



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

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE PŮDNÍCH HUMINOVÝCH LÁTEK IZOLOVANÝCH Z HNĚDOZEMĚ MODÁLNÍ

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SOIL HUMIC SUBSTANCES ISOLATED FROM MODAL
BROWN SOIL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Iuliia Churina

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1849/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Iuliia Churina**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Fyzikálně–chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální

Zadání bakalářské práce:

Cílem této bakalářské práce je kompletní fyzikálně–chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální.

1. Proveďte podrobnou literární rešerši zohledňující půdní huminové látky a vybrané instrumentální techniky, které budou použity v rámci experimentální činnosti této bakalářské práce.
2. V první části experimentální činnosti izolujte z půdní matrice huminové látky, a to za použití standardního izolačního postupu dle mezinárodní společnosti IHSS.
3. Izolaci huminových látek proveďte ve dvou půdních horizontech tzn. Ap a Ev.
4. Izolované HL následně charakterizujte pomocí termických a spektrometrických metod s důležitým přispěním potenciometrické titrace.
5. V případě nízkého extrakčního výtěžku HL navrhnete jiné komplementární instrumentální techniky k potenciometrické titraci, a to k odhadu obsahu kyselých funkčních skupin ve vzorku.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Iuliia Churina
studentka

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá fyzikálně-chemickou charakterizací půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální na základě mezinárodního postupu IHSS. Huminové látky jsou organické sloučeniny vyskytující se v půdě a mají významný vliv na půdní procesy a vlastnosti. Cílem této práce je získat detailní informace o fyzikálních a chemických vlastnostech huminových látek, jako jsou střední molekulová hmotnost \overline{M}_r , spektrální charakteristiky, elementární složení a termická stabilita. Vzorky půdních huminových látek byly charakterizovány termickými technikami, jako jsou termogravimetrická (TGA) a elementární analýza (EA). Pro analýzu vzorků byly použity různé instrumentální metody, jako jsou UV/Vis spektrometrie, infračervená spektrometrie a fluorescenční spektrometrie. Výsledky této práce mohou přispět k lepšímu porozumění půdních procesů a vlastností, což může vést k vylepšení zemědělské produkce a ochraně životního prostředí.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the physicochemical characterization of soil humic substances isolated from brown earth modal based on the international IHSS procedure. Humic substances are organic compounds occurring in soil and have a significant influence on soil processes and properties. The aim of this work is to obtain detailed information on the physical and chemical properties of humic substances such as mean molecular weight \overline{M}_r , spectral characteristics, elemental composition and thermal stability. Soil humic substances samples were characterized by thermal techniques such as thermogravimetric (TGA) and elemental analysis (EA). Different instrumental methods such as UV/Vis spectrometry, infrared spectrometry and fluorescence spectrometry were used to analyze the samples. The results of this work can contribute to a better understanding of soil processes and properties, which can lead to improved agricultural production and environmental protection.

KLÍČOVÁ SLOVA

Půdní huminové látky, huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, elementární analýza, TGA, infračervená spektrometrie, UV/Vis spektrometrie, fluorescenční spektrometrie.

KEYWORDS

Soil humic substances, humic acids, fulvic acids, elemental analysis, TGA, infrared spectroscopy, UV/Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy.

CHURINA, Iuliia. *Fyzikálně-chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149044>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Iuliia Churina

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych chtěla vyjádřit svou vděčnost svému vedoucímu práce doc. Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph. D, za jeho cenné rady, odborné vedení a trpělivost během celé práce. Jeho podpora mi byla neocenitelná. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi poskytla podmínky k psaní této práce a bez které by její realizace nebyla možná.

OBSAH

ÚVOD	7
1. TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 Huminové látky	8
1.2 Rozdělení huminových látek	8
1.2.1 Huminové kyseliny.....	9
1.2.2 Fulvinové kyseliny	10
1.2.3 Humin	10
1.3 Molekulární struktura huminových látek	10
1.3.1 Polymerní teorie	10
1.3.2 Supramolekulární teorie.....	11
1.4 Vznik půdních huminových látek	12
1.4.1 Ligninová teorie	13
1.4.2 Polyfenolová teorie.....	13
1.4.3 Teorie kondenzace cukrů s aminy	14
1.5 Organická hmota v půdě.....	14
1.6 Využití huminových látek	15
1.6.1 Zemědělství.....	15
1.6.2 Průmysl.....	15
1.6.3 Medicína.....	16
1.6.4 Kosmetika	16
1.6.5 Aplikace v ochraně životního prostředí.....	16
1.7 Metody charakterizace huminových látek	17
1.7.1 Elementární analýza.....	17
1.7.2 Termogravimetrická analýza.....	17
1.7.3 Infračervená spektrometrie	18
1.7.4 UV/Vis spektrometrie	18
1.7.5 Fluorescenční spektrometrie	19
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Použité chemikálie.....	23
3.2 Použité metody a přístroje	23
3.3 Charakterizace použitého typu půdy	23
3.4 Extrakce huminových látek	24
3.4.1 Extrakce huminových kyselin ze dvou půdních horizontů.....	24
3.4.2 Extrakce fulvinových kyselin ze dvou půdních horizontů.....	25

3.5	Elementární analýza	26
3.6	Termogravimetrická analýza	26
3.7	Infračervená spektrometrie	26
3.8	UV/Vis spektrometrie	27
3.9	Fluorescenční spektrometrie	27
4.	VÝSLEDKY A DÍKUSE	29
4.1	Elementární a termogravimetrická analýza HL	29
4.2	Infračervená spektrometrie HL	31
4.3	UV/Vis spektrometrie HL	32
4.4	Fluorescenční spektrometrie HL	33
5.	ZÁVĚR.....	36
6.	LITERATURA.....	38
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRAZEK A SYMBOLŮ	42
8.1	Seznam použitých zkratk	42
8.2	Seznam použitých symbolů	42
8.	PŘÍLOHY	43

ÚVOD

Huminové látky jsou téměř všude v přírodě. Tyto organické sloučeniny jsou výsledkem rozkladu rostlinných zbytků a jsou důležité pro udržení kvality půdy a produktivity zemědělské půdy. Možnosti využití huminových látek jsou nekonečné, můžeme se setkat s jejich využitím v různých oblastech lidské činnosti: v medicíně, v ropném průmyslu, kde se používají k rekultivaci ropně znečištěných půd. Studium půdních huminových látek v dnešní době je nedílnou součástí života každého z nás, protože jsou klíčové pro udržení zdravého půdního prostředí a pro udržení udržitelného zemědělství, na jehož kvalitě závisí rostlinné produkty konzumované člověkem.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na fyzikálně-chemickou charakterizaci půdních huminových látek izolovaných z *hnědozemě modální*. Cílem práce je získat detailní informace o fyzikálních a chemických vlastnostech huminových látek, jako jsou střední molekulová hmotnost, spektrální charakteristiky, elementární složení a termická stabilita.

V této práci jsou popsány základní principy fyzikálně-chemických metod používaných k charakterizaci huminových látek, včetně elementární a termogravimetrické analýzy, molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervené spektrometrie a fluorescenční spektrometrie. Dále jsou představeny výsledky analýzy huminových látek izolovaných z *hnědozemě modální*, které jsou získány pomocí těchto metod. Výsledky této práce mohou poskytnout nové informace o vlastnostech huminových látek a jejich vlivu na půdní procesy, což může být užitečné pro zlepšení zemědělské produkce a ochranu životního prostředí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Huminové látky

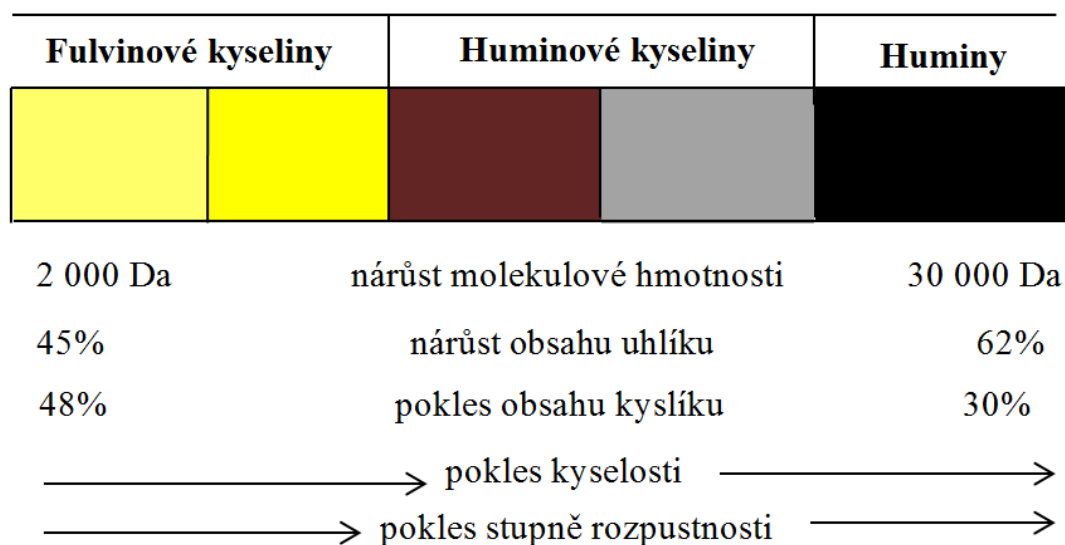
Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny, které vznikly chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů [1]. Aerobní kompostování je typickým biochemickým procesem, při kterém dochází k degradaci organických látek a následně k jejich agregaci, resp. re-syntéze za vzniku HL. Tvorba HL je ovlivněna vlastnostmi použitých vstupních organických sloučenin, přítomností přísad do kompostu, mikrobiální aktivitou, teplotou, pH, poměrem C/N, obsahem vlhkosti, obsahem kyslíku a velikostí částic, z nichž všechny mohou interagovat s každým jiný. HL se vyskytují zejména v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a některých dalších materiálech [3]. Obsah HL v půdě kolísá od stopových množství (písky, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědé uhlí, lignit) [1]. HL se dělí podle jejich vlastností, a to dle jejich extrahovatelnosti (louhovatelności) zásadami a kyselinami na: fulvinové kyseliny, huminové kyseliny a humin, které se liší chemickou strukturou a molekulovou hmotností. HL obsahují heteroatomy, nejdůležitější funkční skupinou je kyslík, který je vázán v karboxylových a fenolických skupinách. Naproti tomu, dusík a síra jsou méně významné [2].

1.2 Rozdělení huminových látek

Rozdělení huminových látek se obvykle provádí na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech. Existují tři hlavní frakce huminových látek [6]:

- huminové kyseliny (HK) jsou rozpustné ve vodě za alkalických podmínek ($\text{pH} > 8$), ale ne za kyselých podmínek;
- fulvinové kyseliny (FK) jsou rozpustné za všech podmínek pH;
- huminy (HU) jsou kompletně nerozpustné ve vodných roztocích různého pH, tzn. 1–14;

HUMINOVÉ LÁTKY

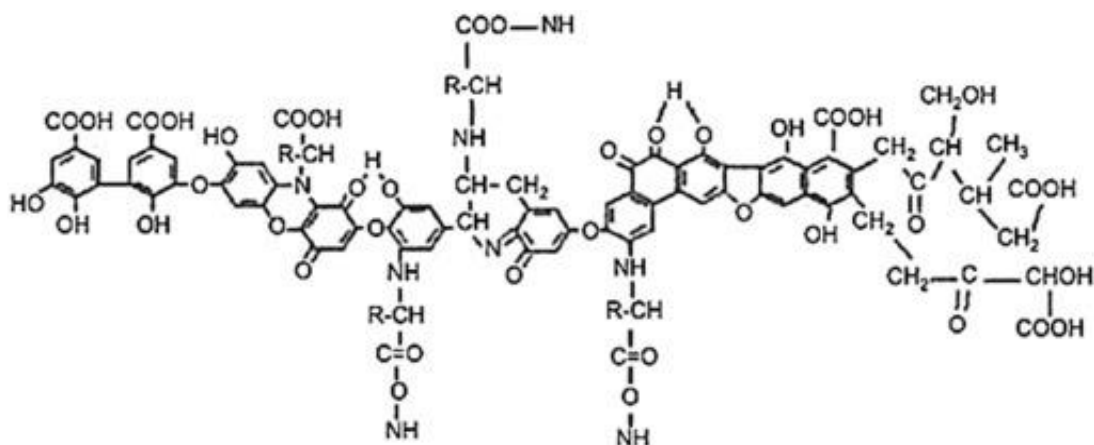


Obrázek 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti HL a jejich rozdělení [9]

1.2.1 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny představují takovou frakci huminových látek, která není rozpustná v kyselých a neutrálních vodných roztocích, ale rozpustná až při vyšších hodnotách pH. Huminové kyseliny tedy mohou být získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu [1]. HK mají rozvětvenou molekulární strukturu, která obsahuje velké množství funkčních skupin a aktivních center, do nichž patří: dusík, draslík, fosfor, a také stopové prvky jako molybden, měď, zinek, železo atd., to vše podmiňuje fyzikální, chemické a biologické vlastnosti huminových kyselin a jejich vliv na rostliny a půdu [4].

Chemické složení HK se může lišit podle geografického původu, stáří, klimatu a biologických podmínek, což ztěžuje přesnou charakterizaci těchto látek [8]. HK se skládají hlavně z fenolových, karboxylových, enolových, chinonových a etherových funkčních skupin, ale mohou zahrnovat také cukry a peptidy. Fenolové a karboxylové skupiny však převládají ve strukturách HK. Obrovská struktura molekuly HK se skládá z hydrofilních částí sestávajících z OH skupin a hydrofobních částí sestávajících z alifatických řetězců a aromatických kruhů [7].



Obrázek 2: Model struktury HK [7]

1.2.2 Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny představují takovou frakci huminových látek, která je rozpustná v celém rozmezí pH a která zůstává v roztoku po odstranění huminových kyselin okyselením. Zabarvení FK je světlejší než u HK, v kterých je větší počet uhlíku, a pohybuje se v rozmezí od světle žlutého do žlutohnědého [1]. FK lze považovat za produkty rozkladu HK nebo jejich prekurzorů.

FK obsahují vyšší počet hlavně karboxylových skupin, které jsou nositelem kyselých vodíků, čímž se tato frakce huminových látek chová kyseleji ve srovnání s huminovými kyselinami a huminy [9].

1.2.3 Humin

Humin představuje takovou frakci huminových látek, která se ve vodě nerozpouští ani při kyselé, ani při alkalické hodnotě pH. Huminy potom mají velmi tmavohnědou až černou barvu [1]. Humin je zbytek, který zůstává po extrakci huminových kyselin. HU je soubor organických sloučenin, nejčastěji lipidické a polypeptidové povahy, nerozpustných ve vodě, které jsou pevně spojeny s minerály a také s některými specifickými sloučeninami (např. celulóza, chitin, lignin atd.) [5].

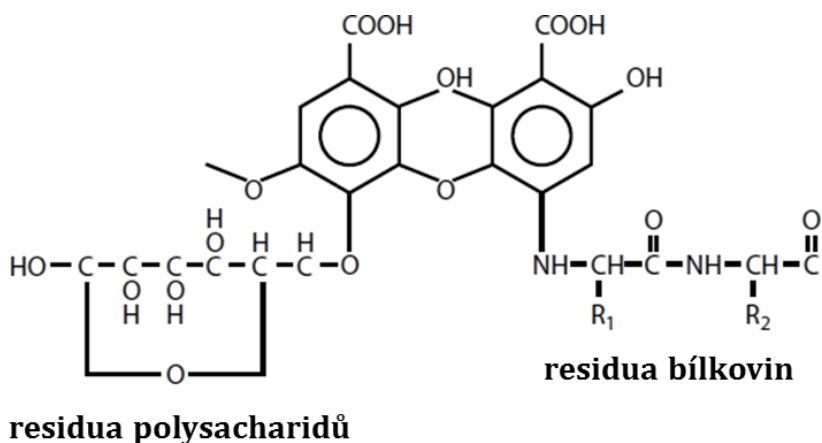
1.3 Molekulární struktura huminových látek

Molekulární struktura huminových látek je složitá a její pochopení vyžaduje analýzu a charakterizaci z různých úhlů.

1.3.1 Polymerní teorie

Z polymerního pohledu je struktura huminových látek popsána jako polymerní síť, která je tvořena různými organickými sloučeninami, jako jsou aromatické a alifatické kyseliny, fenoly, cukry a další. Tyto sloučeniny jsou vzájemně propojeny vazbami, jako jsou kovalentní vazby, vodíkové vazby, iontové interakce a hydrofobní interakce. Podle prvních polymerních modelů byla struktura huminových látek popsána jako lineární, elipsoidního tvaru a pružnějšího charakteru, přičemž měla náhodně stočenou konformaci, nazývanou *random coil*. Nicméně, díky dalším experimentům bylo zjištěno, že makromolekulární struktura

humínových látek se mění v závislosti na koncentraci humínových látek, pH prostředí a iontové síle roztoku. Pozorovalo se, že se tvar struktury mění od sférického ke lineárnímu v závislosti na změnách koncentrace humínových látek, pH a iontové síly. Při zvyšujícím se pH nebo koncentraci humínových látek dochází ke změně tvaru z klubkovitého na náhodně propletenou síť lineárních řetězců, které se spojují do listovité struktury známé jako β -sheet [36].

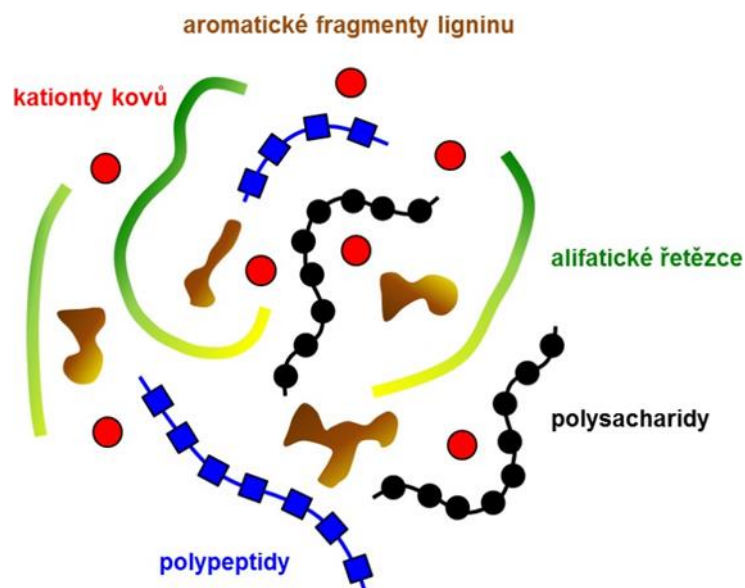


Obrázek 3: Model struktury HK založený na konceptu dimeru dle Stevensonova [4]

1.3.2 Supramolekulární teorie

Ze supramolekulárního pohledu se humínové látky popisují jako soubor supramolekulárních struktur, které vznikají interakcemi mezi organickými sloučeninami. Tyto interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, elektrostatické působení a další. Díky těmto interakcím vznikají koloidní částice a agregáty, které jsou schopny vázat ionty a další molekuly. Autoři popisují humínové látky (HL) jako micelární asociace, které jsou převážně stabilizovány hydrofobními silami, jako jsou van der Waalsovy síly, π - π vazby a CH- π vazby, při pH hodnotě 7. Navrhují, že organické kyseliny pronikají do vnitřního hydrofobního jádra micelární struktury při neutralizaci kyselých funkcí humínových látek z pH 7 na pH 2. To vede k asociaci mezi organickými kyselinami a HL, díky amfifilním vlastnostem kyselin, které mohou interagovat s hydrofobními i hydrofilními doménami humínových agregátů. Tyto interakce jsou schopny narušit slabé síly, které stabilizují strukturu humínových látek [37].

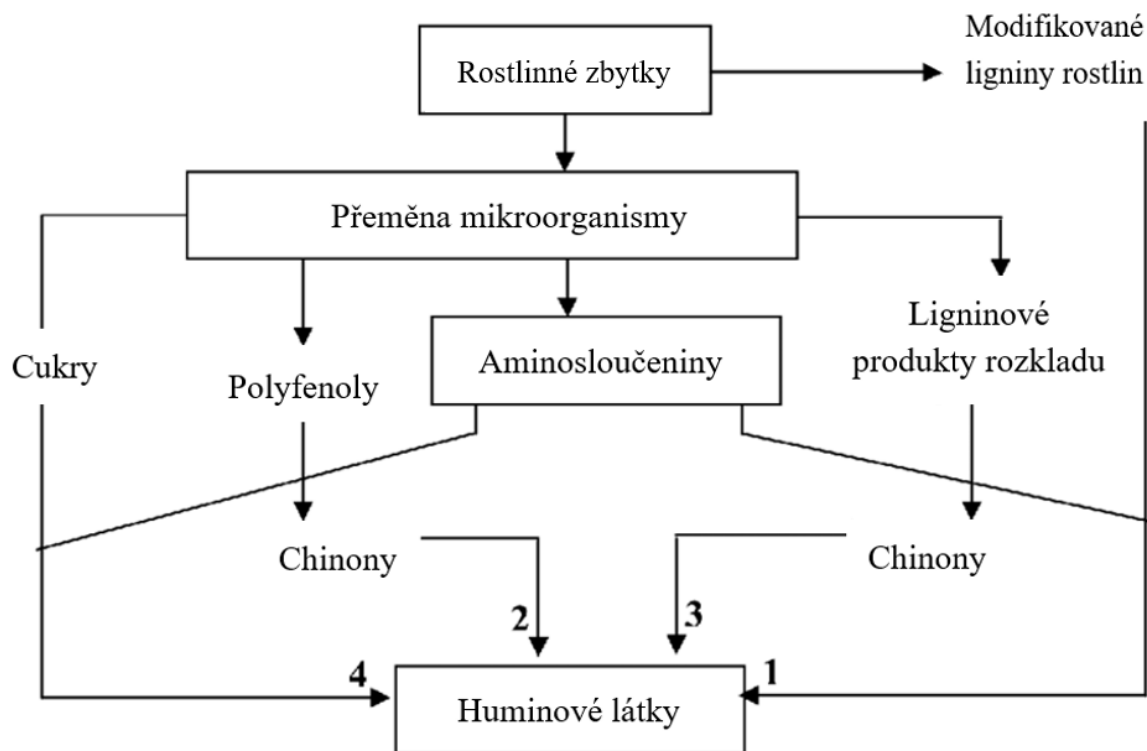
Studie naznačuje, že struktura a uspořádání humínových kyselin (HK) je složitější, než se původně předpokládalo, a přináší nové pojetí, které je chápáno jako supramolekuly. Humínové látky nejsou stabilizovány silnými kovalentními vazbami, jak bylo původně předpokládáno v polymerní teorii, ale spoléhají se na slabé disperzní hydrofobní síly a vodíkové vazby. Tyto interakce jsou zodpovědné za vznik velké molekulární struktury HL, která se zvyšuje s rostoucím pH. Naopak, v oblastech nízkého pH dochází ke vzniku vodíkových vazeb, což vede ke destabilizaci supramolekulární struktury a zmenšení velikosti částic humínových kyselin [37].



Obrázek 4: *Supramolekulární struktura dle Simpsona* [38]

1.4 Vznik půdních huminových látek

Existuje několik hlavních teorií týkajících se tvorby HL. V ligninové teorii jsou HL syntetizovány z prekurzorů pocházejících z ligninu, což znamená, že lignin je surovinou a kostrou prekurzorů HL [6]. Podle Kulikowské částečné degradace ligninu může tvořit fenolové a chinonové skupiny, které mohou sloužit jako prekurzory HL. V teorii polyfenolů jsou HL kondenzační produkty mnoha malých molekul, jako jsou polysacharidy a proteiny [6]. Tyto cesty se nevyskytují samostatně. Široká škála zdrojů a struktury kompostovacích materiálů vedou k interakci s cestami navzájem [11]. Lignin a jeho degradační produkty, včetně fenolů a chinonů, jsou hlavními prekurzory při tvorbě HL polymerací a kondenzací s dusíkatými sloučeninami, jako jsou proteiny, aminokyseliny a nukleové kyseliny [13].



Obrázek 5: Schéma teorie vzniku huminových látek [6]

1.4.1 Ligninová teorie

Teorie ligninu je klasická teorie definovaná Waksmanem (1932). Předpokládalo se, že tvorba HL začíná z modifikovaného ligninu. Díky studiu rozkladu rostlinných složek je známo, že nejnáze podléhají humifikaci látky rozpustné ve vodě, hemicelulózy a nejméně snadno celulóza. Proces spočívá v kombinaci modifikovaných molekul ligninu s dusíkatými složkami proteinového typu (aminosloučeniny) syntetizovanými mikroorganismy (Stenvenson, 1994). Lignin se hromadí ve zbytcích rostlinného materiálu, kde je degradován mikroorganismy za postupné ztráty methoxylových skupin a následného vzniku *o*-hydroxyfenolů. Konečnou oxidací alifatických částí molekuly pak vznikají karboxylové skupiny. Takto pozměněné části ligninu jsou podrobeny dalším reakcím. Při oxidaci reagují s aminovými sloučeninami za vzniku kondenzačních produktů, ve kterých je dusík součástí heterocyklických sloučenin. Posledně jmenovanou složkou je snadno biologicky odbouratelný biopolymer tvořený sestavou tří typů jednotek fenylypropanoidů spojených mezi nimi různými typy spojení C–C a ethyloxidu [6,10].

1.4.2 Polyfenolová teorie

Podle teorie polyfenolů lze HL považovat za kombinaci biopolymerů vzniklých degradací rostlin a dalších organických složek. Také k tvorbě HL dochází v důsledku transformace mikroorganismy (Peña-Méndez et al., 2005). Lignin, uvolněný ze své vazby s celulózou při rozkladu rostlinných zbytků, podléhá degradaci a rozkládá se na své primární strukturní jednotky (jednotky fenylypropanoidy). Tyto poslední složky jsou následně demetylovány a oxidovány za tvorby polyfenolů. Kyseliny a fenolové aldehydy, vznikající z ligninu během

mikrobiálního napadení, jsou přeměněny na chinony pomocí specifických enzymů, zejména polyfenoloxydáz, které odstraňují atom vodíku z fenolických OH funkčních skupin. Chinony jsou poté polymerizovány nebo rekombinovány se sloučeninami, které jsou dusíkaté, za vzniku huminových makromolekul (Huang, 2000). Existuje ještě jeden způsob tvorby HL podle teorie polyfenolů. První způsob se řídí podobným principem jako druhý způsob tvorby HL. Jediný rozdíl je však v tom, že syntéza polyfenolů mikroorganismy počínaje bezdřevitými zdroji uhlíku (například celulórou, ale také bez rostlinných zdrojů). Oxidace těchto bakteriálních polyfenolů v chinony, také vede k tvorbě HL [10].

1.4.3 Teorie kondenzace cukrů s aminy

Mriaillard (1913) navrhl kombinaci redukujících cukrů a aminů k vysvětlení vzniku HL. Je známá jako komplexní reakce, která je prováděna sloučeniny představujícími redukující seskupení (aldehydová nebo ketonová) a aminosloučeniny, které vzájemně reagují za vzniku aromatických a barevných látek. Sloučeniny s karbonylovou skupinou (C=O) mohou být sacharidy (cukry) nebo produkty oxidace lipidů a funkční aminy pochází ze samotných aminokyselin, proteinů nebo přírodních nebo exogenních aminů. Cukry a aminokyseliny vzniklé mikrobiálním metabolismem a degradací z organické hmoty jsou polymerizovány abiotickou kondenzací [22, 23].

1.5 Organická hmota v půdě

Organická hmota v půdě je složena ze zbytků rostlin a živočichů, mikroorganismů a jejich produktů, jako jsou enzymy, sloučeniny dusíku a uhlíku a další organické látky. Tento organický materiál má klíčový význam pro půdní funkce a procesy, protože ovlivňuje vlastnosti půdy, jako jsou její struktura, pH, propustnost pro vodu a živiny, a zásobení živinami. Organická hmota v půdě může být rozdělena do tří hlavních frakcí: lehká frakce, huminové látky a reziduální frakce. Lehká frakce je složena z relativně snadno rozložitelných látek, jako jsou cukry, aminokyseliny a další organické sloučeniny. Huminové látky jsou složitější organické sloučeniny, které jsou rezistentní vůči mikrobiálnímu rozkladu. Reziduální frakce je nejstabilnější frakcí organické hmoty a obsahuje složky, které jsou velmi odolné vůči rozkladu, jako jsou ligniny a polysacharidy vázány na minerální částice [30].

Půdní organická hmota obsahuje více organického uhlíku než globální vegetace a atmosféra dohromady. Z tohoto důvodu může uvolňování a přeměna i malého podílu uhlíku, obsaženého v půdní organické hmotě, na oxid uhličitý nebo metan způsobit kvantitativně významné změny koncentrací skleníkových plynů v atmosféře. Kromě toho organická hmota zadržuje živiny a znečišťující látky v půdě, což zlepšuje růst rostlin a chrání kvalitu podzemní a sladkovodní vody. Půda je také důležitým zdrojem vodního uhlíku s důsledky pro biogeochemické procesy v řekách, jezerech a ústích řek [24]. Organický podíl tvoří v průměru 5 % hmotnosti půdy, ale celkový obsah organické hmoty se v půdě pohybuje v rozmezí od méně než 1 % v chudých písčítých nebo intenzivně zemědělsky obhospodařovaných půdách až po 80 % v rašelinových půdách [30].

Zároveň však může být organická hmota ovlivněna negativními vlivy, jako jsou eroze, nadměrná orná činnost, nadměrné používání hnojiv a pesticidů a další zdroje znečištění. To může vést k degradaci půdy a snižování její úrodnosti. Je proto důležité chránit organickou hmotu v půdě a udržovat její kvalitu pro udržení zdraví půdy a ochranu životního prostředí [30].

Pochopení půdní biogeochemie má zásadní význam pro správu ekosystémových vazeb, které půda poskytuje, jako je úrodnost půdy (pro produkci potravin, vláken a paliv), kvalita vody, odolnost vůči erozi a zmírňování klimatických změn prostřednictvím omezení zpětných vazeb na změnu klimatu [24].

S následným studiem byla velká snaha o určení chemické struktury huminových látek. Díky podrobné analýze huminových látek prostřednictvím pokročilých chemicko-fyzikálních metod, např. IRS (Infra Red Spectroscopy) a NMR (Nuclear Magnetic Resonance) byly získány důkazy potvrzující, že huminové látky nejsou makropolymer, ale ve skutečnosti supramolekulární struktury heterogenních organických molekul s relativně malou střední molekulovou hmotností [25].

1.6 Využití huminových látek

Huminové látky (HL) jsou látky pocházející z půdy, které tvoří jeden z obrovských rezervoárů organického uhlíku v přírodě. HL jsou primárně produkovány fyzikální, chemickou a mikrobiální degradací a transformací rostlinných a živočišných tkání (humifikace) po miliony let. Tvoří většinu organické hmoty půdy – humus, rašelinu, lignity a také hnědé uhlí. HL mohou být také produkovány jako vedlejší produkt syntetických oxidačních reakcí fenolických sloučenin [20,21].

1.6.1 Zemědělství

Huminové látky díky svým unikátním strukturním a chemickým vlastnostem výborně zlepšují půdu. Nabízejí příznivé dopady, pokud jde o celkovou strukturu půdy, kapacitu zadržování vody a dostupnost živin v půdě (sorpční schopnosti HL), spolu s pozitivním účinkem na mikrobiální společenstva v půdě, vliv podobný hormonům na růst rostlin. Proto jsou jednou z důležitých přísad do hnojiv nebo půdních kondicionérů. Dokazují tak svou vitalitu pro ekonomický status zemědělců [20].

1.6.2 Průmysl

Humus a materiály obsahující humus se používají ve velkém měřítku ve stavebnictví, například jako přísady pro regulaci rychlosti tuhnutí betonu. Humusové materiály našly uplatnění také při přípravě kůže. Zpočátku se používaly jako barvivo na kůže, později jako činidlo pro činění kůží, a nakonec jako složka roztoku pro konečnou úpravu kůže. Dalším oborem, kde se HL uplatnily, je dřevozpracující průmysl. Používaly se k přípravě přírodního indiga k barvení dřevěných dýh. Kromě tohoto huminové materiály jsou vhodnými látkami jako součást vodou ředitelných mořidel na dřevěný nábytek [19].

V keramickém průmyslu se huminové látky používaly především jako přísady ke zvýšení mechanické pevnosti nezpracované keramiky, ke zlepšení odlévacích vlastností keramiky, k barvení hliněných dlaždic, a kromě mnoha dalších použití se uplatňovaly také při přípravě kameniny [19].

Dále huminové látky našly uplatnění při výrobě plastů, zejména jako barviva pro barvení plastů z Nylonu 6 nebo PVC, tvrdidla polyuretanových pěn nebo jako změkčovadla PVC [19].

Huminové látky našly četné uplatnění také v papírenském průmyslu. Jsou součástí různých výrobních postupů, například při výrobě elektricky vodivých papírových listů nebo při výrobě papíru s vysokou pevností v tahu, a také při recyklaci papíru [19].

1.6.3 Medicína

Farmakologické vlastnosti huminových látek a produktů z nich odvozených a extrahovaných byly systematicky přezkoumány. Pozitivní vliv těchto látek byl zdokumentován na základě dobře navržených studií pro léčbu různých revmatologických a jiných muskuloskeletálních onemocnění. Shilajit, tradiční exudát z Himálaje v Indii, se vyskytuje ve formě přirozeně se vyskytující minerální látky. Shilajit má prokázané stimulační, omlazující, revitalizační, protistárnoucí a protizánětlivé účinky. Lokální aplikace shilajitu navíc prokázala jeho antiseptické a analgetické vlastnosti. Shilajit obvykle tvoří huminové látky, v nichž působí fulvinová kyselina jako nejvíce bioaktivní složka (15–20 %), o níž je známo, že má imunomodulační chování. Výtažky z rašeliny, pocházející z tzv. organické půdy – hojně zastoupené HL, byly hojně využívány ve starém Římě během 19. století jako bahenní koupele pro své léčebné účinky při gynekologických a revmatických onemocněních. Rašelina se také podávala perorálně k léčbě srdečních, žaludečních, střevních nebo jaterních potíží [20].

1.6.4 Kosmetika

Vzhledem k mírnému adstringentnímu a protizánětlivému účinku jsou huminové látky užitečným doplňkem při lokální terapii zánětlivých kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida, cheiropodopfolyx, psoriáza a mírná fokální hyperhidróza.

Přípravky huminových kyselin a dalších rašelinových sloučenin mohou být speciálně určeny k použití na tělo, pokožku hlavy nebo palmoplantární kůži. Sloučeniny umožňují zapracování do gelů (např. sprchových gelů), krémů a mastí a lze je použít i pro koupelovou terapii. Otevřená studie s každodenní aplikací rašeliny prokázala přínos u pacientů trpících chronickou dermatitidou rukou a psoriasis palmaris [20].

1.6.5 Aplikace v ochraně životního prostředí

Huminové látky mají vynikající sorpční vlastnosti, což znamená, že jsou schopny vázat a ukládat různé chemikálie a látky z okolního prostředí. To je velmi důležité pro ochranu životního prostředí, protože huminové látky mohou přispět k odstraňování toxických a znečišťujících látek z vody, půdy a ovzduší. Díky svým sorpčním schopnostem mohou huminové látky vázat těžké kovy, pesticidy, herbicidy a jiné látky, které mohou být škodlivé

pro zdraví člověka a životní prostředí. Vazbou těchto látek se snižuje jejich koncentrace v půdě, vodě a ovzduší, což zlepšuje kvalitu životního prostředí. Huminové látky také mohou zlepšit půdní strukturu a zvýšit vodní retenci, což přispívá k udržení vlhkosti v půdě a zvyšuje tak její úrodnost. Zlepšením půdní struktury se také snižuje eroze a ztráty půdy [9].

Celkově lze tedy říci, že huminové látky mají velký potenciál pro různé aplikace v mnoha různých odvětvích.

1.7 Metody charakterizace huminových látek

1.7.1 Elementární analýza

Elementární analýza organických látek je metoda chemické kvalitativní analýzy, která se používá k určení elementárního složení organických látek, tj. kolik obsahují uhlíku, vodíku, dusíku, kyslíku a dalších prvků. Tato metoda se zpravidla používá pro jednoduché organické sloučeniny, jako jsou uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a aminy. Huminové látky jsou nevyčísitelně složité organické látky, které obsahují uhlík, vodík, dusík, kyslík a další prvky, jako jsou například síra, fosfor a draslík. Elementární analýza huminových látek se obvykle provádí spalováním vzorku látky v peci za přítomnosti kyslíku, čímž se oxidují všechny prvky obsažené v molekule. Z množství oxidů uhlíku, vodíku, dusíku a dalších prvků, které se uvolní při spalování, lze pak vypočítat procentuální obsah těchto prvků v molekule huminových látek [13].

1.7.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) je metoda, která se používá k charakterizaci materiálů na základě změn hmotnosti během zahřívání. TGA se často používá k analýze organických látek, včetně huminových látek. TGA huminových látek se provádí pomocí zařízení, který umožňuje měření změny hmotnosti vzorku látky v závislosti na teplotě. Vzorek huminových látek se obvykle zahřívá v peci s programovatelným zahřívacím režimem, přičemž se sleduje hmotnost vzorku v průběhu času. Přístroje pro TG se skládají z elektrické pece, analytických vah, nosičů vzorků, zařízení pro měření a řízení teploty a počítače. Nejčastěji se používá teplotní rozsah od teploty okolí až do 1 000 °C a rychlost ohřevu se pohybuje kolem 5–10 °C·min⁻¹. Celý vnitřní prostor pece je, z důvodu ochrany aparatury před korozivními plyny uvolňovanými ze vzorku, proplachován inertním plynem [14].

Při zahřívání huminových látek dochází k postupnému rozkladu organických sloučenin obsažených v molekulách huminových kyselin, fulvinových kyselin a huminů. Změny hmotnosti vzorku během zahřívání se zaznamenávají a interpretují se jako teplotní profil rozkladu látky. TGA huminových látek umožňuje identifikovat teploty rozkladu různých organických sloučenin a stanovit celkové množství organických látek obsažených v huminových látkách. TGA se také používá k porovnání různých druhů HL a ke studiu jejich vlastností, jako je například stabilita vůči teplu a oxidaci. Termogravimetrie jako taková může být prováděna v různých atmosférických podmínkách, od termogravimetrie za vysokého tlaku až po termogravimetrii za běžného tlaku, ale s přítomností různých přídavných plynů [15].

TGA huminových látek je důležitým nástrojem v oblasti půdní a environmentální chemie, protože umožňuje studovat změny vlastností huminových látek v různých podmínkách a využití této znalosti pro optimalizaci řízení půdních a vodních ekosystémů.

1.7.3 *Infračervená spektrometrie*

Infračervená spektrometrie (IR spektrometrie) je analytická metoda, která se používá k identifikaci a kvantifikaci molekul na základě jejich charakteristických vibračních spekter. Principem IR spektrometrie je měření absorpce infračerveného záření molekulami látek. Infračervené záření má nižší energii než viditelné světlo a je vlnění, které způsobuje vibrační pohyby molekul látek. Pokrývá část elektromagnetického spektra v intervalu mezi 0,78 a 1000 μm . Každá chemická vazba má svou charakteristickou frekvenci vibračních pohybů, která odpovídá určitému vlnovému číslu infračerveného záření. Pokud je vazba v molekule látky vystavena infračervenému záření s touto frekvencí, dochází k absorpci záření a k excitaci vibrací této vazby [16,17].

Infračervené spektrum se získává tak, že se infračervené záření o určité vlnové délce (typicky v rozsahu 4000 až 400 cm^{-1}) promítá na vzorek látky. Infračervenou oblast spektra rozdělujeme na tři části, a to na blízkou infračervenou oblast tj. 12800–4000 cm^{-1} ; střední infračervenou oblast tj. 4000–200 cm^{-1} a vzdálenou infračervenou oblast tj. 200-10 cm^{-1} . Některé vlnové délky, resp. vlnočty infračerveného záření budou absorbovány molekulami v látkovém vzorku, zatímco jiné budou přenášeny. Detektor zachycuje množství emitovaného záření a na základě toho se získá spektrum absorpce [16,17].

Každý typ molekuly má specifické vibrační frekvence, které jsou charakteristické pro konkrétní chemickou vazbu nebo funkční skupinu. IR spektroskopie tedy umožňuje identifikovat chemické vazby, funkční skupiny a molekulové struktury látek. Pomocí IR spektrometrie lze také určit množství látky v roztoku, nebo sledovat chemické reakce v čase [16].

IR spektrometrie je velmi užitečná v organické chemii, biochemii, analytické chemii, materiálové vědě a dalších oblastech, protože umožňuje rychlou a citlivou analýzu látek.

1.7.4 *UV/Vis spektrometrie*

UV/Vis spektrometrie je analytická metoda, která se používá k identifikaci a kvantifikaci molekul na základě jejich absorpce ultrafialového a viditelného záření. Principem UV/Vis spektrometrie je měření absorpce elektromagnetického záření látkou. Ultrafialové a viditelné záření jsou vlnění, které se pohybuje rychlostí světla a má určitou energii. Molekuly látek mohou absorbovat toto záření a přecházet do excitovaného stavu. Excitovaná molekula přechází zpět do základního stavu bez radiace, zářivá energie se mění v tepelnou energii, zvyšuje se kinetická energie molekul. Jen v některých případech je molekulou emitováno nové záření, zpravidla o nižší energii. Každá molekula má charakteristické absorpční spektrum, které závisí na konkrétních elektronových přechodech a molekulové struktuře látky. UV/Vis spektrometrie se používá pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. Kvantitativní

analýza se používá k určení množství látky v roztoku, zatímco kvalitativní analýza umožňuje identifikovat látky podle charakteristických absorpčních spekter [18].

Spektrometr se skládá ze zdroje světla, monochromátoru a detektoru. Zdroj světla vysílá ultrafialové a viditelné záření, které prochází vzorkem látky v roztoku. Monochromátor rozděluje záření do jednotlivých vlnových délek a detektor měří množství světla, které prošlo vzorkem látky. Na základě těchto údajů lze vypočítat množství absorbovaného záření, a tedy i koncentraci látky v roztoku [17].

UV/Vis spektrometrie se často používá v organické chemii, biochemii, analytické chemii a dalších oblastech. Tato metoda je velmi citlivá a umožňuje analýzu i velmi malých množství látek.

1.7.5 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektrometrie je běžně využívaná metoda pro charakterizaci huminových látek. Princip této metody spočívá v tom, že huminové látky mají schopnost absorbovat ultrafialové (UV) záření a následně emitovat fluorescenční záření v různých vlnových délkách. Během fluorescenční spektrometrie se vzorek huminových látek osvětlí UV zářením a následně se měří intenzita vyzařovaného fluorescenčního záření v závislosti na vlnové délce. Tento proces umožňuje identifikovat a charakterizovat různé typy organických molekul obsažených v huminových látkách. Fluorescenční spektrometrie se používá pro kvantitativní a kvalitativní analýzu huminových látek, což poskytuje informace o jejich vlastnostech jako je množství aromatických struktur, stupně kondenzace a polymerace, ale také o možných kontaminantech, které mohou ovlivňovat měření [28, 29].

Huminové látky z terestriálních zdrojů mají v excitačně-emisních fluorescenčních spektrech (EEM) dvě fluorescenční maxima označovaná jako A a C. Fluorofor A je označován jako *fulvic-like* a nachází se v excitačně-emisním spektru v oblasti vlnových délek 240–280/400–500 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), zatímco fluorofor C (*humic-like*) se nachází v oblasti s vyššími vlnovými délkami excitace, tedy při $\lambda_{ex} \sim 300\text{--}380$ nm. U některých vzorků huminových látek se vedle A a C objevují také další fluorescenční maxima, která jsou označována jako *odvozené humic-like fluorofory*, které se nacházejí v oblasti s vyššími vlnovými délkami excitace a emise, tedy 435–450/500–540 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Tato maxima jsou typická pro huminové a fulvinové kyseliny izolované z různých přírodních zdrojů. Při analýze huminových látek z pobřežních a mořských sedimentů se vyskytuje specifické fluorescenční maximum M, které se nachází v oblasti vlnových délek 290–310/370–410 nm a je označováno jako *marine humic-like* [31].

Autoři studie Doskočil a spol. provedli spektrální charakterizaci a porovnání huminových kyselin izolovaných ze sedmi vzorků lignitu z různých evropských uhelných pánví. Použili metodu excitačně-emisní fluorescence a pozorovali maxima v oblasti vlnových délek 255–265/460–510 nm, která odpovídají fluorescenčnímu maximu A (*fulvic-like*). Autoři dospěli k závěru, že EEM spektra lignitových huminových kyselin izolovaných z různých evropských uhelných pánví jsou si podobná a chemické vlastnosti se také liší jen málo. Autoři také

naznačili, že fluorescenční maximum A může souviset nejen se systémy aromatických kruhů, ale také s lipidy, jako jsou steroidy [32].

Výhodou fluorescenční spektrometrie je její rychlost, citlivost a schopnost analýzy vzorků bez nutnosti dalších úprav. Díky těmto vlastnostem se tato metoda stává často využívanou pro studium huminových látek a může pomoci k lepšímu porozumění vztahu mezi huminovými látkami a životním prostředím [29].

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Huminové látky jsou složitou směsí organických sloučenin, které se nacházejí v půdách a jsou důležité pro udržení půdní produktivity a ekologické stability. Huminové látky jsou tvořeny převážně ligniny, tříslovinami a polysacharidy, které prošly řadou biologických, chemických a fyzikálních procesů [27].

Fyzikálně-chemická charakterizace huminových látek se v posledních letech intenzivně studuje, především z důvodu vysoké variability jejich chemické struktury a složení, což ztěžuje jejich přesnou analýzu. Huminové látky izolované z hnědozemě modální jsou jedny z nejkompexnějších typů huminových látek a jejich charakterizace je zvláště obtížná.

V roce 2015 Johannes Lehmann a Markus Kleber uvedli článek ve vědeckém časopise Nature s názvem "The contentious nature of soil organic matter". V tomto článku autoři argumentovali, že tradiční koncepce huminových látek jako samostatných chemických sloučenin není zcela přesná, a že výzkumy naznačují, že huminové látky jsou spíše nehomogenními skupinami molekul organické hmoty s různými vlastnostmi a strukturami. Takže Lehmannova hypotéza tvrdí, že huminové látky neexistují jako samostatné chemické sloučeniny, ale spíše představují heterogenní skupinu organických sloučenin, které se vyskytují v půdě. Podle této hypotézy jsou huminové látky výsledkem reakcí a interakcí mezi různými organickými sloučeninami v půdě, jako jsou ligniny, polysacharidy a bílkoviny. Lehmannova teorie byla založena na pozorování, že huminové látky mají velmi složitou strukturu, která se velmi liší od klasických polymerů a organických sloučenin, které se obvykle nacházejí v přírodě. Dále se ukázalo, že huminové látky nejsou snadno izolovatelné a mohou se výrazně lišit ve své chemické a fyzikální struktuře v závislosti na podmínkách extrakce. Tato teorie vzbudila kontroverze a vedla k mnoha debatám mezi vědci v oblasti půdní vědy. Někteří vědci se přiklánějí k hypotéze, že huminové látky jsou samostatné chemické sloučeniny, zatímco jiní podporují Lehmannovu teorii o jejich heterogenní povaze [24].

Je důležité poznamenat, že výzkum huminových látek a jejich charakteristik stále pokračuje a nové poznatky se neustále objevují, takže přesné určení jejich chemické a fyzikální povahy zůstává nadále předmětem intenzivního výzkumu a diskusí v odborné veřejnosti.

V současné době se používají různé analytické metody, jako je NMR spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, fluorescenční spektrometrie a chromatografie, k charakterizaci huminových látek. Tyto metody však často vyžadují složité přípravy vzorků a jsou nákladné [18, 26].

Další oblast, která se v posledních letech intenzivně studuje, je vliv huminových látek na půdní procesy a ekosystémy. Zjištění fyzikálně-chemických vlastností a složení huminových látek jsou klíčové pro pochopení jejich úlohy v půdních procesech a pro využití těchto znalostí při udržitelném zemědělství a ochraně půdních zdrojů. Vzhledem k tomu, že huminové látky jsou důležité pro udržení ekologické stability a produktivity půd, lze

očekávat, že bude pokračovat výzkum zaměřený na jejich fyzikálně-chemickou charakterizaci a využití těchto znalostí v praxi [27].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- destilovaná voda;
- 0,1 M HCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,1 M NaOH (Sigma Aldrich s.r.o.);
- 0,3 M HF (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KCl (Sigma Aldrich s.r.o.);
- KOH (Sigma Aldrich s.r.o.);
- methanol p.a. (Sigma Aldrich s.r.o.).

3.2 Použité metody a přístroje

- váhy, d=0,01 g, (MERCY, S.R.O.);
- skleněná kolona malá pro DAX-8;
- skleněná kolona velká pro Amberlite IR 120;
- lyofilizace (lyofilizátor Vir-Tis);
- elementární analýza CHNS/O – Euro Vector EA 3000;
- termogravimetrický analyzátor TG Q5000, TA Instruments;
- UV/Vis spektrometrie (Hitachi U3900H);
- FTIR spektrometr (Nicolet iS50, Thermo Fischer Scientific, Inc);
- fluorescenční spektrometr (*steady-state*) Edinburgh Instruments FS5.

3.3 Charakterizace použitého typu půdy

Půda může být klasifikována podle různých klasifikačních systémů, které se liší v závislosti na zemi a účelu klasifikace. Pod záštitou Organizace pro výživu a zemědělství OSN (*FAO – Food and Agriculture Organization*) byl vytvořen referenční klasifikační systém *WRB (World Reference Base for Soil Resources)*. V Evropě tento systém funguje jako sjednocující prvek, nicméně v Americe se používá systém *Soil Taxonomy*. V České republice se používá *Taxonomický klasifikační systém půd ČR (TKSP)*, který se svojí nomenklaturou na úrovni nejvyšších taxonů sjednotil s *WRB* [33].

Taxonomický klasifikační systém půd ČR má následující hierarchii. Nejvýše jsou postaveny *referenční třídy půd*, které mají koncovku (-sol). Tyto třídy sdružují skupiny půd podle hlavních rysů jejich vývoje. Další úrovní systému jsou *půdní typy*, které si ve většině případů ponechaly české názvy s koncovkou (-zem). Na této úrovni se jedná o hlavní půdní jednotky dané výskytem a sledem diagnostických horizontů. Půdní typy se mohou vyskytovat v řadě *subtypů*, které představují výrazné modifikace [33].

V této bakalářské práci huminové a fulvinové kyseliny byly izolovány z hnědozemě modální. Hnědozemě je typickým zástupcem třídy Luvisolů. Luvisoly jsou charakterizovány akumulací jílových minerálů v podpovrchových horizontech. Tato třída má dobře vyvinutý A-horizont (půdní horizont bohatý na organickou hmotu a živiny), který je

charakterizován vyšším obsahem jílových minerálů a přítomností iluviálních (akumulačních) procesů. Luvisoly jsou často vytvářeny v mírně zvlněném a kopcovitém terénu [34].

Hnědozemě jsou typickým zástupcem třídy Luvisolů. Jedná se o půdní typ, který se vyskytuje v České republice. Tento půdní typ má hnědý až tmavě hnědý barevný odstín, který je způsoben vysokým obsahem organické hmoty. V hnědozemích se huminové látky nacházejí zejména v organickém horizontu (A horizont). Tento horizont je bohatý na humus, který obsahuje huminové látky. Huminové látky mají schopnost vázat vodu, živiny a další látky, což přispívá k vytváření dobře strukturované a živné půdy. Taky huminové látky přispívají k tvorbě půdního uhlíku, který je důležitý pro zachycování a ukládání oxidu uhličitého z atmosféry [34].

Vzorek hnědozemě modální byl izolován z půdy, která se nachází nedaleko jihomoravské metropole Brna poblíž městyse Podolí. Místo odběru je lokalizováno východně od Brna, kde nadmořská výška byla 261 m. n. m. Místo odběru se rovněž nachází na samé hranici chráněné krajinné oblasti Moravský kras. Přesné místo odběrů neporušených půdních vzorků je znázorněno na Obrázek 6, přičemž přesné GPS lokace jsou dány následujícími hodnotami: 49,1956689N; 16,7412786E.



Obrázek 6: Místo odběru neporušených půdních vzorků hnědozemě modální

3.4 Extrakce huminových látek

3.4.1 Extrakce huminových kyselin ze dvou půdních horizontů

Izolace HK byla provedena podle standardní metody společnosti IHSS. Výchozí množství předem vysušené a prosáté půdy (jemnozeme, 1 mm) bylo 200 g. K vzorku bylo přidáno 1000 cm³ 0,1M roztoku HCl a směs byla míchána po dobu 1 hodiny s rychlostí 10 ot·min⁻¹.

Suspenze byla zneutralizovaná 1M roztokem NaOH na hodnotu pH ~ 7. Potom směs byla odstředěna (15 min, při 4800 ot. \cdot min⁻¹). Kapalný podíl byl odstraněn a k pevnému podílu bylo přidáno 1000 ml 0,1M roztoku NaOH. Takto vzniklá suspenze byla nechána na rotační třepačce přes noc při 10 ot. \cdot min⁻¹. Pak suspenze byla znovu odstředěna (45 min, při 4800 ot. \cdot min⁻¹). Vzniklý supernatant byl dále přefiltrován za sníženého tlaku kvůli odstranění případných nečistot, které nebyly odstraněny při centrifugaci. Tak vzniklý alkalický roztok byl dále okyselen koncentrovanou HCl (35 obj. %). K precipitování (vysrážení) HK dojde po přidavku takového množství HCl až je roztok okyselen na hodnotu pH ~ 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc. Vysrážené HK byly odděleny od supernatantu odstředěním při otáčkách 4800 ot. \cdot min⁻¹ po dobu 45 minut. Supernatant obsahující FK byl přefiltrován a sebrán do nádoby. Vysrážené HK byly poté rozpouštěny přidavkem 500 cm³ 0,1M roztoku KOH. Potom k roztoku bylo přidáno 11 g KCl. Následně byl roztok odstředěn v odstředivce při 4800 ot. \cdot min⁻¹ po dobu 30 minut. Supernatant obsahující FK byl přefiltrován a sebrán do nádoby. Po odstranění nerozpustné frakce, jako jsou humin a anorganické příměsí, byl roztok HK okyselen koncentrovanou HCl (35 obj. %) na hodnotu pH ~ 1. Roztok byl ponechán v lednici přes noc. Vysrážené HK byly oddělené od supernatantu odstředěním při otáčkách 4800 ot. \cdot min⁻¹ po dobu jedné hodiny. Supernatant obsahující FK byl přefiltrován a sebrán do nádoby. K vysráženým HK bylo přidáno 500 cm³ roztoku směsi 0,1M HCl a 0,3M HF. Takto vzniklá suspenze byla ponechána na rotační třepačce po dobu jednoho týdne. Potom byly HK oddělené od supernatantu odstředěním při 4800 ot. \cdot min⁻¹ po dobu jedné hodiny.

Pevný podíl HK byl převeden do dialyzačních membrán s póry o velikosti 1000 Da a dialyzován v ultračisté vodě po dobu 8 dní do vymytí Cl⁻ iontů. Po dialýze byly HK převedené do lyofilizačních baněk, následně byl roztok vymražen a lyofilizován.

3.4.2 *Extrakce fulvinových kyselin ze dvou půdních horizontů*

Do kádinky bylo převedeno potřebné množství pryskyřice DAX-8. Kádinka se naplnila methanolem tak, aby hladina nad vrstvou DAX-8 byla minimálně 2 cm vysoká. Tato suspenze byla míchána na rotační míchačce po dobu 15 min. Následně byl methanol slit a pryskyřice byla promyta destilovanou vodou (tento postup byl proveden 10krát). Potom pryskyřice byla převedena do kolony. Kolona byla propouštěna destilovanou vodou a pak voda byla doplněna přibližně 2 cm nad pryskyřicí, aby nedocházelo k vysychání pryskyřice.

Roztok FK byl ultrafiltrací propouštěn přes filtr s póry o velikosti 0,45 μ m, aby roztok byl zbaven pevných nečistot. Poté byl přefiltrovaný roztok převeden do kolony. Po nadávkování veškerého obsahu FK byla kolona promývána destilovanou vodou. Následně byla provedena desorpce fulvinových kyselin z pryskyřice pomocí roztoku 0,1M NaOH. Po adsorpci FK na pryskyřici DAX a jejich následné desorpci byla provedena regenerace použité pryskyřice. Tato regenerace byla provedena promýváním pryskyřice 0,1 M HCl. Promývání bylo prováděno, dokud hodnota pH HCl vytékající z kolony nebyla stejná s pH HCl na vstupu do kolony. Potom byla kolona 32krát promyta destilovanou vodou, dokud nebyla hodnota pH vody na výstupu z kolony stejná jako na vstupu do kolony. Destilovaná voda byla poté ponechána v koloně přibližně 2 cm nad pryskyřicí, aby nedošlo tedy k vysychání pryskyřice.

Na konci byla provedena protonace FK pomocí katexy Amberlite IR 120, a tím byly odstraněny sodné ionty Na^+ , které byly následně nahrazeny vodíkovými protony H^+ . Katex byl zalit ultračistou vodou a mícháno pomocí tyčinky po dobu 15 minut. Následně byla suspenze převedena do skleněné kolony a hladina destilované vody byla přibližně 2 cm nad pryskyřicí, aby nedocházelo k jejímu vysychání. Roztok FK získán z předešlého kroku byl opakovaně proléván kolonou, dokud neklesla hodnota vodivosti pod hodnotu $120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Poté byla provedena regenerace použité pryskyřice. Tato regenerace byla provedena promýváním pryskyřice 1000 ml 0,1M HCl a poté kolona byla promyta destilovanou vodou do hodnoty $\text{pH}\sim 7$. Destilovaná voda byla poté ponechána v koloně přibližně 2 cm nad pryskyřicí, aby nedošlo tedy k vysychání pryskyřice.

Získané roztoky FK byly zakonzentrovány, vymraženy na rotační vakuové odparce a následně lyofilizovány do úplného vysušení.

3.5 Elementární analýza

Elementární složení huminových látek izolovaných ze dvou půdních horizontů bylo určeno pomocí elementárního analyzátoru EA3000, který byl kalibrován pomocí standardní látky 4-amino-benzen-sulfonamidu. Vzorky HL byly spáleny při teplotě $980\text{ }^\circ\text{C}$ v kyslíkové atmosféře a jejich elementární složení bylo analyzováno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*, verze 5.1. Získaná data byla přepočtena na atomová procenta (*at. %*).

3.6 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena na vzorcích huminových látek izolovaných ze dvou půdních horizontů pomocí přístroje TA Instruments TGA Q5000, kde výsledky měření byly zaznamenávány počítačovým softwarem. Vzorky huminových látek byly spáleny v atmosféře vzduchu s průtokem $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ z laboratorní teploty na konečnou teplotu pece $1000\text{ }^\circ\text{C}$ s rychlostí ohřevu pece $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Na základě získaných dat byl stanoven obsah nespalitelného podílu (popela) a celkové vlhkosti huminových látek.

3.7 Infračervená spektrometrie

Pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byly získány základní informace o struktuře, povaze a obsahu jednotlivých funkčních skupin nacházejících v HL.

Vzorky huminových látek izolovaných ze dvou půdních horizontů byly připraveny smícháním 2 mg vzorku s 100 mg předem vyžíhaného KBr, následným rozetřením v achátové třecí misce a homogenizací. Takto připravený vzorek byl pak měřen pomocí difuzně-reflexní jednotky FTIR spektrometru Nicolet iS50, který umožnil zaznamenání DRIFT spekter v rozsahu vlnočtů od $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 8 cm^{-1} a s celkovým počtem akumulovaných skenů 512. FTIR spektrum bylo převedeno na jednotky Kubelka-Munk, které odpovídají jednotkám absorbance při transmisním měření. Infračervené spektrum vzorku bylo normalizováno na hodnotu nejintenzivnějšího absorpčního pásu nacházejícího se ve spektru.

3.8 UV/Vis spektrometrie

Základem UV/Vis spektrometrie je schopnost látek absorbovat ultrafialové a viditelné záření v rozmezí 200 až 1000 nm. Tato metoda byla v této bakalářské práci použita k primární charakterizaci vzorků huminových a fulvinových kyselin. Pomocí literární rešerše byly určeny určité absorpční koeficienty (E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_4/E_6 a E_{ET}/E_{BZ}), které se získávají pomocí poměru absorbancí při přesně stanovených vlnových délkách. Absorpční koeficient E_2/E_4 byl získán z poměrů absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm. Absorpční koeficient E_2/E_3 je definován jako poměr absorbancí při 250 a 365 nm. Absorpční koeficient E_4/E_6 , který je též nazýván jako *humifikační index*, je v přímé spojitosti s koeficientem E_2/E_4 a definován, jako poměr absorbancí při vyšších vlnových délkách, tzn. při 465 a 665 nm. Absorpční koeficient E_{ET}/E_{BZ} , který je výrazně citlivý k obsahu polárních substituentů na aromatickém jádře HL, je určen poměrem absorbancí v UV oblasti absorpčního spektra při 253 a 220 nm.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky huminových a fulvinových kyselin (HK a FK) o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěním 2,5 mg vzorků HK v 0,1 M roztoku NaOH v 25 ml odměrných baňkách. Takto připravené roztoky byly použity za účelem studia HK a FK pomocí humifikačního indexu E_4/E_6 . V tomto případě byla použita vyšší koncentrace HK a FK z důvodu, že obecně absorpční spektra HL vykazují kvaziexponenciální průběh, kdy při nižších hmotnostních koncentracích by hodnoty absorbancí ve VIS oblasti byly příliš nízké, a absorpční koeficient by byl zatížen významnou chybou. Poté byl z těchto roztoků odpipetován 2,5 ml do 25 ml odměrné baňky a doplněn standardním fosfátovým pufrům o pH 7, tak byly připraveny roztoky o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro získání absorpčních koeficientů E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_{ET}/E_{BZ} byly použity roztoky HK a FK s koncentrací $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Takto připraveny roztoky byly měřeny spektrometrem Hitachi U-3900H v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm v rozmezí 200–800 nm s krokem měření 1 nm a rychlostí skenu $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. Následně byly z těchto spekter vypočteny příslušné absorpční koeficienty.

3.9 Fluorescenční spektrometrie

V této bakalářské práci byla použita metoda fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) k získání informací o struktuře, heterogenitě, stupni humifikace, kondenzaci aromatických struktur a přítomnosti funkčních skupin, jako jsou elektron-donorní ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{O}^-$, $-\text{CN}$, $-\text{OCH}_3$ a $-\text{OR}$) a elektron-akceptorní ($-\text{COOH}$ a $-\text{NO}_2$). Pro zkoumání HK a FK byly použity excitační a emisní spektra, ze kterých byly získány informace o poloze jednotlivých fluorescenčních maxim. Pro měření fluorescenčních spekter byly použity stejné roztoky HK a FK o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, které byly připraveny v kapitole 3.7 pro měření UV/Vis spekter. V této práci byly huminové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK) charakterizovány pomocí excitačně-emisních fluorescenčních spekter (EEM). Tyto spektra byly použity k určení polohy jednotlivých fluorescenčních maxim, což odpovídá jednotlivým typům fluoroforů.

Za účelem studia použitých HK a FK pomocí fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru o hodnotě pH 7.

Fluorescenční spektra vzorků byla získána pomocí *steady-state* fluorescenčního spektrometru Edinburgh Instruments FS5, při použití excitačního a emisního monochromátoru s šířkou štěrby 5 nm. K měření byla použita křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm. U vzorků HL byla fluorescenční spektra změřena v rozsahu vlnových délek emisní osy 300–600 nm a v rozsahu vlnových délek excitační osy 240–550 nm. EEM spektra byla změřena při shodném kroku excitačního a emisního monochromátoru, tj. 5 nm. Z naměřených experimentálních dat byly po korekci vnitřního filtračního efektu (IFE – Inner Filter Effect) vytvořeny matice, ze kterých byly následně vymodelovány EEM spektra vzorků HK a FK pomocí vyhodnocovacího programu OriginPro 9.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Elementární a termogravimetrická analýza HL

V Tabulka 1 jsou uvedeny naměřené hodnoty obsahu biogenních prvků vzorků půdy ze dvou horizontů a huminových látek izolovaných z těchto vzorků, atomových poměrů H/C, O/C, N/C a obsahu nespalitelného podílu, tj. popela a celkové vlhkosti.

Tabulka 1: *Elementární složení půdy a HL izolovaných ze dvou půdních horizontů v at. %, vypočítané atomové poměry H/C, O/C a N/C, obsah popela a celkové vlhkosti*

Vzorek	Elementární složení v at. %					H/C	O/C	N/C	vlhkost (hm. %)	popel (hm. %)
	C	H	N	S	O					
Půda 10 cm	13,33	68,18	0,90	0,00	17,58	5,11	1,32	0,07	3,06	86,97
Půda 30 cm	14,14	70,37	0,93	0,00	14,56	4,98	1,03	0,07	2,75	88,95
HK 10 cm	27,86	60,00	2,42	0,00	9,72	2,15	0,35	0,09	7,25	1,61
HK 30 cm	27,47	59,64	2,53	0,00	10,35	2,17	0,38	0,09	7,03	1,58
FK 10 cm	28,29	56,30	2,02	0,00	13,39	1,99	0,47	0,07	3,46	4,19
FK 30 cm	36,34	38,89	2,87	0,46	21,44	1,07	0,59	0,08	4,75	3,61

Elementární složení je uvedeno v atomových procentech (*at. %*) z toho důvodu, že hmotnostní procenta (*hm. %*) podhodnocují obsah vodíku vlivem jeho nízké atomové hmotnosti. Pomocí atomových poměrů H/C, O/C a N/C lze vyjádřit některé fyzikálně-chemické vlastnosti organických látek, jako například míru hydrogenace, oxidace, dekarboxylace nebo podíl aromatických nebo alifatických strukturních jednotek. Tyto poměry poskytují užitečnou metodu pro charakterizaci organických látek.

Z výsledků uvedených v Tabulka 1 je vidět, že organická hmota ze vzorků půdy a huminové látky jsou převážně tvořeny uhlíkem, vodíkem a kyslíkem. Naproti tomu z ostatních sledovaných prvků byl dusík přítomen v minoritním množství a síra byla detekována pouze u FK izolovaných z půdního horizontu o hloubce 30 cm. Tento fakt značí o tom, že tento vzorek FK má ve své struktuře vyšší zastoupení hydrofilních sulfonových skupin ($-\text{SO}_3\text{H}$).

Z naměřených výsledků je zřejmé, že vzorky HL v porovnání se vzorky půdy jsou tvořeny vyšším obsahem uhlíku, a u vzorku FK 30 cm je nejvyšší obsah uhlíku. Uhlík se vyskytuje ve funkčních skupinách, jako jsou karboxylové ($-\text{COOH}$), amidové, chinonové, ketonové ($\text{C}=\text{O}$) nebo etherové, rovněž přicházejí v úvahu také alkoxy skupiny tzn. $-\text{OCH}_3$. Co se týče strukturních jednotek, tak organický uhlík je přednostně vázán s obsahem aromatických,

alifatických a peptidických sloučenin. Oproti tomu vzorky půdy obsahují větší zastoupení kyslíku, avšak největší zastoupení tohoto prvku má vzorek FK 30 cm. Kyslík je přítomen ve funkčních skupinách, jako jsou karboxylové a –OH fenolické a alkoholové skupiny pocházející z polysacharidů, ketonových a alkoxy skupinách. Z naměřených dat je vidět, že FK mají větší obsah C a O než HK. Obvykle huminové kyseliny obsahují větší obsah uhlíku a dusíku než fulvinové kyseliny. Tento nesoulad mohl nastat kvůli purifikace HL, pokud se na strukturu HL díváme pohledem supramolekulární strukturní teorie, taky by to mohlo být ovlivněno typem půdy, různé typy půdy obsahují různé množství a druhy organických látek, což může ovlivnit složení HL při izolaci.

Vypočtené atomové poměry jsou uvedeny v Tabulka 1. Z tabulky je vidět, že atomový poměr H/C, popisující stupeň aromaticity a míru dehydrogenace, byl nejvyšší v případě vzorku půdy o hloubce 10 cm, a naopak nejnižší u vzorku FK 30 cm. Z tohoto důvodu lze říci, že vzorek FK je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s ostatními vzorky.

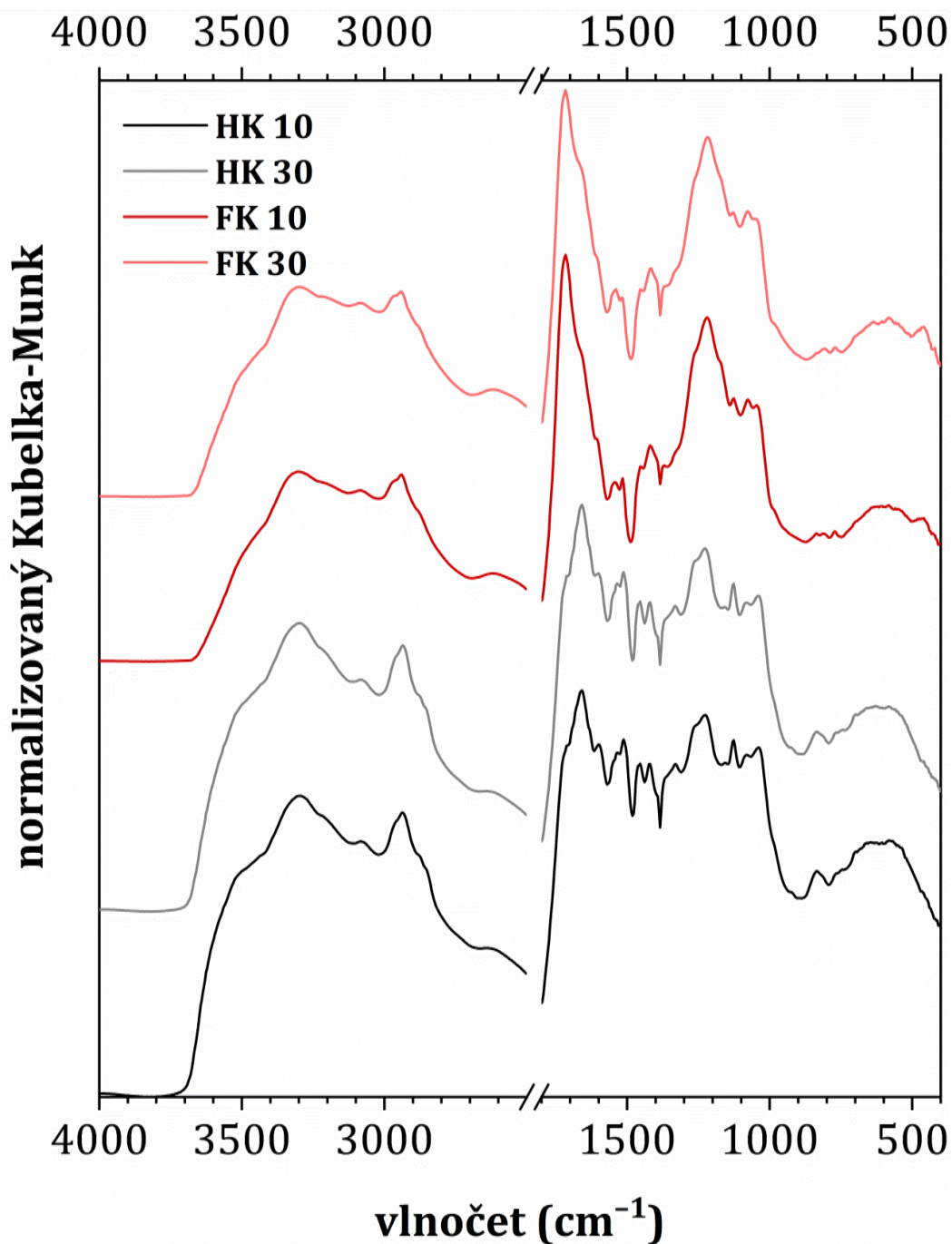
Atomový poměr O/C popisuje množství kyslíkatých funkčních skupin, jako jsou například karboxylové a fenolické skupiny nebo také karbonylové funkční skupiny. Tento atomový poměr byl největší u vzorku půdy o hloubce 10 cm a nejmenší u vzorku HK 10 cm. Vyšší hodnota atomového poměru O/C značí, že vzorek půdy obsahuje větší množství funkčních skupin obsahujících kyslík oproti HK a FK. Dále výsledky tohoto atomového poměru jasně dokládají, že fulvinové kyseliny v porovnání se svými genealogickými protějšky jsou charakterizovány vyšším stupněm hydrofilicity tzn. vyšším obsahem kyslík obsahujících funkčních skupin.

Poslední atomový poměr N/C popisuje obsah dusík obsahující funkčních skupin, který je u všech vzorků přibližně stejný (0,07–0,09). Z tohoto vyplývá, že vzorky obsahují ve svých strukturách srovnatelná množství funkčních skupin obsahujících dusík.

Termogravimetricky stanovena vlhkost měla vyšší hodnotu u vzorku HK 10 cm. To je způsobeno vyšším obsahem polárních funkčních skupin, které sorbují vzdušnou vlhkost na povrchu organické hmoty. Nicméně nelze ani vyloučit sorpci pomocí anorganických sloučenin jako jsou hlinitokřemičitany, křemičitany a další jílové materiály. Tuto skutečnost nám také dokazuje atomový poměr O/C. Největší čistotu z porovnání všech vzorků vykazovaly HK, konkrétně HK 30 cm. Obsah popela je vázán na zvolené purifikační kroky během izolace HL z přírodní matrice, které v případě HK zahrnují působení směsi 0,3 M HF a 0,1 M HCl. Naproti tomu izolace FK probíhá podle standardního postupu izolace HL dle mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS nejdříve na koloně s pryskyřicí DAX-8 a poté, při zpětné protonaci, na koloně Amberlite IR 120, tudíž vzorek FK nebyl přečištěn pomocí směsi roztoků 0,3 M HF a 0,1 M HCl. Logicky vzorky půdy obsahují největší množství anorganických sloučenin vycházející z minerální povahy tohoto přírodního ekosystému, tzn. půdy.

4.2 Infračervená spektrometrie HL

Na Obrázek 7 ve spektru vzorku HL se v rozmezí vlnočtu $3730\text{--}3240\text{ cm}^{-1}$ nachází široký a intenzivní pás, který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, či sekundárních amidech a alifatických alkoholech a fenolech, resp. polyfenolech, které jsou stavebními jednotkami odvozenými od ligninu. Tento pás je nejvíce výrazný u vzorku FK 10 cm. V rozmezí tohoto pásu vzorky FK mají maxima při 3302 cm^{-1} , vzorky HK mají maxima při 3294 cm^{-1} . Méně intenzivní pás lokalizovaný v oblasti vlnočtu $3100\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenční vibraci aromatické vazby C–H. Tento pás měl by být zřetelný ve spektrech všech huminových látek, protože aromatické kruhy nebývají nikdy zcela substituovány. Tento pás je však výraznější jen ve spektrech látek s nízkým počtem substitucí na benzenovém jádře, při vyšším počtu substitucí je intenzita pásu velmi nízká. Další absorpční pás se nachází v rozmezí vlnočtu $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ a popisuje valenční vibrace C–H vazeb alifatických řetězců, kam zpravidla řadíme methylové a methylenové funkční skupiny (kdy asymetrické vibrace jsou více viditelné). Další absorpční pás se nachází v rozmezí $1720\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$, tento pás odpovídá vibracím C=O vazeb v karboxylových kyselinách substituovaných na aromátech. Tento absorpční pás je nejvíce intenzivní v případě FK 10 cm. Proto se můžeme domnívat, že tento vzorek obsahuje více –COOH funkčních skupin na rozdíl od ostatních. Taky tento absorpční pás je nejvýraznějším ve FT-IR spektrech huminových látek. Nicméně je nutné podotknout, že tento absorpční pás je lokalizován v případě všech HK tzn. izolovaných z dvou různých půdních horizontů v oblasti nižších vlnočtů, což je přímým důkazem valenční vibrace karboxylátového anionu COO^- , anebo valenční symetrické vibraci C=O v sekundárních amidech. Další absorpční pás se nachází při 1610 cm^{-1} , který popisuje vibrace C=C skupin v aromatických kruzích. Další méně výrazný absorpční pás se nachází při 1515 cm^{-1} , které odpovídají symetrické C=C valenční vibraci aromatických stavebních jednotek převážně odvozených od ligninu. Absorpční pás lokalizovaný při 1460 cm^{-1} odpovídá deformačním vibracím C–H vazeb v alifatických funkčních skupinách. Rozmezí $1270\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$ patří vibracím odpovídajícím C–O a deformační vibraci O–H v karboxylových a fenolických –OH skupinách. V infračervených DRIFT spektrech si můžeme všimnout absorpčních pásů při 1130 cm^{-1} , který lze připsat asymetrické valenční vibraci C–O–C vazeb v alkyl/aryl etherech. Tento absorpční pás je více intenzivní v případě HK. Absorpční pás lokalizovaný v oblasti 1080 cm^{-1} odpovídá valenční symetrické vibraci C–O–C v alkyl-etherech. Dále je možné tyto pásy přiřadit valenční symetrické vibraci C–O v aryl-esterech. Méně výrazný absorpční pás lokalizovaný při 1040 cm^{-1} je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alkoholech, které mají svůj původ v polysacharidech jako je celulóza a hemicelulóza případně je důsledkem vyměšování rostlinných exsudátů. Pásky při vlnočtu menším než 800 cm^{-1} jsou připisovány minerální hmotě.



Obrázek 7: Normalizovaná DRIFT spektra HK izolovaných ze dvou půdních horizontů

4.3 UV/Vis spektrometrie HL

Získané HK a FK byly charakterizovány pomocí absorpčních koeficientů, které jsou uvedeny v Tabulka 2. Tyto koeficienty byly získány z naměřených absorpčních spekter. Absorpční koeficienty poskytují informace o střední molekulové hmotnosti \overline{M}_r , aromaticitě, stupni humifikace a míře substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ a $-\text{OCH}_3$) studovaných HL.

Tabulka 2: Absorpční koeficienty pro vzorky HK a FK izolovaných ze dvou půdních horizontů

Vzorek	Absorpční koeficient			
	E_{ET}/E_{Bz}	E_2/E_3	E_2/E_4	E_4/E_6
HK 10 cm	0,49	3,52	12,08	††
HK 30 cm	0,49	3,65	14,00	††
FK 10 cm	0,53	7,71	†	24,00
FK 30 cm	0,54	6,18	†	20,67

† Absorpční koeficient E_2/E_4 v případě fulvinových kyselin nebylo možné vypočíst, jelikož absorbance při vlnové délce 465 nm nabývala nulových hodnot.

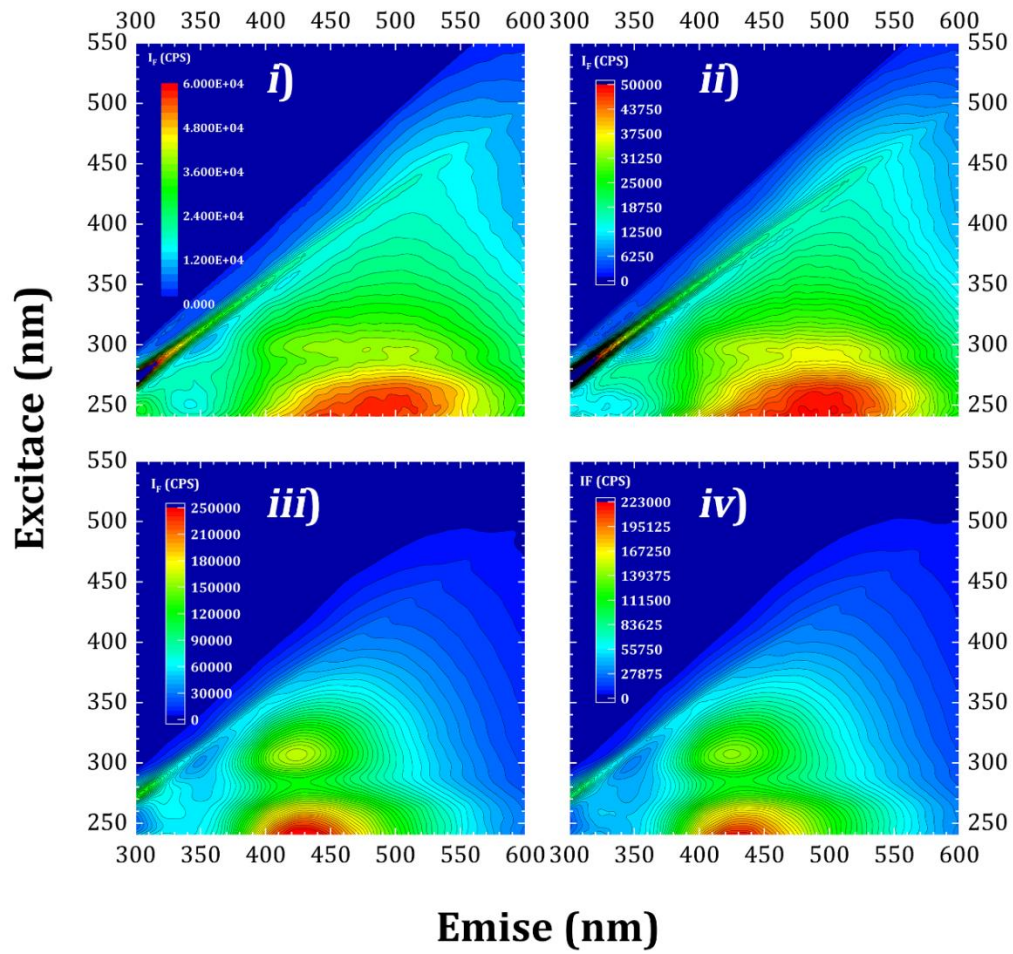
†† Absorpční koeficient E_4/E_6 nebyl v případě HK určen, jelikož absorbance při vlnové délce 465 nm u takto koncentrovaných roztoků nabývala příliš vysokých hodnot, které se nacházely na samé hranici saturace detektoru.

V Tabulka 2 je vidět, že absorpční koeficient E_2/E_3 je vyšší v případě vzorků FK oproti vzorkům HK. Vysoké hodnoty absorpčního koeficientu E_2/E_3 vypovídají o tom, že fulvinové kyseliny charakterizovány nižším stupněm aromaticity. Nižší hodnoty absorpčních koeficientů E_2/E_3 u vzorků HK značí o vyšším stupni aromaticity. U vzorků fulvinových kyselin byla zjištěna nejvyšší hodnota absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} v porovnání s vzorky huminových kyselin. Tento koeficient vyjadřuje poměr absorbancí při vlnových délkách 253 nm, kde jsou zohledněny substituenty na benzenovém jádře, a 220 nm, kde jsou zahrnuty benzenoidní struktury. Absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} je velmi citlivý k přítomnosti polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytuje informace o druhu substituentů, jako jsou například karboxylové $-COOH$, karbonylové $C=O$ nebo fenolické $-OH$, v organických molekulách [35]. Hodnota koeficientu E_{ET}/E_{Bz} je vyšší u vzorků FK, což naznačuje vyšší obsah *O*-obsahujících funkčních skupin, kterými jsou substituovány Ar stavební jednotky.

4.4 Fluorescenční spektrometrie HL

Na Obrázek 8 jsou znázorněna excitačně-emisní fluorescenční spektra vzorků HK a FK izolovaných ze dvou půdních horizontů. V EEM spektru vzorku HK z půdního horizontu hloubky 10 cm (Obrázek 8i) bylo zjištěno, že fluorescenční maximum se nachází v oblasti vlnových délek 240/485 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), zatímco u vzorku HK z půdního horizontu hloubky 30 cm (Obrázek 8ii) se toto maximum nachází při nižších vlnových délkách emise a stejné hodnotě excitační vlnové délky, konkrétně 240/480 nm. V této oblasti je lokalizován *fluorofor A (fulvic-like)*, který patří mezi typické maxima huminových látek izolovaných z různých přírodních matric, jako jsou například půdní matrice, sedimenty nebo sladkovodní zdroje. Porovnáním poloh fluorescenčního maxima *A (fulvic-like)* bylo zjištěno, že vzorek HK 10 cm je silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, jako jsou alkyl- a aryl-estery. Oba vzorky HK se navíc lišily intenzitami fluorescence I_F .

V dolní části Obrázek 8 jsou uvedena EEM spektra fulvinových kyselin. V EEM spektru vzorku FK z půdního horizontu hloubky 10 cm (Obrázek 8iii) se fluorescenční maximum nachází v oblasti vlnových délek 240/425 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), fluorescenční maximum vzorku FK z půdního horizontu hloubky 30 cm (Obrázek 8iv) se nachází při vyšších vlnových délkách emise a stejné hodnotě excitační vlnové délky, konkrétně 240/435 nm. Z porovnání fluorescenčního maxima je vidět, že v tomto případě vzorek FK, který se nachází v nižším půdním horizontu, konkrétně FK 30 cm, je silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, jako jsou alkyl- a aryl-estery. Takže při porovnání vzorku HK a FK můžeme povšimnout, že fluorescenční maximum A bylo v případě HK lokalizováno v oblasti vyšších vlnových délek emise. To může být způsobeno tím, že HK jsou složitější supramolekulární struktury než FK a obsahují více aromatických jader a funkčních skupin. Tyto funkční skupiny mohou ovlivňovat elektronovou distribuci v molekule a interakci s excitací. Díky tomu může dojít k posunu emisního maxima do oblasti vyšších vlnových délek. Takže u vzorků HK a FK se velmi liší hodnoty I_F . Vzorky fulvinových kyselin mají o mnohem vyšší hodnoty intenzity fluorescence u fluorescenčních maxim. Obecně platí, že vyšší intenzita fluorescence značí větší podíl hydroxyly, alkoxyly a metoxyly. Taky nižší hodnoty I_F u HK mohou být způsobeny tím, že huminové kyseliny jsou větší supramolekulární asociáty než fulvinové kyseliny a mají více aromatických jader, což způsobuje delší a méně intenzivní fluorescenci.



Obrázek 8: Excitačně-emisní spektra HL: i) HK 10 cm; ii) HK 30 cm; iii) FK 10 cm; iv) FK 30 cm

5. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla provedena fyzikálně-chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální. Cílem studia bylo získat detailní informace o vlastnostech těchto huminových látek a porozumět jejich chemickému složení a struktuře. Pro dosažení tohoto cíle byly použity několik analytických metod.

Nejprve fyzikálně-chemická charakterizace byla provedena za využití elementární analýzy (EA) a termogravimetrické analýzy (TGA), které umožnily získat informace o obsahu uhlíku, vodíku, dusíku, síry a kyslíku v huminových látkách a porovnat tuto informaci s obsahem stejných prvků vzorků půdy. Elementární analýza potvrdila, že organická hmota ze vzorků půdy, která jsou přírodní matricí, a HL jsou tvořeny převážně uhlíkem, vodíkem a kyslíkem, minoritně dusíkem. Síra byla detekována pouze u FK izolovaných z půdního horizontu o hloubce 30 cm. Tento fakt značí o tom, že tento vzorek FK má ve své struktuře vyšší zastoupení hydrofilních sulfonových skupin ($-\text{SO}_3\text{H}$). Z vypočtených atomových poměrů bylo prokázáno, že vzorek FK 30 cm je charakterizován vyšší mírou aromaticity a dehydrogenace v porovnání s ostatními vzorky. Vzorek půdy o hloubce 10 cm obsahoval větší množství funkčních skupin obsahujících kyslík oproti půdnímu vzorku pocházejícího z nižší vrstvy půdního horizontu. Z porovnání vzorků HL je patrné, že fulvinové kyseliny jsou charakterizovány vyšším stupněm hydrofility, tzn. vyšším obsahem kyslík obsahujících funkčních skupin. Všechny vzorky obsahovaly ve svých strukturách srovnatelná množství funkčních skupin obsahujících dusík. Termogravimetricky stanovená vlhkost měla vyšší hodnotu u vzorku HK 10 cm, což vykazuje vyšší obsah polárních funkčních skupin, které sorbují vzdušnou vlhkost na povrchu organické hmoty. Největší čistotu z porovnání všech vzorků vykazovaly HK, konkrétně HK 30 cm (1,58 hm. %). Vyšší obsah popela ve vzorků FK byl pravděpodobně způsoben vynecháním purifikace izolovaných FK za použití směsi HCl a HF. Vzorky půdy obsahovaly největší množství anorganických sloučenin vycházející z minerální povahy tohoto přírodního ekosystému, tzn. půdy.

Infračervená spektrometrie nám umožnila zkoumat funkční skupiny přítomné v huminových látkách a identifikovat chemické vazby. Pomocí této metody bylo zjištěno, že vzorek FK 10 cm obsahoval na rozdíl od ostatních nejvíce karboxylových skupin, což prokazuje absorpční pás v rozmezí $1720\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$. U HK je tento pás lokalizován v oblasti nižších vlnočtů, což je přímým důkazem valenční vibrace karboxylátového anionu COO^- , anebo valenční symetrické vibraci C=O v sekundárních amidech. Taky vzorek FK 10 cm v rozmezí $1270\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$ obsahoval nejvíce fenolických $-\text{OH}$ skupin.

Pomocí UV/Vis spektrometrie byly vypočítány absorpční koeficienty a humifikační indexy. Vzorky FK charakterizovány vyšším absorpčním koeficientem E_2/E_3 , což znamená nižší stupeň aromaticity. U vzorků fulvinových kyselin byla zjištěna nejvyšší hodnota absorpčního koeficientu $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ v porovnání s vzorky huminových kyselin, což naznačuje vyšší obsah *O*-obsahujících funkčních skupin, kterými jsou substituovány Ar stavební jednotky.

Při měření fluorescenčních spekter (EEM) bylo zjištěno, že se fluorescenční maximum všech vzorků nachází v oblasti, kde lokalizován fluorofor A. Porovnáním poloh fluorescenčního maxima A (*fulvic-like*) u HK bylo zjištěno, že vzorek HK 10 cm je silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, jako jsou alkyl- a aryl-estery. Z porovnání fluorescenčních maxim vzorků FK je vidět, že v tomto případě vzorek FK, který se nachází v nižším půdním horizontu, konkrétně FK 30 cm, je silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, jako jsou alkyl- a aryl-estery. Takže při porovnání vzorku HK a FK můžeme povšimnout, že fluorescenční maximum A bylo v případě HK lokalizováno v oblasti vyšších vlnových délek emise. To může být způsobeno tím, že HK jsou složitější supramolekulární struktury než FK a obsahují více aromatických jader a funkčních skupin. Vzorky fulvinových kyselin byly charakterizovány vyššími hodnoty intenzity fluorescence u fluorescenčních maxim. Nižší hodnoty I_F u HK mohou být způsobeny tím, že huminové kyseliny jsou větší supramolekulární asociáty než fulvinové kyseliny a mají více aromatických jader, což způsobuje delší a méně intenzivní fluorescenci.

Na základě provedených analýz byly získány důležité poznatky o fyzikálně-chemických vlastnostech půdních huminových látek izolovaných z hnědozemě modální. Bylo zjištěno, že tyto látky obsahují vysoký podíl organického uhlíku a jsou bohaté na funkční skupiny, jako jsou hydroxylové skupiny a karbonylové skupiny. Studium také ukázal, že huminové látky vykazují charakteristické absorpční a fluorescenční vlastnosti, které jsou spojeny s přítomností specifických fluoroforů.

Výsledky této práce přispívají k lepšímu porozumění chemického složení a struktury huminových látek izolovaných z hnědozemě modální. Tyto poznatky mohou mít význam pro další výzkum v oblasti půdních věd, zejména při studiu funkce huminových látek v půdním prostředí a jejich vztahu k půdním procesům a ekosystémovým funkcím.

6. LITERATURA

- [1] VESELÁ, L., M. KUBAL, J. KOZLER a P. INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, **99**(10), 711-717.
- [2] HAVELCOVÁ, M., J. MIZERA, V. MACHOVIČ, O. PŘIBYL, L. BORECKÁ a I. KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy*. 2011, **105**(12), 913-917.
- [3] GUO, Xiao-xia, Hong-tao LIU a Shu-biao WU. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. *Science of The Total Environment*. 2019, **622**, 501-510. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.137
- [4] SCHNITZER, M. a S.U. KHAN. Soil Organic Matter. In: *Developments in Soil Science* [online]. 8. 1978, iii-vii [cit. 2023-01-19]. ISBN 978-0-444-41610-0.
- [5] TIWARI, Jaya, AL RAMANATHAN, Kuldeep BAUDDH a John KORSTAD. Humic substances: Structure, function and benefits for agroecosystems—a review. *Pedosphere*. 2023, **33**(2), 237-249. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedsph.2022.07.008
- [6] STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.
- [7] MELO, Bruna Alice Gomes de, Fernanda Lopes MOTTA a Maria Helena Andrade SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, **62**, 967-974. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.12.001
- [8] THORN, K. A., D. W. FOLAN a P. MACCARTHY. Characterization of the International Humic Substances Society standard and reference fulvic and humic acids by solution state carbon-13 (¹³C) and hydrogen-1 (¹H) nuclear magnetic resonance spectrometry. *Water-Resources Investigations Report*. 1989, **89**(4196), 1-93.
- [9] IHSS: O huminových látkách [online]. [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <http://ihss-cz.cz/ohuminovych-latkach.html>
- [10] OUNI, Youssef, Tahar GHNAYA, F. MONTEMURROB, Ch ABDELLYA a LAKHDAR. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production*. 2014, **3**, 353-374.
- [11] WU, Y. T., T. Y. HO, Y. C. CHOU, M. J. KE, T. Y. LI, C. K. TSAI a L. C. CHEN. Six-month Efficacy of Perineural Dextrose for Carpal Tunnel Syndrome: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Mayo Clinic Proceedings*. 2017, **92**(8), 1179-1189. ISSN 0025-6196. Dostupné z: doi:10.1016/j.mayocp.2017.05.025
- [12] SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A., A. ROIG, J. CEGARRA a M.P. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different

organic wastes during composting. *Bioresource Technology*. 1999, **70**(2), 193-201. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(99)00018-8

[13] JANTZI, S.C. a J.R. ALMIRALL. 14.18 - Trace Evidence: Glass, Paint, Soil, and Bone. In: *Treatise on Geochemistry (Second Edition)* [online]. Oxford: Elsevier, 2014, s. 271-284 [cit. 2023-02-04]. ISBN 978-0-08-098300-4.

[14] WUNDERLICH, Bernhard. Thermal analysis of polymeric materials. 2005. ISBN 35-402-3629-5.

[15] HATAKEYAMA, T. Thermal Analysis: Fundamentals and Applications Polymer Science. 1999. ISBN 04-719-8362-4.

[16] Novák, F.; Machovič, V.; Hrabalová, H.; Novotná, M. Kvantitativní FTIR Spektrometrie huminových látek. *Chemické listy* 2017, **111**(6), 363-373.

[17] HELAL, Aly A. a G.A. MURAD. Characterization of different humic materials by various analytical techniques. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011, **4**(1), 51-54. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.018

[18] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

[19] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M.; HAVEL, Josef; PATOČKA, Jiří. Humic substance compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. 2005, 3, s. 13–24. ISSN 1214-0287.

[20] GOEL, Priya, Madhu DHINGRA a Abdelhadi MAKAN. Humic Substances: Prospects for Use in Agriculture and Medicine. In: *Humic Substances*. IntechOpen. Rijeka, 2021. Dostupné také z: doi:10.5772/intechopen.99651

[21] BRADY NC, RR Weil. The nature and properties of soils. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 2008

[22] ANDERSON, H.A., Bick, W., Hepburn, A., Stewart, M., 1989. Nitrogen in Humic Substances. Humic Substances II: In Search of Structure, John Wiley & Sons, Inc.

[23] JOKIC, A., Frenkel, A.I., Vairavamurthy, M., Huang, P.M., 2001. Birnessite catalysis of the Maillard reaction: its significance in natural humification. *Geophys. Res. Lett.* 28, 3899-3902.

[24] LEHMANN, J. a M. KLEBER. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*. 2015, **528**(7580), 60-68. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature16069

[25] TOMAN, Ondřej. GlukohumátyTM – nová generace nízkomolekulárních hnojiv. In: Provit [online]. Provit, a. s., 2014 [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: http://www.provit.cz/Uroda_cl_2-2014.pdf

[26] CANELLAS LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated

from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*. 2010, **78**(4), 457-66. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.018. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19910019.

[27] MAHLER, Claudio Fernando, Nicolý Dal Santo SVIERZOSKI, Cassiano Augusto Rolim BERNARDINO a MAKAN. In: *Humic Substances: Chemical Characteristics of Humic Substances in Nature* [online]. IntechOpen. Rijeka, 2021 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.97414

[28] RODRÍGUEZ, F., P. SCHLENGER a M. GARCÍA-VALVERDE. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of The Total Environment*. 2014, 476-477, 718-730. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.150. ISSN 00489697.

[29] RINOT, Oshri, Mikhail BORISOVER, Guy J. LEVY a Gil ESHEL. Fluorescence spectroscopy: A sensitive tool for identifying land-use and climatic region effects on the characteristics of water-extractable soil organic matter. *Ecological Indicators*. 2021, **121**. ISSN 1470-160X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2020.107103

[30] Základy ekologie půdy [online]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 2014 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <http://kbe.prf.jcu.cz/sites/default/files//prednasky/kbe/521/skripta-puda-metodyfinal.pdf>

[31] RODRÍGUEZ, F., P. SCHLENGER a M. GARCÍA-VALVERDE. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of The Total Environment*. 2014, **476-477**, 718-730. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.150. ISSN 00489697.

[32] DOSKOČIL, L., J. BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, V. ENEV, L. KALINA a J. WASSERBAUER. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*. 2018, (213), 123-132. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.10.114. ISSN 00162361.

[33] PAVLŮ L. (2018): Základy pedologie a ochrany půdy. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2876-1.

[34] ZÁDOROVÁ T., V. PENÍŽEK. (2020): Základy půdní klasifikace I. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-3051-1.

[35] Korshin, G. V., Li, C.-W., & Benjamin, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research*, 1997, **31**(7), 1787–1795. DOI: 10.1016/s0043-1354(97)00006-7

[36] PICCOLO, A., S. NARDI a G. CONCHERI. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere* [online]. 1996, **33**(4), 595-602 [cit. 2023-05-17]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/0045-6535(96)00210-X

[37] PICCOLO, Alessandro. 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. 2023-05-17]. *Advances in Agronomy*. ISBN 9780120007936. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7

[38] SIMPSON, André J., William L. KINGERY, Michael H. HAYES, et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* [online]. 2002, **89**(2), 84-88 [cit. 2023-05-17]. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-001-0293-8

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRAZEK A SYMBOLŮ

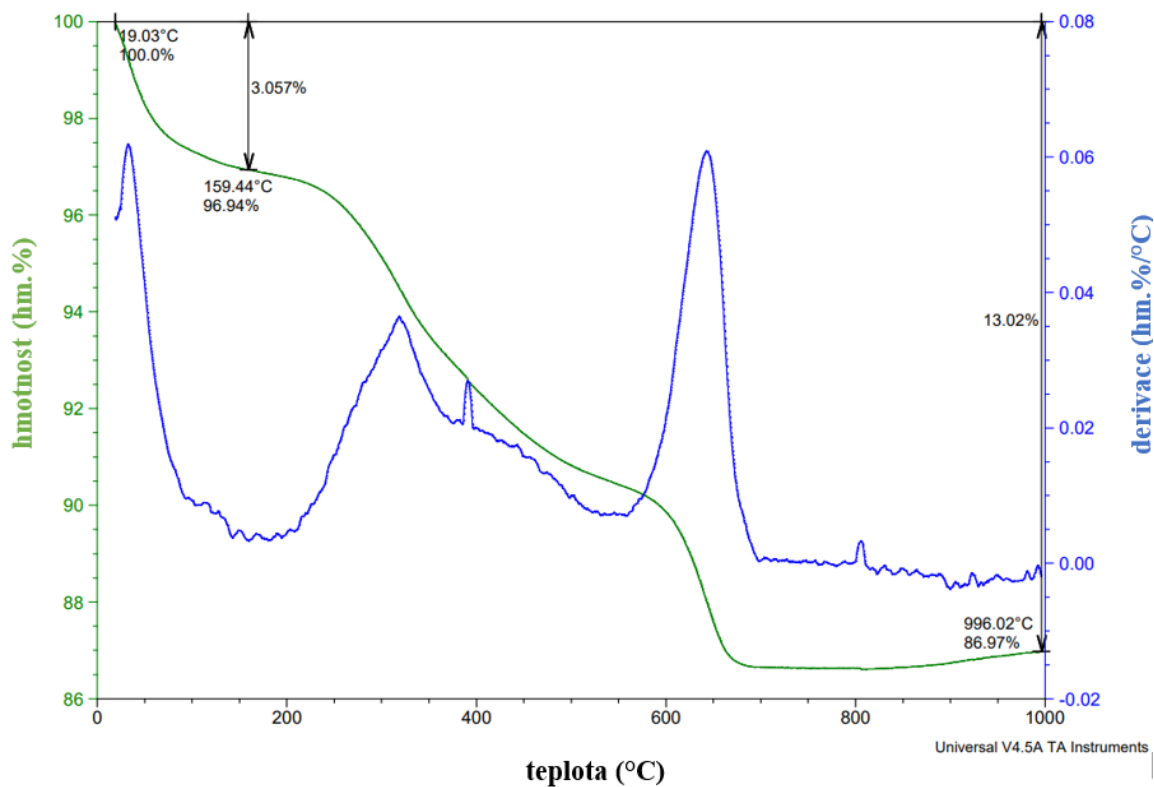
8.1 Seznam použitých zkratk

DRIFT	difuzní reflektance
EA	elementární analýza
EEM	excitačně-emisní matice (spektra)
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
HU	humín
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum humínových látek
TGA	termogravimetrická analýza
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

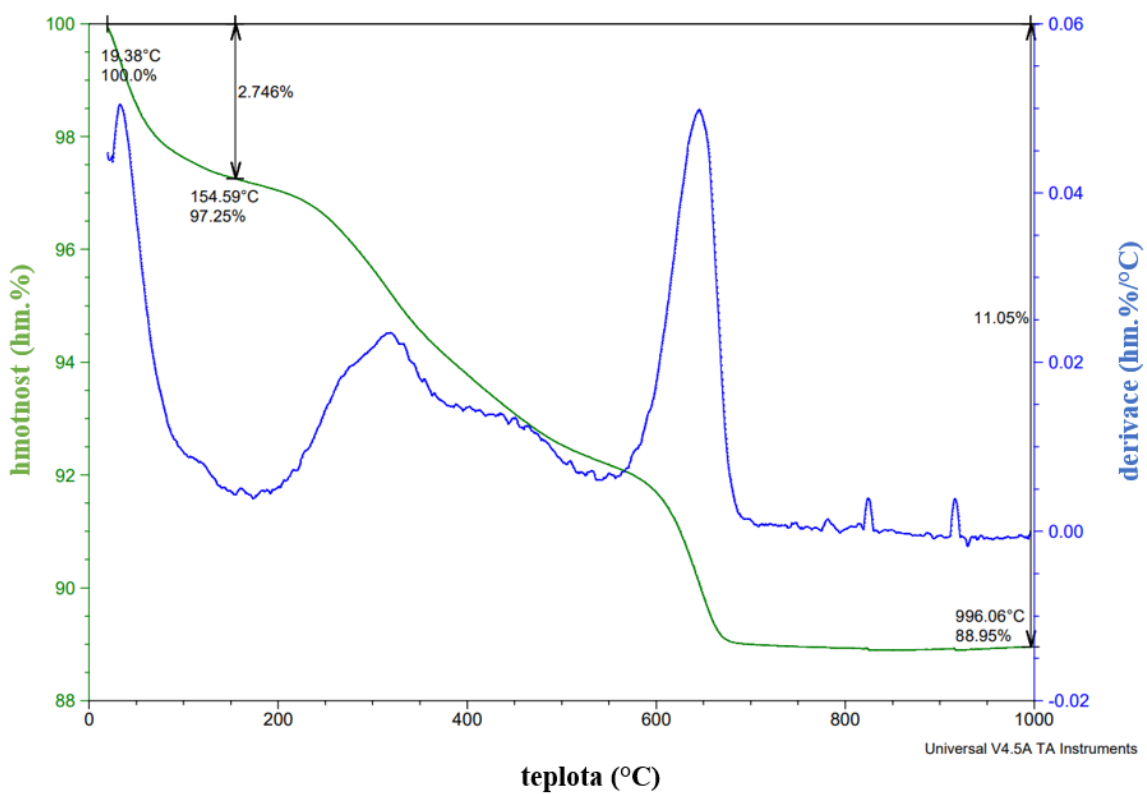
8.2 Seznam použitých symbolů

<i>at. %</i>	elementární složení v atomových procentech	[%]
E_2/E_3	poměr absorbancí při vlnových délkách 250 a 365 nm	[-]
E_2/E_4	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm	[-]
E_4/E_6	poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm	[-]
E_{ET}/E_{Bz}	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 a 220 nm	[-]
<i>hm. %</i>	elementární složení v hmotnostních procentech	[%]
<i>Milori index</i>	plošný integrál přes celé emisní spektrum	[-]

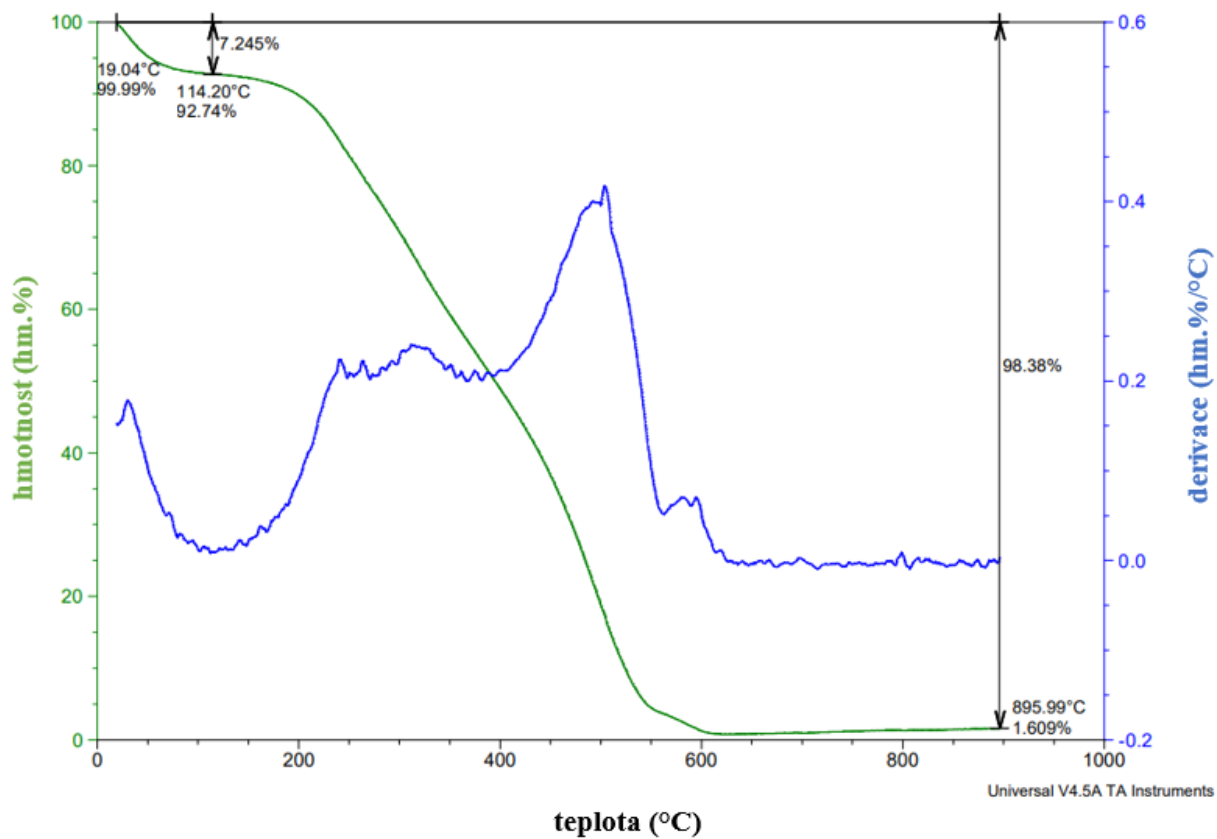
8. PŘÍLOHY



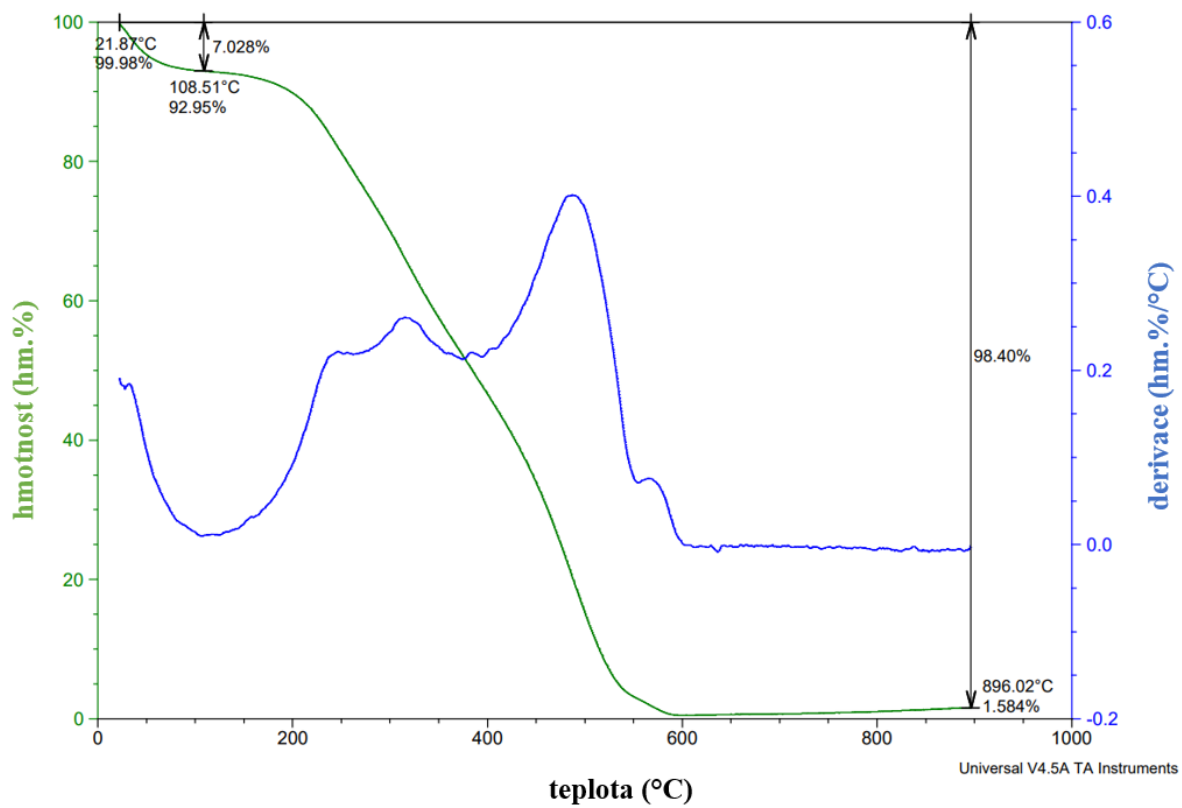
Obrázek 9: TGA pŕdy 10 cm



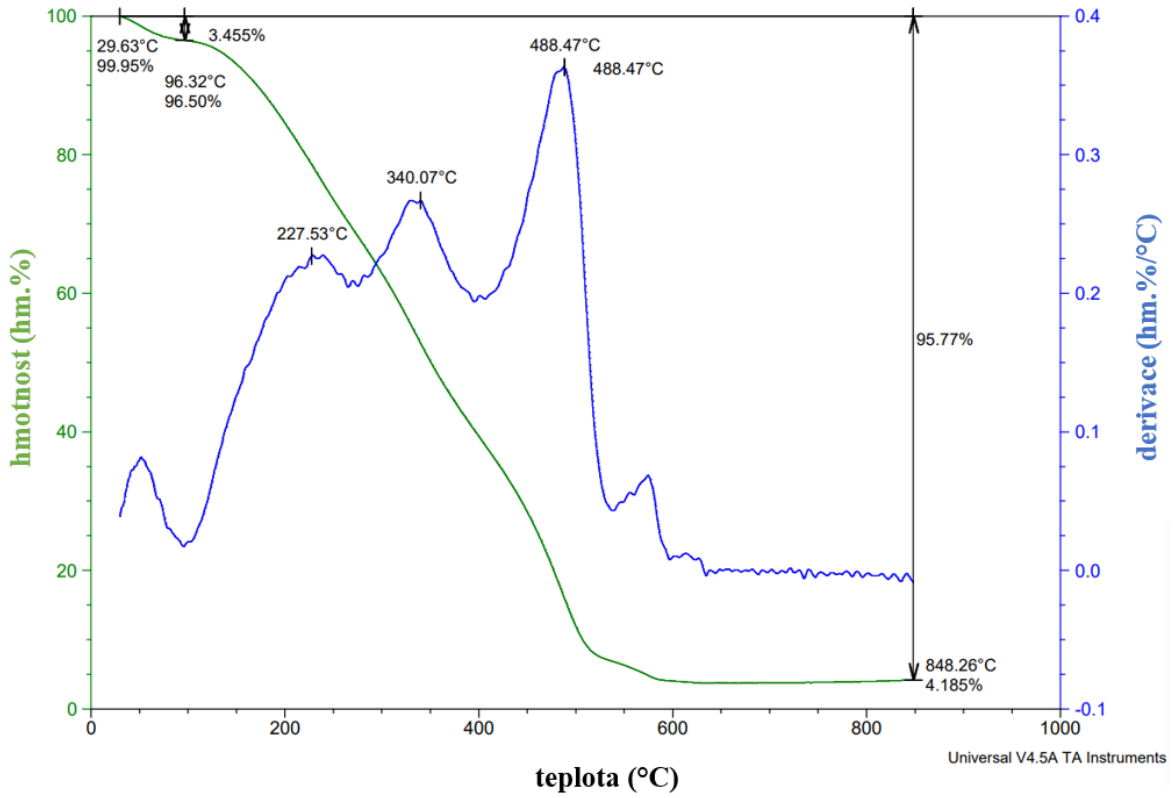
Obrázek 10: TGA pŕdy 30 cm



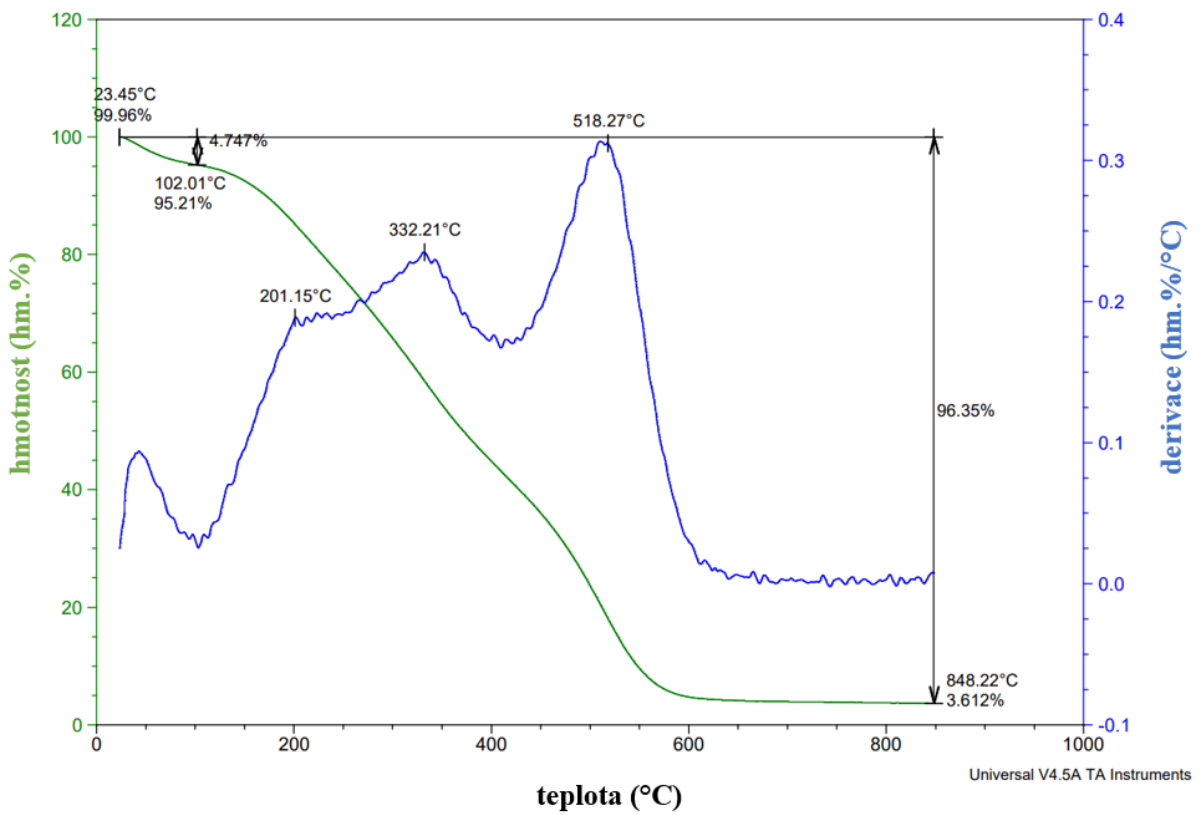
Obrázek 11: TGA HK 10 cm



Obrázek 12: TGA HK 30 cm



Obrázek 13: TGA FK 10 cm



Obrázek 14: TGA FK 30 cm



Obrázek 15: Adsorpce FK na pryskyřici DAX-8



Obrázek 16: Vzorek FK (vlevo) a HK (vpravo)