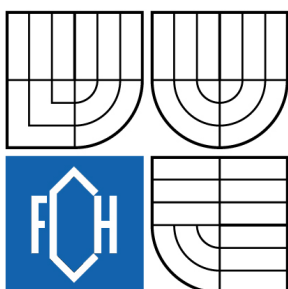




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM HUMINOVÝCH A FULVINOVÝCH KYSELIN EXCITAČNĚ EMISNÍ METODOU

STUDY OF HUMIC AND FULLVIC ACIDS BY EXCITATION EMISSION MATRIX METHOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

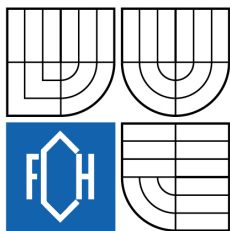
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

VOJTĚCH ENEV

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. NADĚŽDA FASUROVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0253/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Vojtěch Enev	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Studium huminových a fulvinových kyselin excitačně emisní metodou

Zadání bakalářské práce:

Měření fluorescence huminových a fulvinových kyselin a následné zpracování naměřených dat v programu Origin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Vojtěch Enev
Student(ka)

Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce byla zaměřena na měření fluorescence metodou EEM a na nalezení hlavních fluoroforů půdních vzorků huminových a fulvinových kyselin. Výsledky pozice hlavního píku fulvokyseliny izolované z půdy typu Kambizem byly porovnány a byly podobné s pozicí standardu FA Elliot II. Dále byla použita synchronní metoda 3D SFS k určení vedlejšího píku vzorků fulvokyselin v oblasti nízkých vlnových délek.

ABSTRACT

A bachelor thesis was focused on fluorescence measurement by emission-excitation matrix method (EEM) and finding of the main fluorophores of soil humic and fulvic acids samples. The results of the position of the main peak of fulvic acid isolated from soil type Cambisol were compared and were similar to the position of Elliot soil FA standard II. For determining of secondary peaks of fulvic acids the synchronous method (3D SFS) at lower wavelengths was used.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové kyseliny, fulvinové kyseliny, fluorescence, EEM, 3D SFS.

KEYWORDS

Humic acids, fulvic acids, fluorescence, EEM, 3D SFS.

ENEV, V. *Studium huminových a fulvinových kyselin excitačně emisní metodou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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.

.....
Vojtěch Enev

Děkuji své vedoucí bakalářské práce Mgr. Naděždě Fasurové, Ph.D za poskytnutí cenných rad a připomínek. Děkuji dále všem, kteří mi věnovali svůj čas.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Huminové látky	8
2.2	Původ a prekuzory huminových látek	8
2.3	Rozdělení huminových látek	9
2.3.1	Huminové kyseliny	9
2.3.2	Fulvokyseliny	10
2.3.3	Humin	10
2.4	Půdní humus	11
2.4.1	Humusotvorný materiál	11
2.4.1.1	Pochody přeměn humusotvorného materiálu	11
2.4.2	Humifikace	11
2.5	Použití huminových látek	13
2.5.1	Zemědělství	13
2.5.2	Životní prostředí	13
2.5.3	Další použití	14
2.5.3.1	Medicína	14
2.6	Půdní typy v ČR	14
2.6.1	Půdní kategorie	15
2.6.2	Půda Elliott	16
2.7	Luminiscence	16
2.7.1	Měření fluorescence	17
2.7.2	Fluorescenční spektra	17
2.8	Literární rešerše	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Příprava vzorků	23
3.1.1	Použité chemikálie	23
3.1.2	Použité vzorky huminových látek	23
3.1.2.1	Popis půdního profilu kambizemě Vatín	24
3.1.3	Použité přístroje a metody	24
3.1.4	Příprava roztoků huminových a fulvinových kyselin	24
3.1.5	Příprava roztoku hydroxidu sodného	25
3.1.6	Extrakce huminových látek	25
3.1.6.1	Extrakce huminových kyselin z půd	25
3.1.6.2	Extrakce fulvinových kyselin z půd	25
3.2	Fluorescenční spektroskopie	25
3.2.1	Instrumentace	25
3.2.2	Pracovní postup	26
3.2.2.1	Podmínky měření	26
3.2.2.2	Seznámení s technikou přístroje Aminco Bowman Series 2	26
3.2.2.3	Měření vzorků	26
3.2.2.4	Zpracování spektrálních dat	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28

4.1	Fluorescenční spektroskopie huminových látek	28
4.1.1	Vzorek huminové kyseliny a humátu pocházejících z lignitické matrice	28
4.1.1.1	Měření vzorku lignitické huminové kyseliny.....	29
4.1.2	Vzorek humátu 04/06	31
4.1.2.1	Měření vzorku humátu 04/06	31
4.1.3	Závěr.....	33
4.1.4	Vzorky fulvinových kyselin	34
4.1.4.1	Měření vzorku standardu fulvinové kyseliny Elliott Soil II (2S102F).....	34
4.1.4.2	Závěr.....	35
4.1.4.3	Měření vzorku půdní fulvinové kyseliny	36
4.1.4.4	Závěr.....	38
4.1.5	Vzorek huminové kyseliny.....	39
4.1.5.1	Měření vzorku půdní huminové kyseliny.....	39
4.1.5.2	Závěr.....	41
5	ZÁVĚR.....	42
6	LITERATURA.....	43

1 ÚVOD

Huminové látky obsahují ve své struktuře fluoroformní skupiny, které tvoří fenolické a jiné aromatické substituované systémy, které jsou po excitaci schopny emitovat záření. Ke studiu huminových látek lze využít s výhodou měření fluorescence, jelikož výsledná spektra obsahují píky s maximální intenzitou které odpovídají hlavním fluoroformním skupinám. Výsledky pozic excitační a emisní vlnové délky píků lze porovnávat podle typu matrice ze které byly huminové látky izolovány a také lze porovnávat huminové a fulvinové kyseliny, jejichž fluorescenční chování je rozdílné. Měření fluorescence je citlivá metoda z hlediska možnosti měření poměrně nízkých koncentrací vzorku. V předložené práci byla využita fluorescenční metoda určení hlavních píků lignitických a půdních huminových látek v emisně excitačním modu (EEM=Excitation emission matrix). V případě dvou vzorků byla maxima určena pomocí druhé metody 3D SFS (Synchronous fluorescence spectroscopy), jelikož první metodou nebylo možno tyto píky určit z důvodu přítomnosti rozptylu světla ve spektru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Huminové látky jsou již po řadu desetiletí předmětem intenzivního vědeckého zájmu, který vychází zejména z jejich výhodně využitelných chemických a fyzikálních vlastností. [1] První publikace o huminových kyselinách se objevují již koncem 19. století. Větší zájem o jejich studium, výzkum a využití však nastává až v 60. a potom 80. letech 20. století. Huminové látky vzhledem k jejich různě užitným vlastnostem tak začaly postupně nacházet široké uplatnění v nejrůznějších oblastech průmyslového využití. [2]

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny vzniklé chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (zbytků rostlin, živočichů apod.) a syntetickou činností mikroorganismů. Přirozeně se vyskytují zejména v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a některých dalších minerálech. Obsah huminových látek v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (hnědé uhlí, lignit). Mimořádně vysoký obsah – 80 % a více – potom vykazuje např. rašelina. [1]

Půdní HL se ve všeobecnosti vyznačují podobnými vlastnostmi v porovnání s HL z jiných přírodních zdrojích, z výsledků elementárních analýz byly zjištěny jen malé rozdíly v jejich složení a struktuře. [3]

2.2 Původ a prekurzory huminových látek

Během minulého století byl výzkum původu huminových látek velmi populární oblastí. Navzdory tomu, že přesný mechanismus vzniku HL dodnes není úplně objasněný, byly vytvořené tři hlavní teorie. První byla teorie, že HL byly odvozené z lignifikovaných pletiv rostlinných zbytků, druhá upřednostňovala mechanismus prostřednictvím chinonů a třetí teorie podporovala vznik HL z jednoduchých cukrů, přičemž v této poslední teorii měly probíhat reakce mezi redukujícími cukry a aminokyselinami za vzniku hnědých dusík obsahujících polymerů.

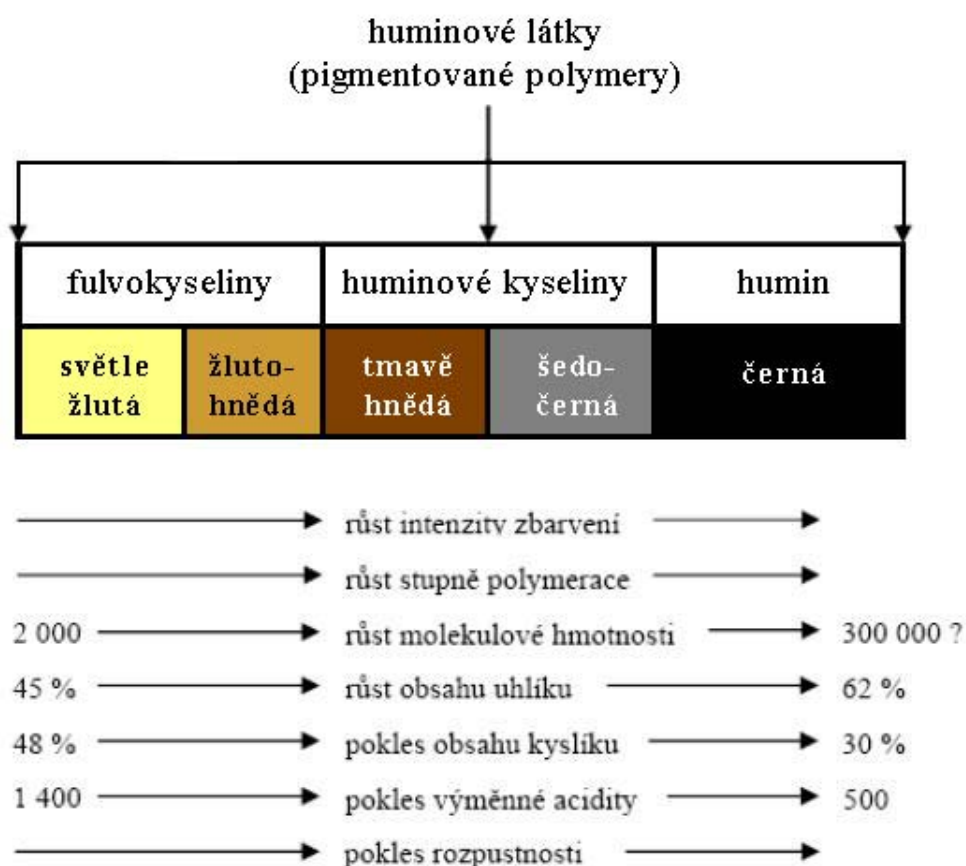
Půdní organický materiál je odvozený z půdní biomasy a striktně řečeno je složen ze živého a také mrtvého organického materiálu.

Z agronomického hlediska se organická hmota dělí na aktivní (labilní) a stabilní. Do aktivní části patří rostlinné zbytky, biomasa a nehumusové látky, které nejsou poutané na minerální složky, a zároveň je tato část i zdrojem živin (N, P, S) pro růst rostlin. Stabilní složka (humus) slouží k zásobení rostlin živinami a je důležitá pro dlouhodobou rovnováhu v půdě.

Prekurzory huminových látek jsou lignin, fenoly a polyfenoly, chinony, proteiny a aminokyseliny, uhlovodíky, lipidy, steroly a steroidy, nukleové kyseliny, růst podporující látky jako i xenobiotika. [3]

2.3 Rozdělení huminových látek

Molekulová hmotnost huminových látek (HS) se pohybuje přibližně v rozmezí od 2 000 do 200 000 g·mol⁻¹. HS jsou strukturně velmi složité a doposud ne zcela přesně popsány. Znalost strukturního složení HS je však nezbytná pro pochopení jejich možných fyzikálněchemických interakcí s látkami přítomnými v životním prostředí. Za hlavní složky HS jsou obvykle považovány huminové kyseliny (HA), fulvokyseliny (FA) a humin (HUM). [1]



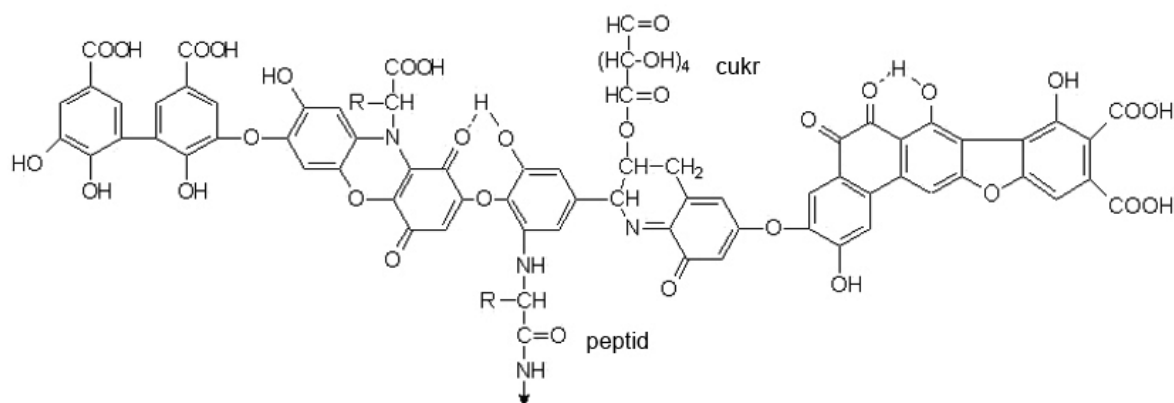
Obr. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti huminových látek podle Stevenson 1982

2.3.1 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny jsou tmavé barvy a hromadí se většinou na místě vzniku. Jsou charakteristické dobrou rozpustností v louhu a roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Základní složkou je aromatické jádro fenolického nebo chinoidního typu s účastí cyklických i alifatických dusíkatých sloučenin. Huminové kyseliny jsou jen částečně nebo velmi slabě rozpustné ve vodě. Elementární složení huminových kyselin je závislé na půdním typu, chemickém složení rostlinných zbytků a podmínkách humifikace. Kyselinový charakter těchto sloučenin je daný přítomností kyselých funkčních skupin, ze kterých jsou nejdůležitější karboxylové (COOH) a fenol hydroxylové (OH). Vodíkové ionty těchto funkčních skupin mají schopnost vyměňovat se za jiné ionty. Huminové kyseliny mají porézní stavbu a vyznačují se vysokou sorpční schopností. Molekulová hmotnost dosahuje až 300 000 g·mol⁻¹.

Huminové kyseliny jsou považovány za nejhodnotnější produkt humifikačních procesů v půdě, výrazně ovlivňují půdní vlastnosti podmiňující vysokou úrodnost. Ovlivňují zejména kationtovou výměnnou kapacitu, strukturu a vysokou pufrovací schopnost půd. V nasyceném stavu jsou stále, vysoce odolné vůči mineralizaci. [4]

V poslední době jsou popisovány jako směs relativně malých heterogenních molekul držících pohromadě slabými disperzními silami a vodíkovými vazbami. Studie Piccola a kol. naznačují, že se jedná o látky, které se skládají ze supramolekul složených z náhodně asociovaných poměrně malých molekul stabilizovaných převážně hydrofobními interakcemi. [5]



Obr. 2 Hypotetický strukturní vzorec huminové kyseliny podle Stevenson 1982

2.3.2 Fulvokyseliny

Fulvokyseliny jsou žluté až hnědé barvy, velmi pohyblivé a lehce se přemísťující v půdním profilu. Jsou charakteristické dobrou rozpustností ve vodě, minerálních kyselinách, loužích i v roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Od huminových kyselin se liší jednodušší stavbou makromolekuly i celkovým složením. Kyselinový charakter fulvokyselin je dán především karboxylovými skupinami. Vodní roztoky fulvokyselin jsou silně kyselé (pH 2,6–2,8). Molekulová hmotnost kolísá od 200 do 50 000 g·mol⁻¹. Fulvokyseliny jsou v důsledku silně kyselé reakce a dobré rozpustnosti ve vodě velmi agresivní na minerální část půdy, kterou zároveň ochuzují o živiny a koloidní látky. [4] Celková kyselost fulvokyselin je podstatně vyšší než-li kyselost huminových kyselin. [1]

2.3.3 Humin

Jedná se pravděpodobně o silně karbonizovanou organickou hmotu, pevně vázanou na minerální podíl půdy a proto se nedá získat ani mnohonásobnou extrakcí alkáliemi z dekalcinované (zbavené vápníku) půdy. Huminy jsou často charakterizovány jako nerozpustné formy huminových kyselin. [4] Humin potom vykazuje černou barvu. [1] Huminy jsou kondenzovanější a silněji dehydrované jako huminové kyseliny. [3]

2.4 Půdní humus

Humus v širším slova smyslu je tvořen zbytky rostlinných a živočišných organismů, které jsou v různém stupni rozkladu, nacházející se na půdě nebo v půdě a s půdou jsou v různém stupni smíšené.

Humus je organická půdní hmota procházející neustálými změnami, jak po stránce chemického složení, tak i po stránce vlastností a funkcí v půdě. Z chemického hlediska se jedná o soubor tmavě zbarvených organických dusíkatých polyfunkčních látek kyselinové povahy, převážně koloidního charakteru, vysoké molekulové hmotnosti, relativně odolných vůči mikrobiálnímu rozkladu.

Další charakteristikou je cyklická struktura jádra, vazba na minerální podíl půdní a amfoterní charakter. V tomto pojetí se jedná o látky, které prošly kompletně humifikačním pochodem a je označován jako humus vlastní. [4]

2.4.1 Humusotvorný materiál

Jedná se o čerstvě odumřelé části rostlin či celé rostliny, živočichy a mikroorganismy včetně produktů jejich metabolismu. Je to organická hmota, která nebyla dosud dotčena rozkladnými procesy. Patří sem i ty zbytky organismů, jejichž část již byla odbourána, ale další část má dosud původní složení. [4]

2.4.1.1 Pochody přeměn humusotvorného materiálu

Humusotvorný materiál nacházející se v půdě podléhá rozkladu, při němž se tvoří řada meziproduktů ze kterých syntézou vznikají nové organické sloučeniny, často velmi odlišné povahy a vlastností. Celý proces je ovlivňován zejména vlivem půdní vlhkosti, teploty a provzdušenosti půdy. Dále je to vliv enzymů, kde se uplatňují zejména oxidázy a tirozomázy při tvorbě tmavě zbarvených látek (melaniny, kondenzáty metylglyoxalu apod.). Na tomto procesu se rozměňováním rostlinných zbytků uplatňují půdní živočichové. V jejich zažívacích traktech jsou rostlinné zbytky dokonale míseny s minerálním podílem a chemicky pozměňovány na látky blízké vlastnímu humusu. Také nelze opomenout ani samotné vlastnosti půdy – zejména reakci, obsah přístupných živin a zrnitostní složení. [4]

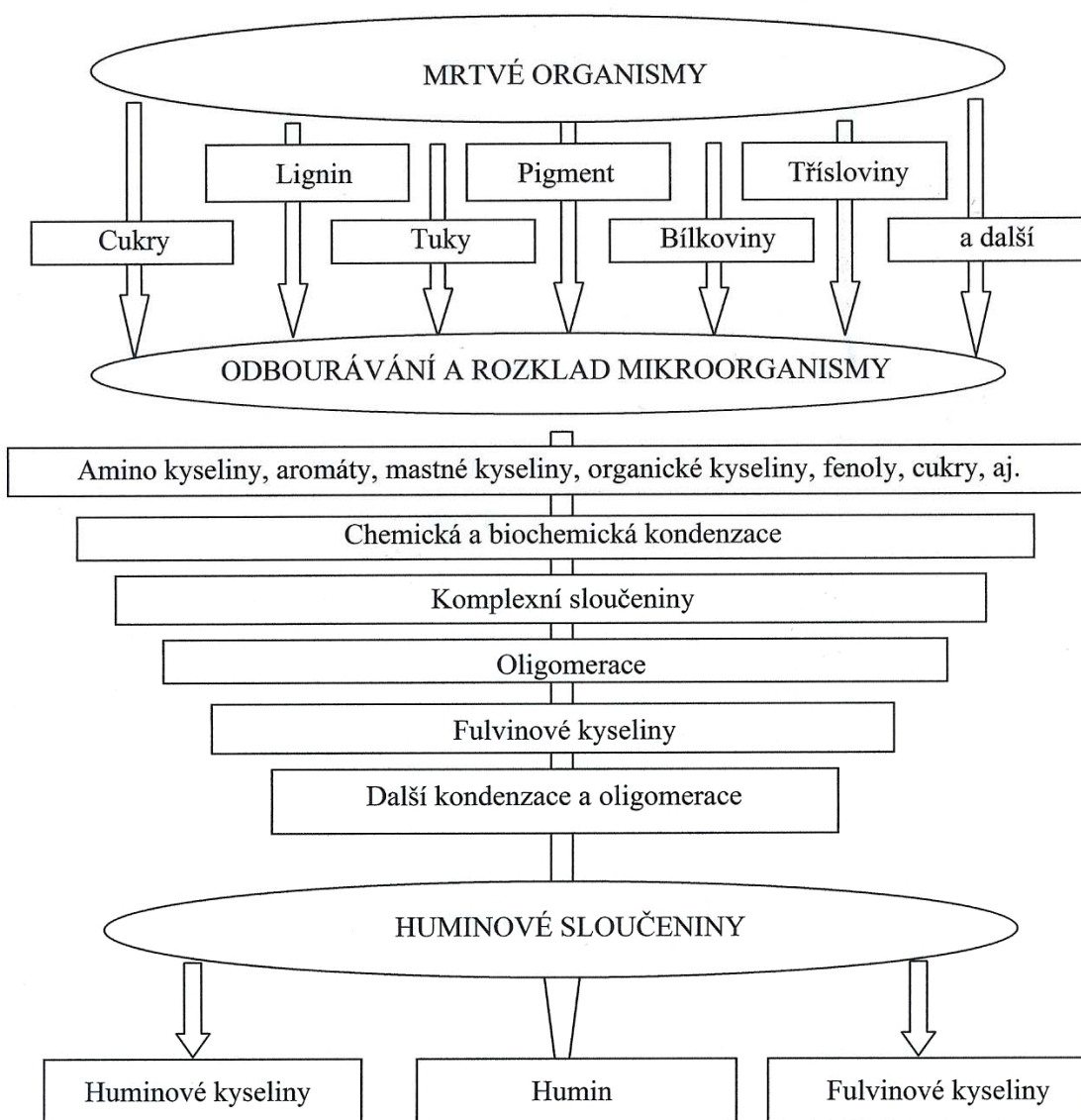
2.4.2 Humifikace

Proces, ve kterém vznikají huminové látky – humifikace, zahrnuje množství biochemických reakcí. Existují dvě teorie vzniku huminových látek, které se liší v tom, jak se prvotní a základní látky využívají v syntéze huminových látek. Jedna teorie je založena na depolymeraci biopolymerů vedoucí k vzniku huminových látek. Další teorie uvažuje o polymeraci malých molekul, uvolněných po kompletní degradaci biopolymerů, za vzniku huminových látek. Hayes a Malcom (2001) tvrdí, že stupeň depolymerace závisí od obsahu kyslíku a humifikace by byla zpomalená v anaerobních podmínkách.

Tvorba humusu se skládá ze tří základních fází:

- V podmínkách příznivých teplot, vlhkosti a provzdušnění existuje velmi silná činnost aerobních bakterií, které rozkládají organickou hmotu na jednoduché složky (CO_2 , H_2O , NH_3 , oxidy aj.).

- Během omezeného přístupu vzduchu – anaerobních podmínek – dochází k nedostatečné oxidaci, kyselé reakci prostředí. Přičemž působením nízké teploty a vysoké vlhkosti, dochází k přeměně organické hmoty, tzv. rašelinění nebo uhelnatění. Jde o nedokonalý rozklad organických zbytků, je to vlastně enzymatický a biochemický proces způsobený zejména anaerobními bakteriemi, což výsledkem jsou huminové a ulminové látky tmavě hnědé-černé barvy s vysokým obsahem uhlíku.
- Samotná humifikace je proces převážně anaerobní, soubor převážně enzymatických a biochemických pochodů, při kterých se z meziproduktů rozkladu tvoří tzv. huminové látky. Poměr obsahu uhlíku k dusíku je 1:10, mají hnědou až černou barvu a vlastnosti koloidů. Humifikace se uskutečňuje mineralizací výchozích látek, nikdy nezhumifikuje všechna organická hmota. [3]



Obr. 3 Schéma procesu humifikace podle Jacksona

2.5 Použití huminových látek

V současnosti mají huminové látky poměrně rozsáhlé využití, které je možné rozdělit na následující oblasti: aplikace v zemědělství, průmyslové využití, využití v oblasti ochrany životního prostředí, medicínské a farmakologické použití. [1]

2.5.1 Zemědělství

Huminové kyseliny jsou v běžných půdních podmínkách pevně vázány na minerální podíl půdy a jsou ve vodě nerozpustné.

Rozpustné humáty předávají rostlině energii, kterou rostlinný organismus dovede využívat k různým metabolickým procesům. V přítomnosti těchto látek rostlina efektivněji využívá podmínek prostředí, především minerálních živin. Rostlina také lépe odolává nepříznivým vnějším vlivům a vytváří i více biomasy, což v praxi znamená vyšší výnos.

Z hlediska ekologických vztahů mezi půdou a rostlinou jsou mimořádně cenné humáty vápenaté. Dvojvazný kation vápníku spojuje mezi sebou jednotlivé molekuly humátu do větších shluků, které označujeme jako micely. Samozřejmě se tím ruší rozpustnost humátů, vytváří se však tixotropní hmota, která samovolně přechází ze stavu sol do stavu gel. Micely humátu vápenatého jsou následně opět prostřednictvím vápníku vázány na povrch půdních jílových minerálů. Vzniká tak humusojílovitý sorpční komplex, který má pozitivní vliv na strukturní stav půdy a na další vlastnosti podmiňující půdní úrodnost, ale zároveň se vytváří rezervoár minerálních iontů vázaných na povrchu komplexu. Kořenový systém rostlin v půdním roztoku může výměnným způsobem snadno přijímat potřebné živiny. [6]

Biohumus získaný s pomocí žížal je považován za nejúčinnější organické hnojivo s obsahem až 17,6% hm. huminových kyselin v sušině. [7]

Praktické zkušenosti s použitím huminových látek v živočišné výrobě ukázaly, že právě toto může být velmi efektivní cesta k zlepšení zdravotního stavu zvířat, snížení výrobních nákladů a tím, v konečném důsledku zvýšení zisku. [8]

2.5.2 Životní prostředí

Půda má schopnost eliminovat kontaminanty (kovy, organické látky) a to jejich interakcí s anorganickými (jílové minerály) a organickými (huminové kyseliny) půdními složkami. Huminové kyseliny (HA) jsou díky svým vlastnostem využitelné pro potenciální zdokonalení remediačního procesu právě s důrazem na zachování živých organismů. [9] Huminové kyseliny váží metabolity aerobní biodegradce a tím půdu bioimobilizují. V případě kovů se jedná o vznik ve vodě nerozpustných anorganických sloučenin (působením bioimobilizace), čímž je dosaženo snížení nebo odstranění škodlivých účinků na životní prostředí. [10]

Všechny půdy s vysokým obsahem huminových kyselin zabráňují vyluhování dusičnanů do nižších vrstev půdy. Dobře vyvinutý kořenový systém, který je způsoben vysokým obsahem huminových kyselin v půdě, předchází dusičnanům a pesticidům proniknout do podzemních vod. Huminové kyseliny redukují zasolení půdy, které je způsobeno nadměrným používáním hnojiv rozpustných ve vodě. [11]

2.5.3 Další použití

Huminové látky jsou využívány nejen jako aktivátor půdy, ale i jako přísada do krmiva pro zvířata, odnímače vlhkosti, povrchově aktivní látky, suroviny pro povrchovou úpravu materiálů za účelem zvýšení jejich elektrické vodivosti či fungicidní aktivity, k výrobě sorbentů plynů a iontoměničů, přísad a prekurzorů do kosmetických krémů, v biotechnologiích, v medicíně, farmakologické a toxikologické vlastnosti HA jsou využívány ve veterinární medicíně.

- Inhibiční efekty huminové kyseliny (HA) při synthese, inhibice polymerace.
- Využití do elektrografických kapalin a elektrofotografických nebo magnetických tónovačů.
- Povlákání povrchu uhlíkatých vláken aminovou solí HA za účelem získání hydrofilních uhlíkatých vláken.
- Deodoranty pro odstraňování zápachajícího plynu z drůbežího hnoje či deodorantu vhodného k odstranění NH_3 , H_2S nebo merkaptanů ze vzduchu.
- Využití HA pro přípravu porézních elektrod pro palivové články. [12]

2.5.3.1 Medicína

Huminové látky nacházejí své uplatnění v různých oborech medicíny. Huminové látky se používaly již v antickém Řecku v podobě rašelinových koupelích a slatinných zábalů. Huminové kyseliny katalyzují některé enzymatické reakce a přispívají tak k zlepšení metabolických dějů v organismu člověka. Snižují produkci stresových hormonů, což příznivě ovlivňuje srdeční činnost, krevní tlak a psychický stav jedince. Podporují krvetvorbu a zvyšují saturaci kyslíku v erytrocytech. Huminové kyseliny příznivě ovlivňují imunitní systém a zabraňují vzniku autoimunitních onemocnění např. artritidy. Jsou prokázány antivirové, antimikrobiální, imunosupresivní, antikarcinogenní, detoxikující a analgetické účinky. Dále ovlivňují hladinu cukru v krvi. Huminové kyseliny stimulují regeneraci tkání a přispívají tak k rychlému hojení ran a spálenin. Léčebný efekt huminových látek je využíván zejména v dermatologii a lázeňských procedurách. [13]

2.6 Půdní typy v ČR

Klasifikace (taxonomie) půd je třídění objektů, v tomto případě přirozených trojrozměrných půdních jednotek (polypedonů) do hierarchického (víceúrovňového) klasifikačního systému. [4]

Nejrozšířenějším půdním typem u nás jsou kambizemě (asi 42,3 % území), které se vyznačují střední úrodností a vyskytují se zejména v pahorkatinách (hnědé půdy nižších poloh), vrchovinách i horských oblastech. Druhým nejčastějším půdním typem u nás jsou luvisoly (jmenovitě hnědozemě) (14,6 %), které mají menší obsah humusu než černozemě, ale jsou také velmi hodnotné a vhodné i pro pěstování náročných obilovin. Vyskytují se hlavně v nižším stupni pahorkatin a v okrajových částech nížin s nadmořskou výškou přibližně 200 až 400 m. Třetí místo se 14,3 % zaujímají černozemě, nejúrodnější půdy s vysokým podílem humusu. Najdeme je zejména ve středním Polabí, v dolním Poohří, v Dyjsko-svrateckém, v Dolnomoravském a zčásti i Hornomoravském úvalu. Čtvrtou nejpočetněji zastoupenou skupinu tvoří illimerizované a oglejené půdy (13,1 %), které se nacházejí spíše

v rovinatých chladnějších a vlhčích oblastech. Zbýlých 15,7 % tvoří ostatní půdní typy jako např. lužní půdy, nivní půdy, podzoly, rendziny, zasolená půda (solončak), rašelinistní půdy apod. [14]

2.6.1 Půdní kategorie

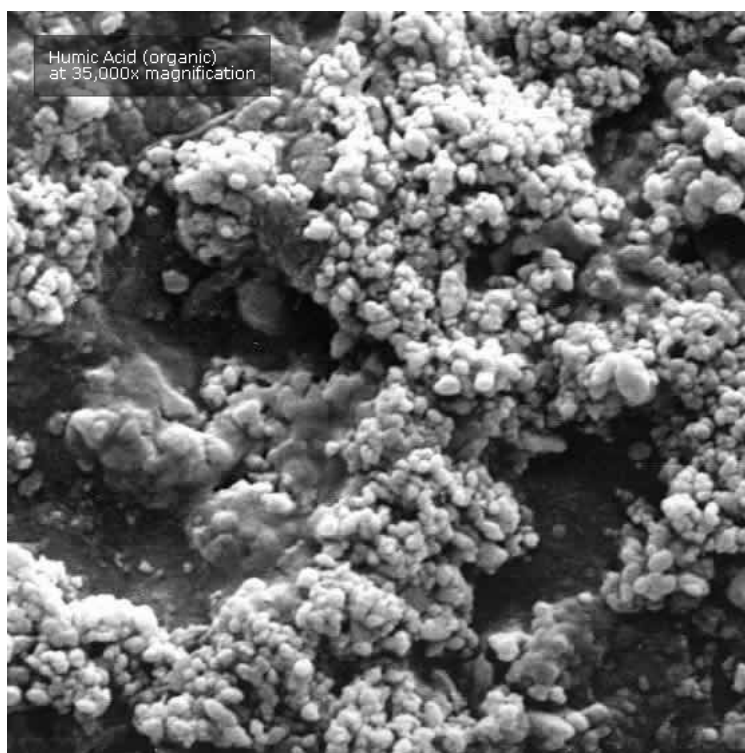
Velké skupiny půd, které vystupují v zahraničních klasifikačních systémech a umožňují české půdy s nimi korelovat; užíváme pro ně nejrozšířenější název jako substantivum s koncovkou – sol.

- Leptosoly: Půdy vytvářející se z rozpadů hornin, s horizonty nejčastěji typu melanický, umbrický, nebo kambický.
- Regosoly: Půdy vzniklé z nezpevněných sedimentů, zejména z písků a štěrkopísků. Horizonty typu organický, nadložní.
- Fluvisoly: Půdy s fluvickými znaky, vzniklými periodickým usazováním sedimentů, jehož důsledkem je nepravidelné a nebo zvýšené ($> 0,3 \%$) množství humusu do hloubky 1 m, někdy i zvrstvení půdního profilu. Horizont organických látek.
- Vertisoly: Půdy s vertickými znaky, projevujícími se u těžkých půd s obsahem smektitických jílu, vyskytujících se v sušších oblastech. Výskyt pouze v SZ Čechách a na J. Moravě.
- Černosoly: Půdy s širokým černickým humusovým horizontem (0,4 – 0,6 m) s drobtovou až zrnitou strukturou, v modálním subtypu černoze s kalcickým horizontem, vyvinuté ze sypkých karbonátových substrátů.
- Luvisoly: Půdy s horizontem (argi)luvicím, nebo albickým horizontem (eluvie jílu), jen výjimečně (u šedoze) s melanickým event. i černickým horizontem.
- Kambisoly: Půdy vytvořené v hlavním souvrství svahovin z přemístěných zvětralin pevných či zpevněných hornin nebo v souvrství jiných substrátů (zahliněné písky, štěrkopísky), se širokou škálou zrnitosti, vyluhování a acidifikace, s možností výskytu všech typů nadložního humusu a několika typů humózních horizontů (melanický, umbrický, andický).
- Andosoly: Půdy s andickými diagnostickými znaky jako důsledek zvětrávání kyselých vulkanických pyroklastik, projevujícím se uvolňováním velkého množství volného Al (kyselé zvětrávání) či tvorbou amorfních jílových minerálů alofanu a imogolitu (slabě kyselá reakce). Výsledkem je tvorba kyprého, často hlubokého, silně humózního andického humusového horizontu (stabilizace humusu hliníkem či amorfními jílovými minerály) a kyprého kambického andického horizontu. V ČR nebyly zatím nalezeny, vyskytují se v SR.
- Podzoly: Půdy typu podzol nebo hnědá půda podzolovaná. Půdy se spodickými horizonty, buď neiluvialními, či iluvialními, vysoce nasycené hliníkem.
- Stagnosoly: Půdy typu pseudoglej a stagnoglej. Půdy s výrazným redoximorfním mramorovaným horizontem v důsledku povrchového periodického převlhčení v hloubce do 0,5 m. Horizont organický, umbrický (histický).
- Glejsoly: Půdy s výrazným reduktomorfním glejovým horizontem v hloubce do 0,5 m v důsledku dlouhodobého provlhčení podzemní ale i povrchovou vodou ze svahových pramenišť. Horizont glejový, kambický a rašelinný.

- Salisoly: Půdy s výraznými znaky zasolení, s obsahem rozpustných solí o vodivosti nasyceného extraktu nad $8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, hodnota pH nad 8,5. Výjimečně se může vyskytovat na jižní Moravě.
- Organosoly: Půdy typu organozem s rašelinnými horizonty.
- Antrosoly: Půdy vzniklé buď výraznou modifikací půdních horizontů kultivačními, melioračními opatřeními nebo půdy vzniklé z přemístěných materiálů, (půdy překryté (sealing) či půdy silně kontaminované). [15]

2.6.2 Půda Elliott

Půda Elliott je typickou stepní půdou států Indiany a Illinois Spojených států amerických. Vzorek IHSS byl získán z nenarušené oblasti na pozemku Joliet Army Ammunition Plant (armádního muničního závodu) blízko Joliet v Illinois. Sada standardů huminových látek Elliott pochází z půdy neobdělávané na podloží moréně a tillu. Propustnost této půdy je pomalá ve vrchní části půdního profilu. [16] Na obr. 4 je mikroskopický snímek huminové kyseliny Elliott HA.



Obr. 4 Povrchová struktura HA pořízená elektronovým mikroskopem podle Humintech

2.7 Luminiscence

Luminiscenční jevy – fluorescence a fosforescence – jsou definovány na základě multiplicity excitovaného stavu, který emituje.

V roce 1935 navrhl Jablonski, že fosforescence je emise z déle žijícího metastabilního elektronového stavu, který je energeticky níže než stav, který vznikl absorpcí světla. Tento

stav je nám již známý stav tripletový. Delší doba života fosforescence je přímý následek kvantově-mechanicky „zakázaného“ zářivého přechodu $T_1 \rightarrow S_0$ ($k_p \approx 10^{-2} - 10^4 \text{ s}^{-1}$), jelikož se mění multiplicita. Na druhé straně fluorescence ($S_1 \rightarrow S_0$) je proces velmi rychlý a spinově „dovolený“ díky zachování multiplicity ($k_f \approx 10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$).

Na tomto místě je třeba uvést dva pojmy, které souvisí s emisí světla - spontánní emise a stimulovaná (indukovaná) emise. V případě spontánní emise ztrácí excitovaná částice energii vyzařením za absence vnějšího zdroje záření.

Elektronově excitovaný atom musí ztratit energii buď emisí záření nebo při kolizi s jinou částicí.

Stručně řečeno, fluorescence z excitovaného singletového stavu musí být dostatečně rychlá a účinná ve srovnání s ostatními deaktivacími procesy.

Měříme-li fluorescenci kapalin, vibrační relaxace je v podstatě úplná a fluorescence probíhá pouze z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu.

Fluorescence je následkem přechodu ze stavu S_1 do S_0 a fosforescence z T_1 do S_0 . Tato teorie se nazývá Kashovo pravidlo. [17]

2.7.1 Měření fluorescence

Pro měření fluorescence chemických látek se nejběžněji používají měřicí přístroje zvané spektrofluorimetry. Spektrofluorimetry jsou přístroje, které měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky. Zdroj budícího záření je v rozsahu ultrafialové a viditelné oblasti spektra.

Budící záření prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek (obvykle temperovaná kyveta s roztokem). Nejčastěji ve směru kolmém k budícímu paprsku se měří emitované fluorescenční záření, které nejprve prochází emisním monochromátorem a je detekováno pomocí fotonásobiče. Používá se uspořádání s jedním emisním monochromátorem (uspořádání „L“).

2.7.2 Fluorescenční spektra

Při měření emisních spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření excitačních spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují ještě šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření.

Pro analýzu neznámých vzorků nebo směsí fluoroforů se používá měření úplné fluorescence (též excitačně emisní matice, maticové skenování). Excitačně emisní matice vzniká spojením excitačního a emisního spektra směsi fluoroforů do trojrozměrného obrazu, kde je na jedné ose excitační vlnová délka, na druhé ose je emisní vlnová délka a na svislé ose je vynesena intenzita fluorescence.

Synchronní luminiscence může být vhodná pro analýzu směsí látek; tato metoda je založena na současném běhu obou monochromátorů, přičemž je nastaven konstantní rozdíl vlnových délek mezi excitačním a emitovaným zářením (synchronní excitace) – výsledkem je konvoluce emisního a excitačního spektra.

Při měření fluorescence metodou SFS, je snímána relativní intenzita na emisní nebo excitační vlnové délce, podle volby nastavení a možností přístroje. Při měření je zvolen

konstantní interval mezi nastavením obou monochromátorů (excitačního a emisního) a dochází k jejich současnému pohybu oproti klasickému měření excitačních nebo emisních spekter. Měřená emise je tedy vždy vyšší než excitace o vybraný interval $\Delta\lambda$. Při měření). Přesnost měření a výsledky závisí také na kroku měření. Spektrofluorimetr Aminco umožňuje měření synchronních spekter jen v emisním modu. Při SFS měření platí vztah : $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$. Výsledná spektra mohou být pak znázorněna dvojím způsobem, buď je to 3D SFS spektrum v prostorovém uspořádání (závislost rel. intenzity fluorescence na $\Delta\lambda$ a emisní vlnové délce, nebo řez 3D SFS spektra (vrstevnicový fluorogram). Měření 3D SFS má výhodu v tom, že umožňuje nalézt hlavní fluorofory ve vzorku a také se využívá s výhodou v těch případech, kdy ve spektru EEM nelze některý z fluoroforů určit přesně, z důvodu nízkých rel. intenzit nebo leží toto hledané maximum v blízkosti rozptylu světla. Metoda je vhodná pro charakterizaci multifuoroforních vzorků.

V některé literatuře se oba typy spekter označují souhrnně Total luminiscence spectra, protože zahrnují všechny excitace i emise vzorku. Jejich princip měření je však rozdílný. Častější používanou metodou je EEM. [18]

2.8 Literární rešerše

Huminové látky (HS) jsou již po řadu desetiletí předmětem intenzivního vědeckého zájmu, který vychází z jejich výhodně využitelných fyzikálních a chemických vlastností. Lze nalézt mnoho odborných pramenů zabývajících se studiem HS. Zaměřili jsme se na ty, které byly publikovány v posledních letech.

Z hlediska pochopení jejich funkce v životním prostředí a různých ekosystémech je nezbytné co nejpodrobněji prostudovat jejich strukturu a tím jejich chování v daném prostředí. Huminové látky se stávají z heterogenních směsí látek, které lze charakterizovat pomocí fyzikálně chemických instrumentálních metod. Pro popis těchto látek se nejhojněji využívají následující instrumentální techniky: UV/VIS (Ultraviolet-Visible) spektroskopická analýza, fluorescenční spektroskopie, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) spektroskopie, hmotnostní spektroskopie, NMR (Nuclear Magnetic Resonance) nukleární magnetická resonance, EPR (Electron Paramagnetic Resonance), HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) a mnoho jiných. Problematika huminových látek je těmito metodami stále více prozkoumávána což nám dává celkový obraz jejich fyzikálních a chemických vlastností. [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28]

Huminové látky (HS) pocházející z různých geologických zdrojů se od sebe výrazně odlišují. Jsou velké rozdíly mezi půdními, vodními nebo lignitickými vzorky. Fyzikální-chemické vlastnosti látek jsou ovlivněny např. lokalitou nálezů, okolní hodnotou pH, stářím, zpracováním vzorku a dalšími faktory. Cílem vědeckého bádání je tedy výzkum huminových látek různého původu, ať už samostatně nebo v kombinaci s dalšími, a snaha o vysvětlení těchto odlišností. Za tímto účelem se hojně využívá právě fluorescenční spektroskopie, které v sobě spojuje měření excitace, emise či synchronní měření při konstantním rozdílu mezi monochromátory. [29]

HS z různých zdrojů se od sebe značně odlišují. Pomocí fluorescenční spektroskopie lze pozorovat rozdíly mezi HAs a FAs o různém původu. [1]

Zhongqi He a kol. [19] studovali přírodní organické látky (NOM) pomocí kapilární elektroforézy (CE) a fluorescenční spektroskopie měřením EEM spekter. V této studii charakterizovali šest fulvokyselin (FA), šest huminových kyselin (HA) a dva vzorky NOM

získané od International Humic Substances Society (IHSS). Byly nalezeny rozdíly ve výsledcích různých typů vzorků podle rozdílné hmotnosti a náboje fragmentů. Analýza fluorescenční spektroskopie s excitačně-emisní maticí (EEM) ukázala, že každý ze 13 zkoumaných vzorků obsahoval čtyři hlavní fluorofory odpovídající huminovým sloučeninám. Relativní množství těchto čtyř látek se lišilo podle původu a typu vzorku. V práci byla provedena dále i frakcionace autoklávováním těchto vzorků (tepelný rozklad po dobu 1 hodiny). Vzorky byly porovnány se vzorky bez autoklávování a byly zjištěny změny ve složení hlavních fluoroforů.

Fan Lu a kol. [20] studovali fluorescenční EEM spektra vzorků různého stáří pocházejících z výluhu městské skládky. Vzorky rozpustných organických látek (DOM) byly intenzivně frakcionovány pomocí gelové chromatografie SEC (hydrofobní pryskyřice) a byly následně zkoumány pomocí fluorescenční spektroskopie EEM. V EEM spektrech identifikovali šest fluorescenčních píků umístěných v odlišných Ex/Em regionech. Byla provedena bivariantní analýza hlavních sloučenin a analýza paralelních faktorů. Jednotlivé fluorescenční maxima byly charakterizovány excitační a emisní vlnovou délkou ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$): (240, 310, 360/460 nm), (220, 280/340 nm), (220, 270/300 nm), (220, 280/360 nm), (230, 320/420 nm) a (220, 310/400 nm). Spektrální charakteristiky těchto fluoroforů byly rozebírány pomocí frakčního EEM spektra a zdánlivých molekulových hmotností (AMW), které byly zjištěny analýzou SEC. První fluorescenční pík odpovídal hydrofobní sloučenině s pyrenylovou funkční skupinou o molekulové hmotnosti 2500–3500 Da. Tento pík byl lokalizován v oblasti 360/460 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

Metoda EEM může být také využita při studiu huminových kyselin pocházejících z korálových extraktů. B. J. H. Matthews a kol. [21] tuto metodu použili při sledování chování huminových kyselin a jiných organických látek extrahovaných z korálů. Výsledky fluorescenční spektroskopie vzorků korálových extraktů, pevných korálů, mořské vody a komerčně dostupných huminových kyselin mají důsledky pro použití korálů jako paleoenvironmentálních indikátorů. Ve fluorescenčních spektrech identifikovali čtyři dominantní píky z nichž tři byly posunuty k vyšším vlnovým délkám a jeden byl lokalizován v oblasti nižších vlnových délek. Polohy fluorescenčních maxim byly lokalizovány v oblastech 310/430 nm, 340/450 nm, 390/490 nm a 280/(320–350) nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) z nichž poslední je připisován proteinové fluorescenci. Pozice těchto maxim byly mezi různými vzorky v podstatě totožné, včetně korálových extraktů, pevných korálů, mořské vody a komerčně dostupných huminových kyselin. Dále stanovili komerční huminovou kyselinu Fluka jejíž fluorescenční maximum bylo lokalizováno v oblasti 460/540 nm. Při měření těchto 3D EEM spekter byla zvolena šířka štěrbin u emisního a excitačního monochromátoru 5 nm. Použití techniky EEM v předkládané práci ukazuje, že změny v koncentraci vzorku může významně změnit distribuci intenzity fluorescenčního spektra, zejména pokud jsou přítomny silně absorpční, nefluorescenční druhy. R.F.I. závisí na koncentraci vzorku a dochází k IFE efektu. Porovnání EEM spektra organických látek extrahovaných ze světlých a tmavých korálových pásů ukazuje, že spektroskopická struktura emitované fluorescence je pro obě pásma prakticky identická; emise se podle všeho liší jen v absolutních intenzitách.

Fluorescenční spektroskopie EEM se často využívá pro objasnění původu a struktury huminových látek. Fu a kol. [22] studovali fluorescenční EEM spektra vzorku komerční huminové kyseliny Fluka (FHA). V EEM spektrech huminové kyseliny identifikovali dvě fluorescenční maxima v oblastech 310/415 nm a 460/540 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$). Dále bylo zjištěno, že největší vliv na intenzitu fluorescence vzorku má koncentrace a hodnota pH roztoku. Vliv

iontové síly roztoku KClO_4 o koncentraci $0\text{--}0,05\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na výslednou fluorescenci je zanedbatelný. Koncentrace vzorku huminové kyseliny Fluka byla v rozmezí $5\text{--}100\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí $2\text{--}12$. Při zvýšení koncentrace nebo hodnoty pH byl pozorován posun fluorescenčních maxim k vyšším vlnovým délkám. Fluorescenční intenzita se zvyšovala s rostoucí hodnotou pH, ale mírně se snížila pro $\text{pH}=5,0$.

J. Alberts a kol. [23] studovali standardy a vzorky huminových látek měřením fluorescence pomocí EEM spekter. Referenčním materiálem byly zvoleny vzorky standardů huminových látek dodávaných společností International Humic Substances Society (IHSS). V EEM spektrech vzorků pocházejících z vodního prostředí a půdních standardů huminových a fulvinových kyselin izolovaných z rašeliny byla zjištěna přítomnost dvou fluorescenčních píků. První pík se nacházel v ultrafialové oblasti excitační osy ($\approx 250\text{ nm}$) a druhý v oblasti spektra excitační osy ($320\text{--}450\text{ nm}$). Získané píky jsou charakteristické pro říční a sladkovodní huminové látky. Ve spektrech půdních huminových kyselin byl detekován další charakteristický pík. Tento pík byl nalezen v oblasti vyšších vlnových délek emisní osy (nad 450 nm), který zastupuje více konjugované fluoroforní molekuly. U pevninských huminových kyselin bylo umístění prvních dvou píků posunuto k vyšším vlnovým délkám excitace i emise. Nejpravděpodobněji je to způsobeno tím, že HAS mají odlišnou proteinovou povahu jako je to u HAS izolovaných z vodního prostředí nebo mají odlišné prostorové uspořádání. Mezi jednotlivými vzorky HS byl pozorován velký rozdíl v intenzitách fluorescence. Fulvinové kyseliny zejména izolované z vodního prostředí vykazovaly nejvyšší intenzity fluorescence. Z naměřených EEM spekter a odlišných poloh fluorescenčních maxim se pokoušeli identifikovat fluorofory přítomných ve vzorcích. J. Alberts a kol. došli k závěru, že umístění maxim ve EEM spektrech nezávisí pouze na přítomnosti určitého fluoroforu ale i na uložení uvnitř makromolekulární struktury.

M. M. D. Sierra a kol. [24] studovali fluorescenční EEM spektra vzorků huminových látek, které pocházely z různých geologických matric. Pro studium EEM spekter si zvolili především huminové látky pocházející z vodního prostředí. V huminových látkách (HS) byly nalezeny dva charakteristické píky α a α' a dále byl pozorován posun těchto maxim v případě huminových kyselin (HAS). V naměřených spektrech byla prokázána přítomnost dalších píků (β , γ , δ), které jsou ovlivněny stářím a původem HS. Vzorky z mořských a přímořských zdrojů jsou bohatší na spektrální rysy, oproti starším nebo půdním vzorkům. Sierra a kol. zvolil pro studování fluorescenčních EEM spekter širší oblast skenu. Emisní osa se pohybovala v rozmezí $260\text{--}700\text{ nm}$ a excitační v rozmezí $250\text{--}410\text{ nm}$ a lépe tak zmapoval i ultrafialovou oblast. Pro excitační sken huminových kyselin (HAS) je nejvhodnější vlnová délka emise přibližně 520 nm . Z výsledků EEM spekter je patrné, že různé vzorky HS mají odlišné intenzity fluorescence píků α a α' . Vzorky z otevřeného oceánu měly poměr intenzit α'/α nejvyšší, což je způsobeno nízkým obsahem α fluoroforů. Tento poměr intenzit je indikátorem stáří půdy, dále závisí na stupni humifikace a hloubce půdních horizontů.

Ve své práci se Huo a kol. [25] zabývali studiem rozpustných organických látek (DOM). Hlavním cílem této studie bylo zkoumat charakteristiky DOM ve výluzích ze skládek různého stáří pomocí elementární a spektroskopické analýzy. Z výluhu byly izolovány frakce huminových kyselin (HA), fulvokyselin (FA) a hydrofilní frakce (HyI), které byly získány pomocí pryskyřice XAD-8 a následného přečištění v koloně s kationtově výměnnou pryskyřicí. V této práci byla použita metoda izolace HAS a FAs publikována společností International Humic Substances Society (IHSS). Jejich rozsah měření byl u emise $200\text{--}600\text{ nm}$ s krokem 10 nm a v případě excitace $200\text{--}480\text{ nm}$ s krokem skenování rovněž 10 nm .

Měření fluorescence pomocí EEM spekter ukázalo, že pro mladý výluh ze skládky jsou charakteristické fluorescenční píky proteinového typu, zatímco pro středně starý a starý výluh poukazují získaná spektra na huminové kyseliny respektive fulvokyseliny. První fluorescenční maximum bylo lokalizováno v oblasti 210–230 nm/340–360 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Druhý pík byl lokalizován v oblasti 270–280 nm/340–380 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), což odpovídá fluoroforu proteinového typu. Třetí pík odpovídal fulvinové kyselině jejíž fluorescenční maximum bylo lokalizováno v oblasti 310–340 nm/420–440 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Jako čtvrtá byla ve 3D EEM spektru lokalizována huminová kyselina s polohou maxima 220–240 nm/420–440 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Elementární analýza prvků ukázala, že se stářím skládky se snižuje obsah uhlíku, vodíku a dusíku, avšak obsah kyslíku se zvyšuje. Huo a kol. dospěli k závěru, že aromatické uhlovodíky a části alifatických funkčních skupin byly hojněji zastoupeny ve vzorcích výluhů s rostoucím stářím skládky.

Studiem vlivu přídavku látky na bázi hnědého uhlí do různých půd se zabývalo několik autorů. J. Kwiatkowska a kol. [26] podrobili studii vzorky podzolové půdy, které byly obohaceny přídavkem přípravku na bázi hnědého uhlí, který se nazývá Rekulter (R). Toto upravené hnědé uhlí se hojně využívá v polském zemědělství. Po sedmi letech byly vzorky půd analyzovány. Z kontrolního vzorku půdy a vzorku, který byl obohacen přídavkem R byly extrahovány huminové kyseliny (HAs). Všechny HAs byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a měřením fluorescence pomocí EEM spekter. Pro 3D EEM spektra byla zvolena oblast emise v rozmezí 400–600 nm se skenovacím krokem 5 nm a oblast excitace v rozmezí 300–500 nm s krokem 5 nm za sekundu. Dále byl lokalizován dominantní pík huminové kyseliny v oblasti 446/500 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) a vedlejší fluorescenční maximum 392/500 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). J. Kwiatkowska a kol. stanovili vyšší obsah uhlíku v obohacených půdách, zatímco v huminových kyselinách byly mezi obohacenou a neobohacenou půdou zjištěny významnější rozdíly. HAs z obohacených půd vykazují vyšší obsah karboxylových skupin a mají více aromatický charakter, zejména pak HA extrahovaná z půdy s nejvyšší dávkou přípravku Rekulter.

Dorota Gołębiowska a kol. [27] studovali optické vlastnosti huminových látek (HS) pocházejících ze sedimentů dimiktického jezera Marta (ML) a meromiktického jezera Czarne (CL). HAs získané z hloubkových vzorků obou jezer byly podrobeny fluorescenční analýze. Byla analyzována emisní spektra při vlnových délkách excitace 310 nm, 380 nm, 405 nm a 440 nm (tedy čtyři pro každou zkoumanou HA). Každá z těchto vlnových délek generuje fluorescenci HA, jejíž intenzita a pozice maxima v emisním spektru se mění. Ukazuje se, že intenzita fluorescence HA z meromiktického jezera (CL) je ve všech případech vyšší než odpovídající hodnoty HA z dimiktického jezera Marta (ML). Dále bylo zjištěno, že umístění fluorescenčního maxima emise ve spektru HA z meromiktického jezera jsou posunuty směrem ke kratším vlnovým délkám, s výjimkou fluorescenčního maxima generovaného excitací při $\lambda=380$ nm. Pozice fluorescenčního maxima emise je 475–480 nm generovaného při $\lambda=380$ nm je stejná pro HAs z obou jezer.

Jeden z faktorů ovlivňující fluorescenci huminových kyselin je koncentrace a to díky efektu vnitřního filtru (IFE). IFE způsobuje při vyšších koncentracích vzorku (kolem $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) velké odchylky čímž narušuje lineární vztah mezi intenzitou fluorescence a koncentrací měřeného vzorku. M. C. G. Antunes a kol. [28] zkoumali vliv koncentrace huminových a fulvinových kyselin na jejich intenzitu fluorescence. Při modelování 3D EEM spekter byl použit krok excitace 5 nm a emise rovněž 5 nm. Měření spekter proběhlo v oblastech 200,1–700 nm u emise a 200,5–675,1 nm u excitace, což odpovídá oblasti, která

byla zvolena v této bakalářské práci. Také použitý krok je z našeho pohledu optimální, protože musíme najít kompromis mezi požadovanou přesností a časovou náročností měření (měření skenu vytyčeného těmito oblastmi excitace a emise s výše zmíněným krokem trvá asi 1 hodinu). 3D EEM spektrum huminových látek HS je většinou charakterizováno přítomností fluorescenčního maxima se širokým emisním pásem. Ve spektrech je často přítomen ostře ohraničený pás fluorescenčních maxim, které vznikají rozptylem světla. Tento pás píků je více patrný u vzorků huminových látek s nižší koncentrací, kde je fluorescenční signál slabý. V této práci použili k odstranění těchto fluorescenčních maxim metodu MCR-ALS (Multivariate curve resolution alternating least squares). Dále bylo zjištěno, že intenzita fluorescence roste lineárně spolu se vzrůstající koncentrací jen v omezených koncentracích huminových látek ve vzorku. Nelineární průběh křivky byl pozorován u těchto vzorků v rozmezí koncentrací $30\text{--}60\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, což je způsobeno efektem IFE.

Jie Chen a kol. prezentovali emisní spektra HA s maximem kolem 510 nm. Synchronní fluorescenční spektroskopie poskytuje vyšší citlivost a zlepšení rozeznání fluorescenčních maxim ve srovnání s tradičními emisními fluorescenčními technikami. Synchronní excitační spektrum HA při $\Delta\lambda=20\text{ nm}$ je charakterizováno ostrým hlavním píkem kolem 460 nm a dvě menší fluorescenční maxima při 480 a 490 nm. Při přepočtu fluorescenčních maxim na pozice odpovídajících emisních píků byly zjištěny tyto hodnoty 480, 500 a 510 nm. [32]

T. M. Miano a kol. studoval pomocí synchronní fluorescenční metody huminové látky izolované z různých půdních matric. Huminové a fulvinové kyseliny byly podrobeny studiu při různých koncentracích a hodnotách pH. V této studii byl použit různý rozdíl vlnových délek a to v rozmezí $\Delta\lambda\ 12\text{--}90\text{ nm}$. Hlavní fluorescenční maximum se v synchronním excitačním spektru posouvalo k vyšším vlnovým délkám v rozmezí 424–476 nm a to při klesající hodnotě $\Delta\lambda$. Intenzita fluorescence se zvyšovala s rostoucí koncentrací huminových látek. Při koncentracích vyšších jak $70\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ byla intenzita prakticky stejná a dominantní pík byl lokalizován při 473–475 nm a $\Delta\lambda=18\text{ nm}$. Vedlejší fluorescenční píky se začaly ve spektru vyskytovat s klesající koncentrací vzorků. Tyto píky byly lokalizovány v oblastech 404–405, 457–458 a 493 nm. [33]

Synchronní fluorescenční metoda zvláště 3D SFS (Total synchronous fluorescence scan) je hojně využívána v oblastech stanovení ropných produktů (nafty, benzínu a petroleje) a motorových olejů [36], huminových látek a jejich frakcí a k přesnější lokalizaci fluorescenčních maxim oproti měřicí metodě EEM. [37]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce je studium huminových látek (huminových kyselin a fulvokyselin) pomocí fluorescenční spektroskopie, za použití 3D emisně excitační metody. Dalším cílem práce bylo zefektivnit měření touto metodou, nalézt optimální parametry nastavení a následné zpracování naměřených dat v 3D spektra. Nalézt případné rozdíly v pozicích hlavních fluoroforů vzorků HAS, FAs a jejich relativních intenzit a následně porovnat výsledky s literaturou, případně se standardem FA Elliott. Výsledky této práce by měly ukázat na rozdíly mezi HAS a FAs a také mezi konkrétní maticí.

Každý z pěti vzorků byl nejprve proměřen v oblasti vlnových délek 300–600 nm (emise) a 300–600 nm (excitace), z důvodu nutnosti získání informací o přibližné poloze fluorescenčních maxim a určení optimálního budícího napětí xenonové lampy spektrofluorimetru. V druhé fázi bylo už měření směřováno na specifické oblasti s pravděpodobným výskytem fluorescenčních maxim, za účelem co možná nejpřesnějšího určení jejich polohy nebo relativní intenzity.

3.1 Příprava vzorků

3.1.1 Použité chemikálie

- hydroxid sodný (p.a.), Lachema, Lach – Ner s.r.o., Neratovice,
- hydroxid sodný Normanal 1 mol·dm⁻³, Lachema, Lach – Ner s.r.o., Neratovice.

3.1.2 Použité vzorky huminových látek

- standard fulvinové kyseliny Elliott Soil II (2S102F) dodávaný společností IHSS,
- huminová kyselina, půdní typ kambizem modální z lokality Vatín, připravena kolektivem MZLU AF Brno,
- fulvinová kyselina, půdní typ kambizem modální z lokality Vatín, připravena Dr. Fasurovou a Evou Rubínkovou,
- lignitická huminová kyselina, připravena Dr. Fasurovou,
- humát 04/06, připravený Dr. Kučeríkem.

Tab. 1 *Elementární analýza standardu FA Elliott Soil a FA kambizem Vatín (v hmot. %)*

FA	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Vlhkost [%]	Popel [%]	Zdroj
Standard	50,12	30,64	4,28	3,75	10,20	1,01	[30]
Kambizem	56,33	34,02	4,41	5,37	14,19	17,08	

Analýza vzorku fulvokyseliny Vatín byla provedena na Strojírenském zkušebním ústavu Brno, CHNS/O Analyzátor PE 2400.

Obsah popela ve vzorku FA byl měřen metodou TGA, TA Instruments Q5000IR, teplotní režim do 800 °C, Dr. Kučerík.

3.1.2.1 Popis půdního profilu kambizemě Vatín

Půdní vzorky byly odebrány z humusového horizontu (0 – 20 cm) kambizemě modální na VPS Vatín, AF MZLU v bramborářské výrobní oblasti. Lokalita se nachází v oblasti Česko-moravské vrchoviny v nadmořské výšce kolem 530 m n. m.. Jedná se o slabě mírně teplou klimatickou oblast s průměrem ročních srážek 621 mm, které jsou zároveň hlavním limitujícím faktorem půdní úrodnosti. Půdní typ je klasifikován jako kambizem modální, varieta kyselá, na rule, půdní druh; lehčí střední zemina (Němeček a kol. 2001).

- Aop (0 až 23 cm) – ochrický humusový horizont, orán před založením stávajícího pokusu; barva za vlhka hnědá 7,5YR4/4 až 4/3; struktura drobtová, v drnu středně, pod drnem slabě vyvinutá; písčito-hlinitá s příměsí kamení ve spodní části horizontu (do 10 % skeletu); vlhká až vlhá, neplastická.
- Bv (23 až 49 cm) – kambický horizont; barva za vlhka rezavohnědá 7,5YR4/6; bez zřetelné struktury; silně kamenitá, střední (jemnozern písčito-hlinitá), s hloubkou rychle roste obsah i velikost skeletu (největší o velikosti 28 cm, jsou slabě zaoblené, slabě až středně zvětřelé); jemnozern vlhá, drobná; slabé prokořenění pouze ve svrchní části horizontu, hlouběji žádné, přechod pozvolný.
- BC (49 cm a více) – přechodný horizont; barva za vlhka rezavohnědá až hnědá 7,5YR4/6 až 7,5YR4/4 díky tmavě zbarveným písčítým částicím s podílem biotitu; slabě zaoblené, vzájemně zaklíněné kameny biotitické ruly představují asi 80 % hmoty.

Tab. 2 *Elementární analýza huminových kyselin a humátů (v hmot. %)*

HA	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
kambizem	52,79	32,66	5,17	4,18	5,2
lignit	57,5	32,1	5,1	2,5	2,8
humát 04/06	41,53	28,45	2,99	1,12	25,91

3.1.3 Použité přístroje a metody

- Aminco Bowman Series 2, program AB2 (fluorescenční spektroskopie),
- OriginPro 6.1 (zpracování dat),
- Powersonic UCC 1 (ultrazvuk).

3.1.4 Příprava roztoků huminových a fulvinových kyselin

Roztoky o koncentraci $0,05 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny následujícím postupem. Navážka $0,0025 \text{ g}$ kyseliny byla kvantitativně převedena do 50 cm^3 odměrné baňky a doplněna $0,5 \text{ M}$ roztokem NaOH po rysku. Vzorky kyselin byly protřepány a dále byly ponechány 1–2 dny v lednici ke stabilizaci. Před vlastním měřením byly vzorky vždy důkladně protřepány.

Vzorek půdní huminové kyseliny z lokality Vatín byl připraven následujícím postupem. Pro optimalizaci měření byla koncentrace roztoku zvolena na $0,055 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Navážka $0,00275 \text{ g}$ kyseliny byla kvantitativně převedena do 50 cm^3 odměrné baňky a doplněna $0,5 \text{ M}$ roztokem NaOH po rysku. Vzorek kyseliny byl vložen na 15 minut pod ultrazvuk a dále byl ponechán 1–2 dny v lednici ke stabilizaci. Před vlastním měřením byl vzorek důkladně protřepán.

3.1.5 Příprava roztoku hydroxidu sodného

Roztok o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven z normalu o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jeho doplněním destilovanou vodou na objem 1000 cm^3 . (výrobce Lach-Ner s.r.o.)

Roztok o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven z normalu o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a jeho zředěním destilovanou vodou na polovinu. (výrobce Lach-Ner s.r.o.)

3.1.6 Extrakce huminových látek

3.1.6.1 Extrakce huminových kyselin z půd

Izolace HA byla provedena podle standardní metody společnosti IHSS. [31] Výchozí množství předem vysušené a prosíté půdy (jemnozemě, 1 mm) bylo 100 g. K půdě byl přidán roztok 10% HCl a směs byla míchána po dobu 1–2 hodin. Po negativním pozorování vzniku CO_2 byl ke sraženině přidán roztok 0,05 M HCl. Po negativní reakci na vápenaté ionty byla sraženina promyta destilovanou vodou. Po negativní reakci na chloridové ionty byl ke sraženině přidán roztok 0,1 M NaOH a směs bylo třepáno 7–8 hodin. Potom byla směs ponechána 6 hodin stát a následně se roztok odstředil (15 min, při $5000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$). Eluce pomocí NaOH a odstřeďování byly provedeny dvakrát. K precipitování (vysrážení) HA dojde po přidavku takového množství HCl až je roztok okyselen na hodnotu $\text{pH}=1$. Supernatant (roztok) obsahující FA se sbírá do nádoby. Sraženina HA byla dekantována destilovanou vodou, promyta vodou a přečištěna směsí 0,5% roztoku HCl a HF. Následně byla HA dialyzována v membránách SpectraPor o molekulové hmotnosti MWCO 3500 a vymrazeny při teplotě -50°C .

3.1.6.2 Extrakce fulvinových kyselin z půd

Extrakce FA byla provedena adsorpcí na hydrofobní pryskyřici Supelite v koloně. Supelite byl nejprve aktivován v koloně v H^+ cyklu (0,1 M HCl) a po nasorbování FA z roztoku na Supelite byla provedena desorpce pomocí roztoku NaOH (0,1 M). Roztok FA byl pak dialyzován v membránách SpectraPor o molekulové hmotnosti MWCO 1000. Izolovaný roztok fulvokyselin byl následně přečištěn směsí HCl a HF. Dialýza se provádí v destilované vodě, jeden týden a pak se FA vymrazí při -50°C .

3.2 Fluorescenční spektroskopie

3.2.1 Instrumentace

Zdrojem světla fluorescenčního spektroskopu Aminco Bowman Series 2 je xenonová lampa. Světelný svazek paprsků produkovaný touto lampou prochází přes první, excitační monochromátor do křemenné kyvety se vzorkem. Při průchodu vzorkem dochází k emisi záření, která následně projde přes druhý, emisní monochromátor a je zachycen detektorem spektroskopu. Získaná data jsou dále vyhodnocena pomocí programu AB2.



Obr. 5 *Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2*

3.2.2 Pracovní postup

3.2.2.1 Podmínky měření

- teplota měření 20°C (u vzorku kontrolována termostatem a v laboratoři klimatizací),
- šířka štěrby (bandpass) 4 nm na excitačním a emisním monochromátoru,
- nastavení monochromátorů (350/397), u excitačního 350 nm a 397 nm na emisním,
- citlivost přístroje 60 %,
- budicí napětí nejčastěji v rozmezí 890–1025 V,
- emisní sken v oblasti 300–600 nm,
- excitační sken v oblasti 300–600 nm,
- křemenná kyveta ze skla Spectrosil o tloušťce 1 mm,
- v případě měření synchronních spekter byl rozsah měření měněn od 200 do 600 nm, při různé hodnotě rozdílu mezi monochromátory ($\Delta\lambda=15$ až 150 nm), s krokem měření 5 nm.

3.2.2.2 Seznámení s technikou přístroje Aminco Bowman Series 2

- zkoušení různých parametrů nastavení přístroje (různé budicí napětí, autorange, nastavení monochromátorů, rozdílné oblasti skenů, různé velikosti kroků měření),
- měření synchronních 3D spekter a 3D emisně excitačních spekter (EEM).

3.2.2.3 Měření vzorků

Byly připraveny vzorky huminových a fulvinových kyselin nejčastěji o koncentraci $c = 0,05 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jak vzorky huminových tak i fulvinových kyselin byly rozpuštěny v 0,5 M NaOH a jejich pH zůstalo na výchozí hodnotě, která byla větší než pH 12. Abychom získali

homogenní roztoky byly vzorky důkladně protřepány, případně byly vloženy pod ultrazvuk. Takto připravené vzorky byly ponechány v lednici 1–2 dny ke stabilizaci.

Měření fluorescenčních 3D emisně excitačních a 3D SFS spekter bylo realizováno za použití křemenné kyvety (materiál Spectrosil), která propouští elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 170–2700 nm.

Nejprve byla spuštěna xenonová lampa a dále samotný přístroj Aminco Bowman Series 2. Následovalo spuštění počítače s vyhodnocovacím programem AB2. Před samotným měřením byl vzorek v kyvetě vytemperován na požadovanou teplotu (20°C) pomocí termostatu. Následně byly nastaveny parametry pro export naměřených dat a přihlášení uživatele do řídicího programu AB2. Po iniciaci instrumentace byly nastaveny parametry měření (šířka štěrbin, monochromátory, citlivost, budící napětí nejčastěji funkcí autorange, velikost kroku měření, velikost $\Delta\lambda$...). Následovalo pojmenování souboru a spuštění samotného měření. Získaná spektrální data byla zpracována programy OriginPro 6.1 a Microsoft Excel.

3.2.2.4 Zpracování spektrálních dat

Naměřená data u 3D emisně excitačních skenů byla exportována programem AB2 ve formě textových souborů, která bylo nutné následně zpracovat a vymodelovat z nich 3D spektra pomocí vyhodnocovacího programu Origin. Měření je totiž založeno na zaznamenávání hodnot emise při pevném excitačním kroku a tudíž hodnoty ležící mezi dvěma kroky excitace musí být dopočítány programem AB2. Tento způsob záznamu 3D spekter je v současné době často používanou metodou a následné programové zpracování je nezbytné pro tvorbu výsledného 3D emisně excitačního spektra nebo jeho horizontálních řezů.

Podobným způsobem byly zpracovány data z 3D synchronní fluorescenční spektroskopie.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Fluorescenční spektroskopie huminových látek

3D emisně excitační spektra roztoků huminových látek byla měřena na spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2. Nejprve byly provedeny orientační skeny k výběru optimálního nastavení přístroje. Jeden z důležitých parametrů je nastavení citlivosti přístroje, které přímo souvisí s měřicím napětím. Nastavení těchto dvou parametrů ovlivňuje velikost relativní fluorescenční intenzity (R.F.I.), která může nabývat hodnot 0–9,99. Vysoké hodnoty relativní fluorescenční intenzity při měření mohou poškodit detektor, proto je optimální nastavení citlivosti spektrofluorimetru 60 %. Optimální hodnotu měřicího napětí při dané citlivosti přístroje zajišťuje funkce Autorange. Měřicí napětí může nabývat hodnot 0–1275 V. Funkcí Autorange byly určeny hodnoty optimálního napětí ke každému vzorku. V případě některých měření bylo napětí nastaveno na požadovanou hodnotu pro korigování výsledků spekter. Hodnoty měřicího napětí se během všech měření pohybovaly v rozmezí 890–1025 V.

Měřicí přístroj umožňuje volbu nastavení šířky štěrbin obou monochromátorů v rozsahu 1–16 nm. Nejvhodnější nastavení šířek štěrbin obou monochromátorů v případě vzorků huminových látek je šířka 4 nm.

Výchozí nastavení monochromátorů pro měření excitačních a emisních spekter bylo u emisního 397 nm a u excitačního 350 nm. V případě 3D spekter je toto nastavení monochromátorů během měření měněno podle zadání rozsahu a kroku měření.

Vlastní měření 3D fluorescenčních spekter vzorků huminových látek se stává z několika fází. V prvním kroku byla u 3D emisně excitačního spektra proměřena oblast excitace v rozmezí 300–600 nm se skenovacím krokem 5 nm a oblast emise v rozmezí 300–600 nm se skenovacím krokem 5 nm za sekundu. Při takovém nastavení máme přehled o přibližné poloze hlavního fluorescenčního maxima a jsme schopni identifikovat vedlejší fluorescenční píky. Doba měření tohoto 3D emisně excitačního spektra je cca 60 minut.

V druhém kroku byly určeny přibližné polohy vybraných fluorescenčních maxim, do kterých byly směřovány oblasti skenování s nižším krokem měření. V druhém kroku se již oblasti skenů lišily podle měřeného typu vzorku. Pro udání přesných poloh fluorescenčních maxim byl stanoven skenovací krok excitace na 1 nm a skenovací krok emise na 1 nm za sekundu. Doba měření těchto spekter se pohybovala v rozmezí 40–80 minut pro jedno maximum.

Vzorky huminových látek byly při měření temperovány na teplotu 20°C a tato teplota byla po celou dobu měření udržována pomocí termostatu.

Během první fáze měření byly u našich vzorků huminových látek lokalizovány 1 až 3 fluorescenční maxima, jejichž polohy byly ve druhé fázi upřesněny s požadovanou přesností na 1 nm. Tyto maxima byly popsány pomocí jejich relativních intenzit fluorescence (R.F.I.), nichž prvnímu maximu odpovídala vždy nejvyšší relativní intenzita fluorescence.

4.1.1 Vzorek huminové kyseliny a humátu pocházejících z lignitické matrice

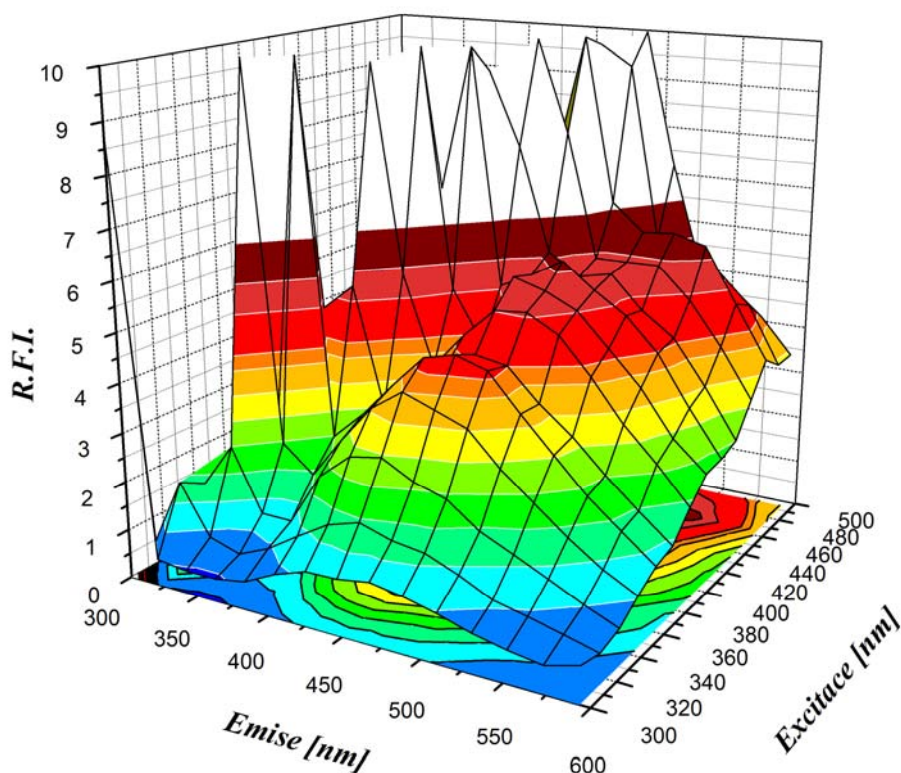
Cílem experimentu bylo určit hlavní fluorofory ve vzorku lignitické huminové kyseliny a humátu připraveného ze stejné matrice. Podle literárních údajů mají půdní a lignitické HA typu II podle rozdělení v práci Senesi a kol. 1991 celkem 3 píky, tedy tři fluorofory. Hlavní jsou dva a to při excitaci 450 nm a 468 nm. Tato maxima byla již dříve ověřena v měření

excitačních spekter. Další pík mají tyto vzorky při excitaci nižší než 400 nm, kdy tato excitace je málo intenzivní. V předchozí diplomové práci [34] však byly identifikovány metodou EEM pouze 2 píky u huminové kyseliny a u humátu jen jedno maximum. Zaměření této části bakalářské práce bylo nalézt dosud neupřesněná maxima.

Vzorek lignitické huminové kyseliny byl izolován z lignitu (lokalita Mikulčice) a humát byl připraven z izolované kyseliny titrací roztokem 0,5 M HCl na pH 7. Byly předpokládány rozdíly v emisních vlnových délkách huminové kyseliny a humátu a také se předpokládala přítomnost dalších píků v oblasti pod 400 nm. Při této práci bylo nutné nalézt optimální nastavení pro měření a vyhodnocování dat. Výsledky práce byly následně porovnány s literárními údaji.

4.1.1.1 Měření vzorku lignitické huminové kyseliny

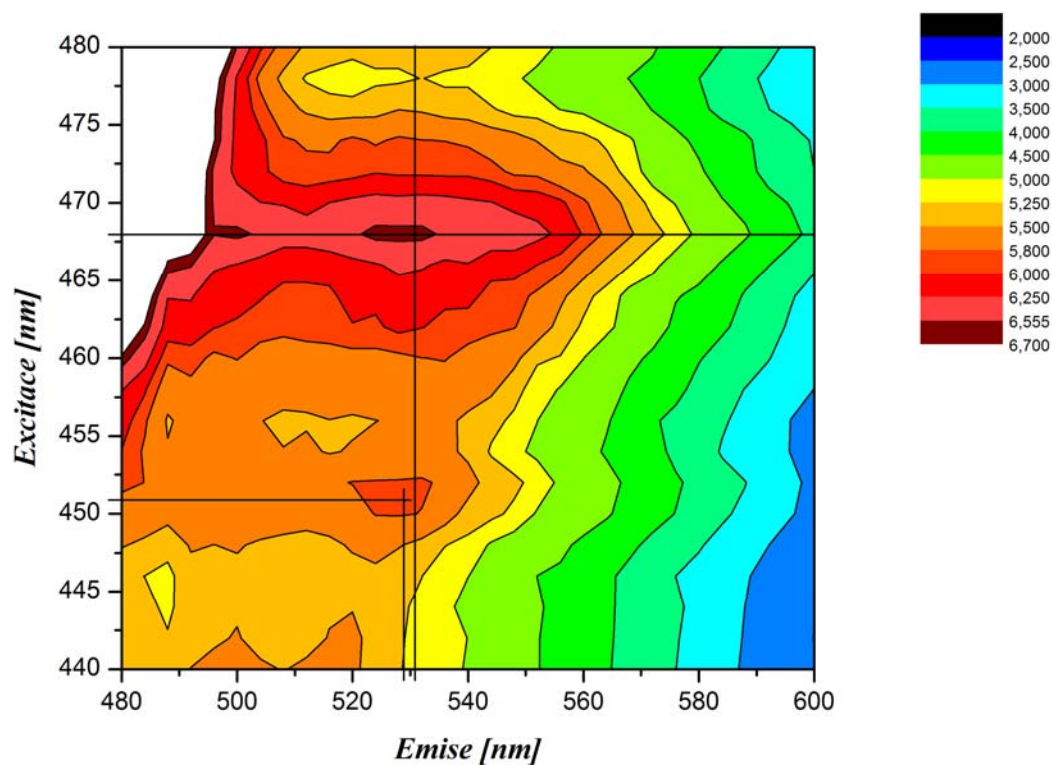
Vzorek lignitické HA byl rozpuštěn v 0,5 M roztoku NaOH o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. První měření bylo provedeno při měřicím napětí 990 V a je znázorněno na (Obr. 6). Ve spektru je patrný dominantní pík, jehož poloha byla v první fázi měření určena na 465/530 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Dále ve spektru byla předpokládána i přítomnost menších fluorescenčních maxim na které jsme se zaměřili v dalším skenu.



Obr. 6 Fluorescenční 3D EEM spektrum vzorku HA lignitická ($c = 50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)

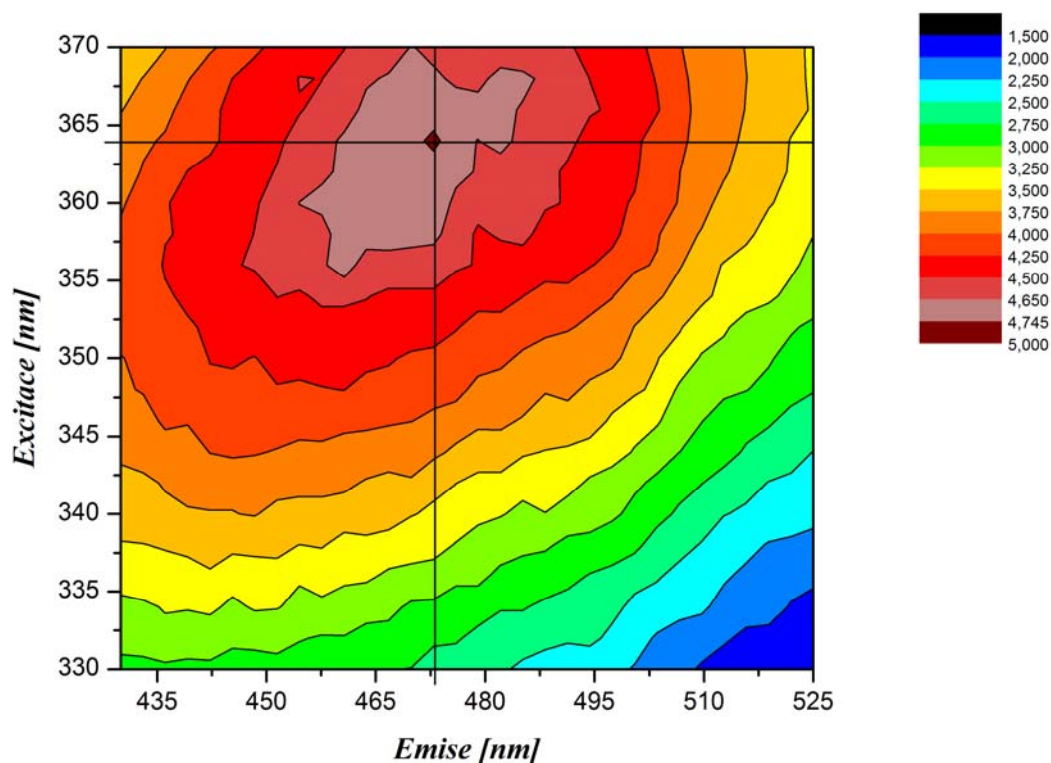
Po přibližném určení polohy dominantního píku následovalo zmenšení kroku měření i skenované oblasti. Měření spektra dominantního píku proběhlo v oblastech 480–600 nm u emise a 440–480 nm u excitace s krokem skenování 1 nm u excitace i emise. Takto byla poloha maxima upřesněna na 468/531 nm (Obr. 7) při napětí 990 V a intenzita maxima byla

6,648 R.F.I.. Poloha druhého fluorescenčního maxima (Obr. 7) byla lokalizována na 451/529 nm. Druhý fluorescenční pík se nacházel v těsné blízkosti hlavního fluorescenčního maxima. Relativní intenzita fluorescence druhého maxima měla při tomto použitém napětí hodnotu 5,977.



Obr. 7 Horizontální řez spektrofluorogramem 1. a 2. maxima HA lignitická

Měření spektra třetího píku proběhlo v oblastech 430–525 nm u emise a 330–370 nm u excitace s krokem skenování 1 nm u excitace i emise. Takto byla poloha maxima upřesněna na 364/472 nm (Obr. 8) při napětí 990 V a intenzita maxima byla 4,771 R.F.I..



Obr. 8 Horizontální řez spektrofluorogramem 3. maxima HA lignitická

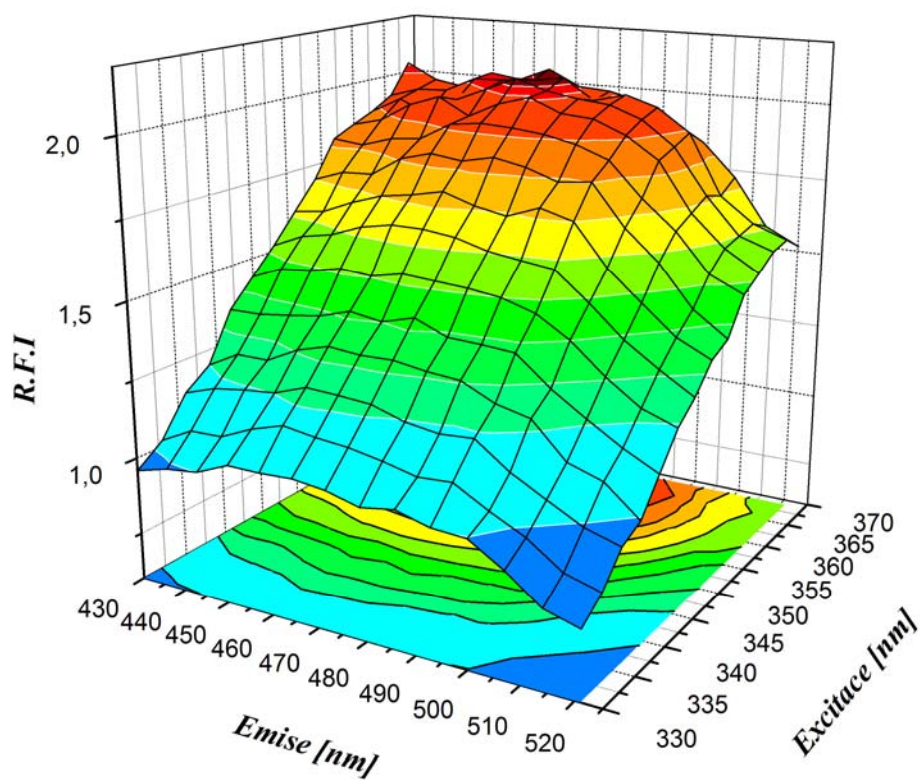
V této části práce se podařilo přesně lokalizovat všechna hledaná maxima a poloha třetího maxima se podařila upřesnit.

4.1.2 Vzorek humátu 04/06

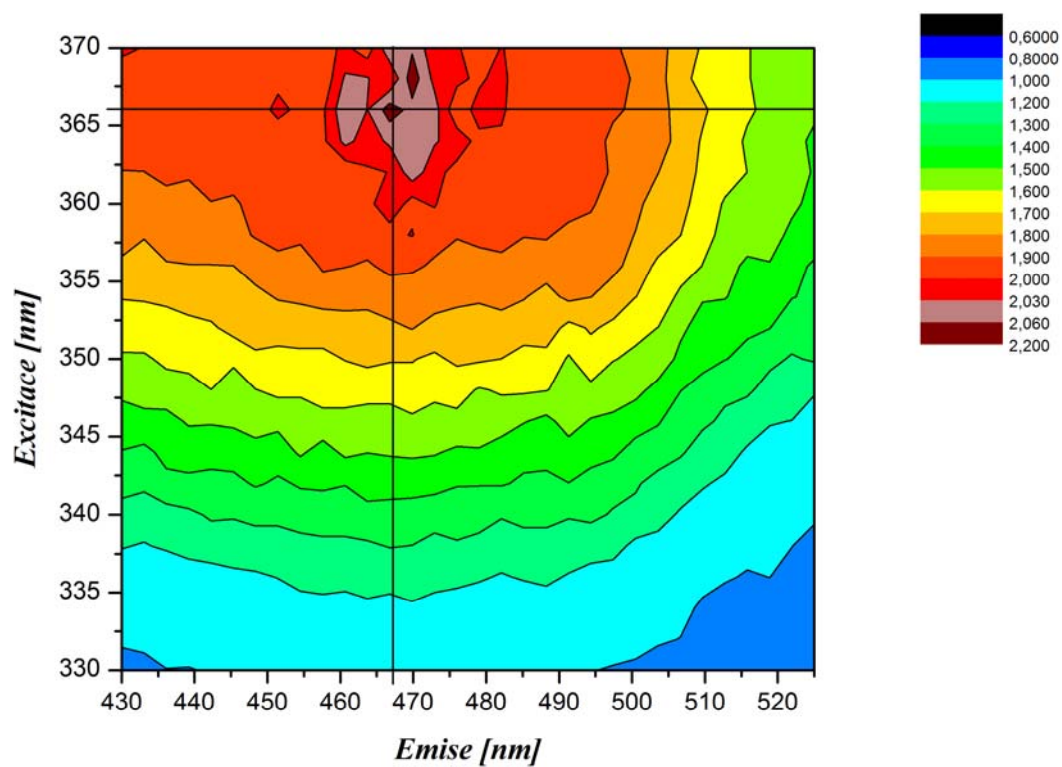
4.1.2.1 Měření vzorku humátu 04/06

3D emisně excitační spektrum (Obr. 9) bylo v první fázi proměřeno při měřicím napětí 895 V. Toto spektrum bylo získáno proměřením oblasti excitace v rozmezí 330–370 nm se skenovacím krokem 5 nm a oblasti emise v rozmezí 430–525 nm se skenovacím krokem 5 nm za sekundu. Ve spektru je patrné dominantní fluorescenční maximum, jehož poloha byla v první fázi měření určena na 365/475 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

Následovalo zmenšení kroku měření a také skenované oblasti. Ve druhé fázi (Obr. 10) byla poloha dominantního fluorescenčního maxima upřesněna na 367/468 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) s přesností 1 nm. Spektrální oblast měla u emise velikost v rozmezí 430–525 nm, oblast excitace v rozmezí 330–370 nm a použité budící napětí bylo rovněž 895 V. Relativní intenzita fluorescence maxima měla hodnotu 2,102.



Obr. 9 Fluorescenční 3D EEM spektrum vzorku humátu 04/06 ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)



Obr. 10 Horizontální řez spektrofluorogramem nalezeného maxima humátu 04/06

4.1.3 Závěr

Z výsledků fluorescenčních EEM spekter lignitických vzorků vyplývá, že v případě huminové kyseliny byly nalezeny celkem tři píky a u humátu jen jeden pík, což bylo způsobeno nízkou hodnotou relativní intenzity fluorescence. V případě vzorku humátu však bylo nalezeno hledané maximum. Dále u těchto vzorků nebyl zaznamenán významný posun druhého fluorescenčního maxima v oblasti excitačních i emisních vlnových délek.

Výsledky hlavních fluorescenčních maxim vzorku lignitického humátu a lignitické huminové kyseliny určené v této bakalářské práci jsou uvedeny v následující tabulce modře, ostatní údaje jsou výsledky z předešlých studií (Fasurová, DP Mlčoch 2008) a jsou také přidány výsledky vyhodnocené metodou 3D SFS (DP Konečná 2009) z důvodu porovnání výsledků těchto dvou metod. Přesnější výsledky poskytuje metoda EEM, protože krok měření byl v tomto případě 1 nm, zatímco u metody 3D SFS byl krok měření 5 nm. Z tabulky číslo 3 vyplývá, že byla zjištěna shoda u prvního fluorescenčního maxima humátu a to oběma metodami, přičemž malý rozdíl byl pozorován u druhého píku, který byl posunut k nižší vlnové délce emise. Výsledky prvních píků lignitických vzorků odpovídají pozici standardu LHA při 454/511 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), kdy uvedená pozice píku je lokalizována s přesností ± 7 nm. [23] Fluorescenční spektrum je také uvedeno na webových stránkách IHSS, kde však přesnou polohu excitace a emise nelze určit přesně. [31]

Výsledky v tabulce 3 uvedené černě jsou převzaty z diplomové práce T. Mlčocha 2008, který lokalizoval fluorescenční maximum lignitické HA v oblasti 395/490 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) a hlavní fluorescenční pík humátu 04/06 byl lokalizován v oblasti 359/465 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

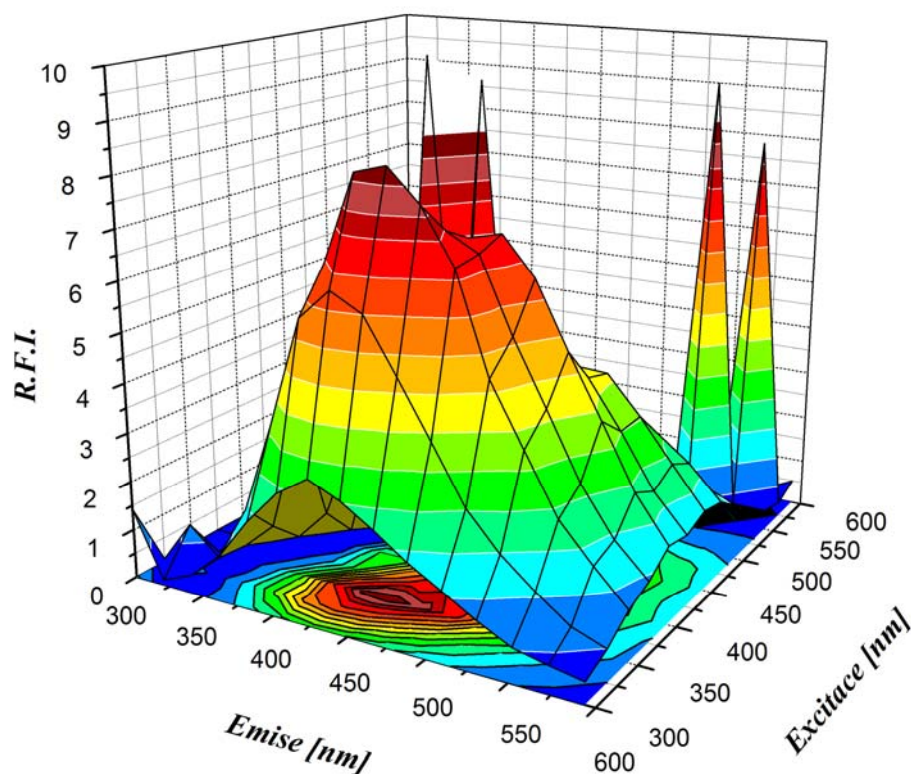
Tab. 3 Výsledky měření hlavních fluorescenčních maxim lignitických vzorků a porovnání s literárními údaji (DP T. Mlčoch 2008, S. Konečná 2009)

	3D EEM			3D SFS	
	Maximum 1	Maximum 2	Maximum 3	Maximum 1	Maximum 2
Název vzorku	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$
humát 04/06	$\lambda_{ex}>451/\lambda_{em}>500$	451/528	359/465	467/502-547	438-458/468
HA lignit	468/531	451/529	364/472	-	-
HA lignit	-	395/490	355/458	-	-

4.1.4 Vzorky fulvinových kyselin

4.1.4.1 Měření vzorku standardu fulvinové kyseliny Elliott Soil II (2S102F)

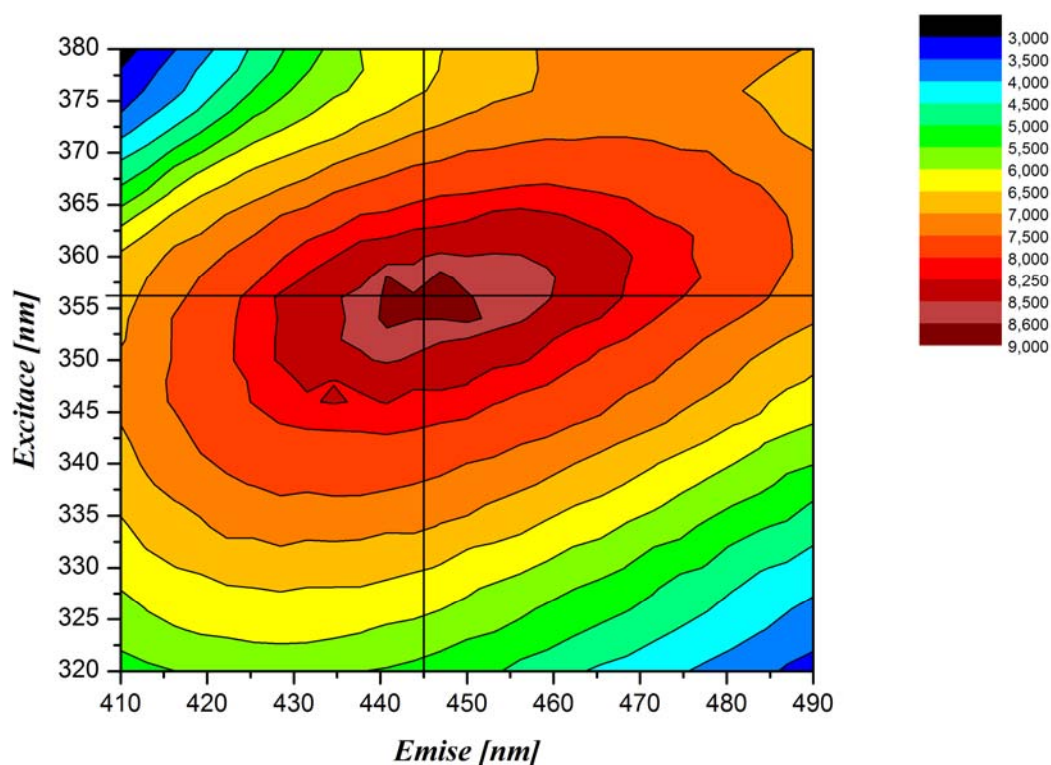
Vzorek standardu fulvinové kyseliny byl rozpuštěn v 0,1 M roztoku NaOH o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. První měření bylo provedeno při měřicím napětí 930 V a je znázorněno na (Obr. 11). Ve spektru je patrný dominantní pík, jehož poloha byla v první fázi měření určena na 358/450 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).



Obr. 11 Fluorescenční 3D EEM spektrum vzorku Elliott Soil II ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Po přibližném určení polohy dominantního píku následovalo zmenšení kroku měření i skenované oblasti. Měření spektra dominantního píku proběhlo v oblastech 410–490 nm u emise a 320–380 nm u excitace s krokem skenování 1 nm u excitace i emise. Takto byla poloha maxima upřesněna na 356/445 nm (Obr. 12) při napětí 930 V a intenzita maxima byla 8,654 R.F.I..

Podle údajů v literatuře [23], [33] mají fulvokyseliny (FA) hlavní fluorescenční píky přítomné při nižších hodnotách vlnové délky excitace i emise oproti huminovým kyselinám (HA). V této práci se podařilo metodou 3D EEM najít jen jeden pík.



Obr. 12 Horizontální řez spektrofluorogramem maxima standardu Elliott Soil II

4.1.4.2 Závěr

Vzorek standardu fulvinové kyseliny Elliott Soil II byl použit v první řadě jako referenční materiál. V současnosti je k dispozici standard FA Elliott Soil II, jehož polohy fluorescenčních maxim jsou uvedeny v práci Alberts, Takács 2004. [23] V této studii jsou popsána dvě fluorescenční maxima, která jsou lokalizována v oblastech 226/431 nm a 335/447 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Alberts a kol. [23] zvolil pro studium těchto maxim skenovací krok 7 nm u excitace i emise. Fluorescenční spektrum je také uvedeno na webových stránkách IHSS, kde však přesnou polohu excitace a emise nelze určit. [31]

Porovnáním námi naměřených výsledků s publikovanými výsledky Albertse a kol. bylo zjištěno, že lokalizace druhého fluorescenčního píku je téměř shodná. Změna nastala v případě excitační vlnové délky, kde byl zaznamenán posun k vyšší vlnové délce.

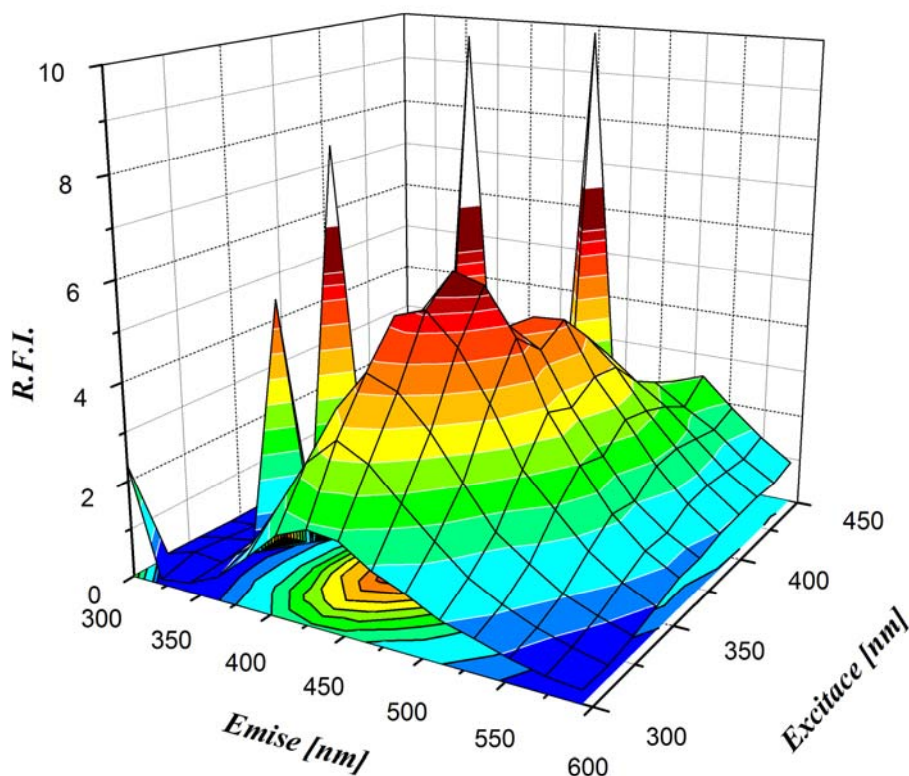
První maximum bylo ovlivněno přítomností rozptylu světla v měřeném spektru EEM a proto nedošlo k jeho lokalizaci. Rozptyl světla splýval s hlavním píkem. Z tohoto důvodu byl tento vzorek proměřen v diplomové práci S. Konečné 2009 metodou 3D SFS a hledalo se vhodné nastavení měření, tak, aby bylo možné tento pík zaznamenat. Metoda 3D SFS byla vhodná pro nalezení tohoto fluoroforu, který byl lokalizován v oblasti 450/475 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). [35] Výsledek měření ve formě pozice píku byl přidán do tabulky číslo 4.

4.1.4.3 Měření vzorku půdní fulvinové kyseliny

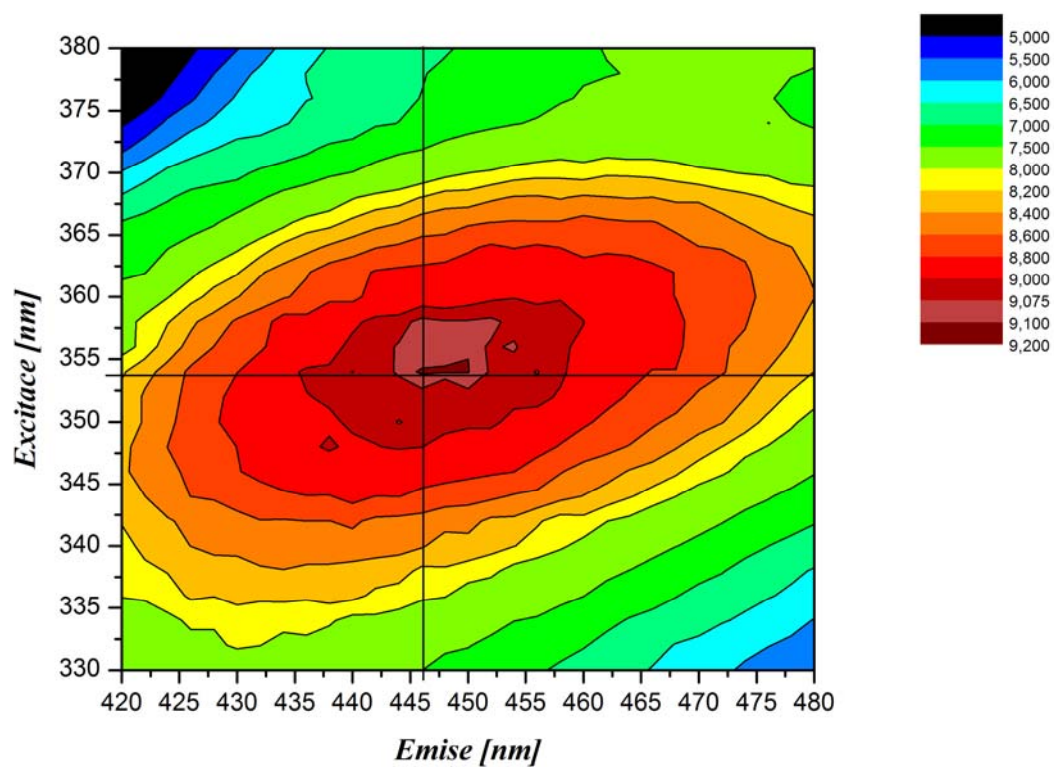
3D emisně excitační spektrum (Obr. 13) půdní fulvinové kyseliny (půdní typ kambizem, lokalita Vatin) bylo v první fázi proměřeno při měřicím napětí 850 V. Toto spektrum bylo získáno proměřením oblasti excitace v rozmezí 300–450 nm se skenovacím krokem 5 nm a oblasti emise v rozmezí 300–600 nm se skenovacím krokem 5 nm za sekundu. Ve spektru je patrné dominantní fluorescenční maximum, jehož poloha byla v první fázi měření určena na 360/455 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).

Následovalo zmenšení kroku měření a také skenované oblasti. Ve druhé fázi (Obr. 14) byla poloha dominantního fluorescenčního maxima upřesněna na 353/446 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) s přesností 1 nm. Spektrální oblast měla u emise velikost v rozmezí 420–480 nm, oblast excitace v rozmezí 330–380 nm a použité budící napětí bylo 915 V. Relativní intenzita fluorescence prvního maxima měla při tomto použitém napětí hodnotu 9,134.

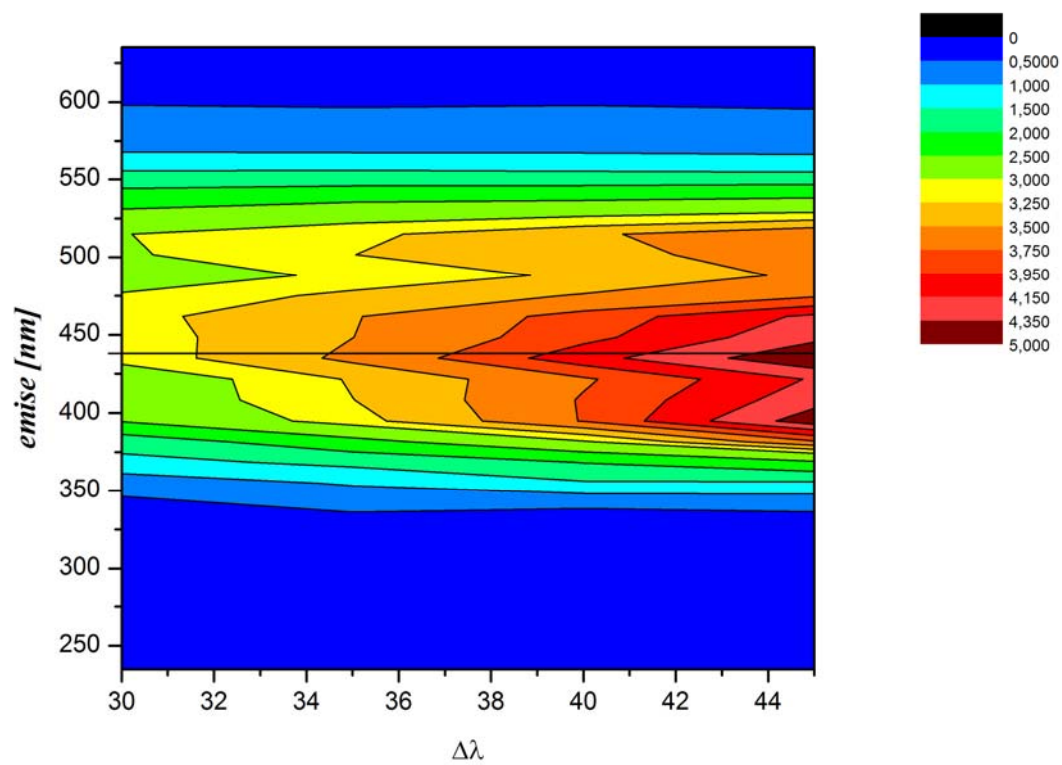
V další části práce bylo úkolem aplikovat metodu 3D SFS k lokalizaci neupřesněného druhého maxima vzorku fulvinové kyseliny. Výsledky zpracování řezu 3D synchronního spektra jsou uvedeny na obrázku 15, kde se podařilo nalézt optimální nastavení mezi monochromátory $\Delta\lambda=45$ nm a podařilo se vyhodnotit hledané maximum 397/442 nm s přesností ± 5 nm.



Obr. 13 Fluorescenční 3D EEM spektrum vzorku půdní fulvinové kyseliny ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)



Obr. 14 Horizontální řez spektrofluorogramem hlavního maxima půdní fulvinové kyseliny



Obr. 15 Horizontální řez 3D SFS spektrofluorogramem maxima půdní fulvinové kyseliny

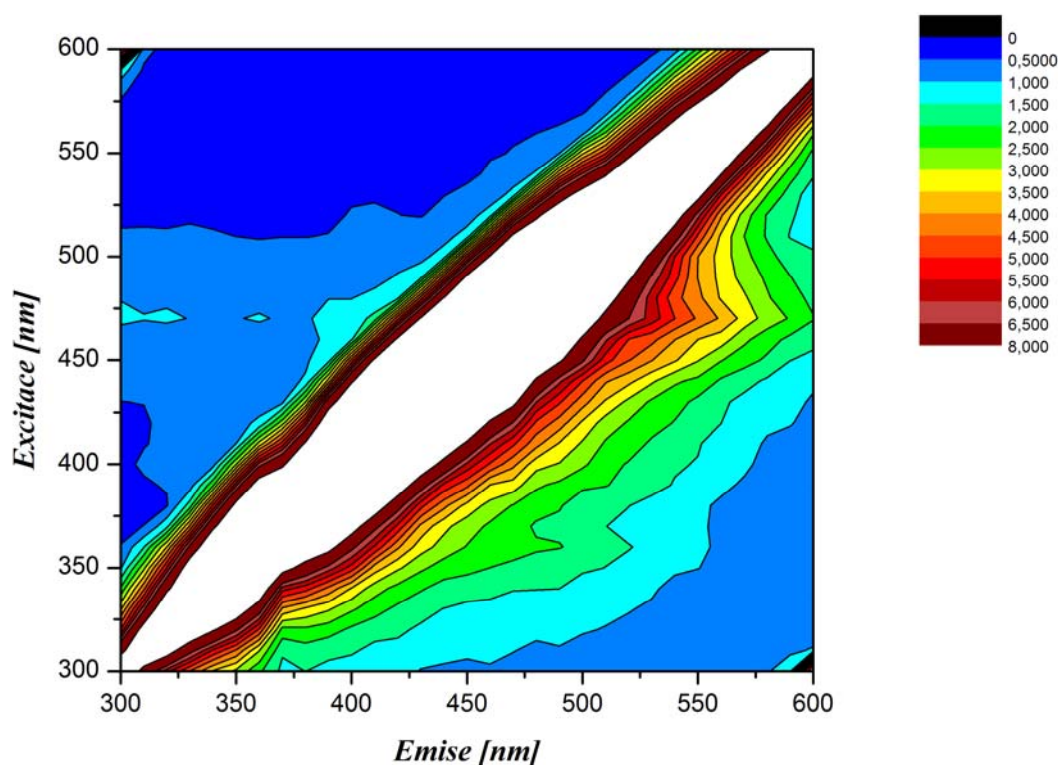
4.1.4.4 Závěr

Výsledné spektrofluorogramy vzorku půdní fulvinové kyseliny Vatín byly porovnány s fluorescenčními maximy standardu FA Elliott Soil II. Poloha hlavního fluorescenčního píku vzorku Vatín byla téměř totožná s lokalizací dominantního maxima standardu FA. Rozdíl vlnových délek upřesněných maxim byl u excitace 3 nm a u emise 1 nm. Další maximum bylo ovlivněno nežádoucím rozptylem světla, a proto nedošlo k jeho lokalizaci metodou EEM. Z tohoto důvodu byla použita metoda 3D SFS, která při měření udržuje konstatní rozdíl mezi nastavením monochromátorů $\Delta\lambda$. Ve spektru se pak zaznamenává závislost relativní intenzity fluorescence na emisní vlnové délce a hodnotě $\Delta\lambda$. Výsledné spektrum bylo nalezeno v oblasti $\Delta\lambda=30\text{--}45$ nm. Fluorescenční maximum bylo v tomto spektru lokalizováno při excitaci a emisi 397/442 nm (viz. obr.15). Při porovnání těchto vedlejších píků lze konstatovat, že pozice druhého píku vzorku FA Kambizem je pozorována při nižší vlnové délce emise. Tento rozdíl je způsoben rozdílnou lokalitou odběru a také půdního typu. Výsledky uvedené výše potvrzují, že ve spektrech EEM nebo 3D SFS fulvokyselin jsou přítomny dva píky (Alberts a kol.). [23]

4.1.5 Vzorek huminové kyseliny

4.1.5.1 Měření vzorku půdní huminové kyseliny

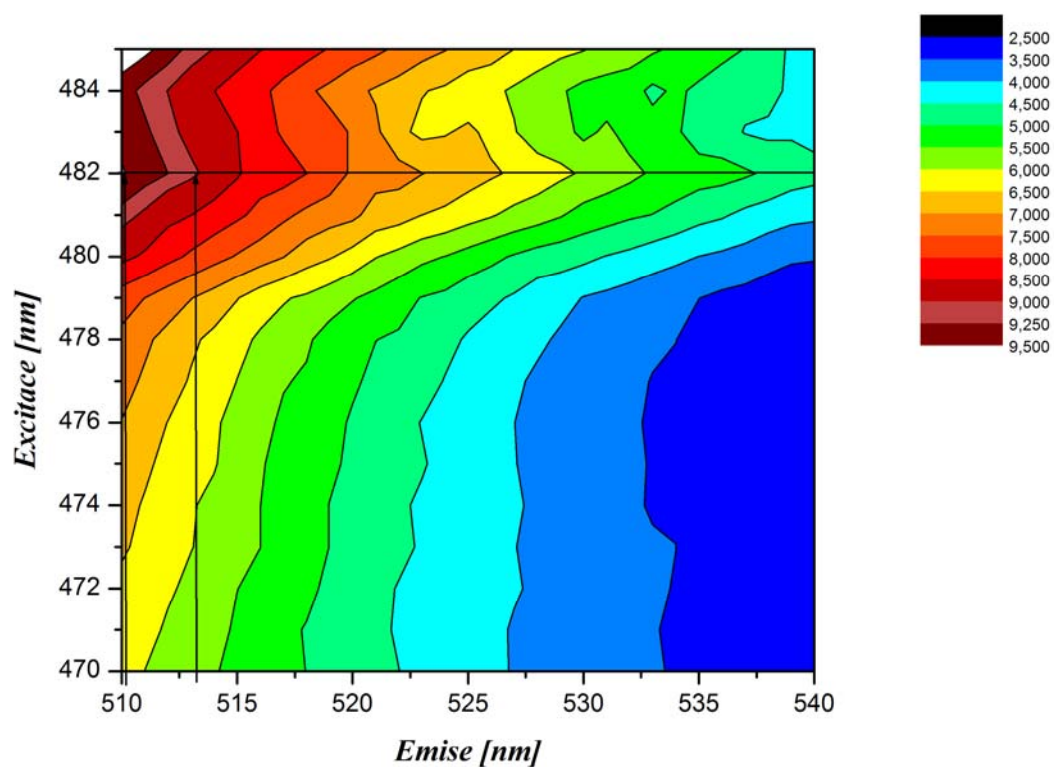
Vzorek půdní huminové kyseliny (půdní typ kambizem, lokalita Vatín) byl nejdříve proměřen v celé oblasti s krokem excitace a emise 5 nm. Výsledné 3D EEM spektrum pořízené při budícím napětí 980 V je znázorněno na (Obr. 16). Na základě literárních údajů bylo předpokládáno, že hlavní píky budou přítomny v oblasti vyšších vlnových délek při porovnání se vzorky FA. [33] Ve spektru EEM byly fluorescenční maxima více ovlivněny nežádoucím rozptylem světla, než v případě fulvokyselin, zvláště fluorescenční pík v oblasti nižších vlnových délek.



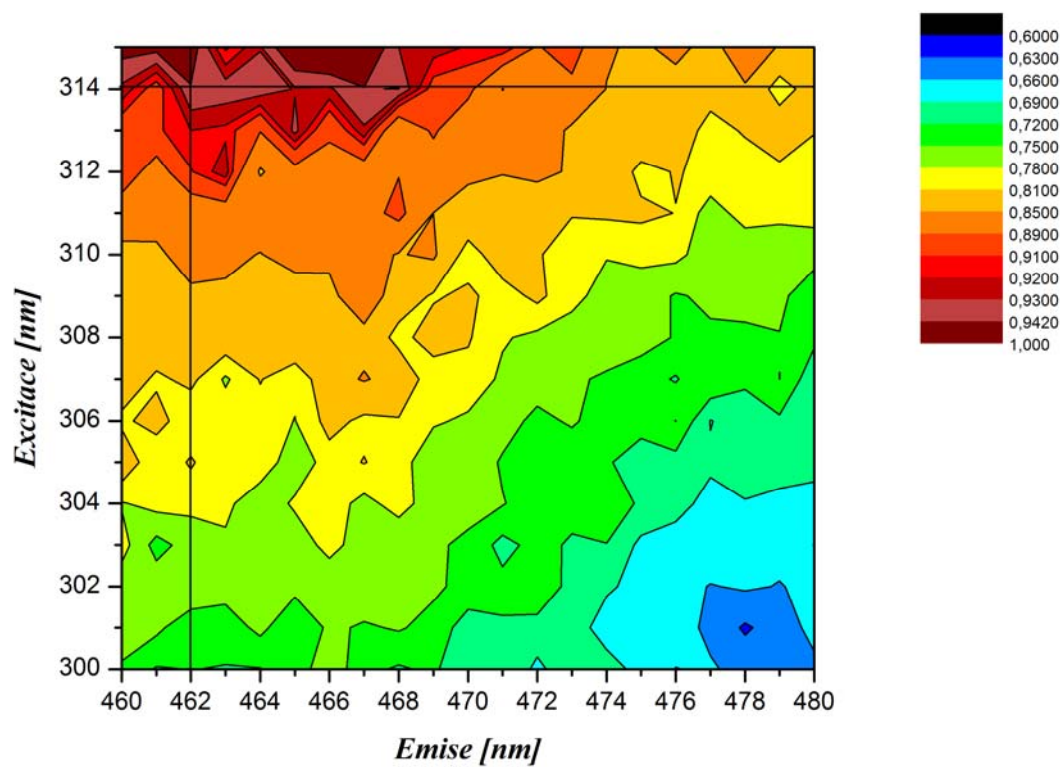
Obr. 16 Horizontální řez spektrofluorogramem půdní huminové kyseliny ($55 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Následovalo zmenšení kroku měření a také skenované oblasti. Měření spektra dominantního píku umístěného v oblasti vyšších vlnových délek proběhlo v rozmezí 470 – 485 nm u excitace a 510–540 nm u emise. Ve druhé fázi měření byla poloha fluorescenčního maxima stanovena na 482/510–513 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) (Obr. 17) při napětí 995 V a relativní intenzita maxima byla 9,311.

Dále bylo lokalizováno vedlejší fluorescenční maximum, které se nacházelo v oblasti nižších vlnových délek. Poloha tohoto vedlejšího píku byla určena na 314/462 nm (Obr. 18) s přesností na 1 nm. Spektrální oblast měla u emise velikost v rozmezí 460–480 nm, oblast excitace v rozmezí 300–315 nm a použité budící napětí bylo opět 995 V. Relativní intenzita fluorescence maxima měla při tomto použitém napětí hodnotu 0,941.



Obr. 17 Horizontální řez spektrofluorogramem dominantního maxima půdní HA



Obr. 18 Horizontální řez spektrofluorogramem vedlejšího maxima půdní HA

Třetí maximum bylo vyhodnoceno v DP Konečná metodou 3D SFS při 416–421/514 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$).

4.1.5.2 Závěr

V této práci byly nalezeny ve fluorescenčním spektru půdní HA dvě maxima. Třetí maximum bylo určeno v jiné práci. [35] Celkem byly ve vzorku půdní huminové kyseliny přítomny tři fluorescenční maxima. Podobně tomu bylo i v případě lignitické HA (viz. tabulka 4). Výsledky pozic píků však přesně nesouhlasí, což může být způsobeno půdním typem vybraného vzorku.

Při porovnání píku měřené půdní huminové kyseliny se standardem HA Elliott Soil [34] byla zjištěna pozice píku při 467/534 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). Rozdíly mezi výsledky těchto dvou vzorků nastaly v případě excitační i emisní vlnové délky. Excitační vlnová délka byla posunuta k vyšším vlnovým délkám s rozdílem 15 nm a emisní vlnová délka byla posunuta k nižším délkám emise s rozdílem ≈ 24 nm. V 3D EEM spektru bylo druhé maximum ovlivněno nežádoucím rozptylem světla a znemožňovalo jeho přesnou lokalizaci. Proto byl vzorek HA Vatín proměřen synchronní fluorescenční metodou.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na měření, zpracování a vyhodnocení emisně excitačních fluorescenčních spekter vzorků huminových a fulvinových kyselin. Úkolem práce bylo určit hlavní fluorofoxy vzorků půdní HA, FA, dále standardu FA a ověřit případné rozdíly mezi 3D EEM spektry lignitické HA a lignitického humátu.

Nejprve bylo ověřeno, že spektra EEM humátu a huminové kyseliny izolované z lignitu mají stejné fluorescenční píky. Dále bylo zjištěno, že obě metody, jak EEM, tak 3D SFS jsou vhodné pro stanovení multifluorofovních vzorků a pokud je ve spektru EEM přítomen rozptyl světla, který znesnadňuje lokalizaci píků, pak je výhodnější použití 3D synchronní metody.

Dále byly v této práci určeny dvě fluorescenční maxima půdní huminové kyseliny, kdy se výsledky oproti lignitickým vzorkům lišily, avšak při porovnání se standardem HA Elliott Soil byla nalezena jistá podobnost.

V další části práce byl určen hlavní pík půdní fulvokyseliny metodou EEM a druhý pík metodou 3D SFS. Zpracovaná data pozic fluoroforů ukázala, že fulvokyseliny obsahují ve fluorescenčním spektru dva píky. Výsledky vzorku fulvokyseliny a jejího standardu byly následně porovnány. Bylo zjištěno že, hlavní pík standardu půdní FA je shodný a vedlejší pík je posunut z důvodu nižší přesnosti měření.

Výsledky určení hlavních fluoroforů měřených vzorků jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4 Polohy fluorescenčních píků měřených vzorků HS a standardu IHSS (*), modrý údaj je výsledkem měření 3D SFS

Název HS	Maximum 1		Maximum 2		Maximum 3	
	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]
Lignitická HA	468	531	451	529	364	472
Kambizem HA	482	≈ 510-513	-	-	314	462
Humát HU 04/06	451	528	-	-	-	-
Elliott Soil FA (*)	356	445	-	-	-	-
Kambizem FA	353	446	397	442	-	-

Výsledky pozic píků určené metodou 3D EEM byly určeny s přesností na ± 1 nm. Výsledek jednoho maxima vzorku půdní HA metodou 3D SFS byl určen s přesností na ± 5 nm.

Tato bakalářská práce přispěla k porovnání fluorescenčního chování huminových a fulvinových kyselin. Výsledky měření fluorescence hlavní metodou emisně excitační matice a vedlejší 3D synchronní metodou ukázaly, že fulvokyseliny fluoreskují při nižších emisních vlnových délkách než huminové kyseliny, což odpovídá jejich složení. Fulvokyseliny obsahují v souladu s literárními údaji jednodušší fenolické látky, zatímco huminové kyseliny obsahují aromatické látky typu kumarin, chinon, deriváty perylenu, naftalenu a další (Kumke a kol. 1995, Senesi 1991). Přesné složení těchto kyselin se v této práci nepodařilo určit.

6 LITERATURA

- [1] VESELÁ, Lenka, et al. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy* [online]. 2005, roč. 99 [cit. 2009-02-04], s. 711-717. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf>. ISSN 1213-7103.
- [2] *SD - Humatex : Informace o huminových látkách* [online]. 2005 , 22.1.2006 [cit. 2009-02-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.sdas.cz/showdoc.do?docid=244>>.
- [3] SKOKANOVÁ, Marianna, DERCOVÁ, Katarína. Humínové kyseliny : Pôvod a štruktúra. In *Chemické listy*. 1. vyd. [s.l.] : [s.n.], 2008. 102. s. 262-268. ISSN 1213-7103.
- [4] JANDÁK, Jiří, PRAX, Alois, POKORNÝ, Eduard. *Půdoznalství*. 3. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 142 s. ISBN 978-80-7157-559-7.
- [5] *Supramolecular humic systems in the environment* [online]. [1997] [cit. 2009-03-20]. Text v angličtině. Dostupný z WWW: <<http://www.suprahumic.unina.it/pages/ourvisionpag.html>>.
- [6] VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík. *Humus - půda - rostlina (3) Humus a rostlina : Rozpustné humusové látky v ekosystému* [online]. Biom.cz : 1994 , 23.11.2003 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-3-humus-a-rostlina-rozpustne-humusove-latky-v-ekosystemu>>. ISSN 1801-2655.
- [7] VÁŇA, Jaroslav. *Ekologické aspekty výroby kompostů* [online]. StaryBiom.cz : 1994 , 22.8.2000 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://stary.biom.cz/mag/20.html>>.
- [8] *Živočišná výroba* [online]. 2008 [cit. 2009-02-16]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.amagro.cz/obecne-info|frabm7w|.html>>.
- [9] SKOKANOVÁ, Marianna, DERCOVÁ, Katarína. Humínové kyseliny : Interakcie huminových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy* [online]. 2008, č. 102 [cit. 2009-02-02], s. 338-345. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_338-345.pdf>. ISSN 1213-7103.
- [10] *Biostabilizace a bioimobilizace* [online]. Is.mendelu.cz : 2002 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <http://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=6434>.
- [11] *Ecological Benefits of Humic Acids* [online]. 1994 , 16. 1. 2008 [cit. 2009-02-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.humintech.de/001/agriculture/information/general.html>>.
- [12] *Jiné použití* [online]. Humatex.cz : 2005 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.humatex.cz/jine-pouziti.html>>.
- [13] Terratol. *Effects of Humic Acid on Animals and Humans* [online]. 2005 [cit. 2009-02-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.terratol.com/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/EffectsofHumicAcidonAnimalsandHumans.pdf>>.
- [14] *Půdy v ČR* [online]. 2004-2008 [cit. 2009-02-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.ptejteseknihovny.cz/uloziste/aba001/pudy-v-cr>>.
- [15] NĚMEČEK, Jan, et al. *Systematický soupis půd v ČR* [online]. 2004 [cit. 2009-02-17]. Dostupný z WWW: <<http://klasifikace.pedologie.cz/index.php?action=showSystemickySoupis>>.

- [16] *International Humic Substance Society : Source Materials for IHSS Samples* [online]. 2008 , 23.1.2009 [cit. 2009-03-10]. Dostupný z WWW: <<http://ihss.gatech.edu/ihss2/index.html>>.
- [17] KLÁN, Petr. *Organická fotochemie*. 1. vyd. Masarykova univerzita v Brně : MU, Brno - Kraví hora, 2001. 121 s. ISBN 80-210-2526-3.
- [18] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách : Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2004 , 5. března 2004 [cit. 2008-12-28]. Dostupný z WWW: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>>.
- [19] HE, Zhongqi, et al. Capillary Electrophoresis and Fluorescence Excitation-Emission Matrix Spectroscopy for Characterization of Humic Substances. *Soil Science Society of America journal* [online]. 2008, vol. 72 [cit. 2009-03-03], s. 1248-1255. Dostupný z WWW: <<http://soil.scijsournals.org/cgi/content/abstract/72/5/1248>>.
- [20] LU, Fan, et al. Dissolved organic matter with multi-peak fluorophores in landfill leachate. *Chemosphere* [online]. 2009, vol. 74, is. 4 [cit. 2009-03-03], s. 575-582. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V74-4TVFYKG-4&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=598c2fa5f5f2f3ed0db9b08bde34ecc7>.
- [21] MATTHEWS, B. J. H. , et al. Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. *Marine Chemistry* [online]. 1996, vol. 55, is. 3-4 [cit. 2009-03-05], s. 317-332. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VC2-3SVPVSF-P&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F1996&_alid=893704680&_rdoc=31&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5942&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=35&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=efcbcd3c641c4c96a0bbec217b10cf7e>.
- [22] FU , Pingqing, et al. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of a commercial humic acid. *Chinese Journal of Geochemistry* [online]. 2004, vol. 23, no. 4 [cit. 2009-03-12], s. 309-318. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/823345651g67q862/>>. ISSN 1993-0364 .
- [23] ALBERTS, James J., TAKÁCS, Monika. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Organic Geochemistry* [online]. 2004, vol. 35, is. 3 [cit. 2009-02-18], s. 243-256. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V7P-4BMC77B1&_user=10&_coverDate=03%2F31%2F2004&_alid=886011536&_rdoc=28&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5848&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=39&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e9784529a79d511cd4461c73747c8a9e>.

- [24] SIERRA, M.M.D., et al. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* [online]. 2005, vol. 58, is. 6 [cit. 2009-02-20], s. 715-733. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V744DS6RNH5&_user=10&_coverDate=02%2F01%2F2005&_alid=886284794&_rdoc=25&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5832&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=26&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=d9b85de7f27f65fdd6fb2a08cc4c4e42>.
- [25] HUO, Shouliang, et al. Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2008, vol. 20, is. 4 [cit. 2009-03-14], s. 492-498. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B8CX4-4S9P2P5M&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=b3dabe4004579ae1b9ce6e71eb07dfdd>.
- [26] KWIATKOWSKA, J, PROVENZANO, M.R., SENESI, N. Long term effects of a brown coal-based amendment on the properties of soil humic acids. *Geoderma* [online]. 2008, vol. 148, is. 2 [cit. 2009-03-16], s. 200-205. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V67-4TX6W7G-2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=b9f532c0f50c7536f7dc44981f99de29>.
- [27] GOŁĘBIEWSKA, Dorota, et al. OPTICAL CHARACTERISTICS OF HUMIC ACIDS FROM BOTTOM SEDIMENTS OF LAKES WITH DIFFERENT MICTIC TYPES. *Electronic journal of polish agricultural universities* [online]. 2005, vol. 8, no. 2 [cit. 2009-03-09], s. 27-35. ISSN 1505-0297.
- [28] ANTUNES, Maria Cristina G., ESTEVES DA SILVA, Joaquim C. G. Multivariate curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2005, vol. 546, is. 1 [cit. 2009-03-22], s. 52-59. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TF44GBWJJD2&_user=640830&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000032308&_version=1&_urlVersion=0&_userid=640830&md5=399e2baf5ac0a1a3113c583fc73c6c9>.
- [29] NOVOTNÁ, I. *Sledování vlastností huminových kyselin metodou synchronní fluorescenční spektroskopie*. FCH VUT Brno, 2006. Diplomová práce.
- [30] *International Humic Substance Society : Elemental Compositions and Stable Isotopic Ratios of IHSS Samples* [online]. 2008, 18. 2. 2009 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <<http://ihss.gatech.edu/ihss2/elements.html>>.
- [31] *International Humic Substance Society : Spectroscopic Properties of IHSS Samples* [online]. 2008, 18. 2. 2009 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <<http://ihss.gatech.edu/ihss2/spectra.html>>.
- [32] CHEN, J., et al. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. In *Chemosphere*. [s.l.] : [s.n.], 2006. s. 59-68.
- [33] MIANO, T.M., SENESI, N. Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. *Science of the total environment* [online]. 1992, vol. 117-118 [cit. 2009-05-19], s. 41-51. ISSN 0048-9697.

- [34] MLČOCH, Tomáš. *Fluorescence huminových kyselin, 3D excitační emisní metoda*. FCH VUT Brno, 2008. 81 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.
- [35] KONEČNÁ, Soňa. *Fluorescence půdních a lignitických huminových látek*. FCH VUT Brno, 2009. 71 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.
- [36] MISHRA, A. K. Total synchronous fluorescence scan spectra of petroleum products. *Anal Bioanal Chem* [online]. 2002, vol. 373 [cit. 2009-04-21], s. 304-309.
- [37] DUARTE, Regina M.B.O. , PIO, Casimiro A., DUARTE, Armando C. . Synchronous Scan and Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy of Water-Soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosols . *Journal of Atmospheric Chemistry* [online]. 2004, vol. 48, no. 2 [cit. 2009-04-18]. ISSN 0167-7764 .