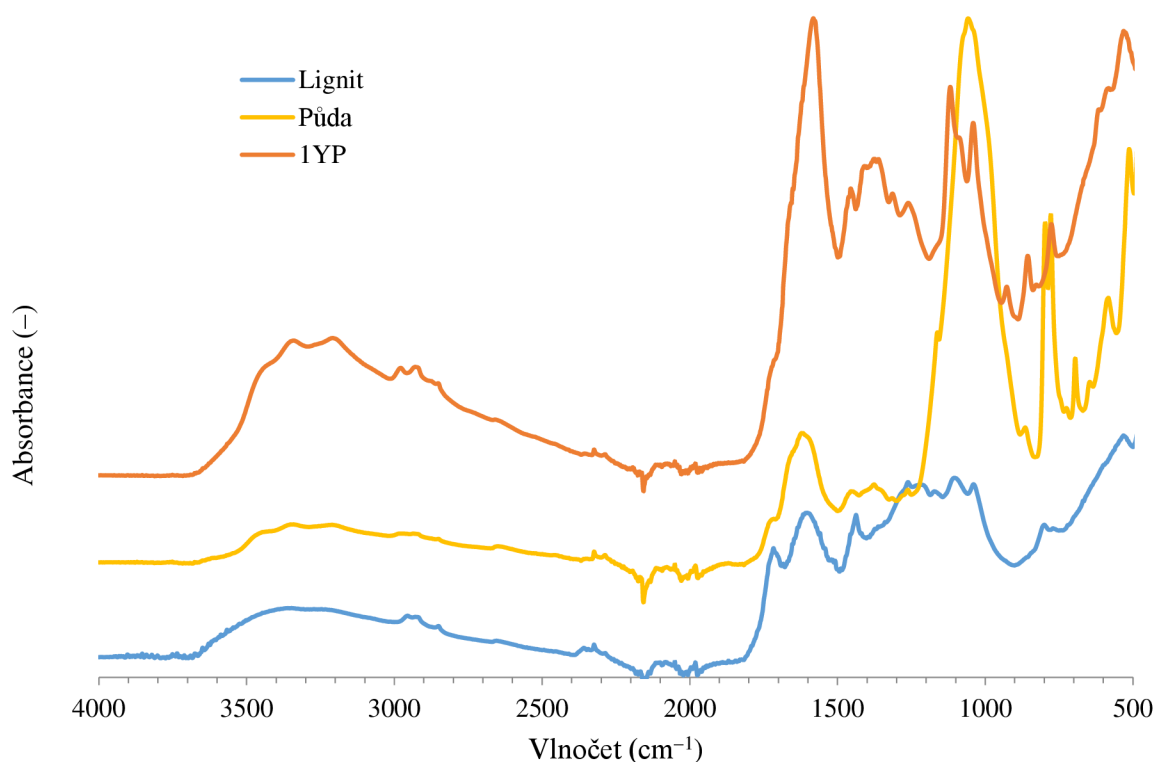


Obr. 35 – FTIR spektrum ORG1 frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

FTIR spektra ORG1 frakcí na Obr. 35 opět obsahují v oblasti 3 650-3 000 cm<sup>-1</sup> pík, který pro lignit téměř mizí a leží v oblasti, kde by se měly vyskytovat vazby N-H, ale také fenolické a alkoholové sloučeniny. Tento roztáhlý pík s sobě ale může obsahovat signál nenasycených C-H vazeb. Dále se od 3 000-2 800 cm<sup>-1</sup> objevuje výrazný pík u všech tří matric značící nasycené C-H vazby alkanů. Dále v oblasti 2 200-1 950 cm<sup>-1</sup> nalezneme opět overtóny. Následuje dvojice píků v rozmezí 1 900-1 550 cm<sup>-1</sup>, jenž značí karbonylové C=O-H vazby a mezi 1 550-1 450 cm<sup>-1</sup> se objevuje oblast ukazující na aromáty. Dále pík s maximem asi v 1 050 cm<sup>-1</sup> by měl odkazovat na přítomnost alifatických O-H vazeb alkoholů a poslední pík s maximem okolo 800 cm<sup>-1</sup> by měl značit deformační přechod u aromátů. Z toho tedy vyplývá, že v této frakci jsou přítomné zejména alifatické uhlovodíky (hlavně nasycené), alifatické kyseliny (mastné kyseliny) a částečně i fenolické kyseliny.

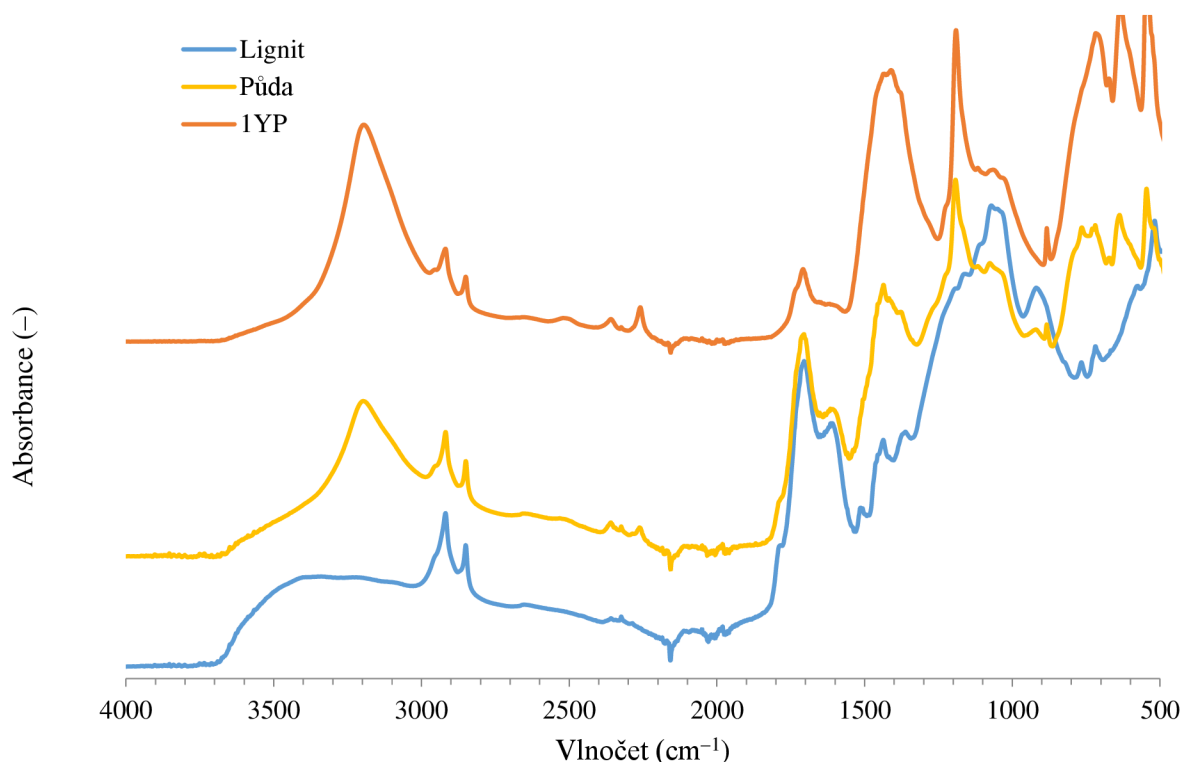


### 5.3.2 Frakcionace II



Obr. 36 – FTIR spektrum AQU2 frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

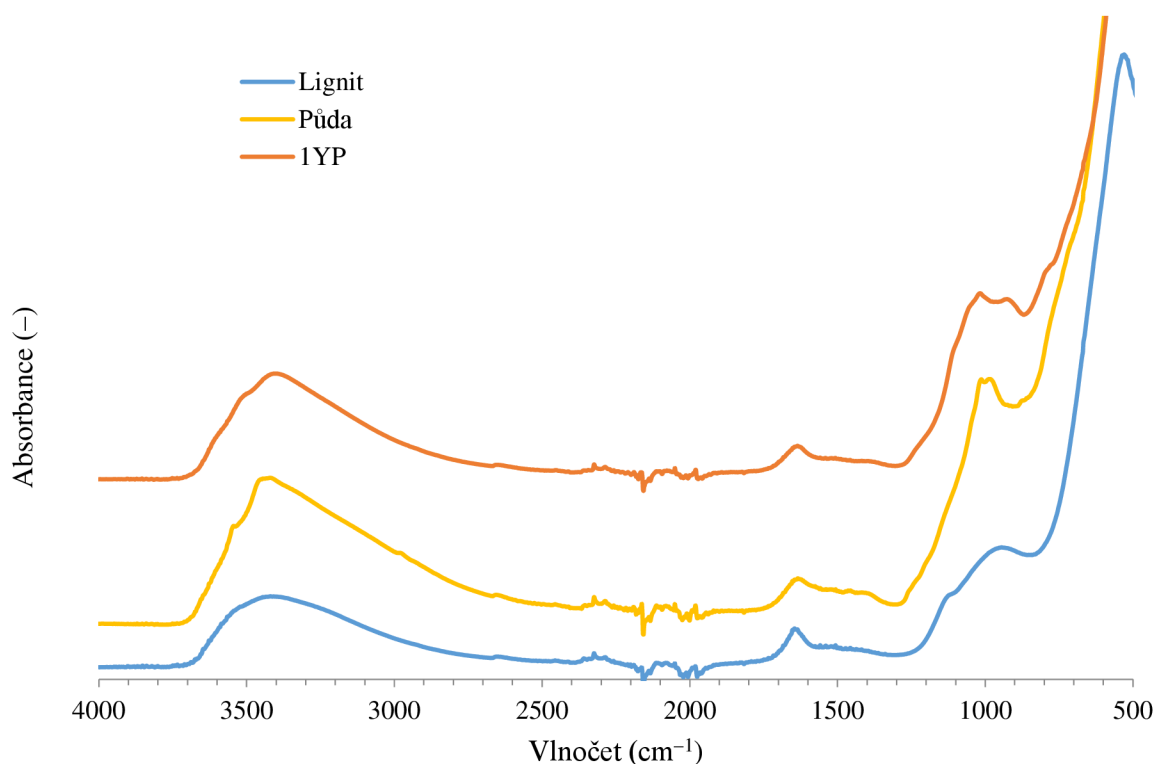
FTIR spektra AQU2 frakcí na Obr. 36 jsou podobná spektrům AQU1 frakcí. Můžeme si opět všimnout širokého roztaženého píku v oblasti  $3\,650\text{--}2\,400\text{ cm}^{-1}$ , který má nejvyšší intenzitu pro 1YP vzorek a leží v oblasti, kde by se měly vyskytovat vazby N-H, fenolické a alkoholové sloučeniny a směrem od  $3\,000\text{ cm}^{-1}$  k menším vlnočtům se v této oblasti objevují i nasycené vazby C-H ukazující na přítomnost alkanů, naopak směrem k vyšším vlnočtům v této oblasti se více objevují nenasycené C-H vazby. Dále v oblasti  $2\,200\text{--}1\,950\text{ cm}^{-1}$  nalezneme opět overtony. Dalšího charakteristický pík v rozmezí asi  $1\,750\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$  by měl reprezentovat aminové vazby  $\text{NH}_2$  a opět má nejvyšší intenzitu pro 1YP vzorek. Následuje směs píků v rozmezí  $1\,450\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$ , jenž značí přítomnost karbonylových C=O-H vazeb. Předposlední markantní pík od  $1\,250\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  by měl ukazovat na přítomnost alifatických O-H vazeb, tento pík ale chybí u lignitu. Poslední pík s maximem okolo  $800\text{ cm}^{-1}$  je výrazný u původního půdního vzorku, ale také u 1YP vzorku a měl by značit deformační přechod u aromátů. Z toho vyplývá, že v této frakci jsou přítomné zejména aminosloučeniny a alifatické alkoholy a fenoly.



Obr. 37 – FTIR spektrum ORG2 frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

FTIR spektra ORG2 frakcí na Obr. 37 mají vysokou podobnost ke spektrům ORG1 frakcí. Opět v oblasti  $3\ 650\text{--}3\ 000\ \text{cm}^{-1}$  můžeme pozorovat pík, který je pro lignit více roztáhlý a leží v oblasti, kde by se měly vyskytovat vazby N-H, fenolické a alkoholové sloučeniny, a také nenasycené C-H vazby alkanů. Dále v oblasti  $2\ 200\text{--}1\ 950\ \text{cm}^{-1}$  nalezneme opět overtóny. Následuje dvojice píků v rozmezí  $1\ 900\text{--}1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ , jenž značí karbonylové C=O-H vazby a pík s maximem ve  $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$  ukazuje opět na aromáty. Dále pík s maximem asi v  $1\ 050\ \text{cm}^{-1}$  by měl odkazovat na přítomnost alifatických O-H vazeb alkoholů a poslední trojice píků s jedním maximem okolo  $800\ \text{cm}^{-1}$  by měly značit deformační přechody u aromátů, tento pík se však skoro neukazuje u lignitu. Z toho tedy vyplývá, že v této frakci jsou přítomné zejména alifatické kyseliny (mastné kyseliny) a částečně i fenolické kyseliny, dále by se tu podle Drosose [71] také měly nacházet vázané cukry. Alifatické uhlovodíky (hlavně nasycené) už tu nejsou tolik dominantní, jako u ORG1 frakcí.

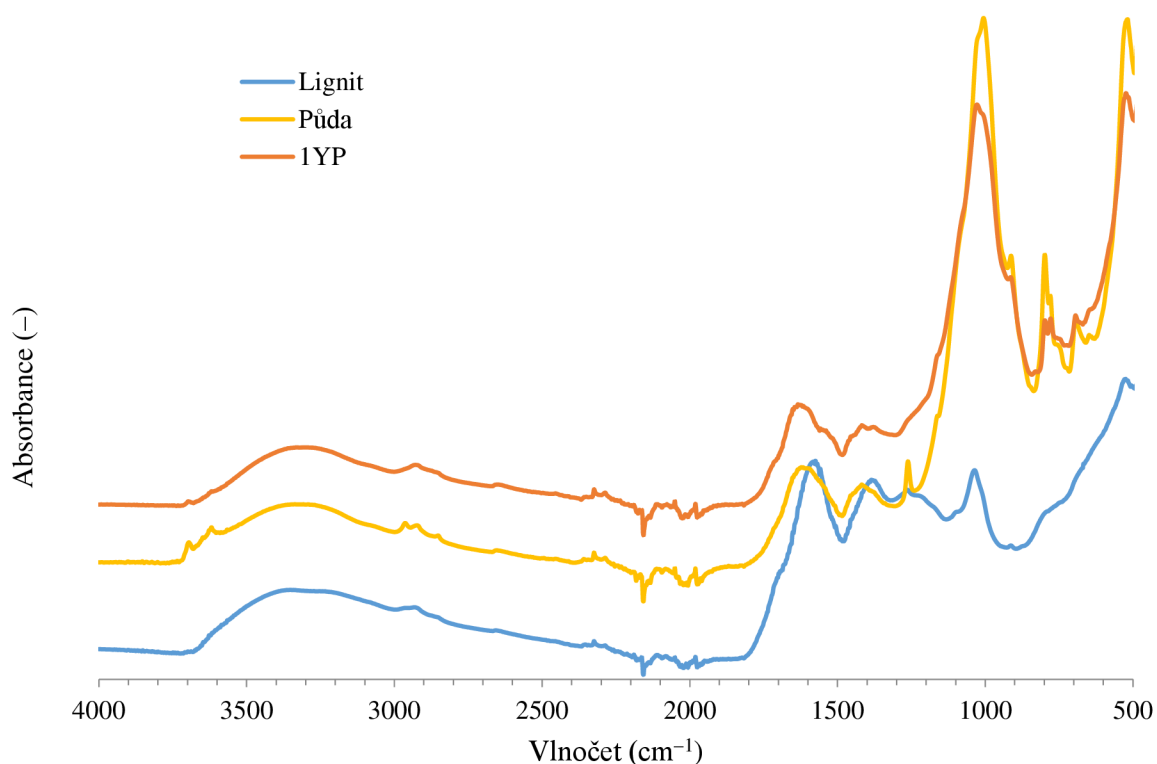
### 5.3.3 Frakcionace IV



Obr. 38 – FTIR spektrum AQU4 frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

FTIR spektra AQU4 frakcí na Obr. 38 již v sobě mnoho signálů nemají. Můžeme si opět všimnout širokého roztaženého píku v oblasti 3 650-2 400 cm<sup>-1</sup>, kde by se měly vyskytovat vazby N-H, fenolické a alkoholové sloučeniny a směrem od 3 000 cm<sup>-1</sup> k vyšším vlnočtům se v této oblasti objevují i nenasycené vazby C-H ukazující na přítomnost alkenů a alkynů, jejich výskyt tu ale bude minimální. Dále v oblasti 2 200-1 950 cm<sup>-1</sup> nalezneme opět overtóny. Následuje malý pík v rozmezí asi 1 700-1 550 cm<sup>-1</sup>, který by měl reprezentovat aminové vazby NH<sub>2</sub>. Poslední pík s maximem okolo 1 000 cm<sup>-1</sup> je výrazný u všech tří matic a měl by ukazovat na přítomnost alifatických O-H vazeb. Z toho tedy vyplývá, že v této frakci jsou přítomné zejména aromáty a nejspíše i heterocykly s obsahem dusíku vzhledem k výsledkům z elementární analýzy. Dále se tu budou objevovat aminy a pravděpodobně i amidy.

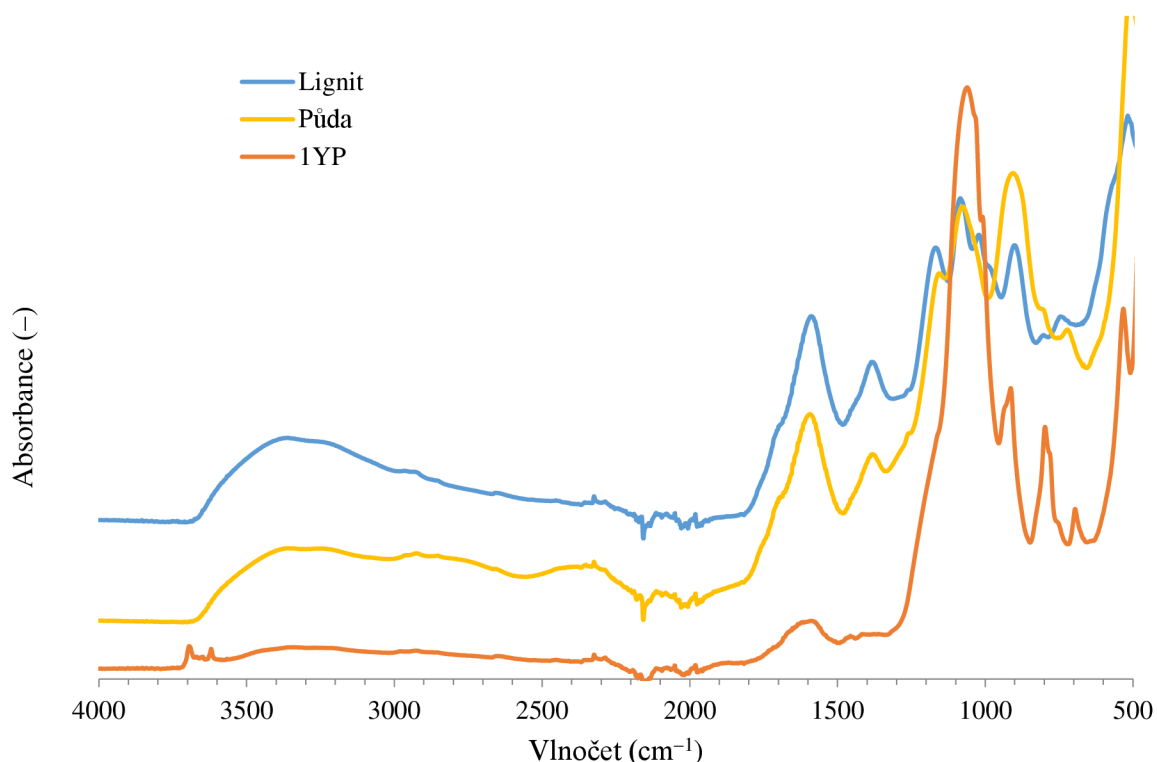
### 5.3.4 NOM extrakce



Obr. 39 – FTIR spektrum NOM frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

Na FTIR spektru NOM frakcí na Obr. 39 již není mnoho charakteristických oblastí. Opět se v oblasti  $3\,700\text{--}2\,400\text{ cm}^{-1}$  nachází velmi široký pík, který především ukazuje na nenasycené C-H vazby a N-H vazby, pravděpodobně i fenolické a alkoholové sloučeniny. Právě tím, že NOM je vlastně směs všech jednotlivých frakcí, se tu objevuje prakticky vše, co u předchozích spekter, ale tím, že je toho například v poslední zmíněné oblasti  $3\,700\text{--}2\,400\text{ cm}^{-1}$  mnoho skupin a vazeb, objevuje se spíše rovnější čára. Dále v oblasti  $2\,200\text{--}1\,950\text{ cm}^{-1}$  nalezneme opět overtóny a ještě si můžeme všimnout píku s maximem okolo  $1\,600\text{ cm}^{-1}$  značícího přítomnost aminových skupin. Ke konci už je markantní pouze pík s maximem okolo  $1\,050\text{ cm}^{-1}$ , který by měl reprezentovat alifatické O-H vazby. Již z FTIR charakterizace je zřejmé, že když se charakterizuje celková vyizolovaná organika, tak je obrovský problém heterogenita a množství různých molekul. Jak bylo rozebráno výše, sekvenční chemickou frakcionací je možné získat frakce s relativně podobnými molekulami, což usnadňuje následnou charakterizaci a už pomocí FTIR bylo možné identifikovat více různých typů látek vyskytujících se ve frakcích. Z toho tedy vyplývá, že v této frakci je to směs všeho, tudíž aminy, alifatické alkoholy, fenoly atd.

### 5.3.5 ResOM extrakce



Obr. 40 – FTIR spektrum ResOM frakcí pro všechny tři zdrojové matrice.

FTIR spektra ResOM frakcí na Obr. 40 je velmi podobný NOM spektrům. Opět se v oblasti 3 700-2 400 cm<sup>-1</sup> nachází velmi široký pík, který především ukazuje na nenasycené C-H vazby a N-H vazby, pravděpodobně i fenolické a alkoholové sloučeniny. ResOM je vlastně směs všeho, co v matrici zůstalo po vyizolování všech jednotlivých frakcí. Tudíž se tu objevuje stejně jako u NOM směsice prakticky všeho. V oblasti 2 200-1 950 cm<sup>-1</sup> nalezneme opět overtóny a ještě si můžeme všimnout píku s maximem okolo 1 600 cm<sup>-1</sup> značícího přítomnosti aminových skupin. Za ním je ještě u půdních vzorků zřetelný malý pík s maximem v 1 400 cm<sup>-1</sup>, který ukazuje na aromáty. Ke konci už je markantní pouze pík s maximem okolo 1 050 cm<sup>-1</sup>, který je nejzřetelnější u vzorku 1YP a měl by reprezentovat alifatické O-H vazby. Z toho vyplývá, že v této frakci je to velmi podobné extraktům NOM, bude tu ale méně alkoholů a aminů, jelikož ty byly hlavně vyizolovány v předchozích frakcích. Spíše se tu budou vyskytovat heterosloučeniny, i s obsahem dusíku.

## 6 ZÁVĚR

Úkolem této diplomové práce bylo optimalizovat metodiku sekvenční chemické frakcionace na humeomika tak, aby byla využitelná pro studium vlivu aplikace lignitu na půdní organickou hmotu, její celkový obsah a distribuce mezi jednotlivými frakcemi v půdě.

Nejdříve byla provedena optimalizace metody sekvenční chemické frakcionace jako hlavního nástroje pro získání tzv. humeomik, tedy úzkých frakcí organické hmoty lišících se principiálně v rozpustnosti a vazbě na půdní anorganickou frakci. Ty byly následně charakterizovány pomocí elementární analýzy, kterou bylo zjištěno zastoupení prvků C, H, N a O, a termogravimetrické analýzy, kterou byl zjištěn obsah organické hmoty, popela a vlhkosti. Také byla využita metoda FTIR spektrometrie, kterou byly sledovány strukturní změny v jednotlivých frakcích a posléze byly přibližně definovány skupiny látek, které byly získány v jednotlivých frakcích.

Výsledky práce potvrzují, že optimalizovaná metodika chemické frakcionace je využitelná pro studium obsahu a distribuce organické hmoty i v tak komplexních a heterogenních vzorcích jako je lignit nebo půda.

V průběhu řešení experimentální části práce byla tato komplexní metodika aplikována na vzorky tří zdrojových matic – lignitu, půdy a ročního odběru půdy po aplikaci lignitu. Pomocí elementární analýzy bylo hlavně zkoumáno zastoupení uhlíku a dusíku, jakožto prvků, které jsou podstatné pro výživu rostlin a pro správnou funkci půdy. Výsledky ukázaly, že posun distribuce těchto dvou prvků byl pozorován jen u první vyizolované frakce, která není na strukturu matrice pevně vázána, a tudíž je nejdostupnější pro rostliny. V ostatních frakcích, nebyly pozorovány žádné změny, což naznačuje, že časový horizont jednoho roku je pro sledování změn vyvolaných aplikací lignitu na půdu velmi krátký a nestačí na vyvolání velkých změn hlouběji ve struktuře matrice. Roční odběr půdy však také vykazoval nižší zastoupení organického uhlíku a dusíku téměř ve všech získaných frakcích, což naznačuje další úskalí využití této komplexní sekvenční frakcionační metodiky. Z výsledků DP vyplývá, že je pro dosažení správných a reprodukovatelných výsledků je naprosto nezbytné studovat vzorky získané z odběrů ze stejných lokalit, ve kterých je původní složení půdního profilu obdobné (zejména poměr organické hmoty k anorganickým frakcím).

Z výsledků práce rovněž vyplývá, že pro správné posouzení vlivu aplikace půdní podpůrné látky (např. lignit, biouhel a další) na obsah a distribuci organické hmoty v půdě je třeba studovat vzorky získané v delším časovém horizontu od aplikace půdní podpůrné látky než tomu bylo v rámci této DP.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MANKO, P., et al. *Chémia životného prostredia* [online]. © Prešovská univerzita v Prešove, 2009 [cit. 2017-03-07]. ISBN 978-80-555-0082-9.
- [2] KUPKOVÁ, V. Pôda: *Prírodné javy v experimentoch pre malých aj veľkých* [online]. Tlačové štúdio Váry pre MTF STU., Trnava, 2009. ISBN 978-80-89422-06-7.
- [3] KUTÍLEK, Miroslav. *Půda planety Země*. Praha: Dokořán, 2012. Bod (Dokořán). ISBN 978-80-7363-212-0.
- [4] FOTH, H. *Fundamentals of soil science*. 8. vyd. New York: Wiley, 1990, 360 s. ISBN 04-715-2279-1.
- [5] GUSTAFSON, A. F. *Soils and soil management*. London: McGraw-Hill Book Company, 1941. McGraw-Hill publications in the agricultural sciences.
- [6] TROEH, Frederick R a Louis M THOMPSON. *Soils and soil fertility*. 6. vyd. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2005, 489 s. ISBN 08-138-0955-X.
- [7] *Agronomy Fact Sheet no. 41: Soil organic matter*. [online]. Cornell University Publications, 2008 [cit. 2014-01-21]. Dostupné z <http://nmsp.cals.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet41.pdf>
- [8] *Vliv obhospodařování trvalých travních porostů na obsah organické hmoty v půdě* [online]. (11) [cit. 2018-01-06]. Dostupné z: <http://svt.pi.gin.cz/vuzt/publ/P2011/014.PDF>
- [9] JANDÁK, J. *Půdoznalství*. 1. vyd. Brno, AF MZLU Brno, 2001. 142 s. ISBN 80-7157-559-3.
- [10] KEMMITT, S.J., C.V. LANYON, I.S. WAITE, Q. WEN, T.M. ADDISCOTT, N.R.A. BIRD, A.G. O'DONNELL a P.C. BROOKES. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2008, roč. 40, č. 1, s. 61-73 [cit. 2014-03-09]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.06.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071707002891>
- [11] BALDOCK, J.A a J.O SKJEMSTAD. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry* [online]. 2000, roč. 31, 7-8, s. 697-710 [cit. 2014-03-09]. DOI: 10.1016/S0146-6380(00)00049-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638000000498>
- [12] EUSTERHUES, K., et al. *Stabilisation of soil organic matter by interactions with minerals as revealed by mineral dissolution and oxidative degradation*. *Organic Geochemistry* [online]. 2003, roč. 34, č. 12, s. 1591-1600 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638003001827>
- [13] PAUL, E. A., CLARK, F. E. (1996): *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 93, 320
- [14] KOBZA, J. *Monitoring pôd Slovenska*. Výskumný ústav pôdoznalstva a ochrany pôdy. Bratislava, 2010, s.37. ISBN 978-80-89128-73-0.)

- [15] TAN, K.H. *Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, 386 pp. Dostupné z: [http://www.pulib.sk/elpub2/FHPV/Fazekasova1/pdf\\_doc/literatura.pdf](http://www.pulib.sk/elpub2/FHPV/Fazekasova1/pdf_doc/literatura.pdf)
- [16] ECKELMANN, W. et al. *Common Criteria for Risk Area Identification according to Soil Threats*: European Soil Bureau Research Report No.20, EUR 22185 EN, 2006. 94 s. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg
- [17] JONES, R. J. A. Vulnerability of subsoils in Europe to compaction: A preliminary analysis. *Soil Till. Res.* vol. 73, 2003, no. 1, p. 131–143. ISSN 0167–1987.
- [18] BOHLEN, P. J.; EDWARDS, C. A. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 1995, roč. 27, č. 3, s. 341-348 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071794001843>
- [19] ŠIMONOVÍČOVÁ, A., et al. *Environmentálna mikrobiológia*. Univerzita Komenského v Bratislave, 2013. ISBN ISBN 978-80-223-3382-5.
- [20] BRADY, N. C.; WEIL, R. R. (2002): *The Nature and Properties of Soils: Prentice Hall*, New Jersey, USA
- [21] EKSCHEMITT, Klemens, Manqiang LIU, Silke VETTER, Oliver FOX a Volkmar WOLTERS. Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability — why is dead organic matter left over in the soil?. *Geoderma* [online]. 2005, roč. 128, 1-2, s. 167-176 [cit. 2014-01-28]. DOI: 10.1016/j.geoderma.2004.12.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706104003325>
- [22] ŠARAPATKA, Bořivoj. *Pedologie a ochrana půdy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3736-1
- [23] NOVÁK, F., HRABAL, R. Kvantitativní <sup>13</sup>C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické Listy*. 1110, 105(10), 752-760 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.
- [24] PIVOKONSKÝ, M., PIVOKONSKÁ, L., BUBÁKOVÁ, P., JANDA, V. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické Listy*. 1011, 104(11), 1015-1022 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.
- [25] SKOKANOVÁ, M., DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny : Interakcie huminových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102 [cit. 2016-11-02], s. 338-345. Dostupný z WWW: <[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_05\\_338-345.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_338-345.pdf)>. ISSN 1213-7103.
- [26] STEINBÜCHEL, A., HOFRIECHTER, M. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3527302301.
- [27] SKOKANOVÁ, M., DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické Listy*. 0804, 102(4), 262-268 [cit. 2016-10-30]. ISSN 00092770.



- [28] VESELÁ, L. a kol. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, roč. 99 [cit. 2016-10-30], s. 711-717. Dostupný z WWW: <[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_10\\_711-717.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf)>. ISSN 1213-7103.
- [29] WEBER, J.: *Definition of soil organic matter*, Humintech. 2002 [citováno: 2016-11-06]. Dostupné z: <<http://www.humintech.com/001/>>.
- [30] JANDÁK, J., PRAX, A., POKORNÝ, E. *Půdoznalství*. 3. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 142 s. ISBN 978-80-7157-559-7.
- [31] PICCOLO, A. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science*[online]. Elsevier, 2002, 2002, s. 57-134 [cit. 2019-02-07]. *Advances in Agronomy*. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7. ISBN 9780120007936.
- [32] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, c1994, xiii, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
- [33] GONZÁLES-GAITANO, M., GARCÍA-MINA, J.: The Macromolecular Or Supramolecular Nature Of Humic Substances: A Dynamic Light Scattering. In *Humic Substances: Nature's most Versatile Materials*. Ed. E. A. GHABBOUR, G. DAVIES, Francis & Taylor, New York, 2004, s. 263 - 274.
- [34] SIMPSON, A. J. a kol. Molecular structure and associations of humic substances in terrestrial environment. *Naturwissenschaften*. 2002, vol 89, s 84-88.
- [35] SUTTON, R., SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *American Chemical Society*. 2005, no. 23, vol. 39, s. 9009-9015.
- [36] BAIGORRI, R., FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO, G., GARCÍA-MINA, J. M. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V, 2007, **302**(1), 301-306 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.02.048. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927775707001628>
- [37] SCHAUMANN, G. E. Review Article - Soil organic matter beyond molecular structure Part I: Macromolecular and supramolecular characteristics. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 2006, vol. 169, s. 145-156.
- [38] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*. 2001,no. 11, vol. 166, s. 810-832.
- [39] ROUBÍČEK, V. *Uhlí: zdroje, procesy, užití*. Ostrava: Montanex, 2002. Odborné publikace. ISBN isbn80-7225-063-9.
- [40] JONES, R. W. Lignite and Stillage: Carrier and Substrate for Application of Fungal Biocontrol Agents to Soil. *Phytopathology* [online]. 1984, **74**(10) [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1094/Phyto-74-1167. ISSN 0031949X. Dostupné z: [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Abstracts/Phyto74\\_1167.htm](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Abstracts/Phyto74_1167.htm)

- [41] KUČERIK, J., PEKAŘ, M., KLUČÁKOVÁ, M. South-Moravian lignite - potential source of humic acids. *Petroleum and coal*. 2003, roč. 45, 1–2, s. 58–62.
- [42] DOPITA, M., HAVLENA, V., PEŠEK, J. *Ložiska fosilních paliv*. 1. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1985.
- [43] HAENEL, M. W. Recent progress in coal structure research. *Fuel*. 1992, roč. 71, č. 11, s. 1211–1223.
- [44] HUBÁČEK, J. *Chemie uhlí*. 1. Praha: SNTL, 1962.
- [45] HUSTAD, J., BARRIO, M. What is biomass. *The Online Combustion Handbook* [online]. 17-10-2000 [cit. 2012-01-14]. Dostupné z: <http://www.handbook.ifrf.net/handbook/cf.html?id=23>.
- [46] KILLOPS, S., KILLOPS, V. *An introduction to organic geochemistry*. 2. vyd. Oxford: Wiley-Blackwell, 2005. ISBN 978-0-6320-6504-2.
- [47] KELEMEN, S.R., GORBATY, M. L., KWIATEK, P. J. Quantification of Nitrogen Forms in Argonne Premium Coals. *Energy Fuels*. 1994, roč. 8, č. 4, 896–906.
- [48] BOUDOU, J. P., ESPITALIE, J. Molecular nitrogen from coal pyrolysis: Kinetic modelling. *Chemical Geology*. 1995, roč. 126, 3-4, 319–333.
- [49] CALKINS, W. H. The chemical forms of sulfur in coal: a review. *Fuel*. 1994, roč. 73, č. 4, s. 475–484.
- [50] MAES, I. I., GRYGLEWICZ, G., MACHNIKOWSKA, H., YPERMAN, J., FRANCO, D. V., MULLENS, J., VAN POUCKE, L. C. Rankdependence of organic sulfur functionalities in coal. *Fuel*. 1997, roč. 76, č. 5, 391–396.
- [51] MATHEWS, J. P., CHAFFEE, A. L. The molecular representations of coal – A review. *Fuel*. 2012, roč. 96, s. 1–14.
- [52] STRAKA, P. Chemická struktura černých uhlí. *Chemické listy*. 2000, roč. 94, č. 5, s. 299–307.
- [53] IINO, M. Network structure of coals and association behavior of coal-derived materials. *Fuel Processing Technology*. 2000, roč. 62, 2-3, s. 89–101.
- [54] CHRISTENSEN, B. T. a . Evaluation of Soil Organic Matter Models. POWLSON, D. S., SMITH, P., SMITH, J. U. *Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure..* Berlin: Springer, 1996, s. 143-160. ISBN 978 3 642 64692 8.
- [55] WANDER, M. M. Soil organic matter fraction and their relevance to soil function. MAGDOFF, F., WEIL, R. *Advances in Agroecology*. 1. Londýn: CRS, 2004, s. 67-102. ISBN 978 0 203 49637 4.
- [56] CHRISTENSEN, B. T. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. SCHJØNNING, P., ELMHOLT, S., CHRISTENSEN, B. T. *Managing soil quality: Challenges in modern agriculture*. Wallingford: CABI Publishing, 2001, s. 345-353. ISBN 0 85199 671 X.

- [57] HAKEEM, K. R. *Soil science: agricultural and environmental prospectives*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 9783319344492.
- [58] CARTER, M. R. *Soil sampling and methods of analysis*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. ISBN 0873718615.
- [59] SWIFT, R. S. Organic matter characterization. SPARKS, D. L. *Methods of Soil Analysis: Part 3: Chemical Methods*. 5. Madison WI: American Society of Agronomy, 1996, s. 1011-1069.
- [60] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 0471594741.
- [61] PLANTE, A. F., CONANT, R. T., PAUL, E. A., PAUSTIAN, K., SIX, J. Acid hydrolysis of easily dispersed and microaggregate-derived silt- and clay-sized fractions to isolate resistant soil organic matter. *European Journal of Soil Science* [online]. 2006, 57(4), 456-467 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2006.00792.x. ISSN 1351-0754. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2389.2006.00792.x>
- [62] ZIMMERMANN, M., LEIFELD, J., FUHRER, J. Quantifying soil organic carbon fractions by infrared-spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2007, 39(1), 224-231 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.07.010. ISSN 00380717.
- [63] VON LÜTZOW, M., KÖGEL-KNABNER, I., EKSCHEMITT, K., FLESSA, H., GUGGENBERGER, G., MATZNER, E., MARSCHNER, B. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2007, 39(9), 2183-2207 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.03.007. ISSN 00380717.
- [64] ROVIRA, P., JORBA, M., ROMANYÀ, J. Active and passive organic matter fractions in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2010, 46(4), 355-369 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1007/s00374-009-0437-0. ISSN 0178-2762.
- [65] ROVIRA, P., ROMANYÀ, J., DUGUY, B. Long-term effects of wildfires on the biochemical quality of soil organic matter: A study on Mediterranean shrublands. *Geoderma* [online]. 2012, 179-180, 9-19 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.geoderma.2012.02.011. ISSN 00167061.
- [66] HAYNES, R. J. *Labile Organic Matter Fractions as Central Components of the Quality of Agricultural Soils: An Overview* [online]. Elsevier, 2005, 2005, s. 221-268 [cit. 2019-02-07]. Advances in Agronomy. DOI: 10.1016/S0065-2113(04)85005-3. ISBN 9780120007837.
- [67] DERENNE, S., LARGEAU, C. A REVIEW OF SOME IMPORTANT FAMILIES OF REFRACTORY MACROMOLECULES: COMPOSITION, ORIGIN, AND FATE IN SOILS AND SEDIMENTS. *Soil Science* [online]. 2001, 166(11), 833-847 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1097/00010694-200111000-00008. ISSN 0038-075X.
- [68] SCHNITZER, M., SCHUPPLI, P. Method for the Sequential Extraction of Organic Matter from Soils and Soil Fractions. *Soil Science Society of America Journal* [online].

1989, 53(5) [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.2136/sssaj1989.03615995005300050019x. ISSN 0361-5995.

[69] EUSTERHUES, K., RUMPEL, C., KÖGEL-KNABNER, I. Composition and radiocarbon age of HF-resistant soil organic matter in a Podzol and a Cambisol. *Organic Geochemistry* [online]. 2007, 38(8), 1356-1372 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2007.04.001. ISSN 01466380.

[70] NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules* [online]. 2011, 12(4), 1187-1199 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1021/bm101488e. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm101488e>

[71] DROSOS, M., NEBBIOSO, A., MAZZEI, P., VINCI, G., SPACCINI, R., PICCOLO, A. 2017. A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Science of The Total Environment*. 586, 807-816. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.059. ISSN 00489697.

[72] NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, 720, 77-90 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.01.027. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012001274>

[73] NEBBIOSO, A., VINCI, G., DROSOS, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humin) by humeomics. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2015, 51(4), 443-451 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1007/s00374-014-0991-y. ISSN 0178-2762. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-014-0991-y>

[74] ZHANG, S., YUAN, L., LI, W., LIN, Z., LI, Y., HU, S., ZHAO, B. Characterization of pH-fractionated humic acids derived from Chinese weathered coal. *Chemosphere* [online]. 2017, 166, 334-342 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.095. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516312966>

[75] KLUČÁKOVÁ, M. Characterization of pH-fractionated humic acids with respect to their dissociation behaviour. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, 23(8), 7722-7731 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1007/s11356-015-5932-2. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5932-2>

[76] KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M. Composition, particle size, charge, and colloidal stability of pH-fractionated humic acids. *Journal of Soils and Sediments* [online]. 2015, 15(9), 1900-1908 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1007/s11368-015-1142-2. ISSN 1439-0108. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11368-015-1142-2>

[77] MASTO, R. ebhin, Md. a. ANSARI, J. GEORGE, V.a. SELVI a L.c. RAM. Co-application of biochar and lignite fly ash on soil nutrients and biological parameters at

different crop growth stages of *Zea mays*. *Ecological Engineering* [online]. Elsevier B.V, 2013, 58, 314-322 [cit. 2019-04-05]. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2013.07.011. ISSN 0925-8574.

[78] NAN, J., CHEN, X., CHEN, C., LASHARI, M., DENG, J., DU, Z. Impact of flue gas desulfurization gypsum and lignite humic acid application on soil organic matter and physical properties of a saline-sodic farmland soil in Eastern China. *Journal of Soils and Sediments* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 16(9), 2175-2185 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1007/s11368-016-1419-0. ISSN 1439-0108.

[79] RAM, L., SRIVASTAVA, N., JHA, S., SINHA, A., MASTO, R., SELVI, V. Management of Lignite Fly Ash for Improving Soil Fertility and Crop Productivity. *Environmental Management* [online]. New York: Springer-Verlag, 2007, 40(3), 438-452 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1007/s00267-006-0126-9. ISSN 0364-152X.

[80] LIU, Y., ZHU, J., YE, C., ZHU, P., BA, Q., PANG, J., SHU, L. Effects of biochar application on the abundance and community composition of denitrifying bacteria in a reclaimed soil from coal mining subsidence area. *The Science of the Total Environment* [online]. Elsevier B.V, 2018, 625, 1218 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.003. ISSN 0048-9697.

[81] CIARKOWSKA, K., SOŁEK-PODWIKA, K., FILIPEK-MAZUR, B., TABAK, M. Comparative effects of lignite-derived humic acids and FYM on soil properties and vegetable yield. *Geoderma* [online]. Elsevier B.V, 2017, 303, 85-92 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1016/j.geoderma.2017.05.022. ISSN 0016-7061.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

<b>Zkratka</b>	<b>Vysvětlení zkratky</b>
AK	aminokyseliny
AQUn	vodná frakce humeomik (n = číslo frakce)
ATR	attenuated total reflectance (zeslabená úplná reflektance)
EA	elementary analysis (elementární analýza)
ESI-MS	electrospray ionization-mass spectrometry (elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie)
FDG	flue gas desulfurization (desulfurizace spalin)
FK	fulvinové kyseliny
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry (plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
HPSEC	high performance size exclusion chromatography (vysokoučinná velikostně vylučovací chromatografie)
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
LFA	lignite fly ash (lignitový popílek)
L/L	liquid/liquid extraction (extrakce kapalina/kapalina)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOM	alkalická extrakce organické hmoty
OM	organic matter (organická hmota)
ORGn	organická frakce humeomik (n = číslo frakce)
RESOM	residual organic matter (residuální organická hmota)
SEC	size exclusion chromatography (velikostně vylučovací chromatografie)
SOM	soil organic matter (půdní organická hmota)
TGA	thermogravimetric analysis (termogravimetrická analýza)
UV	ultraviolet (ultrafialová)
UV-VIS	ultrafialová-viditelná spektrometrie
VMK	vyšší mastné kyseliny