



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 FLUVIZEMĚ**

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SOIL HUMIC SUBSTANCES ISOLATED FROM FLUVISOL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Šátková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1644/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eliška Šátková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Fyzikálně–chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z fluvizemě

Zadání bakalářské práce:

Cílem této bakalářské práce podrobná fyzikálně chemická charakterizace HL izolovaných z fluvizemě; lokalita Jižní Morava – Ivaň.

Nejprve bude studentkou provedena podrobná a aktuální literární rešerše na zadané téma.

V první části budou z půdní matrice izolovány huminové látky, a to za použití standardního izolačního postupu dle mezinárodní společnosti IHSS.

Izolované HL budou následně charakterizovány pomocí termických a spektrometrických metod s důležitým přispěním potenciometrické titrace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Eliška Šátková
studentka

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na fyzikálně-chemickou charakterizaci huminových látek, které jsou izolované z fluvizemě. Huminové látky byly izolované standardním postupem podle mezinárodní společnosti IHSS (International Humic Substances Society). Extrahované huminové látky byly dále charakterizovány pomocí termických a spektrometrických metod, které zahrnují elementární (EA) a termogravimetrickou analýzu (TGA), UV/Vis a FTIR spektrometrii. Důležitým příspěvkem charakterizace byly potenciometrické titrace.

Na základě získaných dat z EA a TGA byl stanoven obsah biogenních prvků, a také termická stabilita HL. Z naměřených UV/Vis spekter byly vypočteny absorpční koeficienty, které sloužily ke zjištění aromaticity a střední molekulové hmotnosti HL. Funkční skupiny HL byly určeny pomocí FTIR spekter a kyselost byla stanovena potenciometrickými titracemi. Získané výsledky velmi dobře charakterizovaly jednotlivé huminové látky izolované z fluvizemě.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the physicochemical characterization of humic substances that are isolated from fluvisol. Humic substances were isolated by a standard procedure according to the International Humic Substances Society (IHSS). Extracted humic substances were further characterized by thermal and spectrometric methods, which include elemental (EA) and thermogravimetric analysis (TGA), UV/Vis, and FTIR spectrometry. Potentiometric titration was an important contribution to characterization.

Based on the obtained data obtained from the EA and TGA, the content of biogenic elements and the thermal stability of HL were determined. Absorption coefficients were calculated from the measured UV/Vis spectra to determine the aromaticity and average molecular weight of HL. The HL functional groups were determined by FTIR spectra, and the acidity was determined by potentiometric titrations. The obtained results very well characterized the individual humic substances isolated from fluvisol.

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové látky, fulvinové kyseliny, huminové kyseliny, fluvizemě, potenciometrická titrace, termické a spektrometrické metody

KEY WORDS

humic substances, fulvic acids, humic acids, fluvisol, potentiometric titration, thermal and spectrometric methods

ŠÁTKOVÁ, Eliška. *Fyzikálně-chemická charakterizace půdních huminových látek izolovaných z fluvizemě*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139181>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. 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.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za jeho cenné rady, věnovaný čas a veškerou pomoc při práci v laboratoři a při psaní bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÉ ZÁKLADY.....	8
2.1	Půda	8
2.1.1	<i>Složení půdy.....</i>	8
2.1.2	<i>Půdní organická hmota</i>	9
2.1.3	<i>Charakterizace Fluvizemě.....</i>	9
2.2	Huminové látky	10
2.2.1	<i>Rozdělení huminových látek.....</i>	10
2.2.2	<i>Vznik a geneze huminových látek.....</i>	13
2.2.3	<i>Struktura huminových látek.....</i>	14
2.3	Huminové látky a půdní prostředí	16
2.4	Využití huminových látek	16
2.4.1	<i>Využití HL v medicíně</i>	17
2.4.2	<i>Využití HL v průmyslu</i>	17
2.4.3	<i>Využití HL v zemědělství</i>	17
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
4.1	Použité chemikálie	22
4.2	Použité přístroje.....	22
4.3	Izolace huminových látek z fluvizemě dle IHSS	22
4.3.1	<i>Izolace huminových kyselin.....</i>	23
4.3.2	<i>Izolace huminů</i>	23
4.3.3	<i>Izolace fulvinových kyselin.....</i>	24
4.4	Fyzikálně-chemická charakterizace.....	25
4.4.1	<i>Elementární analýza.....</i>	25
4.4.2	<i>Termogravimetrická analýza.....</i>	25
4.4.3	<i>UV/Vis spektrometrie</i>	26
4.4.4	<i>Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR).....</i>	26
4.4.5	<i>Potenciometrická titrace</i>	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	Elementární a termogravimetrická analýza	28
5.2	UV/Vis spektrometrie.....	32
5.3	FTIR spektrometrie	34

5.4	Potenciometrické titrace	36
6	ZÁVĚR	39
7	LITERATURA.....	41
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	44
8.1	Seznam zkratk.....	44
8.2	Seznam symbolů.....	44
PŘÍLOHY		45

1 ÚVOD

Huminové látky (HL) se řadí mezi přírodní organické sloučeniny, jejichž vlastnosti mají příznivý vliv na vyvážené fungování v půdním ekosystému. Jejich ojedinělé vlastnosti postupem času nachází široké uplatnění v medicíně, v zemědělství nebo i v různých odvětvích průmyslu. Huminové látky vznikají během humifikačního procesu, do kterého vstupují odumřelé živočišné a rostlinné tkáně. Mezi tyto látky, které vstupují do humifikačního procesu, se řadí celulóza či hemicelulóza, lignin nebo chitin. Avšak vše se nemusí přeměnit na stabilní organické látky, ale část může být přeměněna na oxid uhličitý a vodu během procesu mineralizace. Procesy humifikace a mineralizace vytváří mezi sebou jakousi rovnováhu, kdy právě mineralizací dochází k uvolnění energie, jejíž majoritní část je spotřebována např. metabolismem mikroorganismů a zbytek této energie je uložen ve stabilních frakcích OM tj. huminových látek. Vzniklé huminové látky se tedy nachází ve velké míře kolem nás a dokáží nás ovlivňovat například svým vlivem na úrodnost půd a zdravotní kondici plodin.

Tato bakalářská práce je zaměřena na představení struktury jednotlivých frakcí HL a v neposlední řadě i odhadu a charakterizaci jednotlivých stavebních kamenů těchto složitých biokoloidních sloučenin. Je to právě jejich struktura, která podmiňuje reaktivitu a chování těchto látek. Nejdříve je nutné huminové látky získat, kde k extrakci jednotlivých frakcí HL byla vybrána *fluvizem*, která se nachází na jižní Moravě v okolí řek. Konkrétně byly vzorky půdy odebrány na poli v katastru města Ivaň na jižní Moravě poblíž Novomlýnských nádrží. Izolací HL podle postupu IHSS byly získány tři frakce huminových látek, a to huminy (HU), huminové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK).

První část bakalářské práce představuje úvod k dané problematice, jež tvoří dvě základní kapitoly, a to kapitolu o půdě a o huminových látkách. Nejdříve bude prostudována anorganická a organická složka půdy a charakterizována fluvizem. Druhá kapitola zahrnuje představení huminových látek. Následující část bakalářské práce je věnována charakterizaci huminových látek pomocí spektrálních a termických metod, mezi které je zařazena elementární a termogravimetrická analýza, UV/Vis a FTIR spektrometrie. Charakterizace fulvinových a huminových kyselin je doplněna potenciometrickými titracemi.

2 TEORETICKÉ ZÁKLADY

2.1 Půda

V půdě dochází k interakcím a vzájemnému ovlivnění všech hlavních sfér Země, které dále vede k vytvoření velkého množství různých půdních druhů, jejichž taxonomická klasifikace není doposud zcela sjednocená. Tento jistý problém lze spatřit v taxonomickém názvosloví půdních druhů, které je používáno v Evropě a na americkém kontinentu. Tvorba půdních částic, z širšího hlediska, závisí na působení mnoha specifických vlivů, jako jsou klimatické podmínky, druhy půdotvorných substrátů, rozmanitosti půdní bioty (fauna, flora, půdní mikroorganismy, houby, plísňe atd.), které přímo ovlivňují minerální a organické složky půdy. Obsah vody určuje pohyb a rozpustnost látek v půdě. Klimatické podmínky ovlivňují vytváření půdy a biosféra zahrnuje organismy, které mají předpoklad ke kolonizaci určitého typu půdy. Právě půda má zásadní vliv na stabilitu ekosystému [1].

2.1.1 Složení půdy

Půda je směsí anorganických a organických složek. Zvětráváním různých druhů hornin vzniká anorganická složka a organická složka je výsledkem života rostlin a živočichů [2].

Anorganické sloučeniny tvoří různě velké částice, které definují texturu půdy. V půdě je velmi široké rozmezí velikostí částic. Půda obsahuje, jak velké úlomky hornin, tak i malé fragmenty velikostně se přibližujících koloidním rozměrům. Prostorové uspořádání vychází z velikosti minerálních složek, kde právě písek, prach a jíl určují strukturu půdy. Mezi hrubozrnný sediment se řadí písek, jehož částice mají velikost v rozmezí 0,05 milimetru až 2,0 milimetry. Písčité půdy vznikají ze zvětralých částí horniny křemene, magnetitu nebo různých úlomků schránek a minerálů. Půdy obsahující větší množství písku nedokáží udržet vlhkost, tudíž rychle vysychají, což vede k chudšímu obsahu živin, které mohou být využívány rostlinami a půdními mikroorganismy. Velikost prachu se pohybuje v rozmezí od 0,002 milimetru do 0,05 milimetru a vzniká zvětráváním starších hornin, a to ze zrn živce, křemene a dalších minerálů. Půda bohatá na prach organominerálního komplexu zadržuje vlhkost potřebnou pro růst rostlin a omezuje tak vysychání půdy napříč půdními horizonty. Mezi částice, které jsou menší než písek a prach patří jíl, který má částice menší než 0,002 milimetru. Jíl je výsledkem výrazného zvětrávání minerálů, které časem degradovalo. Tyto méně provzdušněné půdy mají pevnější vazby s vodou, ale obsahují převážně jen minerály a zanedbatelné množství organického materiálu. V této souvislosti často mluvíme o tzv. těžkých půdách, které jsou velmi nepropustné nejen pro vodu, ale i pro půdní plyny [2].

Půdní organická hmota zahrnuje rostlinnou nebo živočišnou tkáň, která se nachází v různém stádiu dekompozice. Mezi živou část organické složky se řadí bakterie a houby, které se podílejí například na tvorbě humusu, rozkladu a mineralizaci. Organická část půdy zaujímá 0,4-10 %, zbytek tvoří anorganická část půdy [3].

2.1.2 Půdní organická hmota

Primární organická hmota plynule přechází reakcemi jako je humifikace, karbonizace, mineralizace nebo ulmifikace, v sekundární organickou hmotu.

Odumřelé části rostlin a živočichů nebo hnojiva, která se dostala do půdy, podléhají přeměnám na nové látky v závislosti na podmínkách a vlastnostech půdy. Tudíž primární organická hmota působí krátkodobě a rychlost rozkladu závisí na vyšším obsahu dusíku oproti uhlíku. Snadněji se budou rozkládat bílkoviny a celulóza oproti pomalému rozkladu lipidů nebo ligninu [1].

Látky, které prošly dlouhodobými přeměnami, se označují jako huminové látky. Jedná se o stabilní vysokomolekulární látky, které jsou těžce rozložitelné a díky tomu, že byly vytvořeny polymeračními či syntetickými reakcemi, při kterých se spotřebovalo velké množství energie, tak jsou tyto látky i velkým zdrojem energie a živin pro různé organismy. Mezi tyto organismy lze zařadit nižší a vyšší rostliny, houby, plísňe a především mikroorganismy [4].

Přírodní organická hmota (NOM – Natural Organic Matter) je vysoce heterogenní směs, kterou tvoří také HL. NOM lze rozdělit dle velikosti částic na nerozpuštěnou půdní organickou hmotu (SOM – Suspended Organic Matter) a rozpuštěnou organickou hmotu (DOM – Dissolved Organic Matter), která je součástí povrchových nebo podzemních vod. Rozklad rostlinných materiálů v aerobním prostředí závisí na dostatečných zásobách vody a odolnosti dané složky se transformovat. Rozmanitost složení půdy a rozdíly v transformacích složek vede k nepřesnému definování směsi, kterou tvoří SOM, DOM nebo dříve již zmíněné frakce huminových látek [4].

2.1.3 Charakterizace Fluvizemě

Výzkumy založené na jednoduchých analytických metodách byly značně nedostatečné pro charakterizaci rozdílů různých druhů půd, tudíž jsou půdy rozděleny podle spolehlivějšího kritéria, které zahrnuje parametry, mezi které se řadí velikost částic, množství humusu nebo vody [5]. Dále lze zařadit mezi charakteristické fyzikální vlastnosti půdy pórovitost, objemovou hustotu i rychlost infiltrace [6].

Fluvizemě vznikají na všech kontinentech působením periodického zaplavování v oblastech povodňových sedimentů v okolí řek a potoků s výrazným vlivem povrchových a podzemních vod [7–8]. Pokud je tato půda dostatečně provzdušněná, tak je převážně hnědého zbarvení, avšak pokud je půda nasáklá vodou, tak vykazuje šedé zbarvení. Právě důsledkem pravidelného zaplavování dochází v půdě k vytváření barevné strakatosti. Také struktura se liší v závislosti na obsahu vody, kde v zaplavených oblastech jsou převážně těžké jíly a v sušších oblastech tvoří půdu převážně písek [8].

Vlivem ukládání sedimentů, vzdáleností od řeky, stářím a obděláváním půdy dochází k vytvoření vertikální a horizontální heterogenity, vytváří se značné rozdíly v textuře a minerálním složení půdy. Fluvisoly obsahují také díky mořským lasturám uhličitán

vápenatý. Vzniká nepravidelné vrstvení huminových látek a minerálních sedimentů, kde s klesající hloubkou klesá obsah organického uhlíku v půdě [5–6, 9]. Tento typ půdy vykazuje téměř neutrální hodnoty pH, tudíž nedochází k narušení dostupnosti živin a je využíván k pěstování suchomilných plodin, rýže a v období sucha slouží k pastvě. Fluvizem tvoří přibližně 2,8 % zemského povrchu [8–9].

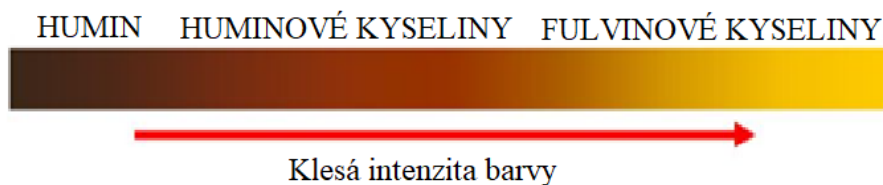
2.2 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přirozeně se vyskytující složkou v půdě, vodě a také v geologických organických ložiscích, jako jsou například rašeliny, hnědé uhlí nebo lignit. Stopové zastoupení HL obsahuje písek, jíl nebo stojatá voda. Vyšší koncentrace HL je v rašelině, hnědém uhlí nebo lignitu a nejvíce huminových látek obsahují oxihumolity, které vznikají za určitých oxidačních podmínek z lignitu. Lehce hydrolyzovatelné frakce HL (frakce o velmi nízké střední molekulové hmotnosti) se také mohou nacházet v buňkách rostlin a organismů či mikroorganismů, kde hrají důležitou roli v jejich metabolických drahách. Huminové látky se řadí mezi přírodní organické sloučeniny, které jsou přirozenou součástí mnoha přírodních ekosystémů [10–11].

Biochemickými reakcemi při dekompozici a přeměně rostlinných a živočišných zbytků dochází ke vzniku složitých heterogenních směsí polydisperzních sloučenin, které jsou označovány jako huminové látky (tento proces se nazývá humifikace). Humifikace se řadí mezi anaerobní proces, který můžeme rozdělit na tzv. dvoustupňovou transformaci. V prvním kroku dochází k biologickému rozkladu, tedy dojde k rozkladu rostlinných a živočišných polymerů a případně jejich fragmentů na jednodušší molekulární jednotky. V druhém konečném kroku převládá biochemická syntéza, kdy se přemění právě vzniklé strukturně jednoduché molekulární jednotky na složité biomakromolekuly. Takto vzniklé frakce huminových látek mají obecně složitější strukturu s vyšší molekulovou hmotností oproti původnímu materiálu. Nicméně, v případě biopolymeru jako je lignin, toto tvrzení nemusí být zcela pravdivé, jelikož se tato biomakromolekula vyznačuje podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou syntetizované HL (tzn. vysoká hodnota $\overline{M}_r$, omezená rozpustnost, barva atd.). Huminové látky ovlivňují fyzikální a chemické vlastnosti půdy a hlavně zlepšují její úrodnost, což je v přímé souvislosti s jejich pozoruhodnou reaktivitou. Tyto biokoloidní sloučeniny hrají významnou roli při „komunikaci“ rostlin a půdních mikroorganismů. Jinými slovy, tyto biokoloidní sloučeniny jsou dorozumívacím jazykem mezi výše zmíněnými organismy, kde plní úlohu tzv. signálních molekul [10, 12].

2.2.1 Rozdělení huminových látek

Huminové látky lze rozdělit dle jejich acidobazické rozpustnosti na tři základní frakce, které jsou známy pod označením huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy. Zbarvení jednotlivých HL je vidět na Obrázku 1.



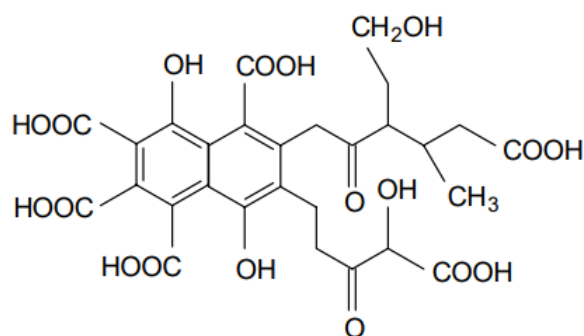
Obr. 1: Zbarvení jednotlivých frakcí HL [13]

Humín

Humín resp. huminy (HU) jsou frakce, které jsou zbarveny do velmi tmavé až černé barvy a zároveň jsou nerozpustné, jak v kyselinách, tak i v zásadách. Tuto odolnost vůči rozpustnosti lze vysvětlit tak, že humín je ve své podstatě huminová kyselina, která je pevně vázaná na minerální podíl půdy. Jedná se tedy o sloučeniny s nejvyšší střední molekulovou hmotností. Huminy vykazují vysoký stupeň kondenzace a polymerace. Funkce a vlastnosti huminů nejsou stále zcela objasněny, ale je zřejmé, že bude díky nim docházet k zadržování vody v půdě, ke zlepšení struktury půdy nebo ke kation-aniontové výměně [14–16].

Fulvinové kyseliny

Fulvinové kyseliny (FK) jsou zbarveny do světle žluté až žlutohnědé barvy a jsou rozpustné za všech podmínek pH [17]. FK jsou složeny z aromatických stavebních jednotek bohatě substituovaných kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxylové a fenolické skupiny. V porovnání s HK jsou méně substituovány alifatickými funkčními skupinami či fragmenty lipidických sloučenin tzn. vyšších mastných kyselin či vosků. Složení těchto kyselin je proměnlivé. Jejich malá velikost a vysoká rozpustnost molekul umožňuje vysokou mobilitu v půdním profilu, což hraje klíčovou roli ve výživě rostlin a dostupnosti výživových prvků pro různé půdní organismy. Naproti tomu, tyto frakce HL mohou v půdách a podzemních vodách způsobovat jisté environmentální riziko, a to v případě, kdy jsou těmito mobilními sloučeninami vázány toxické kovy např. Ni^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} aj. Fulvinové kyseliny jsou velmi reaktivní z důvodu velkého množství karboxylových a hydroxylových skupin a mají tak vysokou kationtovou výměnnou kapacitu. FK neobsahují žádné methoxy skupiny, obsahují méně uhlíku, dusíku a jsou méně aromatické oproti huminovým kyselinám, které mají vyšší obsah fenolů a chinoidních struktur. Avšak díky vysokému obsahu karboxylových skupin mají FK oproti HK vyšší obsah kyslíku [14–15]. Model struktury FK dle Bufflera je uveden na Obrázku 2.

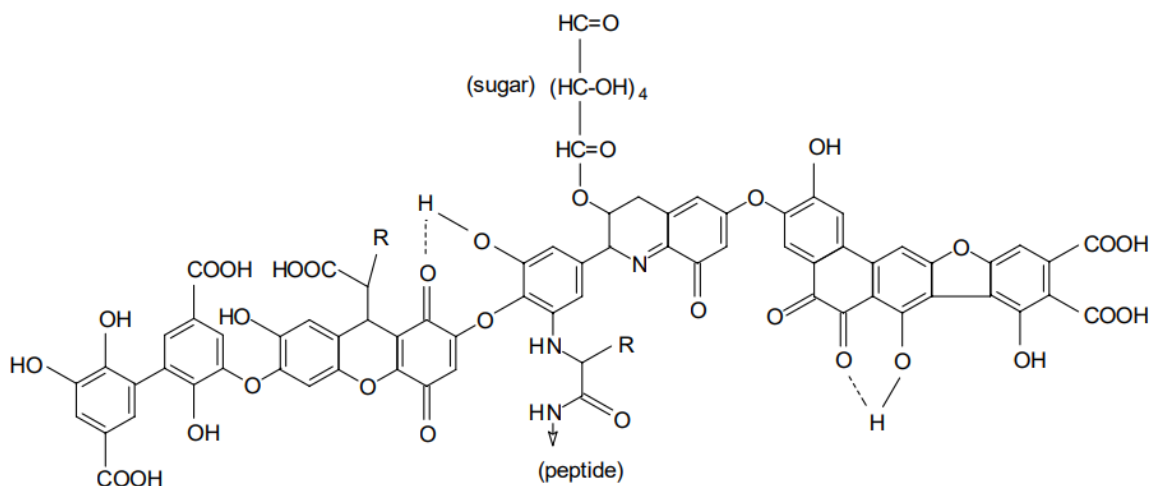


Obr. 2: Struktura fulvinových kyselin podle Bufflera (1977) [18]

Huminové kyseliny

Třetí frakcí jsou huminové kyseliny (HK), které jsou zbarveny do tmavě hnědé až černé barvy a jejich rozpustnost se pohybuje při vyšších hodnotách pH. Nejsou rozpustné v kyselém pH a ve vodě jsou omezeně rozpustné, avšak rozpustnost se může lišit v závislosti na struktuře a složení HK, pH a iontové síle [19].

V závislosti na stáří, původu nebo klimatu a dalších vnějších podmínkách se také liší obsah funkčních skupin v HK. Mezi hlavní funkční skupiny HK se řadí karbonyly, alkoxyly, karboxylové a $-OH$ fenolické skupiny. Mezi další funkční skupiny lze zařadit enolové, chinonové a etherové skupiny, avšak ve struktuře HK mohou být i fragmenty polysacharidů či polypeptidů. Takto se makromolekula HK skládá z hydrofilních a hydrofobních částí, kde hydrofilní domény jsou bohatě substituovány $-OH$, $-COOH$ a $-NH-CO-$ funkčními skupinami, zatímco hydrofobní část je převážně tvořena aromatickými stavebními jednotkami, případně fragmenty lipidických řetězců. Molekula HK vytváří prostorově globulární strukturu, kde vnitřní část této makromolekuly je tvořena aromatickými sloučeninami a lipofilními fragmenty. V této souvislosti je nad míru jasné, že její hydrofilní části budou exponovány do vodného, resp. polárního prostředí. Toto uspořádání je podobné micelám a vede ke snížení povrchového napětí. HK dokáží vytvářet komplexy s těžkými kovy, což je výhodné, jelikož tímto způsobem může dojít k imobilizaci těžkých kovů v půdách anebo sladkovodních zdrojích [20]. Právě HK jsou nejkvalitnějším produktem humifikace, díky nim dochází k výraznému ovlivnění pufrční schopnosti půdy, kationtové výměnné kapacity a ovlivnění struktury a úrodnosti půdy [14]. Příklad struktury HK podle Stevensona je uveden na Obrázku 3.



Obr. 3: Struktura huminových kyselin podle Stevenson (1982) [18]

2.2.2 Vznik a geneze huminových látek

Humifikaci neboli syntézu humusu, který zahrnuje huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy, lze zařadit po fotosyntéze mezi druhý nejdůležitější děj přeměny organických látek v půdě [15]. Představy, jak přesně vznikají HL, jsou založeny na ligninové a polyfenolové teorii, a také na teorii kondenzace sacharidů s aminy a teorii polyketidové. Jednotlivé teorie vzniku huminových látek se mohou uplatňovat a doplňovat v určitých půdách v různém rozsahu. Například ligninová teorie bude převládat ve špatně odvodněných půdách a naopak teorie kondenzace sacharidů s aminy bude převládat v půdách, které jsou vystavovány častým změnám teplot, vlhkosti a slunečního svitu [21].

Ligninová teorie

Ligninová neboli degradační teorie vychází z toho, že výchozí látkou pro vznik HL je lignin, kutin nebo melanin. Tato teorie předpokládá rozklad rostlinné tkáně mikroorganismy za účasti půdních aktinomycet a plísní, kdy je lignin dekompozičními reakcemi rozložen na jednodušší fragmenty, ze kterých jsou následnou kaskádou biochemických reakcí syntetizovány nejprve vysokomolekulární huminy. Humin je dále přeměněn na huminové kyseliny a následně na fulvinové kyseliny. Během delšího časového úseku může dojít k rozkladu až na oxid uhličitý a vodu, což je děj, jež je dobře znám pod označením mineralizace organické hmoty [13]. Nejdříve dojde k odštěpení methoxylových skupin za vzniku *o*-hydroxyfenolů a dále následuje oxidace alifatických postranních řetězců a přeměna na karboxylové funkční skupiny. Tyto produkty dále reagují s amoniakem, kde dojde k vytvoření cyklických molekul se začleněním dusíku. Organický dusík je v huminových látkách vázán v podobě sekundárních amidů ($-\text{NH}-\text{CO}-$), které poukazují na začlenění polypeptidických fragmentů do makromolekuly HL [21].

Polyfenolová teorie

Polyfenolová teorie vzniku huminových látek je určitou modifikací ligninové teorie, která v hlavních aspektech kopíruje dřívější teorii ligninovou. Fenolové aldehydy a kyseliny, které byly uvolněné z ligninu při mikrobiálním rozkladu, jsou pomocí enzymů přeměněny na chinony. Chinony dále polymerují za vzniku huminových látek. Dále druhou cestou syntézy HL je syntéza polyfenolů ze zdrojů, které neobsahují lignin, v přítomnosti celulózy. Nejdříve dochází k dekompozici odumřelé rostlinné tkáně na základní molekuly, mezi které se řadí karboxylové kyseliny a fenoly, a dále se přeruší vazby mezi ligninem a celulózou. Dochází k odstranění methylové skupiny na postranním řetězci a oxidaci, což vede k vytvoření polyfenolů. V přítomnosti enzymu polyfenoloxidázy dochází ke katalyzované oxidaci polyfenolů na chinony, které dále reagují se sloučeninami obsahujícími dusík. Následuje polymerace za vzniku fulvinových kyselin potom huminových kyselin a huminu [22, 24].

Teorie kondenzace sacharidů s aminy

Kondenzace sacharidů s aminy je teorie, kdy dochází ke vzniku HL chemickou syntézou. Nejdříve dochází ke štěpení stavebních jednotek makromolekuly na základní organické sloučeniny, jako jsou monosacharidy a aminokyseliny. Následně adicí amino skupiny na karbonylové skupiny vznikají *N*-substituované glykosylaminy, které podléhají přeskupení a vytváří *N*-substituované amino-deoxyketózy. Dochází k eliminaci molekul vody u tří uhlíkatých zbytků aldehydů a ketonů a následnou polymerizací vznikají hnědě zbarvené HL [24–25].

Polyketidová teorie

Nejnovější teorií vzniku HL je teorie polyketidová, která vychází z předchozích teorií vzniku HL, ale na rozdíl od nich se především zaměřuje na půdní mikrobiální a enzymatické činitele. Tato teorie lze rozdělit na dvě části, kdy v první části nejdříve dochází k rozkladu rostlinných a mikrobiálních směsí na základní stavební jednotky a následně v druhé části vznikají přeměnami polyketidy, ze kterých jsou dále syntetizovány HL [22].

2.2.3 Struktura huminových látek

Huminové látky se skládají z organických makroprvků C, H, O, N a S bez ohledu na jejich původ. Molekulová hmotnost HL se pohybuje v rozmezí 2–200 kDa. V závislosti na podmínkách vzniku HL se liší i v průběhu tvorby obsah funkčních skupin. Například množství COOH a C=O skupin se v průběhu humifikace huminových kyselin zvyšuje a naopak množství OH a CH₃ skupin se během tohoto procesu snižuje [16]. Fulvinové kyseliny obsahují více kyselých funkčních skupin, zejména karboxylové, fenolické, alkoholové, ketonické skupiny na rozdíl od HK, které obsahují více chinoidních skupin. Celková kyselost FK je tedy oproti HK vyšší a molekulová hmotnost nižší [26].

Právě znalost struktury a složení HL je nutné pro chápání fyzikálně-chemických interakcí, avšak v případě huminových látek není struktura stále zcela popsána. Ke stanovení skutečné

velikosti a strukturní morfologii HL a následné reaktivitě v půdě je zapotřebí znát molekulární hmotnost, která není stále zcela známá. Pochopení struktury huminových látek je založeno na dvou rozdílných teoriích. První teorie uvádí, že huminové látky jsou polymery a druhá teorie uvažuje nad supramolekulárními molekulami [25, 27].

Polymerní teorie

Názor, který je relativně zastaralý a není podložen žádným přímým důkazem, popisuje HL jako polymerní sloučeniny. Tato teorie vznikla na základě laboratorních experimentů a představuje si HL jako makromolekuly, které mají lineární polymerní strukturu. Později bylo zjištěno, že HL jsou uspořádány do náhodně stočené polymerní konformace. Avšak následně bylo díky dalším experimentům zjištěno, že se molekulární struktura dokáže na základě pH, iontové síle rozpouštědla nebo náboje na polymerním řetězci změnit z klubkovitého tvaru na lineární tvar a naopak [27].

Hlavní myšlenkou při pohledu na huminové látky z polymerního hlediska je polydisperzita. Kdy huminové látky jsou polymery, které mají různou molekulovou hmotnost, která je podobná právě přírodním makromolekulám. Mezi tyto makromolekuly se řadí například polysacharidy (škrob, celulóza, hemi-celulóza, β -D-glukany aj.), lignin nebo proteiny. Tato teorie našla své opodstatnění na základě podobnosti s biopolymery, které jsou syntetizovány v buňce a tvoří různé nadmolekulární útvary. Několik důvodů, proč byla přijata polymerní teorie zahrnuje tedy srovnání makromolekulárních polymerů, které jsou v živých buňkách, ačkoli tady hraje důležitý předpoklad, že HL nejsou produkt buněčné syntézy, ale spíše produkt buněčné smrti. Dalším zohledňujícím motivem je poměrně vysoká stabilita HL v půdě, kdy po vytvoření „zralé“ makromolekuly, již nedochází k významným strukturním změnám. Tato stabilita je podobně jako u škrobu indikována prostřednictvím intra- a intermolekulárních interakcí mezi jednotlivými stavebními jednotkami spoluvytvářejících strukturu HK a huminů. Mezi další důvod lze zařadit koloidní vlastnosti HL, které se podobají vlastnostem polyelektrolytů, jako jsou procesy flokulace, disperze nebo dvojrstvého chování ve vodném prostředí [27–28].

Supramolekulární teorie

S nebývalým rozvojem moderních analytických metod došlo k odklonu od dřívějšího polymerního modelu a uvažovalo se nad supramolekulární strukturou HL. Tato supramolekulární teorie uvádí, že struktura není stabilizována kovalentními vazbami, ale ke stabilizaci a spojení různých malých molekul dochází prostřednictvím spontánních spojení pomocí tzv. slabých vazebných interakcí. Mezi slabé interakce lze zařadit van der Waalsovy síly, π - π vazby, CH- π vazby nebo vodíkové můstky, kvůli kterým dochází s rostoucím pH k vytváření velké molekulární struktury. Z této teorie tedy vychází, že HL nejsou makromolekulárními polymery, ale představují sdružení malých heterogenních jednotek, které jsou stabilizovány do supramolekulární struktury, ve kterých se nacházejí hydrofobní a hydrofilní domény [22, 27].

Zjištění, že jsou HL spojeny slabými interakcemi, otevřelo nové znalosti o jejich fyzikálně-chemických vlastnostech v půdě a životním prostředí. Katalytickou technologií je možné přeměnit volné HL ve skutečné kovalentní polymery v půdním nebo vodním prostředí. Tato skutečnost umožňuje zlepšit schopnost kontroly půdní organické hmoty v našem hospodářství, zamezit riziku eroze, snížit rozsah desertifikace půdy a tím zlepšit úrodnost půdy. Výsledkem mnoha pozorování vedla k tomu, že díky molekule, která je uvolněná z velkých supramolekulárních HL, je možné ovlivnit příjem živin rostlin a zvýšit tak výnosy plodin. Dále docházelo k vytváření metod, které byly založené na interakcích například s amfifilními organickými kyselinami, močovinou nebo s kationty, které jsou schopny narušit zdánlivě velké struktury huminových látek a získat tak frakce, které jsou jednodušší a homogenní [27–28].

2.3 Huminové látky a půdní prostředí

Významnou schopností HL je jejich schopnost vázat těžké kovy, pesticidy, barviva a povrchově aktivní látky. HL představují přírodní ligandy, které dále interagují s polutanty a dochází tak ke snížení toxicity. Pokud půda obsahuje málo HL, tak se těžké kovy a další toxické látky dostávají do rostliny, kde dále dochází k ovlivnění celého potravního řetězce [11].

HL vázané na minerální částice půdy představují pro půdní organismy zdroj energie a výživu ve formě minerálů. Huminové látky mají ve svých uhlíkových vazbách uskladněnou energii, kterou dále využívají organismy ke svým metabolickým dějům. Mezi tyto organismy lze zařadit kvasinky, bakterie, řasy nebo i drobné živočichy. HL zlepšují kvalitu půdy svou schopností zadržovat vodu v kořenové oblasti půdy. Voda představuje nosič, který obsahuje živiny a je schopen dodávat rostlinám a půdním organismům potřebné živiny. Jestliže je v půdě vysoká koncentrace HL, tak dochází k zadržení dostatečného množství vody pro vyživení rostliny i v období sucha [14, 21].

Mezi organismy, které jsou výrazně prospěšné půdě a životu rostlin lze zařadit houbové hlístice, řasy, drobné živočichy, bakterie, a také kvasinky. Například bakterie svými organickými výměšky ovlivňují rozpustnost minerálních látek v půdě nebo jsou schopné uvolňovat polysacharidy, které dále vytváří půdní agregáty. Tyto agregáty napomáhají vytvářet potřebnou strukturu půdy. Jiný druh bakterií je zase schopen vylučovat do půdy antibiotika (polyketidy), které chrání rostlinu před škůdci. Organické látky, které vylučují houby, napomáhají tvořit humus a agregáty. Drobní živočichové napomáhají tvorbou humusu a kanálků, které umožňují půdě dýchat [14, 26].

2.4 Využití huminových látek

Už v dřívějších dobách se využívaly HL, avšak lidstvo HL neznalo, a tudíž ani nevědělo, co způsobuje tyto příznivé vlastnosti. Až v nedávných dobách se zjistila bližší charakterizace HL, a tak se HL začaly využívat v různých odvětvích průmyslu, zemědělství nebo v medicíně [23].

2.4.1 *Využití HL v medicíně*

Využití HL v medicíně sahá až do historie, kdy se pomocí HL léčily mnohá onemocnění, avšak až v nedávné době se zjistilo, že v těchto léčebných procesech hrají významnou roli HL. V medicíně mají HL velký vliv na živý organismus. Vynikají svými vlastnostmi při transportu kyslíku v krvi, kdy dodávají erytrocytům vyšší schopnost a rychlost k okysličení celého organismu. HL umožňují snadnější propustnost minerálních látek přes buněčnou stěnu, a tak zamezují například strumě, takže podporují přenos jódu do štítné žlázy. Také je známo, že HL dokáží na sebe snadno vázat těžké kovy nebo různé polutanty, kterých následně tělo zbavují, a tak dochází k detoxikaci organismu. Pozitivní vliv HL lze vidět i v trávicím traktu, kde jsou HL schopné vytvořit na povrchu sliznice ochranný film, který zamezuje vstřebávání infekčních patogenů do organismu. Speciálně HK vykazují léčivé účinky při transdermálním podání, ať už na různá kožní onemocnění nebo pouze jako prevence před viry tak, že se naváží na vir a tím zabrání jeho následné replikaci. Další výzkumy ukazují, že HK dokáží bojovat nejen proti virovým onemocněním vně organismu, ale také proti dalším vnitřním virovým onemocněním [11, 17, 21].

2.4.2 *Využití HL v průmyslu*

V průmyslu našly HL velké využití jako zdroj energie v podobě uhlí. Avšak od tohoto způsobu získání energie spalováním fosilních paliv bylo odstoupeno kvůli produkci vysokého množství oxidu uhličitého v atmosféře, který vytváří skleníkový plyn. Skleníkový plyn způsobuje globální oteplování a okyselení oceánů, takže kvůli ochraně životního prostředí je zvolena náhrada šetrnějšími zdroji, mezi které se řadí větrné, sluneční nebo vodní elektrárny [23].

Velkého využití našly HL ve stavebnictví, kde se používají jako přísady pro řízení rychlosti tuhnutí betonu. Při přidavku huminových kyselin při výrobě cementů dochází k ovlivnění disperzity nebo adhezi vzniklých povrchů. Také se huminové kyseliny přidávají do keramiky, kde zvyšují odolnost nevypálené keramiky při mechanickém namáhání. Dále se HL uplatňují při výrobě plastů, například při výrobě PVC nebo Nylonu 6 plní HL roli změkčovadla a barviva. V papírenském průmyslu se HL zahrnují do několika výrobních procesů, například při výrobě papírů s vysokou pevností v tahu, při recyklaci papíru nebo při výrobě elektricky vodivých papírů. V kožedělném průmyslu se HL přidávají do roztoku, který slouží ke konečné úpravě kůže. V papírenském, textilním a dřevozpracujícím průmyslu jsou HL hojně využívány jako přírodní pigmenty [26].

2.4.3 *Využití HL v zemědělství*

Huminové látky výrazně ovlivňují kvalitu a produktivitu půdy. Mezi hlavní využití HL v zemědělství patří zvýšení úrodnosti, vlhkosti a kvality půdy. Huminové látky také vykazují vysokou výměnnou kapacitu, která pozitivně ovlivňuje úrodnost půdy [26]. Po přidavku HL do jílovitých půd dochází k výraznému zlepšení v pronikání vody, a tudíž k lepšímu růstu rostlin v kořenové oblasti. Při aplikaci HL do písčitých půd naopak dochází k zadržení vody,

čímž se výrazně zlepšuje schopnost zadržovat a nevyplavovat živiny z půdy. Zejména huminové kyseliny jsou důležité pro zajištění optimálního rozsahu pH, kde právě HK jsou schopné vyrovnávat výkyvy pH půdy, a tak stále udržovat pH v rozmezí 5,5–7,0, které je vhodné pro růst rostlin. HK jsou také schopny postupně uvolňovat prvky, mezi které lze zařadit fosfor, dusík, draslík aj. a tím je poskytnout rostlinám. Například draslík reguluje otvírání a zavírání průduchů na listech a tím podporuje metabolismus [29].

Chelátové komplexy, které jsou tvořené kovy a HK, jsou využívány při klíčení rostlin, kdy tyto komplexy umožňují slabé rostlině snadnější příjem živin. V půdě jsou cheláty přístupnějšími živinami pro rostliny a mikroorganismy, na rozdíl od kovů v iontovém stavu. Udržují hnojiva, která jsou rozpustná ve vodě v kořenové zóně a dávkuje je přiměřeně v závislosti na stavu rostliny. Přičemž v současné době se HL přidávají i do hnojiv, kde ke zvýšení úrodnosti se používají soli huminových látek. HL jsou schopné katalyzovat procesy, které vedou ke vzniku vyššímu obsahu sacharidů, lipidů a různých vitamínů v půdě a dále v rostlinách. Také uvolňují CO_2 z uhličitánů a tím dochází k ovlivnění fotosyntézy [11, 26].

Huminové látky tvoří soli, mezi které lze zařadit draselné, sodné, vápenaté nebo amonné. Alkalické soli HL jsou vysoce rozpustné ve vodě a zvlhčují kyselé půdy a tím dochází k zabránění okyselení půdy. Tyto draselné nebo sodné soli HL pozitivně přispívají k zakořenění mladých rostlin, zvýšení účinnosti minerálního hnojení nebo k odolnosti rostliny vůči nepříznivým podmínkám, mezi které se řadí houbové choroby nebo chlad [30]. Amonné soli HL se používají s přídavkem dusíku, fosforu a draslíku do hnojiv, která vykazují široké rozmezí aplikací, které vede ke zlepšení úrodnosti půd [29]. Humát vápenatý umožňuje přeměnu iontu vápníku na takovou formu, která poskytne rostlině snadné vstřebávání. Humát vápenatý zajišťuje chemickou rovnováhu v půdě, a také snižuje salinitu půdy [31].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Vybraná publikovaná studie M. Eshwar a kol. [32] byla věnována extrakci, izolaci a purifikaci huminových a fulvinových kyselin z hnoje. Tyto izolované HL a jejich reaktivní funkční skupiny byly následně rozsáhle charakterizovány pomocí UV/Vis spektrometrie, a také zpětnou a karboxylátovou titrací. Metodou $\text{Ba}(\text{OH})_2$ byla stanovena celková kyselost HK a FK. Principem tohoto stanovení je specifická reakce, resp. neutralizace veškerých funkčních skupin, které jsou schopny odštěpit proton. V této souvislosti máme především na mysli funkční skupiny, jako jsou karboxylové a fenolické. Určitá část hydroxidu barnatého je spotřebována na neutralizaci kyselých funkčních skupin, které se následně ve vzorku nacházejí v podobě solí HL tzn. fulvátů a humátů. Přebytké množství $\text{Ba}(\text{OH})_2$ je následně titrováno za použití standardního roztoku HCl . Pokud bychom měli tuto titraci blíže specifikovat, tak se jedná o tzv. titraci zpětnou. Bylo zjištěno, že celková kyselost byla vyšší v případě FK ($9,4 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$) v porovnání s HK ($7,2 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$). Také bylo dokázáno, že procentuální podíl karboxylových skupin má na celkovou kyselost vyšší vliv než podíl fenolických $-\text{OH}$ skupin. Tento vyšší poměr právě karboxylových skupin vedl k podrobnému prostudování funkčních skupin a bylo zjištěno, že produkované sacharidy a další fenolové sloučeniny jsou snadno rozložitelné, což vede k jednoduché přeměně na karboxylové skupiny. Absorpční koeficient E_4/E_6 je definován jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm. Hodnota tohoto absorpčního koeficientu je dobrým ukazatelem tzv. humifikace HL. Jinými slovy, odborný termín humifikace v sobě skrývá následující fyzikálně-chemické vlastnosti, kterými lze analyzované HL a DOM blíže charakterizovat: (i) střední molekulová hmotnost $\overline{M}_r$; (ii) aromaticita resp. stupeň aromaticity. Nicméně je zapotřebí říci, že tento absorpční koeficient je silně závislý na hodnotě pH roztoku, a tudíž je vhodné rozpuštěné HL analyzovat, až po jejich uvedení do roztoku pufru. Autoři uvádí, že poměr optických hustot byl vyšší v případě FK (6,2), v porovnání s HK (4,3), kde tento rozdíl je pravděpodobně způsoben vyšší střední molekulovou hmotností a vyšším obsahem aromatických stavebních jednotek ve struktuře HK. Na tomto místě je nutné říci, že aromatické stavební jednotky FK jsou podstatně strukturně jednodušší, avšak s vyšší mírou substituce jejich Ar jader kyselými funkčními skupinami. Naproti tomu, aromatické jednotky HK se mohou nacházet v podobě kondenzovaných systémů, a tudíž můžeme hovořit o polyaromatickém charakteru HK. V případě rychlé charakterizace HL a DOM je UV/Vis spektrometrie nepostradatelnou instrumentální technikou, avšak je zřejmé, že pouhé vizuální zhodnocení průběhu jejich UV/Vis spekter by bylo zcela nedostačující. V případě porovnání UV/Vis spekter HK a FK je zřejmé, že tyto spektra jsou si navzájem velmi podobná, jelikož se u těchto organických sloučenin nenachází žádné specifické absorpční maximum, které by blíže definovalo jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. V této souvislosti lze hovořit o tzv. kvazi-exponenciálním průběhu UV/Vis spekter.

Y. Zhang a kol. [33] použili ke studiu huminových látek metody termické analýzy a v neposlední řadě i spektrometrické techniky. K základní fyzikálně-chemické charakterizaci použili termogravimetrii, elementární analýzu CHNS/O a potenciometrickou titraci. Kvalitativní zhodnocení izolovaných HL bylo realizováno pomocí infračervené spektrometrie

s Fourierovou transformací a ^{13}C NMR spektrometrie. Huminové látky byly extrahovány ze dvou sedimentů mangrovových bažin na ostrově Hainan (Čína) dle postupu mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek IHSS. Hlavní myšlenka autorů spočívala v pochopení struktury, a z toho vyplývající reaktivity huminových látek. Vypočtené elementární složení HK a FK ukazuje, že vzorky HK jsou bohatší na uhlík, dusík a vodík na rozdíl od FK. Naopak obsah kyslíku u FK byl vyšší než ve vzorcích HK. Tento rozdíl ve vyšším obsahu kyslíku u FK je způsoben přítomností funkčních skupin, mezi které lze zařadit karboxylové, fenolické, hydroxyly nebo karbonyly. Dále bylo zjištěno, že obsah dusíku byl vyšší u HK, z důvodu snadného uchovávání v jejich struktuře, a to v podobě sekundárních amidů resp. polypeptidů, které obvykle odrážejí významnou mikrobiální aktivitu během geneze těchto biokoloidních sloučenin. Nicméně nelze opomenout ani příspěvek původní organické hmoty, která byla použita k formaci těchto „vysokomolekulárních“ sloučenin. Naproti tomu, v případě FK byl dusík během procesu humifikace vyčerpán. Výsledky práce autorů ukazují, že HK obsahují více substituentů alifatického charakteru, které jsou odvozeny od lipidických sloučenin a vosků. Obsah karboxylových skupin představuje většinu celkové kyselosti, kde u FK je tento obsah vyšší než u HK. Autoři dále uvádí, že fulvinové kyseliny obsahují relativně více aromatických struktur na rozdíl od HK. Tuto nezvyklost se autoři pokusili vysvětlit dvěma možnými přístupy, z nichž první zahrnoval nestandardní podmínky během procesu geneze HL a druhý se odvolával na disproporce v obsahu dusík obsahujících sloučenin tzn. polypeptidových fragmentů, což má ve skutečnosti za následek podhodnocení obsahu Ar jednotek ve struktuře HK.

Shirshova a kol. [34] publikovali studii, kde extrahovali huminové látky z bažinné půdy v New Hampshire (USA), které následně charakterizovali elementární analýzou, FTIR, UV/Vis a fluorescenční spektroskopií. Autoři se zaměřili na izolaci HL třemi způsoby, kde výsledkem této studie je kvalitativní vyhodnocení metod izolace HK. První metoda zahrnovala nejdříve extrakci huminových látek benzenem/methanolem, a poté byla suspenze HL dekalcinována 0,1 M HCl a purifikována deionizovanou vodou. Nakonec byl vzorek HK extrahován 0,1 M NaOH. Druhý způsob izolace HL zahrnoval nejdříve adsorpci HL na sulfonátovou pryskyřici, po které následoval krok zahrnující karboxylátovou pryskyřici. Následně byly adsorbované HL desorbovány pomocí 0,1 M roztoku NaOH. Právě k oddělení slabě vázaných kationtů HL od silně vázaných kationtů se postupně využívají sulfonátové a karboxylátové pryskyřice. Poslední, třetí způsob izolace huminových látek spočíval ve zkombinování prvního a druhého způsobu izolace HL. Nejdříve byly HL extrahovány benzenem/methanolem dle prvního způsobu a poté následovala extrakce pryskyřicemi, po kterých následovala extrakce HK v alkalickém prostředí. Benzen/methanol, který byl použit v prvním kroku extrakce HL, nevedl k žádným kritickým změnám v UV/Vis a fluorescenčních spektrech, pouze tímto krokem bylo docíleno zvýšení stávajících rozdílů při vyhodnocení některých spektroskopických vlastností HK. Všechny získané HK obsahovaly nízký obsah popela a podobné obsahy organických prvků, jako je uhlík, dusík, vodík, síra a v neposlední řadě i kyslík. Z podrobného studia a interpretace absorpčních pásů v FTIR spektrech vyplývá, že alkalicky extrahované HK obsahují více alifatických strukturních jednotek, fragmentů polysacharidů a polypeptidů ve srovnání s HK, které byly extrahovány

pryskyřicí. Na rozdíl od alkalicky extrahovaných HK, tak HK, které byly extrahované pryskyřicí, mají vyšší poměr E_4/E_6 , obsahují více karboxylových a fenolických skupin, a také vykazují vyšší intenzitu fluorescence v celém emisním spektru a delší vlnovou délku emisních maxim. Jinými slovy se dá říci, že právě fluorescenční spektrometrie podala nezvratné důkazy o nižším stupni humifikace, střední molekulové hmotnosti a aromaticitě, jelikož zvýšení intenzity fluorescence je přímým indikátorem výše zmíněných strukturních vlastností HL. Extrakce HL pomocí pryskyřic a alkalických hydroxidů zajišťuje mírnější podmínky ve srovnání s klasickým postupem izolace HL, z hlediska pH a iontové síle, a také materiály nejsou kontaminovány organickými sloučeninami ne-huminového původu. Autoři uvádí, že extrakce HK pomocí pryskyřic a alkalických hydroxidů zajišťuje mírnější separaci HK od nehumínových sloučenin, tudíž při studiu huminových kyselin se izolace pomocí pryskyřic jeví jako výhodnější.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- vzorek fluvizemě (jemnozem typu I), lokalita jižní Morava – Ivaň;
- 0,1 M HCl – normanal (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- 1 M a 0,1 M NaOH – normanal (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- kyselina fluorovodíková 38–40 obj. % (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- hydrofobní pryskyřice DAX–8 (výrobce Sigma Aldrich);
- katex Amberlite 120 IR H⁺ (výrobce Sigma Aldrich);
- AgNO₃ (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- KCl (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- KOH (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- KBr (výrobce Lach-Ner s.r.o.);
- Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O (výrobce Sigma Aldrich).

4.2 Použité přístroje

- analytické váhy Sartorius (přesnost 0,1 mg);
- rotační třepačka hlava-pata;
- Hettich Rotina 46R centrifuga;
- pH metr, konduktometr Mettler Toledo;
- lyofilizátor BenchTop VirTis;
- UV/Vis spektrometr Hitachi U3900H;
- FTIR spektrometr Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific;
- Elementární analyzátor CHNS/O EuroVector EuroEA3000;
- TGA Q5000;
- Metrohm Titrando automatický titrátor.

4.3 Izolace huminových látek z fluvizemě dle IHSS

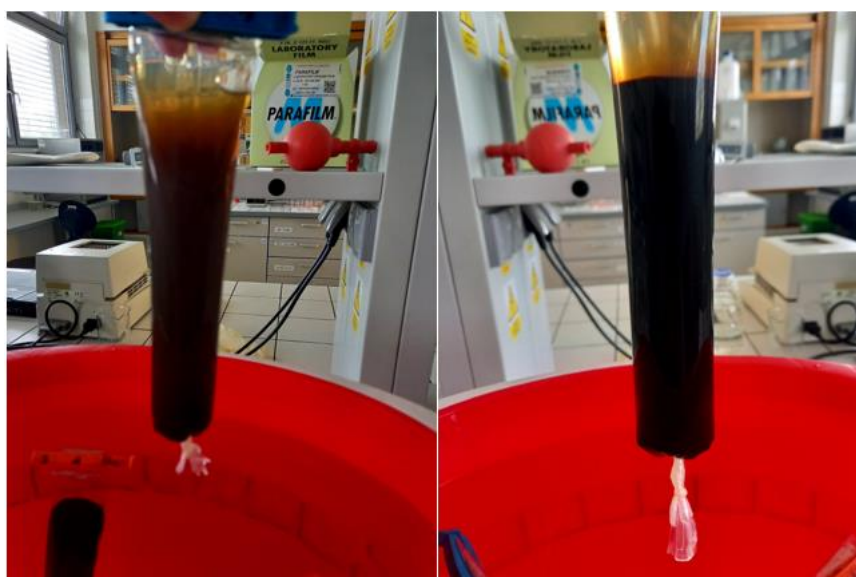
Nejdříve byla fluvizem proseta přes síto o průměru ok 1 mm, tudíž vzorek obsahoval půdní částice, které jsou označovány jako jemnozem typu I. Na analytických vahách bylo naváženo 250 g vzorku a následně byl vzorek přidán k 1 litru 0,1 M roztoku HCl. Takto vytvořená suspenze byla třepána na rotační třepačce (hlava-pata) s rychlostí 10 ot · min⁻¹ po dobu 60 minut, čímž došlo k tzv. dekalifikaci půdní matrice. Po uplynutí 60 minut byla suspenze zneutralizována 1 M roztokem NaOH na hodnotu pH 6,7. Následně byla suspenze odstředěna při 4800 ot · min⁻¹ po dobu 15 minut. K pevnému podílu byl přidán 1 litr 0,1 M roztoku NaOH. Vzniklá suspenze měla pH 12,4 a nechala se třepat na rotační třepačce přes noc. Dále byla opět suspenze odstředěna při 4800 ot · min⁻¹ po dobu 30 minut. Z takto připraveného vzorku následovala jednotlivá izolace huminových frakcí.

4.3.1 Izolace huminových kyselin

Roztok, získaný v kapitole 4.3, byl okyselen koncentrovaným roztokem HCl na hodnotu přibližně pH 1 a následně docházelo přes noc ke koagulaci HK. Vysrážené HK byly odděleny od supernatantu odstředěním při $4800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 60 minut. Roztok nad sraženými HK byl uschován pro izolaci FK. Vysrážené HK byly znovu rozpuštěny přidávkou 1 litru 0,1 M roztoku KOH, a také bylo ke vzniklému roztoku přidáno 22 g KCl. Vzniklý roztok byl opět odstředěn při 4800 otáčkách za minutu po dobu 60 minut. Následně došlo k uchování vzniklé nerozpustné části tedy huminů. Roztok byl opět okyselen koncentrovaným roztokem HCl na hodnotu přibližně pH 1 a k vysrážení HK docházelo po dobu 18 hodin resp. přes noc. Poté byly HK odděleny od supernatantu odstředěním při $4800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 30 minut a ke vzniklým vysráženým HK bylo přidáno 500 ml roztoku směsi 0,1 M HCl a 0,1 M HF. Touto směsí HCl a HF dojde k odstranění anorganických příměsí, jako jsou silikáty, případně vázané kovy. Vzniklá suspenze byla 10 dní třepána na třepáče. HK byly odděleny od supernatantu odstředěním při $4800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 30 minut a následně byly převedeny do dialyzačních membrán o velikosti pórů 1000 Da, jež lze vidět na Obrázku 4. Huminové kyseliny byly dialyzovány oproti čisté vodě 14 dní, kde docházelo k vyplavení fluoridů a chloridů ze vzorku. Poté byly HK vymrazeny a lyofilizovány do úplného vysušení.

4.3.2 Izolace huminů

Získané HU z předchozího postupu byly odstředěny při $4800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 30 minut. Poté byl roztok nad HU odstraněn a vzorek HU byl plněn do dialyzačních membrán viz Obrázek 4, kde byly rovněž jako HK dialyzovány oproti čisté vodě po dobu 14 dní. Mimo jiné je na Obrázku 4 zřejmé, že HK jsou částečně rozpustné ve vodě a vytváří tmavě zbarvený roztok, zatímco HU tvoří suspenzi, která sedimentuje. Následně byly HU zamrazeny a lyofilizovány do úplného vysušení.

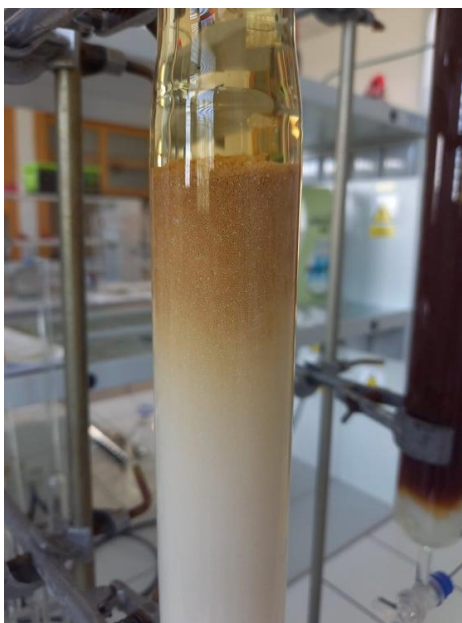


Obr. 4: Dialyzační membrány naplněné HU (vlevo) a HK (vpravo)

4.3.3 Izolace fulvinových kyselin

Získaný roztok obsahující FK a lehce hydrolyzovatelné organické sloučeniny, které byly získány při izolačním postupu HK resp. HL, byl ultrafiltrován, z důvodu odstranění případných nečistot, které nebyly odstraněny centrifugací. Poté izolace FK probíhala nejdříve na hydrofobní pryskyřici DAX-8, kde docházelo k oddělení FK od ostatních organických sloučenin tzn. lehce hydrolyzovatelné organické kyseliny a sloučeniny, které doposud neprošly humifikačním procesem např. DOM. Jakmile se FK adsorbovala na pryskyřici, což je zobrazeno na Obrázku 5, tak následně došlo k prolívání kolony s pryskyřicí deionizovanou vodou, dokud nebyla absorbance deionizované vody vytékající z kolony při vlnové délce 350 nm menší než 0,015. Jestliže byla absorbance nižší jak 0,015, tak následovala desorpce, kdy byla kolona s pryskyřicí prolívána přibližně 1,5 litrem 0,1 M NaOH. Kolona se promývala 0,1 M roztokem NaOH, dokud na výstupu z kolony nebyla absorbance roztoku při vlnové délce 350 nm menší než 0,03. Po desorpci FK byla kolona s pryskyřicí prolita 0,1 M roztokem HCl z důvodu odstranění anorganických příměsí, které zůstaly navázané na povrch pryskyřice. Následně byla kolona s kyselým pH prolita deionizovanou vodou, dokud výtok z kolony neměl neutrální pH.

Získané FK jsou ve formě sodných solí tzn. fulvátů, tudíž je nutné opět FK naprotonovat resp. je převést na kyselou formu. K výměně sodných iontů za vodíkový kationt z roztoku FK došlo pomocí katexu Amberlite IR 120, který právě tuto výměnu umožnil. Získaný alkalický roztok byl přibližně 30krát prolit kolonou, dokud hodnota elektrické vodivosti vytékajícího roztoku z kolony neklesla pod $120 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Poté byla kolona opět promývána deionizovanou vodou. Promývání bylo ukončeno, když hodnota absorbance deionizované vody na výstupu z kolony byla při vlnové délce 350 nm nižší jak 0,015. Následně byla kolona regenerována, aby byla připravena pro další použití. Tudíž bylo nutné Amberlite IR 120 naprotonovat a vymyt sorbované sodné ionty. Sorbované sodné ionty byly vymyty přibližně 1000 ml 0,1 M HCl, která byla prolita kolonou. Poté byla kolona promyta deionizovanou vodou, dokud na jejím výstupu nebylo neutrální pH. Takto získaný roztok FK byl zakoncentrován na vakuové odparce. Následně byl vzorek FK vymražen a poté lyofilizován do úplného vysušení.



Obr. 5: Kolona naplněná hydrofobní pryskyřicí DAX-8 s adsorbovanými FK

4.4 Fyzikálně-chemická charakterizace

Struktura a z toho dále vyplývající vlastnosti získaných huminových látek byly charakterizovány pomocí jednotlivých termických a spektrometrických metod, které zahrnují elementární a termogravimetrickou analýzu a dále UV/Vis a FTIR spektrometrii. Důležitým příspěvkem charakterizace huminových a fulvinových kyselin byla potenciometrická titrace.

4.4.1 Elementární analýza

Jednotlivé prvkové složení vzorku fluvizemě a izolovaných HL, bylo zjištěno pomocí elementárního analyzátoru CHNS/O Eurovector EuroEA3000. Nejdříve byla pomocí standardní látky 4 – aminobenzensulfonamidu provedena kalibrace analyzátoru. Následně, při teplotě reaktoru 980 °C, byl vzorek spálen v kyslíkové atmosféře. Nosným plynem jednotlivých vzniklých produktů, které jsou následně analyzovány pomocí tepelně-vodivostního detektoru TCD (*Thermal Conductivity Detector*) je velmi čisté hélium. Získané elementární složení v hmotnostních procentech (hm. %) vzorků bylo vyhodnoceno pomocí programu CallidusTM 5.1.

4.4.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena na přístroji TGA Q5000 a výsledkem této analýzy byl stanoven obsah popela a celkové sorbované vlhkosti. Nejdříve bylo na platinovou pánvičku naváženo 5–10 mg vzorku, z nichž horní uvedená mez odpovídala půdě fluvizemě. Vzorky HL a půdy byly následně spáleny v atmosféře vzduchu z laboratorní teploty na konečnou teplotu 800 °C. Průtok vzduchu odpovídal 50 ml·min⁻¹ a rychlost ohřevu pece byla 10 °C·min⁻¹. Stejný postup byl proveden v inertní atmosféře dusíku.

4.4.3 UV/Vis spektrometrie

Měření molekulových UV/Vis spekter bylo realizováno pomocí Hitachi U3900H spektrometru. UV/Vis spektra vzorků HL byla měřena v rozsahu vlnových délek 200–800 nm, přičemž všechna absorpční spektra vykazovala typický kvazi-exponenciální průběh (s rostoucí vlnovou délkou klesala hodnota absorbance). Absorpční spektra HL byla použita pro výpočet tzv. absorpčních koeficientů, které hrají hlavní úlohu při kvalitativní analýze těchto biokoloidních sloučenin. Konkrétně se jedná o následující absorpční koeficienty a indexy: E_{ET}/E_{BZ} , E_2/E_4 , E_2/E_3 a $SUVA_{254}$. Nejdříve byl připraven standardní fosfátový pufr Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 o koncentraci 0,1 M a pH 7. Poté byla navážka ~ 5 mg HK rozpuštěna v 0,1 M roztoku NaOH, a tak byla získána koncentrace roztoku $100\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Stejný postup byl proveden v případě FK, avšak FK byly rozpuštěny pouze v deionizované vodě. Z těchto zásobních roztoků bylo odpipetováno potřebné množství, aby finální koncentrace byla $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $50\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru. Takto připravené roztoky HK a FK byly následně měřeny v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

4.4.4 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR)

Infračervená spektra byla získána pomocí difúzního odrazu DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) pomocí spektrometru Nicolet iS50. Infračervená spektra byla měřena v rozmezí vlnočtů $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, s rozlišením 8 cm^{-1} a celkovým počtem akumulovaných skenů 512. Vzorky HL a fluvizemě, jejichž navážky činily ~ 3 mg, byly smíchány se 100 mg vyžíhaného KBr. Právě KBr zastupoval funkci tzv. nosného média k získání vzorku o požadované hmotnostní koncentraci, a to zejména proto, aby nedocházelo k saturaci absorbance v naměřených FTIR spektrech. Jinými slovy, pokud bychom měřili vzorky bez přídavku nosného média, tak v případě DRIFT spekter by mohlo docházet k tzv. *cut off* efektu („oříznutí“ jednotlivých absorpčních pásů). Jelikož KBr takřka neabsorbuje infračervené záření, a to zejména ve střední infračervené oblasti, tak ho lze s výhodou použít při FTIR spektrometrii. Pomocí FTIR spektrometrie byly získány informace o struktuře a obsahu funkčních skupin a základních stavebních jednotek HL a půdy.

4.4.5 Potenciometrická titrace

Pomocí titrací byla stanovena celková a karboxylátová kyselost huminových a fulvinových kyselin.

Zpětná titrace

Nejdříve byla navážka 0,1 g HK rozpuštěna ve 100 ml 0,01 NaOH. Vzniklá suspenze byla míchána 24 hodin na magnetické míchačce, z důvodu úplného rozpuštění HK. Následně byl vzorek titrován 0,05 M HCl s přídavkem $0,1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jakmile přídavek titračního činidla dosáhl 60 ml, tak byla titrace ukončena. Stejný postup byl realizován s FK.

Karboxylátová titrace

Byla vytvořena suspenze, která obsahovala 50 mg HK, 40 ml 0,5 M roztoku octanu vápenatého a 10 ml deionizované vody. Zároveň byl smícháním 40 ml octanu vápenatého a 60 ml deionizované vody připraven roztok, jež posloužil k přípravě tzv. slepého vzorku. Takto vytvořená suspenze HK a slepý vzorek byly přibližně 24 hodin míchány na magnetické míchačce. Dále následovala filtrace, kde byl filtrát převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Roztok byl následně titrován 0,1 M NaOH s přídavkem $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, kde docházelo ke stanovení uvolněné kyseliny octové. Titrace byla ukončena po dosažení celkového objemu titračního činidla 10 ml. Totožná titrace byla provedena se slepým vzorkem a stejný postup byl také použit pro vzorek FK.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Z 250 g fluvizemě byly dle postupu IHSS extrahovány fulvinové kyseliny, huminové kyseliny a huminy, jejichž obsah byl přepočítán na hmotnostní procenta a doplněn do Tabulky 1.

Tabulka 1: *Obsah HL izolovaných z fluvizemě (vyjádřené v hmotnostních %)*

vzorek	extrakční výtěžek (hm. %)	celkový obsah HL (hm. %)
HK	0,55	1,4
FK	0,09	
HU	0,76	

Tabulka 1 zobrazuje obsah extrahovaných huminových látek z půdy. Z hlediska obsahu je nejvíce HU a nejméně FK. Pro srovnání byla vybrána fluvizem, která se nachází v Číně v okolí Žluté řeky (Chuang-che) [35]. V této lokalitě bylo z půdy celkově extrahováno 1,8 hm. % huminových látek, kde největší zastoupení tvoří HU (1,13 hm. %). Fulvinové a huminové kyseliny izolované v Číně se od obsahu FK a HK izolovaných v Ivani víceméně nelišily. V porovnání s výsledky uvedenými v odborné práci [35] lze říci, že celkové množství HL je v průběhu jejich geneze spíše vázáno na půdní typ tzn. fluvizem, nežli na přesnou geografickou lokalitu půdního vzorku. Jinými slovy, přírodní prostředí, které je typické pro výskyt tohoto půdního druhu musí splňovat jistá environmentální kritéria, jako je nadmořská výška, teplota podnebí, množství srážek, specifická diverzita půdní bioty atd., a tudíž i obsah půdní organické hmoty je převážně řízen těmito klimatickými a mikrobiologickými podmínkami.

5.1 Elementární a termogravimetrická analýza

Elementární analýza nám obecně poskytuje údaje o obsahu jednotlivých biogenních prvků tzn. stavebních jednotek všech biopolymerních sloučenin, kterými jsou vystavěna jak živočišná, tak i rostlinná těla. V této souvislosti nelze opomenout ani zástupce půdní bioty, jako jsou mikroorganismy, plísňe, houby atd. Pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) bylo nezbytné zjistit zastoupení vlhkosti a popela pro dosažení přesných výsledků obsahu kyslíku, který byl na základě těchto údajů dopočítán. Huminové látky jsou schopné pojmout dostatek vzdušné vlhkosti, a také vyšší obsah hydrátů solí, které byly extrahovány společně s HL, obsahují rovněž větší zastoupení sorbované vody. Tudíž bylo nejdříve zjištěno zastoupení vlhkosti a množství pevného nespalitelného podílu, a z toho dále vyplývající obsah kyslíku v jednotlivých frakcích HL a v půdě. V Tabulce 2 jsou uvedeny jednotlivé obsahy vlhkosti a popela, a dále výsledky elementární analýzy půdy fluvizemě a z ní dále extrahovaných huminových látek. Získaná hmotnostní procenta biogenních prvků z elementární analýzy byla přepočtena na atomová procenta (at. %), z důvodu podhodnocení obsahu vodíku, pokud by bylo složení uváděno v hmotnostních procentech.

Tabulka 2: *Elementární složení fluvizemě a HL, atomové poměry a obsah vlhkosti a popela*

	C	H	N	S	O	H/C	O/C	N/C	Vlhkost	Popel
	at. %								hm. %	
Půda	14,28	79,44	1,13	0,00	5,15	5,56	0,36	0,08	2,258	92,12
HK	28,08	59,07	2,98	0,00	9,86	2,10	0,35	0,11	5,248	1,472
FK	30,03	50,00	3,10	1,08	15,78	1,66	0,53	0,10	6,587	9,962
HU	8,68	85,27	3,81	0,00	2,24	9,83	0,26	0,44	7,221	79,12

Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tabulce 2, tak HL izolované z fluvizemě jsou tvořené převážně uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a v nižším zastoupení i dusíkem. Lze si povšimnout, že fluvizem, ze které se extrahovaly HL, tvoří převážně minerální podíl a pouze menšinové zastoupení představují humifikované huminové látky případně i ostatní organická hmota, která se nachází v různých fázích dekompozice. Jedině u fulvinových kyselin bylo zaznamenáno zastoupení organické síry, která představuje navázané sulfonové funkční skupiny, jež mají obvykle původ v mikrobiální aktivitě půdních mikroorganismů. Huminy obsahují největší podíl N, následovaný FK a nejméně dusíkem substituovanými HK, což může být výsledkem biologického rozkladu bílkovinných residuí, kde si v závěru HU dusík ponechaly, zatímco HK dusík víceméně ztratily.

Elementární složení je významným ukazatelem průběhu humifikace, oxidace a stupně kondenzace, jež lze odhadnout z atomových poměrů H/C, O/C a N/C. Tyto atomové poměry ukazují počet atomů vodíku, kyslíku a dusíku, které připadají v molekule HL na atomy uhlíku. Proto na základě zvýšení atomového poměru H/C lze usuzovat, že dochází ke zvýšení podílu alifatických fragmentů a snížení aromatů v molekule HL. Indikátorem aromaticity, kondenzace, a tedy i koncentrace nenasycených fragmentů je atomový poměr H/C, který udává obohacení uhlíku vodíkem, a tudíž i celkovou strukturu HL. Jinými slovy, čím nižší je poměr H/C, tím vyšší je stupeň aromaticity a kondenzace. Tento poměr H/C dosahuje nejvyšší hodnoty v případě huminu, který následují HK a FK. Velmi často se tvrdí, že HK mají poměr H/C nižší na rozdíl od FK, avšak v tomto případě byl tento poměr vyšší o 0,44 u FK než u HK, což může být způsobeno v důsledku použité půdní matrice, která upřednostňuje genezi FK v průběhu humifikace. Další vysvětlení může být takové, že poměr H/C nezávisí pouze na aromátech, ale i na dalších stavebních jednotkách organických sloučenin, které tvoří strukturu HL.

Fulvinové kyseliny obsahují nejvíce polárních funkčních skupin, kam zpravidla řadíme karboxylové, –OH fenolické, karbonylové a amidové skupiny, což svědčí i o jejich vysoké reaktivitě v porovnání s ostatními frakcemi HL. Díky těmto funkčním skupinám mohou tyto frakce HL hrát klíčovou roli např. při výživě rostlin, imobilizaci polutantů atd. Pokud bychom měli v krátkosti shrnout dosažené výsledky fokusované na tento atomový poměr O/C, tak lze bez jakéhokoliv zaváhání konstatovat, že právě nejvíce substituovanými frakcemi HL polárními funkčními skupinami jsou FK. Jinými slovy, tyto frakce HL se vyznačují nejvyšší mírou oxidace v porovnání s ostatními HL. V této souvislosti je dobré říci, že tyto závěry jsou ve velmi dobré shodě s výsledky celkové, karboxylátové potažmo fenolické kyselosti.

Atomový poměr N/C poskytuje měřítko stupně zralosti, udává stupeň zabudování dusíku do HL, a tudíž nepřímou reflektuje tzv. stupeň humifikace. V případě poměru N/C jsou nejméně humifikované FK a výrazně nejvíce humifikované jsou huminy. Nicméně, toto srovnání má spíše aspekt odhadu zralosti HL, než-li faktické srovnání stupně humifikace, které je odrazem obsahu aromatických stavebních jednotek ve struktuře HL. Z těchto výsledků však vyplývá, že všeobecně uznávaný názor, že nerozpustné frakce HL tj. HU jsou tvořeny převážně kondenzovanými strukturami je poněkud zavádějící. Toto tvrzení lze podpořit výsledky z elementární a TG analýzy, jakož to i FTIR spektrometrie, kde je vidět, že tyto frakce jsou spíše tvořeny bílkovinnými residui sorbovanými na minerální částice např. vysoký obsah popela, vysoký poměr N/C a přítomnost absorpčních pásů při 1660 cm^{-1} a 1540 cm^{-1} , které jsou typické pro sekundární amidové skupiny.

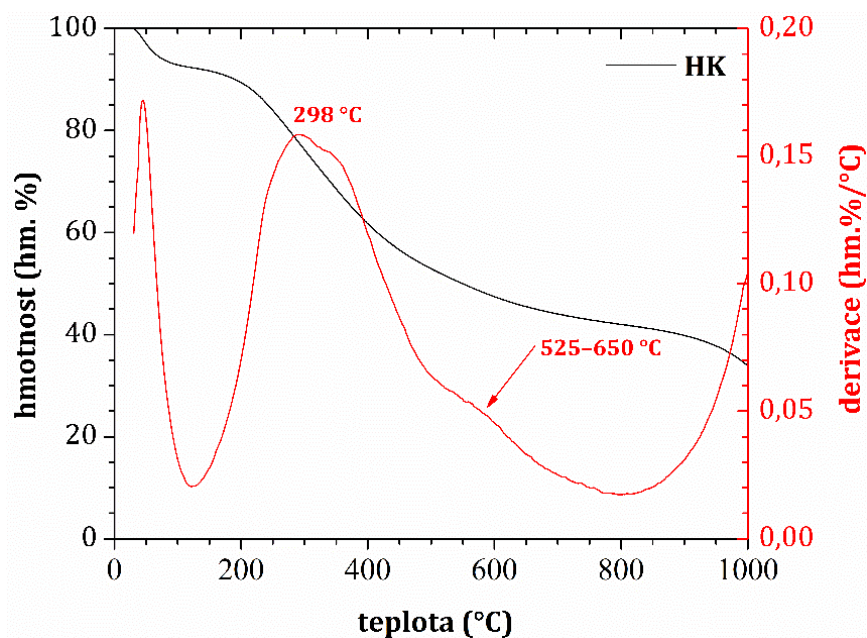
Termogravimetrickou analýzou byla zjištěna vlhkost, a také obsah popela, který tvoří pevný nespalitelný podíl. Vlhkost představuje adsorbování vzdušné vlhkosti na kyslíkaté funkční skupiny. Tudíž je zřejmé, že vlhkost bude nejvyšší v případě FK, z důvodu vyššího množství polárních funkčních skupin, které byly zjištěny jak z titrací, tak už ze zmíněného poměru O/C. Vysoký podíl nespalitelného popela je výsledkem znečištěného vzorku, tedy vzorku, který obsahuje vyšší podíl anorganických příměsí. Tyto složky tvoří převážně Si a Al a v minoritním množství například i alkalické kovy, kovy alkalických zemin nebo Fe, Ti a stopové množství těžkých kovů. Huminové kyseliny obsahují popela nejméně, což bude pravděpodobně výsledkem purifikace pomocí roztoku HF a HCl, jež tedy vedlo k účinnému odstranění anorganických látek. Avšak huminy, které tomuto purifikačnímu kroku nebyly vystaveny, mají obsah popela mnohokrát vyšší. Na základě těchto výsledků lze říci, že při izolaci jednotlivých frakcí HL je nezbytným a zároveň nepostradatelným krokem právě krok purifikace, kdy jsme schopni získat velmi „čisté“ vzorky HL, které mohou být dále analyzovány a charakterizovány. Právě obsah nespalitelného podílu tj. popela významně znesnadňuje charakterizaci organické hmoty resp. HL, a to v důsledku velmi špatné rozpustnosti těchto frakcí v 0,1 M NaOH anebo v pufrch.

Termická analýza v inertní atmosféře dusíku byla provedena k podrobnému studiu termické stability izolovaných HL. Je zřejmé, že za použití inertní atmosféry během tepelného namáhání vzorku nedochází k jeho oxidaci resp. spálení na konečné produkty tzn. H_2O , CO_2 a anorganické příměsi, ale vzorek je fakticky podroben pyrolyznímu procesu degradace. Jinými slovy, z průběhu TG resp. DTG křivky lze determinovat tepelnou stabilitu, která je obvykle spojena s procesem degradace alifatických a aromatických stavebních jednotek, případně s procesy degradace jednotlivých vazeb či funkčních skupin, jako je de-karboxylace, de-esterifikace a v neposlední řadě i degradace etherových vazeb. Proces pyrolýzy HL je obvykle spojen s výskytem jednoho maxima, které je doprovázeno více či méně zjevnými rameny při různých teplotách degradace.

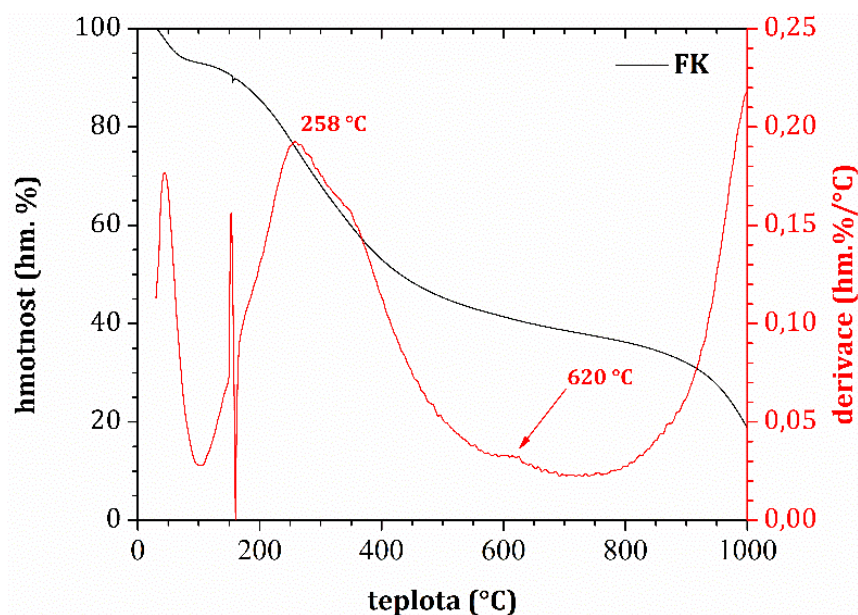
DTG křivky izolovaných HL jasně ukazují, že pyrolyzní proces je doprovázen třemi hlavními úbytky hmotnosti, které jsou umístěny v rozsahu teplot $260\text{--}300^\circ\text{C}$, $\sim 350^\circ\text{C}$ a $530\text{--}650^\circ\text{C}$. První krok představuje největší hmotnostní úbytek během pyrolyzního procesu. V ostatních teplotních intervalech mají hmotnostní úbytky podobu ramen či méně

výrazných maxim. Rozdíly mezi HK a FK jsou významné, a to zejména v poloze hlavního maxima, které bylo v případě HK lokalizováno při vyšších teplotách termální degradace. Z průběhu DTG křivek lze usoudit, že vzorek HK je v porovnání se svým protějškem charakterizován vyšší teplotní stabilitou. Jinými slovy, lze vidět, že v průběhu geneze HL jsou pro výstavbu HK upřednostňovány takové stavební jednotky, které se vyznačují vyšší tepelnou stabilitou. Tyto stavební jednotky, lze přiřadit k prekurzorům, které mají svůj původ v biopolymerních sloučeninách, jako je lignin, celulóza atd. Nižší tepelná stabilita FK je pravděpodobně otiskem mikrobiální aktivity v průběhu geneze této organické frakce, jelikož půdní mikroorganismy jsou producenty, resp. mediátory organických sloučenin, které se vyznačují jednoduššími strukturními motivy. Tyto sloučeniny se rovněž vyznačují nižší střední molekulovou hmotností.

První vrchol (hlavní pík) lze přiřadit ztrátě těkavých organických sloučenin a rozkladu nejméně stabilních organických frakcí (např. dekarboxylace organických kyselin). Na tento proces je navázána degradace polysacharidových a alifatických stavebních jednotek. Poslední vrchol či méně výrazné rameno lze přisoudit degradaci nejstabilnějších komponent HL, a to zejména aromatickým stavebním jednotkám. Tento poslední vrchol je více patrný v případě HK, a dále si lze povšimnout, že je ohraničen širším rozmezím teplot tzn. 525–650 °C. Naproti tomu FK má tento vrchol více teplotně ohraničený, a také je spojen s nižším hmotnostním úbytkem OM. Tudíž lze z tohoto vyvodit, že HK obsahují mnohem více aromatických strukturních jednotek na rozdíl od FK. Obrázky 6 a 7 ukazují TG a DTG křivku HK a FK v inertní atmosféře dusíku.



Obr. 6: TG a DTG křivka HK



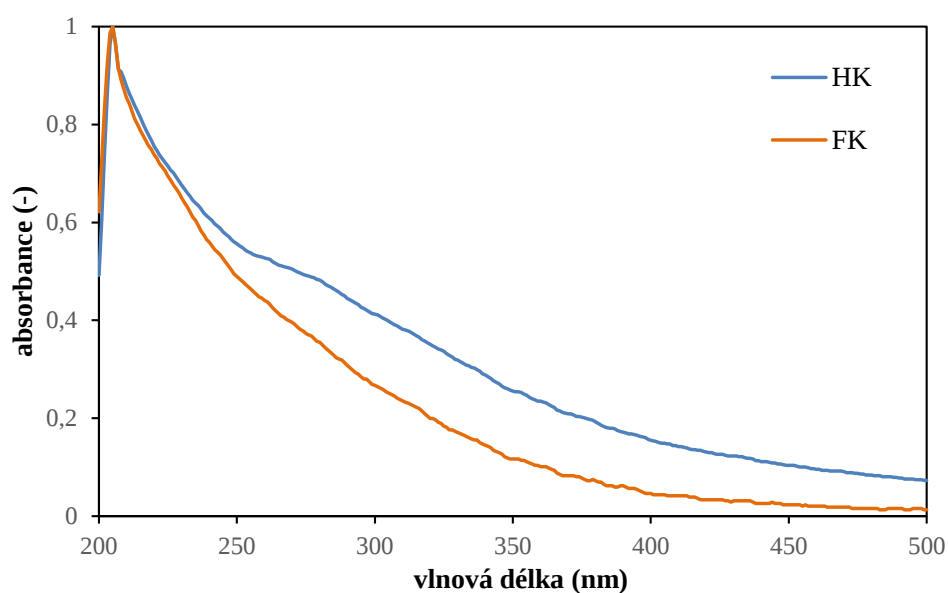
Obr. 7: TG a DTG křivka FK

5.2 UV/Vis spektrometrie

Na základě získaných absorbancí, při určitých vlnových délkách z UV/Vis spekter, byly následně vypočteny absorpční koeficienty, z kterých lze určit klíčové vlastnosti huminových látek, mezi které se řadí především aromaticita, stupeň humifikace, molekulová hmotnost či míra substituce aromatického jádra kyslíkatými funkčními skupinami. Výsledné absorpční koeficienty HK a FK jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Absorpční koeficienty HK a FK

	E_2/E_3	E_2/E_4	E_{ET}/E_{BZ}	$SUVA_{254}$
HK	2,51	5,05	0,72	6,33
FK	5,25	19,62	0,64	4,48



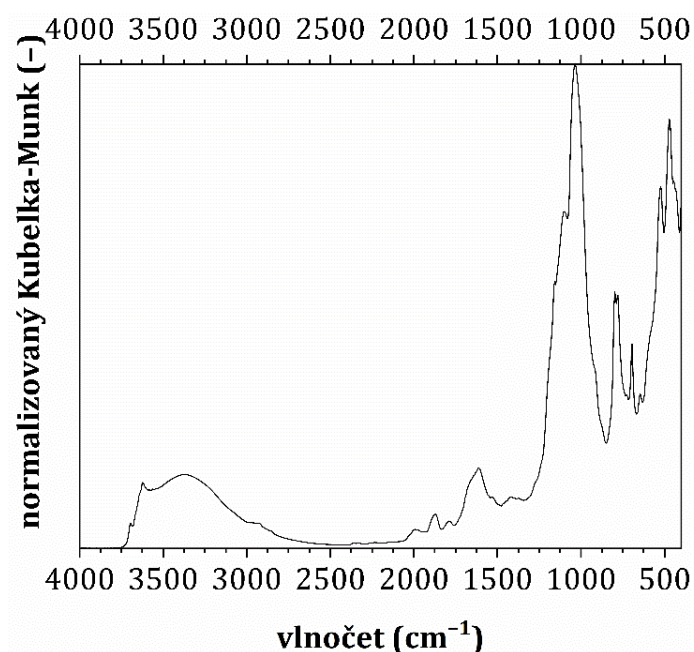
Obr. 8: UV/Vis spektrometrie pro vzorky FK a HK o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

Z Obrázku 8 je zřejmé, že absorbance má své maximum při 200 nm a dále už pouze postupně klesá. Rovněž lze z Obrázku 8 vyčíst, že k největší absorbanci dochází v UV-B a ve vzdálené UV-C oblasti elektromagnetického záření. Tudíž v UV oblasti dochází k absorbanci velkého množství chromoforů, které tvoří polycyklické aromatické uhlovodíky, fenoly, kyseliny benzoové nebo také deriváty jednoduchých organických kyselin, které mají svůj původ v degradačních produktech ligninu, či jsou přímo spojeny s metabolismem půdních mikroorganismů. Absorbance ve viditelné oblasti zahrnuje rozsáhlé četné konjugované vazby v alifatických a chinoidních strukturách či v přítomných kovových komplexech [36].

Jak z absorpčních spekter, tak i z absorpčních koeficientů je zřejmé, že vyšší aromaticitě odpovídají HK na rozdíl od FK. Absorpční koeficienty E_2/E_3 a E_2/E_4 poskytují informace o střední molekulové hmotnosti a humifikaci. Jestliže jsou tyto absorpční koeficienty nižší, což je v případě extrahovaných HK, tak struktura HL má vyšší stupeň humifikace, a také obsahuje struktury s vyšší molekulovou hmotností, v porovnání s FK. Pomocí absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{BZ} lze určit stupeň substituce kyslíkatých funkčních skupin na aromatické struktuře. Tento absorpční koeficient je mírně vyšší v případě HK, tudíž FK obsahují vyšší zastoupení navázaných alifatických řetězců na aromatickém jádře. Specifická UV absorbance zahrnuje vyjádření při jedné vlnové délce a v případě $SUVA_{254}$ se jedná o poměr absorbance při 254 nm k celkovému organickému uhlíku anebo DOC (Dissolved Organic Carbon). $SUVA_{254}$ poskytuje rovněž informace o aromaticitě. Výsledky $SUVA_{254}$ uvádí, že HK jsou více aromatické na rozdíl od FK, což je v dobré shodě s absorpčními koeficienty, a také absorpčními spektry, jež jsou znázorněny na Obrázku 8.

5.3 FTIR spektrometrie

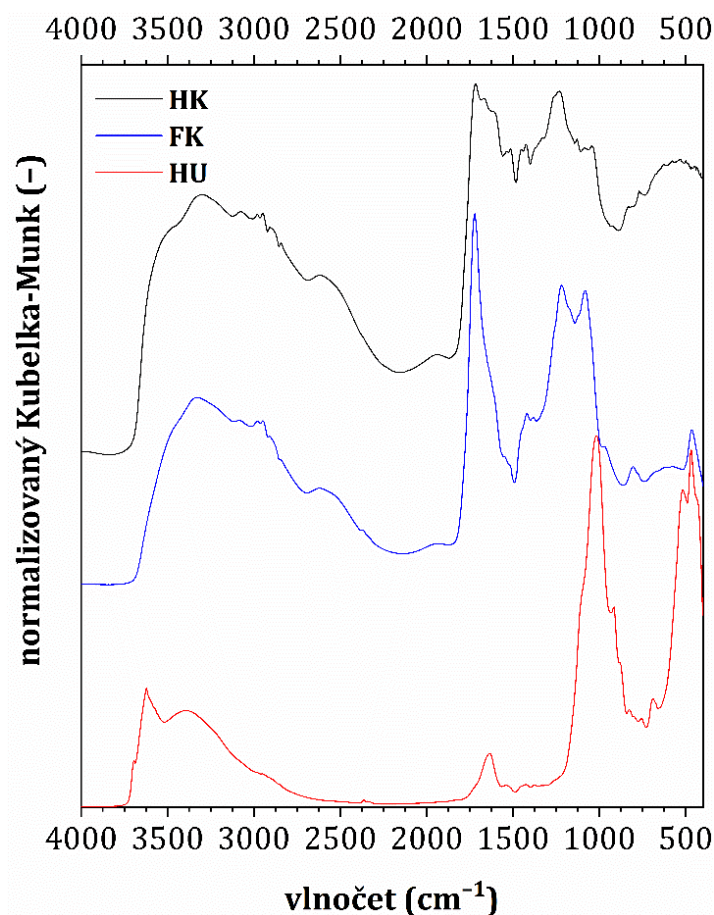
Infračervená spektra izolovaných huminových látek a půdy jsou uvedena na Obrázku 9 a 10. Všechny vzorky byly měřeny metodou difuzní reflektance (DRIFT), která má tu výhodu, že při přípravě vzorků nedochází k deprotonaci kyselých funkčních skupin, jak je tomu v případě „klasické“ metody tzn. lisování KBr tablet.



Obr. 9: FTIR-DRIFT spektrum pro vzorek fluvizemě

Infračervené spektrum DRIFT vzorků půdy je uvedeno na Obrázku 9. Široký, nicméně méně intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ je připisován valenční symetrické vibraci O–H vazeb v molekulách sorbované vlhkosti tj. H_2O . Tento absorpční pás odpovídající vlhkosti je podpořen přítomností pásu při 1640 cm^{-1} , který odpovídá valenčním vibracím O–H $\cdots$ O vazeb tvořící vodíkové můstky. V DRIFT spektru vzorku půdy byly lokalizovány absorpční pásy při 3695 cm^{-1} , 3622 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 780 cm^{-1} , 695 cm^{-1} , 523 cm^{-1} a 470 cm^{-1} , které připadají valenční vibraci Si–O, deformační vibraci Si–O–Al a Si–O–Si vazeb v kaolinitu, montmorillonitu, křemenu eventuálně jeho amorfni modifikaci, a také anionům CO_3^{2-} a PO_4^{3-} .

Specifické absorpční pásy, které by bylo možné přiřadit organickým sloučeninám, tak nebylo možné v DRIFT spektrech lokalizovat, a to zejména z důvodu překryvu těchto pásů silnou absorpcí anorganických sloučenin. Nicméně je z Obrázku 9 vidět, že v oblasti alifatických funkčních skupin tzn. $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ nastává méně výrazná absorpce, která má zde podobu méně výrazného raménka.



Obr. 10: FTIR-DRIFT spektra pro vzorek HK, FK a HU izolované z fluvizemě

V infračervených spektrech vzorku HK a FK jsou nejintenzivnějšími absorpčními pásy ty, které byly lokalizovány při $1720\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$. Výše zmíněné pásy odpovídají valenční symetrické vibraci $\text{C}=\text{O}$ vazeb v karboxylových skupinách. Tento absorpční pás je rovněž potvrzen dalšími absorpčními pásy při 2600 cm^{-1} , 1226 cm^{-1} a 1211 cm^{-1} , které lze přiřadit valenční symetrické vibraci $\text{O}-\text{H}$ vazeb (tvořící dimery COOH) a valenční symetrické vibraci $\text{C}-\text{O}$ vazeb v karboxylových funkčních skupinách. V případě HK lze tento pás rovněž připsat valenční symetrické vibraci $\text{C}-\text{C}-\text{O}$ vazeb v aryl-esterech.

Vyjma vzorku izolovaného huminu byly ve všech ostatních spektrech lokalizovány absorpční pásy při 3080 cm^{-1} , které jsou velmi dobrým indikátorem aromatických sloučenin resp. Ar stavebních jednotek. Tento vibrační mód souvisí s valenční symetrickou vibrací $\text{C}-\text{H}$ vazeb v Ar konstitučních jednotkách. V případě vzorku HK byla tato hypotéza podpořena dalšími pásy, a to při hodnotách vlnočtů 1612 cm^{-1} a 1511 cm^{-1} , které odpovídají valenční symetrické vibraci $\text{C}=\text{C}$ vazeb v Ar jednotkách. Nicméně, tyto absorpční pásy byly u ostatních vzorků překryty významnou absorpcí strukturních motivů karboxylových kyselin a sorbované vlhkosti.

Dalšími absorpčními pásy jsou ty, jejichž specifické hodnoty absorpce jsou lokalizovány při 2980 cm^{-1} , 2945 cm^{-1} a 2840 cm^{-1} a ve skutečnosti je lze přiřadit asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím $\text{C}-\text{H}$ vazeb v $-\text{CH}_3$ a $-\text{CH}_2-$ funkčních skupinách. V infračerveném spektru HU měly tyto absorpční pásy podobu méně výrazných ramének, a to

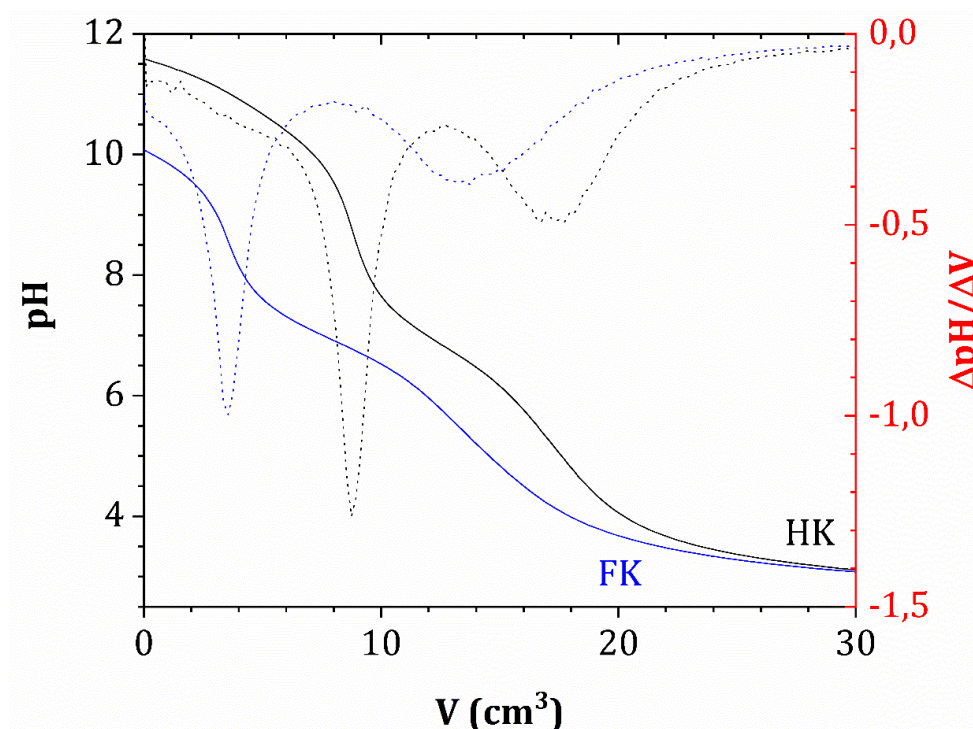
z důvodu silné absorpce anorganických příměsí v tomto vzorku. Strukturní motivy odpovídající alifatickým sloučeninám lze spatřit i v dalších absorpčních pásech, které se vyskytovaly v oblasti otisku palce tzn. fingerprintu ($1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Jedná se zejména o absorpční pásy lokalizované při 1450 cm^{-1} a 1380 cm^{-1} , které lze bez jakéhokoliv zaváhání přiřadit deformačním vibracím C–H vazeb v methylových a methylenových funkčních skupinách. V případě vzorku HU byl nalezen pouze absorpční pás při 1380 cm^{-1} , který je spjat s deformační symetrickou vibrací C–H vazeb v --CH_3 skupinách. Dále byl u vzorku HK lokalizován absorpční pás při 1130 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci C–O–C vazeb v aryl-etherech. Tento absorpční pás měl v případě FK povahu méně výrazného ramene, avšak jeho přítomnost je doplňující informací o struktuře této rozpustné frakce HL. Velmi široký a intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnočtů $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ je poměrně nespecifický, a to zejména z důvodu, že tento absorpční pás odpovídá jak absorpci O–H a N–H vazeb v alkoholech, karboxylových kyselinách a amidech, tak i sorbované vlhkosti. Nicméně přítomnost polysacharidových residuí je odhalena absorpčním pásem při $1045\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$, který lze připsat valenční symetrické vibraci C–O vazeb ve výše zmíněných strukturách, jako jsou alkoholové funkční skupiny.

Poměrně cenným výsledkem je lokalizace absorpčních pásů odhalujících přítomnost bílkovinných residuí ve struktuře HK a FK, v nichž dominantněji tyto pásy manifestují v případě HK. Jedná se o absorpční pásy při 1660 cm^{-1} a 1540 cm^{-1} , které odpovídají C=O a N–H valenční vibraci v sekundárních amidech, a také deformační vibraci C–N ve stejných strukturních motivech. Tyto absorpční pásy byly nejdominantnějšími v případě vzorku HU, a tedy se můžeme domnívat, že vzorky huminů jsou tvořeny převážně bílkovinnými sloučeninami sorbovanými na anorganické částice.

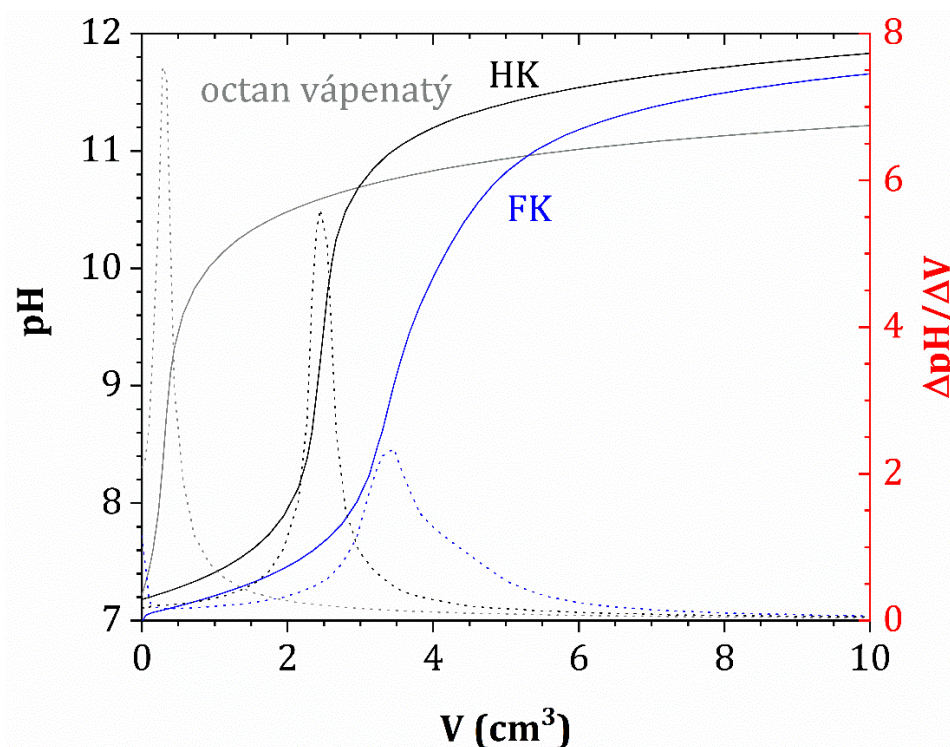
5.4 Potenciometrické titrace

V důsledku různých typů funkčních skupin, které uplatňují funkci vazebných míst pro různé výživové prvky anebo kovové ionty, dochází u HL k výměnné sorpci kationtů či aniontů. Mezi hlavní vazebná místa se řadí funkční skupiny obsahující kyslík, kde dominantní zastoupení těchto reaktivních míst tvoří karboxylové a fenolické skupiny. Tudíž stanovení koncentrace anebo obsahu těchto funkčních skupin může poskytnout informace o kyselosti huminových a fulvinových kyselin. Avšak pro vazbu kationtů mohou být důležité i méně početně zastoupené funkční skupiny, které jsou tvořeny dusíkem a sírou.

Na Obrázku 11 je grafické znázornění potenciometrických titračních křivek huminové a fulvinové kyseliny při zpětné titraci. HK či FK byla nejdříve rozpuštěna ve zředěném roztoku NaOH, kde část NaOH se spotřebovala na vznik soli huminových nebo fulvinových kyselin, resp. k deprotonaci kyselých funkčních skupin, jimiž jsou tyto biokoloidní sloučeniny bohatě substituovány. Nejdříve tedy dochází přidávkem titračního činidla HCl ke „ztitrování“, lépe řečeno ke zpětnému naprotonování HK či FK. Dále je samozřejmě titrován i nezreagovaný roztok NaOH. Následně lze z rozdílů jednotlivých spotřeb stanovit tzv. celkovou kyselost HL.



Obr. 11: Zpětná titrace HK a FK



Obr. 12: Karboxylátová titrace HK a FK

Obrázek 12 ilustruje průběh karboxylátové titrace, která probíhala v přítomnosti octanu vápenatého. Karboxylátová titrace probíhá na principu výměny iontů mezi fulvinovou či huminovou kyselinou a octanem vápenatým. Touto výměnou docházelo ke vzniku kyseliny octové, která byla následně titrována NaOH. Pro získání karboxylátové kyselosti byla jako v předchozím případě titrační křivka derivována, a to zdůvodu zjištění maxima odpovídajícího určitému objemu použitého titračního činidla. Vzniklý rozdíl mezi blankem a

uvolněnou kyselinou octovou, v důsledku naprotonování HK nebo FK, vedl k výpočtu karboxylátové kyselosti.

Vyhodnocení zpětné a karboxylátové titrace vedlo ke zjištění celkové a karboxylátové kyselosti. Následným dopočítáním byla zjištěna fenolická kyselost. Jednotlivé zastoupení kyselých funkčních skupin u HK a FK je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: *Karboxylátová, fenolická a celková kyselost HK a FK izolovaných z fluvizemě.*

	kyselost [mmol·g ⁻¹]		
	karboxylátová	fenolická	celková
HK	2,2	6,4	8,6
FK	3,5	6,7	10,2

Jak je zřejmé z Tabulky 4, tak FK mají vyšší zastoupení karboxylových i fenolických skupin, tudíž celková kyselost je vyšší než v případě HK. V obou případech měření byla fenolická kyselost výrazně vyšší na rozdíl od kyselosti přispěné karboxylovým funkčním skupinám.

6 ZÁVĚR

Informace o celkové charakterizaci huminových látek v jednotlivých půdách jsou velmi vzácné. Právě díky těmto informacím můžeme předpovědět, jak tyto sloučeniny působí na zlepšení chemických, fyzikálních a biologických vlastností substrátu, v němž se rostliny vyvíjejí, a tím i zvýšit jejich produktivitu. Rovněž znalost strukturních rysů HL je nezbytná k vysvětlení mechanismu humifikace v různých půdách a z toho důvodu hrají klíčovou roli v otázkách životního prostředí. Cílem této bakalářské práce tedy bylo nejdříve získat jednotlivé frakce HL podle postupu IHSS a následně tyto extrahované látky charakterizovat pomocí elementární a termogravimetrické analýzy, UV/Vis a FTIR spektrometrie a potenciometrických titrací. Vybraná půda, jež je taxonomicky klasifikována jako Fluvizem, se nachází v okolí řek a potoků, kde dochází k periodickému zaplavování, a právě tyto podmínky podporují tvorbu fulvinových kyselin. Z toho důvodu byl extrahován relativně vysoký výtěžek FK. Rovněž byly dle postupu IHSS získány huminy a huminové kyseliny.

Pomocí elementární a termogravimetrické analýzy bylo zjištěno přesné zastoupení biogenních prvků v HL a z těchto údajů byly dále vypočteny atomové poměry. Atomový poměr N/C vyhodnotil FK jako nejméně humifikované a huminy výrazně nejvíce humifikované. Avšak tímto atomovým poměrem nelze odhadnout stupeň humifikace, ale spíše byla získána představa o zralosti HL. S příspěvkem TG analýzy a FTIR spektrometrie bylo zjištěno, že HU je tvořen převážně minerálními částicemi, na kterých jsou navázány bílkovinná residua. Z atomového poměru O/C byl stanoven obsah polárních funkčních skupin, a tedy stupeň oxidace, který je nejvyšší v případě FK. Tento výsledek je podpořen výsledky potenciometrických titrací, které uvádí, že fulvinové kyseliny mají vyšší zastoupení jak karboxylových, tak i fenolických funkčních skupin v porovnání se svým protějškem HK.

Vyhodnocením atomového poměru H/C bylo zjištěno, že FK obsahují více aromatických struktur na rozdíl od HK, které jsou více alifatické. Tento výsledek byl vyvrácen termogravimetrickou analýzou, a také UV/Vis spektrometrií, která poskytla mnohem přesnější informace v oblasti aromaticity. Možné vysvětlení může být takové, že poměr H/C nezávisí pouze na aromátech, ale na všech stavebních jednotkách tvořících HL. Z vypočtených absorpčních koeficientů UV/Vis spektrometrie byla zjištěna rovněž vyšší molekulová hmotnost u HK a vyhodnocením absorpčních pásů v infračervených spektrech HK a FK byla získána představa o obsahu jednotlivých stavebních kamenů a jejich funkčních skupinách. Termická analýza v inertní atmosféře svědčí o vyšší tepelné stabilitě HK, tudíž lze předpokládat, že mezi prekurzory HK se řadí biopolymerní sloučeniny na rozdíl od FK, na jejichž výstavbě se budou podílet jednodušší organické sloučeniny.

Spojením všech zmíněných termických a spektrálních metod si lze představit hrubou strukturu a z toho dále vyplývající reaktivitu huminových látek, avšak přispěním dalších metod by bylo možné získat hlubší povědomí o přesné struktuře a charakteru HL. Mezi další metody by bylo možné zařadit například fluorescenční nebo ^{13}C NMR spektrometrii. Pro lepší pochopení úlohy organické hmoty v přírodním prostředí by bylo dále dobré se zabývat studiem půdního roztoku anebo tzv. půdního gelu, který je kapilárně uvolňován z půdních

agregátů při dostatečném množství srážek. Tento půdní anebo i jiný roztok obsahující půdní organickou hmotu a HL by odpovídal reálným podmínkám, které panují v různých ekosystémech, tudíž by docházelo k minimalizaci kyselé a alkalické hydrolýzy jednotlivých stavebních kamenů při izolaci IHSS a rovněž by byla zachována mikrobiota v půdním roztoku.

7 LITERATURA

- [1] ŠIMEK, Miloslav. *Živá půda*. Praha: Academia, 2019. ISBN 978-80-200-2976-8.
- [2] BARNHARD, Tracy. Inorganic & Organic Components in Soil. *Sciencing* [online]. 2017 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://sciencing.com/sediment-affect-ecosystems-6393377.html>.
- [3] FENTON, Megan, Carl ALBERS a Quirine KETTERINGS. Soil organic matter. *Agronomy fact sheet series* [online]. 2008, (41) [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <http://franklin.cce.cornell.edu/resources/soil-organic-matter-fact-sheet>.
- [4] KOSOBUECKI, Przemyslaw a Boguslaw BUSZEWSKI. Natural Organic Matter in Ecosystems - a Review. *Nova Biotechnologica et Chimica* [online]. 13-2. 2014, s. 110-111. [cit. 2021-12-08]. DOI:10.1515/nbec-2015-0002.
- [5] GALIĆ, Zoran. Properties of fluvisol and humofluvisol in defended part of alluvial zone in Middle Danube [online]. Institute of Lowland Forestry and Environment [online]. 04. 03. 2010, 4-8 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: https://www.seefor.eu/images/arhiva/vol1_no1/galic1_2010.pdf.
- [6] KERCHEVA, Milena, Zofia SOKOŁOWSKA, Mieczysław HAJNOS, Kamil SKIC a Toma SHISHKOV. Physical parameters of Fluvisols on flooded and non-flooded terraces [online]. 2017, 73-82 [cit. 2022-02-18]. DOI:10.1515/intag-2016-0026.
- [7] Taxonomický klasifikační systém půd ČR: Půdní typy, subtypy, variety [online]. In: Brandýs nad Labem: Ústav pro hospodářskou úpravu lesů [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: http://www.uhul.cz/images/typologie/taxonomicky_klasifikacni_system_pud_v_cr.pdf.
- [8] ANJOS, L., C. GAISTARDO, J. DECKERS, et al. Orld reference base for soil resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps [online]. Rome, 2015 [cit. 2022-02-18]. ISBN 978-92-5-108369-7. Dostupné z: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC91947>.
- [9] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Fluvisol. *Britannica* [online]. 2011 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Fluvisol>.
- [10] What are humic substances. *International Humic Substances Society* [online]. 2007 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://humic-substances.org/what-are-humic-substances-2/>.
- [11] Huminové látky. *Enviproduct* [online]. [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://www.enviproduct.cz/huminove-latky>.
- [12] VESELÁ, Lenka, et al. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* [online]. 2005, roč. 99, s. 711-717 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf. ISSN 1213-7103.
- [13] O huminových látkách. *IHSS Česká republika* [online]. Brno, 2008 [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: <http://ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>.

- [14] PETTIT, Robert E. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health. *CTI Research* [online]. 2004, 10: 1-7 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://humates.com/wp-content/uploads/2020/04/ORGANICMATTERPettit.pdf>.
- [15] VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík: Humus-půda-rostlina (2) Humus a půda. *Biom.cz* [online]. 2006-11-14 [cit. 2021-12-08]. ISSN: 1801-2655. Dostupné z: <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-2-humus-a-puda>.
- [16] SKOKANOVÁ, Marianna, Katarína DERCOVÁ. Huminové kyseliny. Původ, struktura. *Chemické listy* [online]. 2008(102), s. 262-268 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2008_04_262-268.pdf.
- [17] WEBER, Jerzy. Soil humic substances: Properties of humic substances. *Jerzy Weber's Homepage* [online]. [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/kwasy2.htm>.
- [18] STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [19] MCDONALD, Suzanne, et al. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2004, 527.2: 105-124 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.011>.
- [20] DE MELO, Bruna Alice Gomes, Fernanda Lopes MOTTA a Maria Helena Andrade SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2016, 62, s. 967-974 [cit. 2021-12-08]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001.
- [21] HAVELCOVÁ, Martina, Jiří MIZERA, Vladimír MACHOVIČ, Oldřich PŘIBYL, Lenka BORECKÁ a Ivana KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy* [online]. 2011(105), s. 913-917 [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_12_913-917.pdf.
- [22] SCHNITZER, Morris a Carlos MONREAL. Quo Vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification *Elsevier* [online]. 2011, s. 143-217 [cit. 2021-12-08]. Advances in Agronomy. ISBN 9780123864734. DOI:10.1016/B978-0-12-386473-4.00003-8.
- [23] OUNI, Y., T. GHNAYA, F. MONTEMURRO, CH. ABDELLY a A. LAKHDAR. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production* [online]. 2014, 8(3), s. 353-374 [cit. 2022-01-24]. DOI: 10.22069/ijpp.2014.1614.
- [24] WEBER, Jerzy. The formation of humic substances. *Jerzy Weber's Homepage* [online]. [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>.
- [25] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances. *Soil science* [online]. 2001, 166.11: 810-832 [cit. 2022-01-25]. Dostupné z: https://journals.lww.com/soilsci/Abstract/2001/11000/THE_SUPRAMOLECULAR_STRUCTURE_OF_HUMIC_SUBSTANCES.7.aspx.

- [26] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2005, 3(1), s. 13-24. [cit. 2022-01-24]. DOI: 10.32725/jab.2005.002. ISSN 12140287.
- [27] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Elsevier* [online]. 2002, 75, s. 57-134 [cit. 2022-01-24]. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
- [28] SEMENOV, V. M., et al. Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: A review. *Eurasian Soil Science* [online]. 2013, 46.4: 355-368 [cit. 2022-01-25]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1134/S106422931304011X>.
- [29] Ammonium Humate. Saint Humic Acid [online]. 11. 06. 2017 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.humicacidinc.com/humic-acids/ammonium-humate/>.
- [30] Potassic and sodium salts. *Humatex* [online]. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <http://www.humatex.cz/en/general-information/potassic-and-sodium-salts>.
- [31] Calcium humate. *Sincerechemical* [online]. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.sincerechemical.com/product/calcium-humate>.
- [32] ESHWAR, M., et al. Characterization of humic substances by functional groups and spectroscopic methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2017, 6(10), 1768-1774 [cit. 2022-03-04]. DOI:10.20546/ijcmas.2017.610.213.
- [33] ZHANG, Yaoling, et al. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* [online]. 2011, 93.3: 220-227 [cit. 2022-03-04]. DOI: 10.1016/j.ecss.2010.12.025.
- [34] SHIRSHOVA, Ludmila Timofeevna; GHABBOUR, Elham A.; DAVIES, Geoffrey. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma* [online]. 2006, 133.3-4: 204-216. [cit. 2022-03-04]. DOI: 10.1016/j.geoderma.2005.07.007.
- [35] XU, Jisheng, et al. Chemical nature of humic substances in two typical Chinese soils (upland vs paddy soil): A comparative advanced solid state NMR study. *Science of the Total Environment* [online]. 2017, 576: 444-452 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.118>.
- [36] GIOVANELA, M., et al. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2010, 981.1-3: 111-119 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286010006356>.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

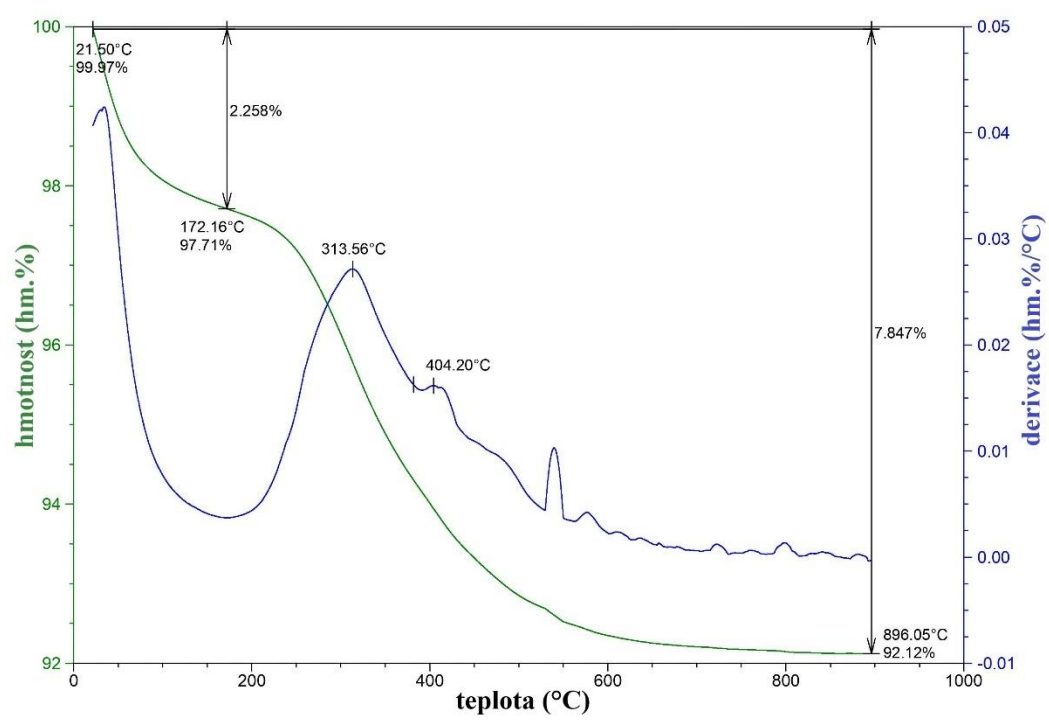
8.1 Seznam zkratk

DOM	rozpuštěná organická hmota (Dissolved Organic Matter)
DTG	derivační termogravimetrie
EA	elementární analýza
FK	fulvinové kyseliny
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
HU	humín
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum humínových látek (International Humic Substances Society)
NOM	přírodní organická hmota (Natural Organic Matter)
OM	organická hmota (Organic Matter)
SOM	nerozpuštěná organická hmota (Suspended Organic Matter)
TGA	termogravimetrická analýza
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření
UV-B	středněvlnné ultrafialové záření
UV-C	krátkovlnné ultrafialové záření

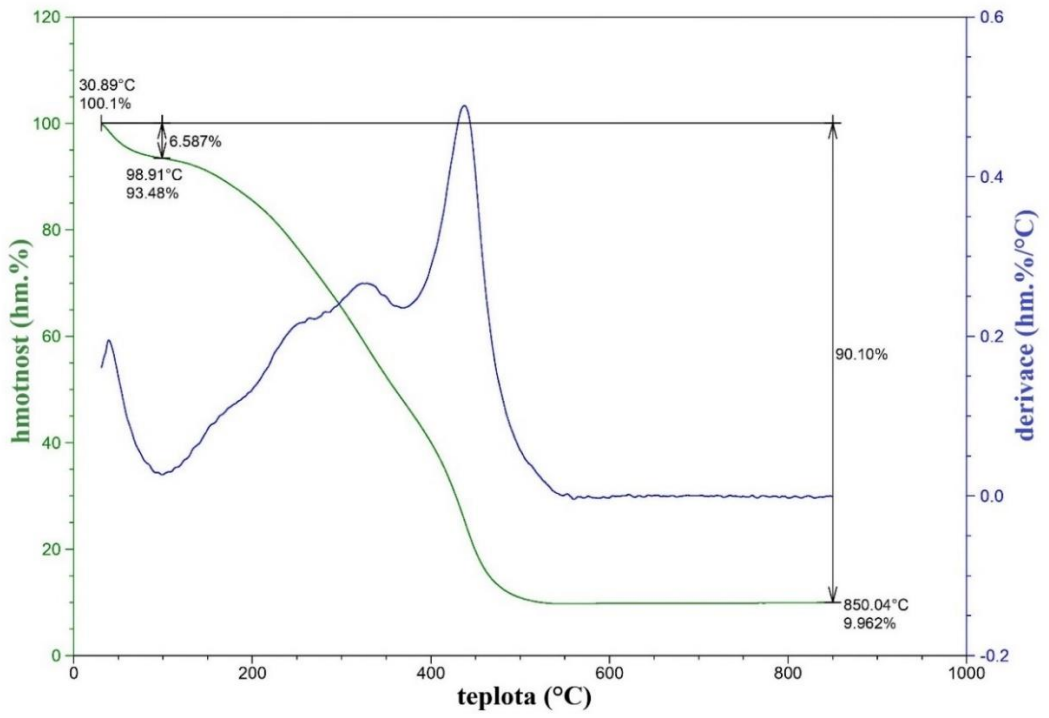
8.2 Seznam symbolů

At. %	složení v atomových procentech
E_2/E_3	poměr absorbancí při vlnových délkách 250 nm a 365 nm
E_2/E_4	poměr absorbancí při vlnových délkách 265 nm a 465 nm
E_{ET}/E_{BT}	poměr absorbancí při vlnových délkách 253 nm a 220 nm
Hm. %	složení v hmotnostních procentech
$\overline{M}_r$	relativní molekulová hmotnost
SUVA ₂₅₄	specifická UV absorpce při vlnové délce 254 nm

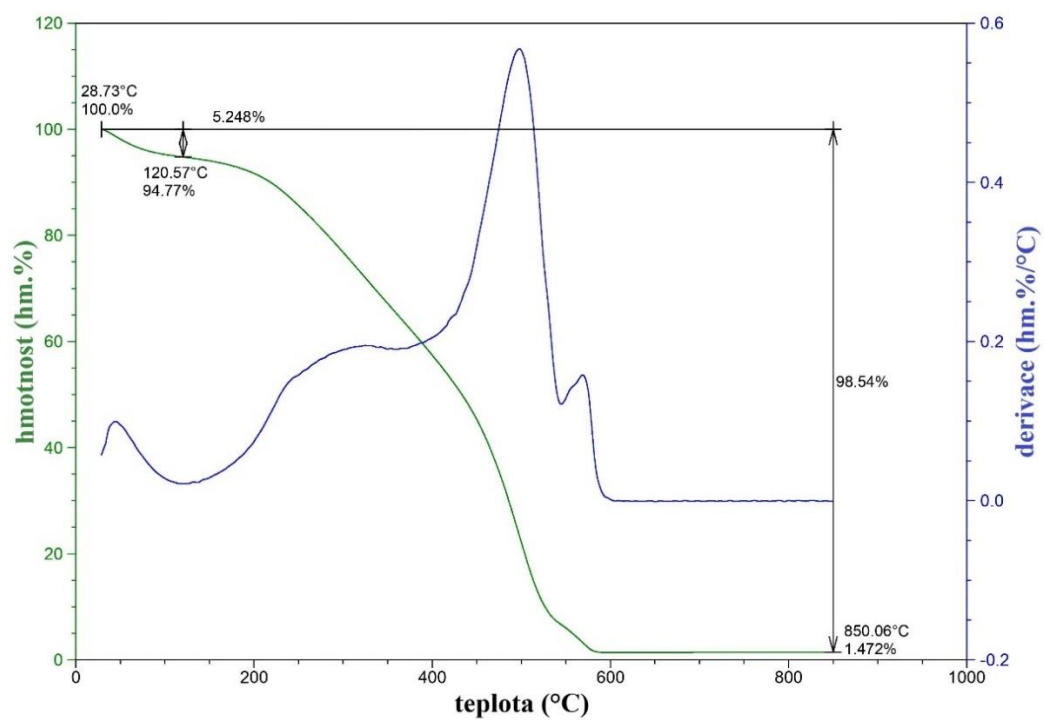
PŘÍLOHY



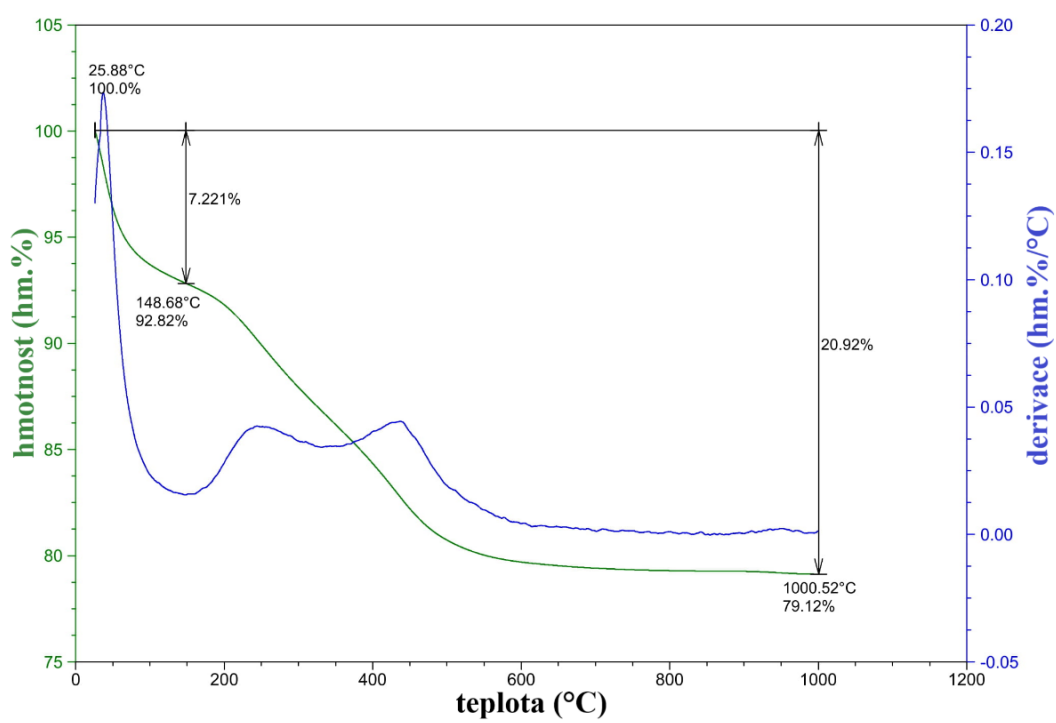
Příloha 1: TGA fluvizemě



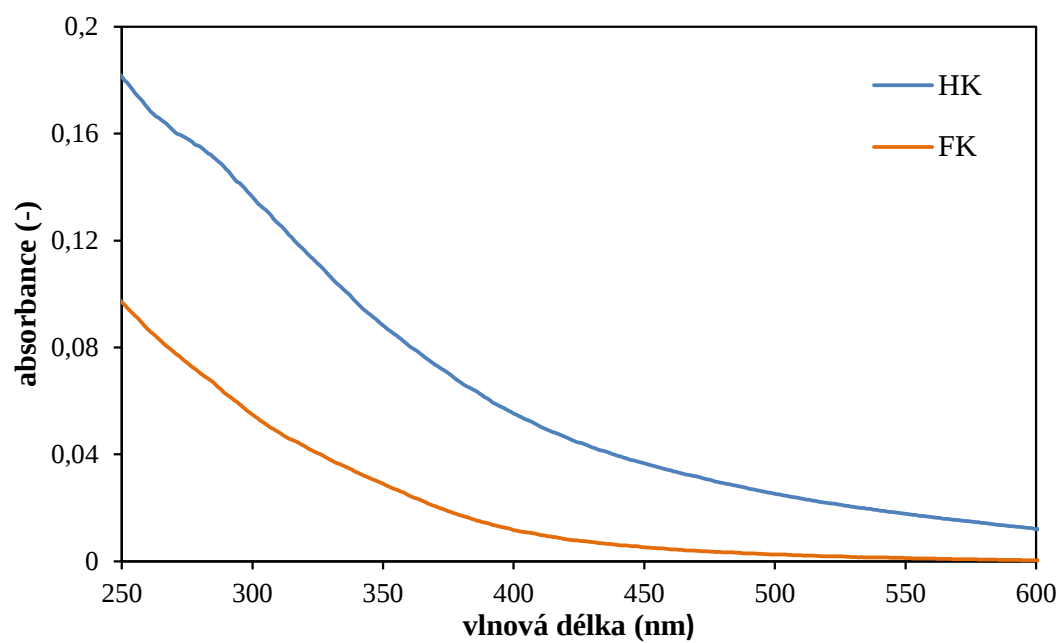
Příloha 2: TGA FK



Příloha 3: TGA HK



Příloha 4: TGA HU



Příloha 5: UV/Vis spektrometrie pro vzorek FK a HK o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$