



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

CHARAKTERIZACE HUMINOVÝCH LÁTEK IZOLOVANÝCH Z VERMIKOMPOSTOVANÉHO PŘÍRODNÍHO ODPADU

CHARACTERIZATION OF HUMIC SUBSTANCES ISOLATED FROM NATURAL WASTE TREATED BY
VERMICOMPOSTING PROCESS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kamila Marková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1184/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kamila Marková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Charakterizace huminových látek izolovaných z vermikompostovaného přírodního odpadu

Zadání bakalářské práce:

Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce: Charakterizace huminových látek izolovaných z vermikompostovaného přírodního odpadu.

Izolace HL z vermikompostu pomocí alkalické extrakce dle společnosti pro výzkum huminových látek – IHSS.

Fyzikálně–chemická charakterizace huminových a fulvinových kyselin pomocí elementární analýzy (EA), emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–OES), UV/Vis spektrometrie a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR).

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Kamila Marková
student(ka)

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá studiem huminových látek (HL) izolovaných z vermikompostovaného přírodního odpadu pomocí spektrometrických metod. Hlavním cílem bakalářské práce je studium fyzikálně-chemických vlastností huminových látek za pomoci moderních instrumentálních technik, jako jsou molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), dále pak elementární analýza (EA), termogravimetrická analýza (TGA) a emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES). V teoretické části je vypracována rešerše zaměřená na základní informace o HL, kde je popsáno jejich rozdělení i struktura a v neposlední řadě jejich využití v oblasti medicíny, průmyslu či ekologii. Též jsou popsány některé metody, které jsou využívány za účelem studia HL. Nezbytnou součástí práce byla izolace huminových a fulvinových kyselin z vermikompostovaného přírodního odpadu. Z naměřených UV/Vis spekter byly vypočítány absorpční koeficienty, které sloužily k následné charakterizaci HK a FK. FTIR spektra byla využita k určení funkčních skupin studovaných HL. Využitím elementární analýzy byl stanoven obsah biogenních prvků a na základě termogravimetrické analýzy byl určen celkový obsah vlhkosti a popela. Obsah stopového množství studovaných prvků byl stanoven za pomoci ICP-OES.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of humic substances isolated from vermicompost natural waste through spectrometric methods. The aim of this thesis is to study physicochemical properties of the humic substances through modern instrumental techniques such as molecular absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible regions of electromagnetic radiation (UV/Vis), infrared spectroscopy with Fourier transformation (FTIR), elemental analysis (EA), thermogravimetric analysis (TGA) and inductively coupled plasma emission (ICP OES). A research focused on basic information about the humic substances was developed in the theoretical part. A description about their distribution or structure was made and also their utilization in medicine, industry or ecology. Then, methods, which are used for study of the humic substances, were described as well. An essential part of the thesis was isolation of humic and fulvic acid from the vermicompost natural waste. Absorption coefficients were calculated from the measured UV/VIS spectrum which served to following characterization of HK and FK. FTIR spectrum was used to determination of functional groups of studied HL. An area of biogenic elements was specified using the elementary analysis. Total amount of studied trace elements was determined with with the help of ICP-OES.

KLÍČOVÁ SLOVA

humínové látky, izolace HL z vermikompostovaného přírodního odpadu, UV/Vis spektrometrie, FTIR spektrometrie, elementární analýza, termogravimetrická analýza, ICP-OES

KEY WORDS

humic substances, humic substances isolated from vermicompost natural waste, spectrometric methods

MARKOVÁ, K. Charakterizace huminových látek izolovaných z vermikompostovaného přírodního odpadu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vojtěch Enev, Ph.D..

Prohlášení

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

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí této práce panu Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup a ochotu, za cenné rady, odborný dohled a celkovou pomoc při měření. V neposlední řadě děkuji i své rodině, přátelům a příteli za jejich podporu.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 8 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 1.1 Historie | 9 |
| 1.2 Huminové látky | 9 |
| 1.3 Výskyt huminových látek | 10 |
| 1.4 Rozdělení huminových látek | 10 |
| 1.4.1 Huminové kyseliny | 10 |
| 1.4.2 Fulvinové kyseliny | 11 |
| 1.4.3 Huminy | 12 |
| 1.5 Struktura huminových látek | 12 |
| 1.6 Teorie vzniku huminových látek | 13 |
| 1.7 Jednotlivé teorie | 14 |
| 1.7.1 Ligninová teorie | 14 |
| 1.7.2 Polyfenolová teorie | 14 |
| 1.7.3 Kondenzační teorie | 15 |
| 1.8 Kompostování a vermikompostování | 15 |
| 1.8.1 Kompostování | 15 |
| 1.8.2 Vermikompostování | 15 |
| 1.9 Využití huminových látek | 16 |
| 1.9.1 Medicína | 16 |
| 1.9.2 Životní prostředí | 17 |
| 1.9.3 Průmysl | 17 |
| 1.10 Metody studia huminových látek | 18 |
| 1.10.1 Gelová permeační chromatografie HL | 18 |
| 1.10.2 Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektroskopie | 18 |
| 1.10.3 Nukleární magnetická rezonance HL | 18 |
| 1.10.4 UV/Vis spektrometrie HL | 19 |
| 1.10.5 Infračervená spektrometrie HL | 21 |
| 1.10.6 Elementární analýza HL | 21 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.1 | Použité chemikálie a spotřební materiál..... | 23 |
| 2.2 | Použité přístroje a zařízení | 23 |
| 2.3 | Extrakce HK a FK z vermikompostu | 23 |
| 2.4 | Lyofilizace HL | 24 |
| 2.5 | Elementární analýza | 24 |
| 2.6 | ICP-OES | 24 |
| 2.7 | UV/Vis spektrometrie..... | 24 |
| 2.8 | FTIR spektrometrie | 25 |
| 3 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 26 |
| 3.1 | TGA a elementární analýza HL..... | 26 |
| 3.2 | ICP OES | 27 |
| 3.3 | UV/VIS spektrometrie HL izolovaných z vermikompostu..... | 28 |
| 3.4 | FTIR spektrometrie HL a vermikompostu | 31 |
| 4 | ZÁVĚR | 34 |
| 5 | LITERATURA | 35 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 38 |
| 7 | PŘÍLOHY | 39 |

ÚVOD

Huminové látky řadíme k přírodním organickým látkám, které vznikají chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty. Jsou to nejvíce distribuované organické sloučeniny na zemském povrchu. Díky svým vlastnostem jsou velmi důležité pro rostlinnou výživu. HL nejsou nedílnou součástí pouze výživy rostlin, ale přispívají k lepší kvalitě vod či půd. Historie HL sahá až do starověku, kdy už starověcí Egypťané využívali blahodárné účinky HL k rašelinovým zábalům či později k balneoterapii. HL jsou v posledních devadesáti letech předmětem intenzivního vědeckého výzkumu. Jejich využití se stává aktuální i v 21. století ovšem v širších aspektech použití. Jsou využívány především v oblasti dermatologie, neboť mají protizánětlivé a antivirové účinky a jsou proto vhodné k lázeňským procedurám. Také je zaznamenán jejich příznivý vliv při podpoře krve tvorby. Není to však pouze oblast medicíny, která aktivně využívá HL. Své uplatnění nacházejí v oblasti zemědělství například jako zdroj fyziologicky aktivních látek k regulaci růstu nebo v odvětví průmyslu, kdy jsou využívány jako přídavná aditiva do cementu.

Cílem této práce byla charakterizace HL izolovaných z vermikompostovaného přírodního odpadu za pomoci vybraných moderních instrumentálních technik. HL byly charakterizovány UV/Vis spektrometrií a z naměřených absorpčních spekter byly vypočteny vybrané absorpční koeficienty, jež slouží jako indikátory aromaticity, stupně humifikace či obsahu kyslík obsahujících funkčních skupin ($-\text{COOH}$ a fenolických $-\text{OH}$), které jsou výhradně substituovány na aromatických jádrech HL. K další charakterizaci HL byla využita FTIR spektrometrie a výsledná infračervená spektra nám podala informace o lokalizovaných absorpčních pásech, které jsou dobrými ukazateli přítomnosti funkčních skupin tvořících unikátní strukturu těchto *biokoloidních* sloučenin. V neposlední řadě byla použita elementární a termogravimetrická analýza, která nám umožnila charakterizovat HL z hlediska obsahu biogenních prvků (C, H, N, S a O), popele či vlhkosti. Technikou ICP-OES byl stanoven obsah výživových prvků, mikroelementů a vybraných těžkých kovů ve vermikompostu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie

Používání HL sahá až do starověku, kdy starověcí Egypťané využívali rašelinové zábaly k léčení povrchových ran. Léčivé rašelinové obklady využívali lidé i ve středověku, proto lze středověk nazvat obdobím prvních bahenních koupelí. Bahenní koupele našly využití dokonce i v průběhu 1. světové války, kdy jejich léčivé účinky byly využívány při léčbě bolestivých ran poraněných vojáků. HK jsou nedílnou součástí hnědého uhlí, které se v lidovém léčitelství používalo k léčbě akutních a chronických chorob gastrointestinálního traktu. Hnědé uhlí se v 19. století využívalo i jako pigment k barvení pod označením „*Cologne brown*“. Toto označení je odvozeno podle místa výskytu, čímž je oblast lignitových dolů v okolí Cologne v Německu. V průběhu minulého století byly HL využívány převážně v hospodářství, veterinárním a environmentálním sektoru [2].

1.2 Huminové látky

HL představují z hlediska globální stability na Zemi nejvýznamnější zásobu organického uhlíku. Vznikají chemickými a biochemickými procesy, které doprovázejí děj, jež je všeobecně znám jako proces humifikace, kdy během tohoto procesu dochází k přeměně odumřelých těl rostlin a živočichů. Důležité látky, které se účastní tohoto procesu, jsou lignin a produkty jeho přeměny dále lipidy, polysacharidy, nukleové kyseliny, kutin, melanin, aj. V půdní organické hmotě je vázáno zhruba 3,3krát více uhlíku než je vázáno v atmosféře a dokonce 4,5krát více než v živých organismech. Organické sloučeniny tvoří $\sim \frac{2}{3}$ půdních zásob organického uhlíku, přičemž minimálně $\sim \frac{1}{2}$ je tvořena právě relativně odolnými HL. HL jsou dále obsaženy v sedimentech vodních toků, jezer, moří a v ložiscích rašeliny, uhlí a lignitu. Je nesporné, že HL zásadním způsobem ovlivňují život na Zemi, určují kvalitu vod, půdy [19].

HL jsou všudypřítomné, mají vysokou molekulovou hmotnost a heterogenní strukturu. Zařazujeme je mezi přírodní organické látky, protože jsou výsledkem rozkladu rostlinných a živočišných těl [6]. HK můžeme definovat jako směs amorfních, polydisperzních sloučenin žluté až hnědočerné barvy. Tvoří heterogenní skupinu přírodních organických molekul s komplikovanou polymerní a supramolekulární strukturou. V půdě se ve formě HK vyskytuje 60–80 % organického uhlíku. Ve vodě je 50–75 % rozpustné organické hmoty tvořeno převážně fulvinovými kyselinami [2].

HL umožňují chemické a fyzikální interakce iontů v prostředí. Organická hmota hraje velmi důležitou roli v oblasti úrodnosti půdy. Umožňují také imobilizovat rozsáhlé množství organických a anorganických polutantů. Tato jejich vlastnost se využívá v ochraně životního prostředí [20].

1.3 Výskyt huminových látek

Kaustrobiolity (rašelina, lignit a zoxidované hnědé uhlí tzv. oxyhumolit) jsou zdrojem HL. Oxyhumolit je vhodnou surovinou pro získávání HL, neboť je velmi bohatý na HK. HK se přirozeně vyskytují i v dalších přírodních materiálech, a to v sedimentech, zeminách a hnědém uhlí. Obsah HL v přírodních matricích kolísá od stopového množství (písek, jíl) přes jednotky procent v běžných zeminách (3 *hm. %*) až k desítkám procent v hnědém uhlí (3–10 *hm. %*). Mimořádně vysoký obsah HL až 30 *hm. %* vykazuje lignit a oxyhumolit. Obsah huminových a fulvinových kyselin v jednotlivých přírodních zdrojích je znázorněn v Tab. 1 [1].

Tab. 1: Obsah huminových a fulvinových kyselin v přírodních materiálech

| Přírodní zdroj | Obsah huminových a fulvinových kyselin v (<i>hm. %</i>) |
|----------------|---|
| Černé uhlí | 0–1 |
| Půda | 1–5 |
| Kompost | 2–5 |
| Hněj | 5–15 |
| Hnědé uhlí | 10–30 |
| Černá rašelina | 10–40 |
| Humát | 40–85 |

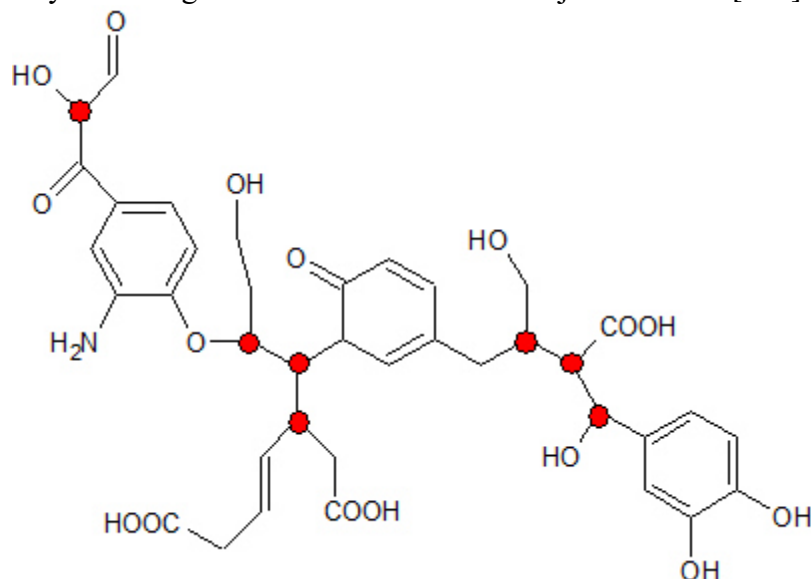
1.4 Rozdělení huminových látek

HL můžeme rozdělit dle různých kritérií, nejčastěji se dělí na základě jejich rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí. Rozdělit je tedy můžeme na huminové kyseliny (HK), fulvinové kyseliny (FK) a huminy (HU). HU jsou nerozpustné jak v zásadách tak kyselinách. FK jsou žluto až žlutohnědé barvy a jsou ve vodných roztocích rozpustné v celé rozsahu pH hodnot. HK mají tmavě hnědou barvu a koagulují v silně kyselém prostředí tj. $\text{pH} < 2$. Jednou z frakcí HK jsou mimo jiné i hymatomelanové kyseliny, které mají žlutou až žluto hnědou barvu a od HK je lze oddělit alkoholovou extrakcí [3–4].

1.4.1 Huminové kyseliny

V půdě se nachází převážně v koloidní formě, kdy tvoří tzv. *organominerální komplex* a vyznačují se vysokou sorpční schopností, a to díky vysokému obsahu reaktivních funkčních skupin ($-\text{COOH}$ a $-\text{OH}$ fenolických). HK jsou nejcennějšími produkty humifikačních procesů, neboť zvyšují úrodnost půdy. Aromatické jádro fenolického nebo chinoidního typu s obsahem alifatických a cyklických dusíkatých sloučenin je základní strukturní složkou těchto biokoloidních látek. Fenolické $-\text{OH}$ a karboxylové funkční skupiny jsou zodpovědné za

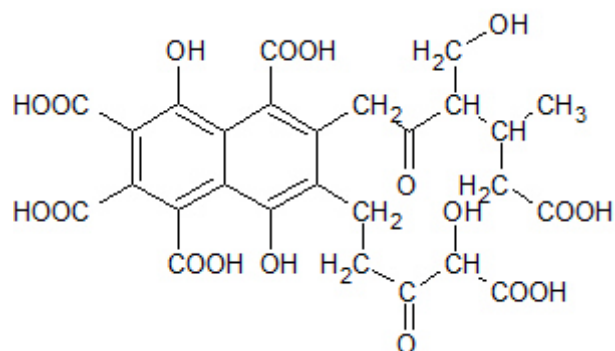
kyselinový charakter HK. Ve vodě jsou jen velmi slabě rozpustné, ale dobře rozpustné jsou v zásadách. Vodíkové ionty těchto funkčních skupin umožňují iontovou výměnu. HK jsou stálé a odolné proti mineralizaci, pokud se nachází v nasyceném stavu. Jejich složení se odvíjí od chemického složení živočišných a chemických prekurzorů, dále pak rovněž záleží na typu půdy a humifikačních podmínkách v průběhu geneze těchto unikátních *biokoloidních* sloučenin. Vysoký obsah organického uhlíku tzn. HK mají černozemě [3–4].



Obr. 1: Model huminových kyselin podle Steelinka

1.4.2 Fulvinové kyseliny

FK jsou jednou z frakcí HL. Jejich stavba „makromolekuly“ odvozené z polymerní teorie vzniku HL je jednodušší než u HK. Obsahují méně uhlíku a více kyslíku než je tomu v případě HK. Za kyselý charakter FK jsou zodpovědné karboxylové, karbonylové a fenolické funkční skupiny, kterých FK obsahují více v porovnání s HK. Pro FK je charakteristická dobrá rozpustnost ve vodě, zásadách, minerálních kyselinách a roztocích hydrolyticky zásaditých solí. Poněvadž jsou jejich vodné roztoky kyselé a jejich rozpustnost ve vodě je dobrá, ochuzují minerální část půdy o živiny a koloidní látky. FK mají žlutou až světle hnědou barvu [3–4].



Obr. 2: Model fulvinových kyselin podle Buffela

1.4.3 Huminy

Jsou silně karbonizovaná organická hmota, která je nerozpustná jak v kyselém tak v alkalickém prostředí. Huminy jsou pevně vázány na minerální podíl půdy. Obsahují biopolymery, jako je lignin a rozličné polysacharidy. Jejich barva je hnědočerná a jejich molekulová hmotnost je nejvyšší z HL [3–4].

Tab. 2: Elementární složení huminových a fulvinových kyselin

| Prvky | Huminové kyseliny (hm. %) | Fulvinové kyseliny (hm. %) |
|---|---------------------------|----------------------------|
| Uhlík | 52–62 | 40–52 |
| Vodík | 3–6 | 4–6 |
| Kyslík | 31–39 | 40–48 |
| Dusík | 2–5 | 2–6 |
| Popelovin (Si, Al, Fe, S, P, Ca, Mg, K, Na aj.) | 1–10 | 2–8 |

1.5 Struktura huminových látek

HL mají velmi složitou strukturu, jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 2 do 200 kDa. V minulosti se objevilo více teorií, které předpokládaly jejich typickou strukturu. V současnosti odhad struktury HL pokračuje za použití nových pokročilejších instrumentálních technik. Konkrétně u HK jsou v jejich struktuře nejvíce zastoupená reaktivní aromatická jádra s kyslík obsahujícími funkčními skupinami (–COOH, –OH, –C=O, –O– atd.). Kromě výše zmíněných reaktivních skupin jsou v HK přítomny i méně reaktivní skupiny amidové (–CO–NH–) atd. [5]. Karboxylové (–COOH) a hydroxylové (–OH) skupiny považujeme za nejdůležitější funkční skupiny obsažené v HL. Jejich původ a postup izolace HL je rozhodující pro obsah funkčních skupin [8]. Taktéž poměry prvků C/H, C/O a C/N obsažených v HL závisí na fyzikálně-chemických podmínkách vzniku HL. V průběhu humifikace se zvyšuje obsah karboxylových (–COOH) a karbonylových (–C=O) funkčních skupin, přičemž obsah methoxylových (–OCH₃), alkoholových a fenolových (–OH) skupin se během tohoto procesu snižuje. Ve FK je prakticky všechen kyslík obsažený v karboxylových (–COOH), hydroxylových (–OH) a karbonylových (–C=O) skupinách. V případě HK tvoří větší část kyslíku strukturní složku, tzv. *jádro* (např. esterové vazby). Uspořádání kyslíku je hlavním strukturním rozdílem v distribuci funkčních skupin HL. Dalším rozdílem může být skutečnost, že obsah keto-skupin (–C=O) je vyšší v případě FK, jelikož v HK se nacházejí převážně chinonové skupiny (C=O). Z pohledu reaktivity mají HL, resp. HK značnou schopnost interagovat s téměř všemi sloučeninami a strukturami, jež se vyskytují v jejich blízkém okolí (organické a anorganické molekuly, ionty, minerální a mikrobiální povrchy). Schopnost interagovat s cizorodými látkami umožňuje rozmanitý obsah reaktivních funkčních skupin. Tím dochází i ke vzniku různých vazeb. Funkční karboxylové a fenolické skupiny ovlivňují svoji přítomností vznik koordinačních vazeb. Ionexový charakter HL je důsledkem vzniku iontové

vazby. Další funkční skupiny jako jsou amidové ($-\text{CO}-\text{NH}-$), nitrilové ($-\text{C}\equiv\text{N}$) aj. ovlivňují možný vznik vodíkových můstků [5].

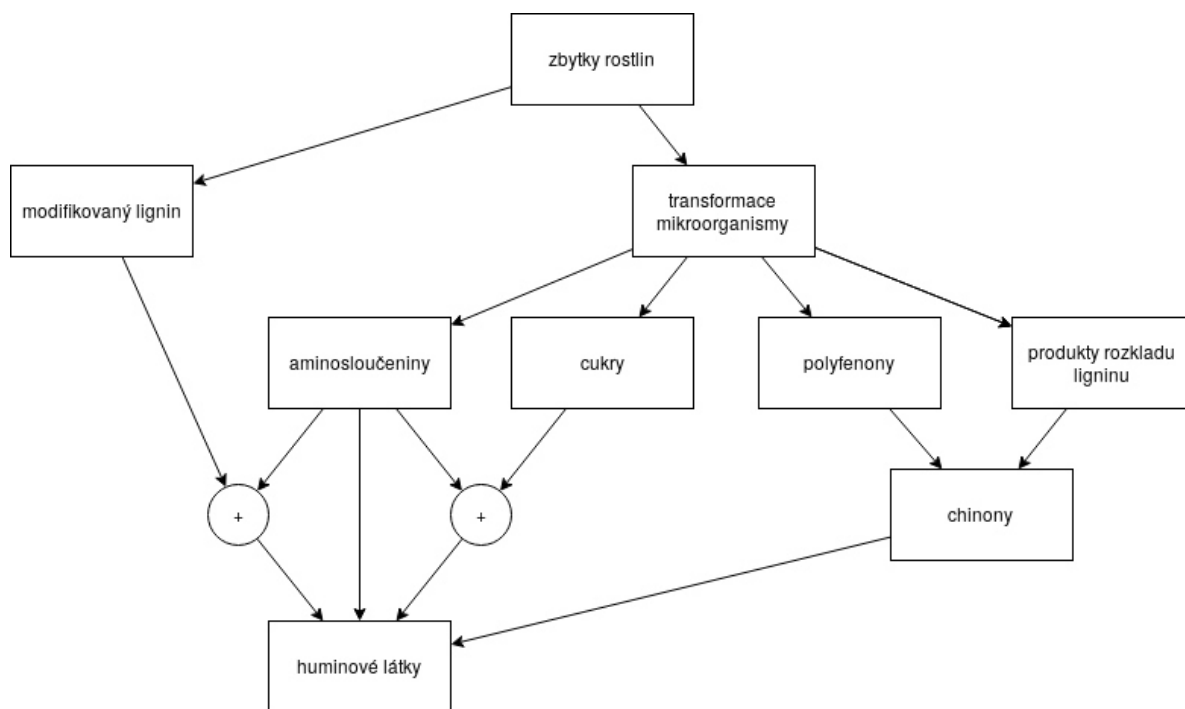
HL jsou známé tím, že obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb, které jsou náhodně distribuovány v jejich „makromolekulách“. Jsou zodpovědné za jejich hnědou barvu, která může být na základě optických vlastností indikátorem o rozsahu stupně humifikace [20].

1.6 Teorie vzniku huminových látek

Proces geneze HL se nazývá humifikace. Humifikace zahrnuje velké množství biochemických, enzymatických a mikrobiálních reakcí. Všechny teorie vzniku HL se shodují, že ke vzniku HL je potřeba materiál rostlinného, ale i živočišného původu [1]. Mezi nejvíce uznávané teorie patří teorie *ligninová*, *kondenzační* a *teorie vzniku za účasti polyfenolů*. Některé reakční mechanismy, ke kterým dochází během těchto procesů, jsou znázorněny na Obr. 3 [1]. Při těchto procesech se z meziproductů organické hmoty vytvářejí nové sloučeniny, které nazýváme HL [4]. Současně s procesem humifikace organické hmoty probíhá i mineralizace, která je ukončena různorodou formou organominerálního komplexu. Tyto látky významným způsobem ovlivňují vlastnosti nejbližšího okolí, a to převážně v interakci s minerálním podílem půdy. HL se podílejí na půdní struktuře a udržují půdní reakci v rozmezí příznivém pro růst rostlin, chrání je před působením určitých toxických vlivů a dokonce ovlivňují podmínky v půdě z hlediska teploty. Mohou se podílet na uvolňování minerálních prvků do tzv. půdního roztoku v důsledku biologické činnosti půdy [16]. Dvěma rozličnými procesy při tvorbě humusu jsou mineralizace a rašelinění [4].

Úplným rozkladem organické hmoty až na jednoduché složky (CO_2 , H_2O , NH_3 , oxidy různých prvků atd.) je mineralizace. K mineralizaci dochází u půd lehčího charakteru, které mají nižší obsah vody. U půd dostatečně provzdušněných probíhá mineralizace při vyšších teplotách. Při tomto procesu se silně zvyšuje činnost aerobních bakterií, díky nimž se organická hmota může rozkládat na výše uvedené složky [4].

Proces rašelinění probíhá za anaerobních podmínek, za výrazně sníženého přístupu vzduchu a nedostatečné oxidace. Proces probíhá za předpokladu nízké teploty, vysoké vlhkosti a kyselého prostředí. Uplatňují se zde anaerobní bakterie, protože rašelinění a uhelnatění organické hmoty je proces převážně enzymatický a biochemický. Výsledkem jsou huminové a ulminové látky tmavě hnědých až černých odstínů s velkým podílem uhlíku. Humusové uhlí tj. huminy vznikají při karbonizaci, ke které dochází za extrémních podmínek [4].



Obr. 3: Mechanismus vzniku huminových látek v půdě

1.7 Jednotlivé teorie

Existuje několik teorií o vzniku HL. Do popředí se dostávají tři teorie: *ligninová*, *kondenzační teorie* a *teorie vzniku za účasti polyfenolů*.

1.7.1 Ligninová teorie

Řadu let se vycházelo z toho, že HL jsou v první řadě odvozeny z ligninu. Tato teorie uvádí, že lignin je částečně mineralizován mikroorganismy a jeho nerozložený zbytek se stává součástí půdního humusu. V ligninu dochází k určitým změnám, mezi které patří ztráta methoxylových skupin ($-\text{OCH}_3$), jež jsou spojeny s vytvořením *o*-hydroxyfenolů a oxidací alifatických postranních řetězců, které napomáhají vzniku karboxylových skupin ($-\text{COOH}$). Díky těmto změnám jsou tyto vzniklé prekurzory HL předmětem dalších změn, které následně vedou k tvorbě HL. Zastáncem ligninové teorie byl v hlavní řadě Hasman [30], který mimo jiné uveřejnil informace o tom, že lignin i HL jsou rozpustné v alkáliích a sráží se kyselinami, dále že lignin i HL mají kyselou povahu a jsou částečně rozpustné v alkoholu a pyridinu atd. [1],[8–9].

1.7.2 Polyfenolová teorie

Tato teorie vychází z ligninové teorie, kde hlavní úlohu hraje lignin, ovšem tato teorie je její určitou modifikací. Při uvolňování fenolických aldehydů a kyselin z ligninu dochází k enzymatické transformaci na chinony, která následně vede k polymeraci a umožňuje vznik HL. Druhým způsobem přeměny je syntéza polyfenolů prostřednictvím mikroorganismů

z neligninových zdrojů uhlíku (celulózy). Následně jsou vzniklé polyfenoly enzymaticky oxidovány na chinony a umožňují tak další převod na HL [1],[8–9].

1.7.3 Kondenzační teorie

Kondenzační teorie vychází z předpokladu, že humus je tvořen ze sacharidů, a to na základě reakcí redukujících cukrů s aminokyselinami, vytvořených jako vedlejší produkty mikrobiálních procesů. Následně jsou látky vystaveny neenzymatické polymeraci, kdy dochází ke vzniku polymerního řetězce, jež obsahuje atom dusíku. Hlavní negativní stránkou této teorie je skutečnost, že reakce probíhá o něco pomaleji. Naopak výhodou je vznik velkého množství reaktantů [1],[8–9].

1.8 Kompostování a vermikompostování

1.8.1 Kompostování

Kompostování můžeme rozdělit mezi tři základní fáze, které jsou od sebe snadno rozeznatelné, přestože se jedná o komplikovaný kontinuální proces. Jedná se o fázi rozkladu neboli minezalizaci, fázi přeměny a fázi dozrávání kompostu.

Při kompostování dochází k využití biodegradabilních odpadů, které slouží k výrobě organického hnojiva, tedy kompostu. Aerobní mikroorganismy umožňují přetransformování organické odpadní hmoty na humusové složky. V první fázi dochází k rozkladu cukrů, bílkovin, škrobu. Tento proces trvá přibližně tři týdny. Díky aktivitě mikroorganismů dochází k zvyšování teploty, která umožňuje zničit patogenní organismy. Za rozkládání lignocelulózové hmoty jsou zodpovědné termofilní houby. Vlivem těchto hydrolyzních procesů a hromadění organických kyselin dochází ke značnému zvyšování substrátu. V další fázi klesá teplota z původní teploty 50–65 °C, kdy dochází k ochlazení zrajícího kompostu na teplotu 40–45 °C. Změnou teploty se mění složení mikroorganismů, vznikají HL a dozrávající kompost získává svoji hnědou barvu. Podíl HL se zvyšuje a snižuje se kyselost substrátu. Důležitým aspektem při procesu kompostování je provzdušňování, ke kterému obvykle dochází překopáváním, popřípadě tlakovou aerací či odsáváním vzduchu nasyceným oxidem uhličitým přes vzdušný filtr. Zvyšováním intenzity provzdušňování se urychluje zrání kompostu. Při nedostatečném provzdušňovacím procesu dochází k anaerobním procesům. Poměr dusíku a uhlíku hraje důležitou roli při vytváření vhodných podmínek pro mikroorganismy [24–25].

1.8.2 Vermikompostování

Za jednu z nejpokročilejších kompostovacích metod se považuje *vermikompostování*, tj. využívání žížal. Vermikompostování využívá interakce mezi činností mikroorganismů a žížal, nedochází zde k termofilní fázi rozkladu. Jedná se o stabilizační proces přeměny organického materiálu. Tento způsob kompostování je příznivý k životnímu prostředí a patří mezi nízkonákladové systémy zpracování odpadů, neboť fragmentaci, aeraci a překopávání do značné míry zajišťují právě žížaly. Při porovnání klasického kompostování

s vermikompostováním, dosahuje vermikompostování lepších vlastností. Vermikompost obsahuje větší množství živin, růstové hormony, kvalitní humus či látky, které mohou rostliny ochraňovat před možnými škůdci. Díky těmto lepším vlastnostem, je hnojení tímto kompostem ekonomicky výhodnější. Tento druh kompostu může být využit jako absorbent k imobilizaci těžkých kovů v půdě nebo může být použit k odstraňování kovových iontů z odpadních vod. Dokonce ho můžeme využít i k rozložení biodegradabilních organických polutantů.

Existuje několik základních technologických systémů, jež se odlišují svým technologickým postupem, které se mohou dále dělit na více proveditelných variant. Vermikompostování kuchyňských zbytků můžeme provádět přímo v domácnosti za pomoci malých vermikompostérů. Pro velkoprodukční vermikompostování se využívají například vermireaktory s kontinuálním procesem. Ať už se využívá jakéhokoliv z těchto systémů, je nejdůležitější, aby bylo vytvořeno ideální prostředí pro žížaly. Musí být zajištěny další parametry, jako jsou teplotní podmínky, vyhovující míra provzdušnění, dostatečný přísun biologického odpadu [23].

1.9 Využití huminových látek

Huminové látky nacházejí své uplatnění v zemědělství, veterinárním lékařství, humánní medicíně a v oblastech životního prostředí [7].

1.9.1 Medicína

Již v dřívějších dobách, lidé znali, léčebné účinky HL. Jednou z nejstarších zaznamenaných medicínských metod využití HL byla balneoterapie, která má pozitivní vliv na léčbu osteoartritidy a revmatu. Při této léčbě se využívaly blahodárné účinky rašeliny. Již v 19. století byly na speciálních klinikách v Evropě zaváděny bahenní koupele [13]. Díky vysokému obsahu organického uhlíku jsou HL jeho důležitým zdrojem. Mohou zachycovat iontové a rozličné polutanty [7]. HL sloužily především k léčbě gynekologických a revmatických onemocnění. Jejich protizánětlivé účinky byly hojně využívány při zánětech trávicího traktu a jaterních onemocněních, při kterých se HL podávaly orálně. Dokonce i při teplých rašelinových obkladech bylo zaznamenáno zlepšení krevního tlaku a zvýšení regenerace u nemocných pacientů. HL využívané jako léčebné prostředky ve farmacii mají pozitivní účinky na lidské zdraví. Jejich využití je však omezené, protože znalosti o HL nejsou ještě na tolik známé [13]. Komerčně jsou HL používány v humánní i veterinární medicíně. HL mají pozitivní vliv na zdravotní stav a celkovou kondici zvířat. Mají protizánětlivé účinky, vážou volné radikály, stimulují receptory imunitního systému v střevních klcích proti gastrointestinálním patogenům. Protizánětlivě působí převážně zásahem do cyklu kyseliny arachidonové. Ovlivňují tvorbu leukotrienů, zvyšují vstřebávání železa a mědi. Vážou další toxické sloučeniny endogenního a exogenního původu (PCB, dioxiny), a tím zabraňují jejich zpětné resorpci. Převážná část HL je z organismu eliminována trusem, část může být degradována střevní mikroflórou, což umožňuje jejich bezrizikové využití v humánní a veterinární medicíně. HL také mohou zvýšit aktivitu imunitního systému. Tvoří složité komplexy v těle, které působí jako stimulanty nitrobuněčných pochodů [2]. Obrannost se zvyšuje stimulací aktivity bílých krvinek

[12–13]. Díky antibakteriálním a antivirovým vlastnostem HL se zdají být vhodné pro širší využití v medicíně [2]. Za přítomnosti HL jsou červené krvinky savců více saturované kyslíkem. Díky tomu pak HL zrychlují léčení některých zranění a urychlují čas rekonvalescence. Jsou nápomocné i při rozpouštění trombů a krevních hematomů. HL inhibují koagulační enzym trombin, tím dochází ke snížení tvorby fibrinu z fibrinogenu. Jsou vhodné při prevenci infarktu myokardu a mozkové mrtvice. HL dokáží vázat těžké kovy a další látky nepříliš prospěšné pro naše tělo. Zajišťují detoxikaci organismu, zvyšují propustnost buněčné stěny, a tím umožňují přenos minerálních látek do organismu. Současně inhibují mikrobiální růst, protože mezi jejich další vlastnosti patří antimikrobiální účinky. Mohou zvyšovat i aktivitu imunitního systému, neboť v těle vytváří složité komplexy, jež slouží jako modulátory intercelulárních interakcí. Zabezpečují optimální a přiměřenou aktivitu imunitního systému a zabraňují alergickým reakcím organismu. Protizánětlivé účinky jsou dány tím, že HL dokáží na povrchu sliznice vytvářet ochranný film a ten pak zabraňuje průchodu infekce a toxinů do organismu. Zmírňují otok a dokáží pomoci hojení postižených kolagenních vláken šlach a kostí. V dermatologii a kosmetice lokální aplikací zmírňují kožní defekty či rány. Z HL jsou vyráběny masti a gely, které přináší úlevu při svědění pokožky nebo hojení puchýřů [10], [12–13].

1.9.2 Životní prostředí

HL dokáží dobře zadržovat vodu, mimo jiné jsou využívány v oblasti ochrany životního prostředí. Umožňují zádrž a přenos důležitých látek pro rostlinu (voda, živiny) a vytvářejí v půdách pórovitou strukturu, čímž pomáhají zlepšit půdní mikroflóru a zvyšují klíčivost semen. Dále jsou využívány jako aditivní hnojiva, kde se využívá různých solí např. vápenaté soli HL tzv. *humáty*. HL umožňují vázat těžké kovy (kadmia, mědi, železa, rtuti aj.) či barviva nebo odstraňují škodlivé látky (insekticidy, herbicidy, pesticidy, kyanidy atd.). Těchto vlastností se využívá v ochraně životního prostředí (při čištění vody, odpadních vod či půd) [11].

1.9.3 Průmysl

V papírenském průmyslu jsou HL využívány jako barviva. Díky zbarvení se využívají v dřevozpracujícím průmyslu při barvení dřevěných dýh. Dále slouží k barvení PVC plastů, jsou využívány jako přísady k změkčování PVC při výrobě plastických hmot. Na druhou stranu zbarvení HL je problémem ve farmaceutickém průmyslu, kde odbarvení nelze provést standardními postupy. Ve stavebním průmyslu jsou používány jako aditiva řídicí rychlost tuhnutí betonu [11].

1.10 Metody studia huminových látek

HL mohou být analyzovány pomocí nejrůznějších metod. Mezi analytické techniky, které slouží k charakterizaci HL, patří zejména spektrometrické metody. Tyto analýzy umožňují analyzovat vzorky v pevném převážně však v kapalném stavu. Výhodou těchto metod je právě jejich nedestruktivnost, jsou experimentálně poměrně jednoduché a není zapotřebí velkého množství vzorku. Výsledkem analýz jsou cenné informace o molekulární struktuře, chemických a fyzikálních vlastnostech HL. Těmito spektrometrickými technikami jsou především NMR spektrometrie izotopu uhlíku C^{13} , FTIR, UV/Vis, EPR a fluorescenční spektrometrie. Vícesložkový charakter přírodní organické hmoty obvykle ztěžuje výslednou interpretaci experimentálních dat. [18]

1.10.1 Gelová permeační chromatografie HL

Jednou ze základních charakteristik HL je jejich molekulová hmotnost. Pro kvantifikaci molekulové hmotnosti HL se využívá nejčastěji nízkotlaká vylučovací chromatografie (SEC), která umožňuje dělení látek na základě velikosti molekul [17]. Tato metoda je založena na separaci molekul, které mají odlišnou velikost tj. molekulovou hmotnost. Separace u gelové permeační chromatografie je na rozdíl od jiných rozdělovacích chromatografií závislá pouze na velikosti molekul studovaných látek a dá se říci, že skoro nezáleží na jejich chemické povaze [14]. Stacionární fáze je tvořena gelem, jehož póry jsou propustné pro definované velikosti molekul. Používá se inertní zesítěná nerozpustná polymerní matrice. Vodou nebo roztokem fosfátového pufru o vhodném pH je tvořena mobilní fáze. Na gel, který je umístěn ve skleněné koloně, kterou protéká konstantní rychlostí eluční činidlo, je nanesen roztok vzorku HL. Molekuly vzorku protékají kolonou různou rychlostí, větší molekuly než je velikost pórů jsou eluovány nejrychleji. Menší molekuly jsou zadržovány v pórech gelu, postupují kolonou pomaleji a jsou z kolony vyloučeny později. Eluát je jímán do zkumavek, z nich se poté stanoví relativní koncentrace HL z absorbance při vlnové délce 280 nm nebo se měří absorbance při výstupu eluátu z kolony kontinuálně [17].

1.10.2 Vysoce rozlišovací ultrazvuková spektroskopie

Metoda má bimodální uspořádání, které umožňuje sledovat vlastnosti vzorku buď za izotermického režimu, nebo neizotermického. Rychlost ultrazvukové vlny je ovlivňována stlačitelností vzorku a jeho hustotou.

1.10.3 Nukleární magnetická rezonance HL

Jedná se o spektrometrickou metodu umožňující studovat strukturu HL měřením interakcí elektromagnetických vln s jádry atomů ^{13}C v silném magnetickém poli [17]. Dochází zde k interakci mezi elektromagnetickým zařízením v oblasti rádiových vln s atomovými jádry analyzované látky. Absorbovaná energie má za následek přechod nenulových magnetických momentů do vyšších energetických stavů. Ve výsledných spektrech nukleární magnetické

rezonance se objevují magnetické momenty jaderných spinů [14]. Výsledkem je spektrum, které znázorňuje závislost intenzity interakcí na frekvenci elektromagnetických vln. Tato interakce je vyjádřena jako tzv. *chemický posun* δ vůči standardu v jednotkách ppm. Detailnější informace o struktuře molekul získáváme díky tomu, že vlastnosti jader ^{13}C jsou ovlivňovány jejich nejbližším okolím. HL lze ^{13}C NMR spektrometrií měřit jak v pevné fázi, tak i v roztoku. Při měření vzorku v pevné fázi bývá preferována technika CP/MAS NMT (*Cross Polarization, Magic Angle Spinning*), tj. zkřížená polarizace při rotaci vzorku pod magickým úhlem. Vzorek, který je měřen v pevném stavu umožňuje měřit i nerozpustné frakce HL. Měřením vzorku v roztoku by mohlo dojít při rozpouštění k nežádoucím změnám v jejich struktuře. Aby výsledné spektrum mělo dostatečnou kvalitu, je nezbytné zabezpečit vysoký odstup signálu od šumu, kterého se dosáhne dlouhou dobou měření vzorku. Studuje se především ^{13}C , ale pro speciální účely lze také měřit jádra ^{27}Al , ^1H , ^{31}P , ^{113}Cd , vzácněji pak ^{15}N NMR spektra [19]. Standardní délka měření ^{13}C NMR spektra je 12 hodin i více [17]. Měření NMR spektrometrie v roztoku je dost náročné na přístrojový čas, ale má oproti měření v pevné fázi vyšší rozlišení [19]. Výsledný záznam volně dozrívající indukce (FID - *Free Induction Decay*) se matematicky upravuje před Fourierovou transformací za pomoci vážící funkce. Klesající exponenciální funkce umožňuje zvýšit poměr signálu k šumu, a to rozšířením základní linie spektra bez výrazného snížení rozlišení. Rozlišujeme čtyři základní oblasti v ^{13}C NMR spektrech HL. První sekci je oblast alifatických atomů C (0–45 ppm), druhou oblastí jsou O-alkylové a peptidové C (45–110 ppm), třetí oblast tvoří aromatické a fenolické C (110–160 ppm), čtvrtou a poslední oblastí jsou karboxylové a karbonylové atomy C (160–200/230 ppm) [17]. Hranice mezi jednotlivými pásy nevolí všichni autoři stejně [19]. Aromaticita f_a HL je hlavním strukturním údajem získaným z NMR spekter. Je udávána jako podíl součtu fenolických a aromatických atomů uhlíku ke všem atomům uhlíku. Výjimkou jsou karbonylové a karboxylové atomy uhlíku, neboť je nelze přiřadit ke strukturám aromatickým ani alifatickým [17].

1.10.4 UV/Vis spektrometrie HL

Podstatou této metody je absorpce ultrafialového a viditelného elektromagnetického záření (200–900 nm) zředěnými roztoky analytu. Dochází zde k absorpci elektromagnetického záření molekulami a k excitaci elektronů valenční vrstvy. V excitovaném stavu molekula zůstává do chvíle než je nežářivými deexcitačními přechody uvedena opět do základního stavu. Při měření ultrafialové oblasti se využívá křemenných kyvet na rozdíl od skleněných nebo plastových, a to z důvodu schopnosti propouštět UV záření [15]. Absorbance HL je nejsilnější v UV/Vis oblasti od 190 nm do 600 nm [18]. Funkční skupiny, které obsahují valenční elektrony, jež umožňují absorpci světla, jsou označovány jako chromofory [21]. Přítomnost aromatických chromoforů a jiných organických látek způsobuje silnou absorpci v oblasti UV. Ke kvantitativnímu stanovení aromatických vazeb C=C v přírodní organické hmotě (NOM) se využívá absorbance při 254 nm. Při této vlnové délce dochází v substituovaných aromatických sloučeninách (benzenových nebo polyfenolových kruzích) k maximálnímu přenosu elektronu $\pi \rightarrow \pi^*$. UV/Vis spektra ukazují pokles absorbance při zvyšující se vlnové délce. Čím větší je vlnová délka, tím se absorbance HL plynule snižuje, tzn. roztoky HL mají kvaziexponenciální průběh UV/Vis

spekter. Ketonické skupiny ($-C=O$) přispívají k absorpci v UV oblasti a rovněž jsou v menší míře schopny absorpce ve Vis oblasti elektromagnetického záření. Absorpce v rozsahu vlnových délek při 260–280 nm je vyvolána chinony a rozkladnými produkty ligninu. Stupeň substituce aromatických kruhů či stupeň jejich kondenzace ovlivňuje absorpci ve viditelné oblasti spektra. Absorpce v rozsahu 400–500 nm je způsobena množstvím organických látek v počátečním stádiu humifikace tj. „mladé HL“. Silně humifikovaná OM, jejichž stupeň kondenzace aromatických kruhů je vyšší, absorbuje v rozsahu 600–670 nm [17–18]. Stupeň humifikace roste se zvyšující se hodnotou absorbance při vlnové délce 600 nm za použití 1% roztoku HL a se snižující se hodnotou $\Delta \log K = \log E_4^{1\%} - \log E_6^{1\%}$ [20]. Poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm určuje tzv. *humifikační index* A_{465}/A_{665} , který je nezávislý na koncentraci HL, ale je charakteristický pro různé HL pocházejících z odlišných přírodních matric. V případě HK je zpravidla tento poměr menší, a to v rozmezí 4–8, u FK je rozmezí vyšší, a to 10–15, jejich hodnota se může případně blížit až k 20. UV/Vis spektrometrie HL je ovlivněna relativním zastoupením aromatických $C=C$ a ketonických ($-C=O$) funkčních skupin (nebo chromofory) a auxochromy jako jsou $C-OH$ a $C-NH_2$. Ketonické funkční skupiny ($-C=O$) způsobují slabší absorpci v oblasti Vis spektra, kdy auxochromy neudělují barvu analytů samy o sobě, ale zvyšují barevnost chromoforů [17–18]. Další absorpční koeficient, který lze z UV/Vis spekter určit je koeficient E_{ET}/E_{Bz} . Jedná se o poměr absorbancí při 253 nm a 203 nm, případně 220 a 230 nm. Vlnová délka 253 nm je charakteristická pro elektronové přechody aromatických sloučenin a často je označována jako *pásmo přenosu elektronů*. Intenzita tohoto pásu je výrazně ovlivněna přítomností aromatického kruhu s polárními funkčními skupinami jako je hydroxylová, karbonylová a karboxylová, které zvyšují molární extenční koeficient. Oproti tomu nepolární alifatické skupiny připojené k aromatickému kruhu jeho hodnotu nezvyšují. Korshin a spol. [26] ve své práci uvádí, že v důsledku přítomnosti dusičnanových aniontů, které mohou negativně ovlivňovat absorpci při 203 nm, definovali další absorpční koeficient, který vyhovuje absorpčnímu koeficientu E_{ET}/E_{Bz} , je jím například poměr absorbancí při vlnových délkách 253 nm a 220 nm [26].

Absorpce elektromagnetického záření vzorkem přírodních vod je semi-kvantitativním indikátorem koncentrace přírodní organické hmoty ve vzorku. Přírodní organická hmota (NOM) absorbuje světlo v širokém rozsahu vlnových délek, zatím co anorganické látky běžně přítomné v přírodních sladkých vodách neabsorbují záření větší než 230 nm. Při úpravě vody bylo zjištěno, že záření absorbované při 245 nm může být užitečným indikátorem při sledování koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOM). V NOM (přírodní organická hmota) sloučeninách je drtivá většina chromoforů, které absorbují v UV oblasti ($\lambda < 400$ nm), jedná se o aromatické struktury s různým stupněm substituce včetně monosubstituovaných a polysubstituovaných fenolů a jednoduchých aromatických kyselin. Tyto chromofory jsou primárně spojovány s HL frakcí NOM [21].

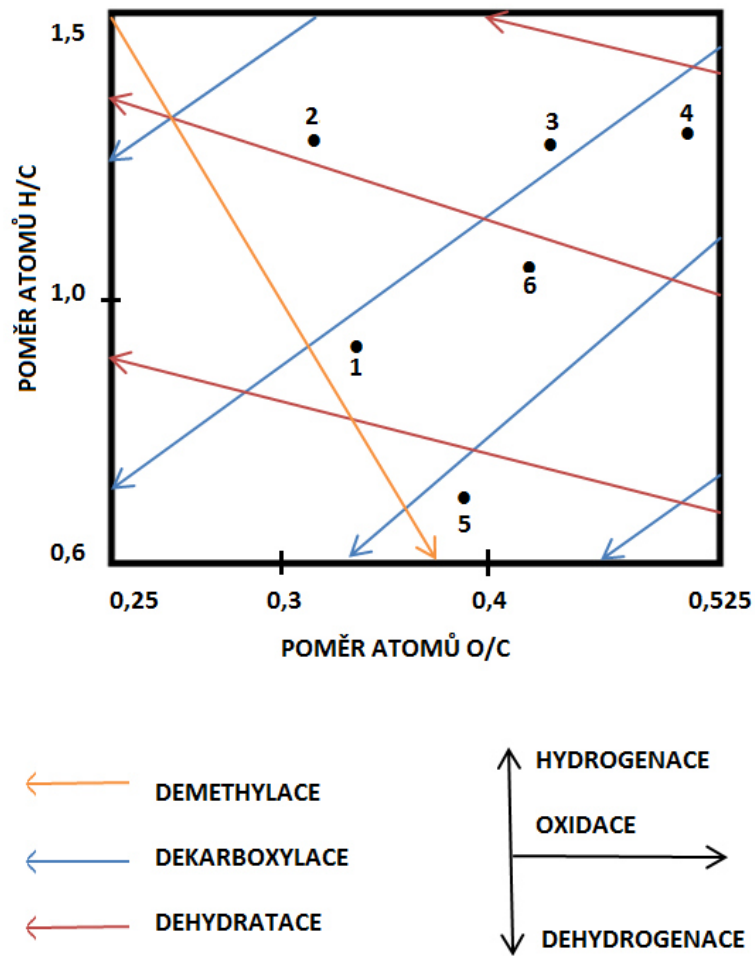
1.10.5 Infračervená spektrometrie HL

Výhoda této metody spočívá ve využívání vzorků v kapalně, plynné i pevné fázi. Patří do skupiny nedestruktivních analytických metod, protože analýzou podrobený vzorek není žádným způsobem poškozen. [15]. I přes složitou strukturu HL lze pozorovat v jejich infračervených spektrech řadu absorpčních pásů, které jsou charakteristické pro různé funkční skupiny a molekulární struktury. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací poskytuje důležité informace o HL zejména o prostorovém uspořádání kyslíkatých funkčních skupin, obsahu vázaných anorganických skupin, reaktivitě apod. Stejně jako u jiných optických metod i zde platí *Lambert-Beerův zákon*. Proto tato metoda má dobré předpoklady pro kvalitativní analýzu funkčních skupin HL. Široce se uplatňuje kromě měření FTIR spekter v pevné fázi (KBr tablet) také měření difúzně reflektančních spekter – DRIFT. Oproti NMR spektrometrii je v případě infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací nespornou výhodou podstatně rychlejší měření. Mimo jiné se FTIR spektrometrie vyznačuje nízkou náročností na množství analyzovaného vzorku. Další předností je možnost srovnání spekter neznámého vzorku s vlastní knihovnou spekter [17]. Helal a spol. při identifikaci spekter HL zjistili, že hlavním absorpčním pásem je oblast v rozmezí $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, který je charakteristický pro valenční vibrace O–H vazeb v –OH skupinách. Absorpční pásy v rozmezí $2980\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$ jsou především způsobeny symetrickými a asymetrickými valenčními vibracemi C–H vazeb v alifatických skupinách (–CH₂ a –CH₃). Oblast vlnočtů $1720\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ je typická pro symetrické valenční vibrace C=O vazeb v karboxylových skupinách. Absorpční pásy lokalizované v oblasti vlnočtů $1280\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ jsou zpravidla připisovány valenčním vibracím C–O a O–H vazeb v karboxylových skupinách. Poměrně intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci C–O a Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech. Rovněž za zmínku stojí i absorpční pás lokalizovaný při $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, který odpovídá valenční symetrické vibraci –C=C– vazeb v aromátech [27].

1.10.6 Elementární analýza HL

Elementární analýza se využívá ke stanovení makroskopických tj. biogenních prvků (C, H, N, S a O). Vysoký atomový poměr C/N a nízký poměr H/C HK naznačuje jejich vysokou stabilitu vůči mineralizaci a vysoký stupeň kondenzace aromatických struktur. Doba kompostování OM hraje významnou roli v konečném obsahu biogenních prvků v FK. Během kompostovacího procesu se zřetelně zvyšuje obsah N, zatímco hodnoty obsahu S, C a H se pouze mírně zvyšují. Obsah kyslíku během doby kompostování klesá. Atomový poměr C/H je během kompostování zpravidla stabilní, což naznačuje pouze mírné změny v molekulové struktuře HL. Vysoký obsah N a S může být způsoben vysokým podílem nehumifikované NOM, jako jsou polysacharidy a polypeptidy v kompostu [22]. Chemické procesy ovlivňující genezi HK hrají velkou roli na jejich celkové chování. Z *van Krevelenova* diagramu (atomový poměr H/C na O/C) lze podle vzájemných atomových poměrů a celkového umístění vzorku HL v diagramu vyvodit určité závěry. Na Obr. 4 je HK lokalizována ve spodní části diagramu, při její genezi byly dominantní de-hydrogenační a de-methylační procesy, a tím se u této HK předpokládá

poměrně vysoká stabilita a nízká tendence k mineralizaci, ve srovnání s HK 2, která se nachází v horních polohách diagramu [20].



Obr. 4: příklad van Kreveleného diagramu vzorků HK [20]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a spotřební materiál

- Hydroxid sodný (Lach-Ner s.r.o)
- Kyselina chlorovodíková 0,1 M
- Dusičnan stříbrný
- dekahydrát pyrofosforečnanu sodného
- bromid draselný pro FTIR
- destilovaná voda
- vermikompost

2.2 Použité přístroje a zařízení

- jednopozicový planetární mlýnek Pulverisette 6, FRITSCH
- centrifuga Hettich Rotina 46
- elementární analyzátor Euro-Vector CHNS/O EA 3000
- UV/Vis spektrometr Hitachi U3900
- FTIR spektrometr Nicolet iS5
- ICP-OES Horiba Scientific
- TGA analyzátor Q5000 (TA Instruments)

2.3 Extrakce HK a FK z vermikompostu

Pro izolaci HK a FK byl jako výchozí zdroj zvolen vermikompost, který byl v planetárním mlýnu při $250 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 20 minut pomlet. Namletý vermikompost byl smíchán s $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem kyseliny chlorovodíkové. Takto připravená suspenze byla ponechána na třepačce po dobu jedné hodiny. Dekalcinovaný vermikompost byl následně promyt deionizovanou vodou do úplného odstranění chloridových iontů. Zkouška přítomnosti chloridových iontů byla uskutečněna $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem dusičnanu stříbrného. Předupravený vermikompost bez přítomnosti chloridových iontů byl umístěn do plastové nádoby s extrakčním činidlem. Extrakční činidlo obsahovalo směs roztoků NaOH a $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ o souhlasné koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Plastová nádoba obsahující vermikompost spolu s extrakčním činidlem byla umístěna přes noc na třepačku na promíchávání.

Následně byla suspenze odstředěna na centrifuze při 4000 RPM po dobu 20 minut. Supernatant čili roztok HK a FK byl přefiltrován přes Büchnerovu nálevku a následně okyselen koncentrovaným roztokem kyseliny chlorovodíkové na $\text{pH} < 2$. Po dvou hodinách došlo k vysrážení HK, které byly od roztoku FK odděleny odstředěním. Poté byla suspenze odstředěna na centrifuze při 4000 RPM po dobu 20 minut. Získané HK byly umístěny do nádoby se směsí roztoků kyseliny chlorovodíkové a fluorovodíkové o koncentraci $0,5 \text{ obj. } \%$. Suspenze byla umístěna na třepačku po dobu dvou dnů. Po uplynutí časového intervalu byla suspenze HK opět odstředěna na centrifuze, aby došlo k oddělení pevného podílu, který byl

následně umístěn do dialyzační membrány o velikosti pórů 1000 Da. Pevný podíl byl dialyzován proti destilované vodě, dokud nebyly vymyty veškeré chloridové ionty. Zkouška na přítomnost chloridových iontů byla opět prováděna pomocí dusičnanu stříbrného. Roztok FK byl taktéž umístěn do dialyzační membrány. Po dialýze byly HK a FK vymrazeny a podrobeny lyofilizaci.

2.4 Lyofilizace HL

Vzorky HL byly umístěny do lyofilizačních baněk. V ethanolové lázni došlo k postupnému zmražení. Po tomto kroku byly baňky umístěny na lyofilizátor, kde zůstaly do úplného vysušení. Následně byl lyofilizát rozetřen v achátové třecí misce dokud nevznikl jemný prášek, který byl následně použit pro další analýzu.

2.5 Elementární analýza

Elementární složení vzorků HL bylo provedeno z důvodu základní charakterizace tj. zjištění obsahu biogenních prvků CHNS/O. Vzorky HL byly spáleny v atmosféře kyslíku, a to konkrétně při pracovní teplotě reaktoru 900 °C. Vzorky HL byly dále termogravimetricky analyzovány na TGA Q5000 s rychlostí ohřevu pece 10 °C·min⁻¹, kdy konečná teplota byla 800 °C. Na základě získaných experimentálních dat bylo možné určit obsah nespalitelného podílu tj. celkové vlhkosti a popela. Výsledné grafy z termogravimetrické analýzy jsou uvedeny v příloze na Obr.p. 8–10.

2.6 ICP-OES

Obsah prvků byl stanoven ve výluhu extrakčního roztoku Melich III. Byl připraven roztok s 69,45 g NH₄F a 36,75 g EDTA v 500 dm³ demineralizované vody. Poté došlo k rozpuštění 20 g NH₄NO₃ v demineralizované vodě a k přidání 4 cm³ připraveného roztoku fluoridu amonného – EDTA. Následně byla přidána koncentrovaná kyselina octová o objemu 11,5 cm³ a kyselina dusičná o objemu 0,825 cm³. Výsledné pH připraveného extrakčního roztoku bylo 2,5 ± 0,1. Následně bylo 5 g vermikompostu rozpuštěno ve 100 dm³ připraveného extrakčního roztoku Melich III. Připravená suspenze se nechala po dobu jednoho dne třepat. Poté byla provedena ultrafiltrace s membránou o velikosti pórů 0,45 μm. Výsledný filtrát byl použit k měření na ICP-OES.

2.7 UV/Vis spektrometrie

Aby mohly být popsány použité HL pomocí vybraných absorpčních koeficientů, byly připraveny roztoky HL v 0,1 mol·dm⁻³ hydroxidu sodném o konečných koncentracích 10 a 50 mg·dm⁻³ viz. Obr.p. 12. Vzorky byly doplněny standardním fosfátovým pufrem (směs Na₂HPO₄ a NaH₂PO₄) o hodnotě pH 7 a koncentraci 0,05 mol·dm⁻³. Roztoky HL připravené tímto způsobem byly proměřeny na UV/Vis spektrometru v oblasti vlnových délek od 200–900 nm v křemenné kyvetě, jejíž optická dráha byla 1 cm.

2.8 FTIR spektrometrie

Pro měření infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byly připraveny tablety následujícím způsobem. Byly použity vzorky HK, FK a dále pak nativní vermikompost. Vzorky byly rozetřeny v achátové misce. Bylo použito ~ 0,4 g KBr a ~ 2,5 mg vzorku HL. Transparentní tablety byly lisovány ve speciálním lisu. Velikost vylisovaných tablet byla 1 cm o tloušťce ~ 2 mm. Tablety byly následně použity k charakterizaci HL ve FTIR spektrometru Nicolet iS5, kde byla proměřena transmisní vibrační spektra. Proměřena byla oblast vlnočtů 4000–400 cm^{-1} . Výsledná transmisní vibrační spektra vzorků byla získána pomocí 256 skenů s rozlišení 8 cm^{-1} .

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 TGA a elementární analýza HL

Základní charakterizaci, která byla provedena pomocí elementární analýzy, byl podroben vermikompost a z něho izolované HK a FK. Naměřené výsledky elementárního složení, tedy obsah biogenních prvků a termogravimetrické analýzy, jež určuje celkovou vlhkost a obsah popela, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Elementární složení izolovaných HL a vermikompostu (elementární složení vzorků HL a vermikompostu je uvedeno v hm. % a vztaženo na suchý vzorek bez popela).

| vzorek | elementární složení v hm. % | | | | | vlhkost (hm. %) | popel (hm. %) |
|--------|-----------------------------|------|------|---|-------|--------------------|------------------|
| | C | H | N | S | O | | |
| VK | 28,59 | 3,56 | 1,94 | – | 23,73 | 6,31 | 35,87 |
| HK | 57,16 | 6,18 | 4,36 | – | 27,90 | 3,45 | 0,95 |
| FK | 40,94 | 5,77 | 2,90 | – | 31,31 | 10,88 | 8,20 |

Z uvedených výsledků elementární analýzy vyplývá, že použité HL jsou převážně tvořeny uhlíkem, kyslíkem, vodíkem a dusíkem. Naproti tomu byl vzorek vermikompostu v komparaci s HL charakterizován nižším obsahem uhlíku, dusíku, vodíku a konečně i kyslíku. Z výsledků uvedených v Tab. 3 je zřejmé, že použité vzorky huminových a fulvinových kyselin projevují typické prvkové složení HL izolovaných z terestriálních přírodních matric [28]. Na základě těchto výsledků můžeme tvrdit, že FK izolované z vermikompostu v porovnání s HK obsahují nižší obsah uhlíku a dusíku. Oproti tomu je FK v porovnání s ostatními vzorky charakterizována vyšším obsahem kyslíku tzn. vyšším obsahem kyslík obsahujících funkčních skupin, kam zpravidla řadíme karboxylové a –OH fenolické funkční skupiny.

Tento závěr je právě tak souhlasný s vypočtenými hodnotami absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} , který je výrazně citlivý na obsah polárních substituentů na aromatických jádrech HL. Též si nelze nepovšimnout v Tab. 3, že daný vzorek vermikompostu byl charakterizován vysokým obsahem popela, tzn. vysokým obsahem nespalitelného podílu anorganických sloučenin. V důsledku tohoto výsledku můžeme konstatovat, že během vermikompostovacího procesu dochází k silné mineralizaci organické hmoty vermikompostu. Výsledky z infračervené spektrometrie tento závěr také podporují, protože v infračerveném spektru vzorku vermikompostu byly lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy při $\sim 1427\text{ cm}^{-1}$ a 875 cm^{-1} , které jsou zpravidla přisuzovány valenčním a deformačním vibracím uhličitanového aniontu. Ovšem obsah popela byl v preparátech HL poměrně nízký. V případě izolovaných HL se tato hodnota vyskytovala v rozmezí $\sim 1,0\text{--}8,2\text{ hm. \%}$. Díky těmto nízkým hodnotám můžeme říci, že byly použity vhodné purifikační postupy během izolace HL z vermikompostu. Mezi purifikační kroky, jež výrazně ovlivňují výsledný obsah popela v preparátech HL, řadíme především dekalifikaci přírodní matrice a v neposlední řadě i dialyzační postupy [29]. Jak vyplývá z výsledků uvedených v Tab. 3, vlhkost použitých vzorků se pohybovala v rozmezí $\sim 3,5\text{--}10,9\text{ hm. \%}$.

Atomové poměry H/C, O/C a N/C byly vypočteny z naměřených hodnot elementárního složení HL a vermikompostu, jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Atomové poměry H/C, O/C a N/C vypočtené z příslušných hodnot elementárního složení použitých HL a vermikompostu

| vzorek | H/C | O/C | N/C |
|--------|------|------|------|
| VK | 0,12 | 0,83 | 0,07 |
| HK | 0,11 | 0,49 | 0,08 |
| FK | 0,14 | 0,76 | 0,07 |

Z výsledků uvedených v Tab. 4 je patrné, že izolované vzorky vykazují typické hodnoty atomových poměrů HL extrahovaných z terestriálních přírodních matric. Dosáhnuté výsledky naznačují, že HK jsou v porovnání s FK charakterizovány nižšími hodnotami atomových poměrů H/C a O/C, které jsou ukazateli aromaticity, míry dehydrogenace a obsahu strukturálních jednotek, které ve svých strukturách obsahují kyslík. FK byla charakterizována vyššími hodnotami těchto atomových poměrů. V souvislosti s těmito výsledky můžeme konstatovat, že FK jsou v porovnání s HK charakterizovány nižším stupněm humifikace, aromaticity a mírou dehydrogenace. V Tab. 4 si nelze nepovšimnout, že vzorek FK byl v porovnání s HK charakterizován vyšší hodnotou atomového poměru O/C, který je dobrým ukazatelem stupně oxidace těchto biokoloidních sloučenin. Vezmeme-li v úvahu atomový poměr N/C byly HL charakterizovány blízkými hodnotami, jejichž atomový poměr N/C se pohyboval v rozmezí ~ 0,07–0,08. Z tohoto důvodu můžeme usuzovat, že huminové a fulvinové kyseliny ve svých strukturách obsahují obdobná množství dusík obsahujících funkčních skupin. Tato domněnka byla podpořena pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací, protože v FTIR spektrech HL byly lokalizovány absorpční pásy, které bývají zpravidla připisovány valenčním a deformačním vibracím N–H a C–N vazeb v amidových skupinách (–NH–CO–). Z výsledků shrnutých v Tab. 4 je evidentní, že vzorek vermikompostu byl charakterizován vysokou hodnotou atomového poměru O/C. Na základě tohoto výsledku můžeme říci, že během vermikompostovacího procesu tzn. *procesu humifikace* dochází k silné oxidaci přírodní organické hmoty, a tím i k genezi kyselých funkčních skupin zejména karboxylových a –OH fenolických.

3.2 ICP OES

Optickým emisním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem (ICP-EOS) bylo stanoveno celkové množství prvků, které jsou obsaženy ve vermikompostu. Jejich přehled je uveden v Tab. 5. Z výsledků je znatelné, že nejvyšší koncentrací biogenní prvků je zastoupen vápník, který je pro rostlinu zásadní, jelikož ovlivňuje metabolismus rostliny a jeho nedostatek negativně ovlivňuje přísun živin. Dalším prvkem, který je ve vermikompostu obsažen ve značném množství je draslík, jež se v zelených rostlinách podílí na syntéze sacharidů, dokonce i proteinů. Nejnižší koncentrací biogenních prvků byl zastoupen prvek fosfor, jehož koncentrace byla $0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Fosfor spolu s draslíkem je zařazován mezi hlavní výživové prvky u rostlin. Železo, jakož to mikroelement, byl obsažen v koncentraci $41,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Železo je důležitou součástí chlorofylu, jeho absence se projevuje nízkou mírou produkce chlorofylu. Stopová množství dalších mikroelementů, konkrétně manganu, zinku, hliníku, kobaltu, niklu a mědi obsažených ve vermikompostu, jsou uvedeny v Tab. 5. Na základě experimentálních výsledků můžeme říci, že vermikompost neobsahuje těžké kovy, jako jsou chrom, olovo, kadmium a arsen. Prvek chrom byl ve vermikompostu obsažen v množství $0,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, nicméně nemá nežádoucí účinky.

Tab. 3: ICP OES vermikompostu

| | prvek | koncentrace $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ |
|----------------|-------|--|
| biogenní prvky | K | 92,20 |
| | P | 0,02 |
| | Mg | 75,03 |
| | Ca | 2490,30 |
| | Na | 31,41 |
| mikroelementy | Fe | 41,01 |
| | Mn | 3,44 |
| | Zn | 1,24 |
| | Al | 20,34 |
| | Co | 0,02 |
| | Ni | 0,10 |
| | Cu | 0,00 |
| těžké kovy | Cr | 0,01 |
| | Pb | 0,00 |
| | Cd | 0,00 |
| | As | 0,00 |

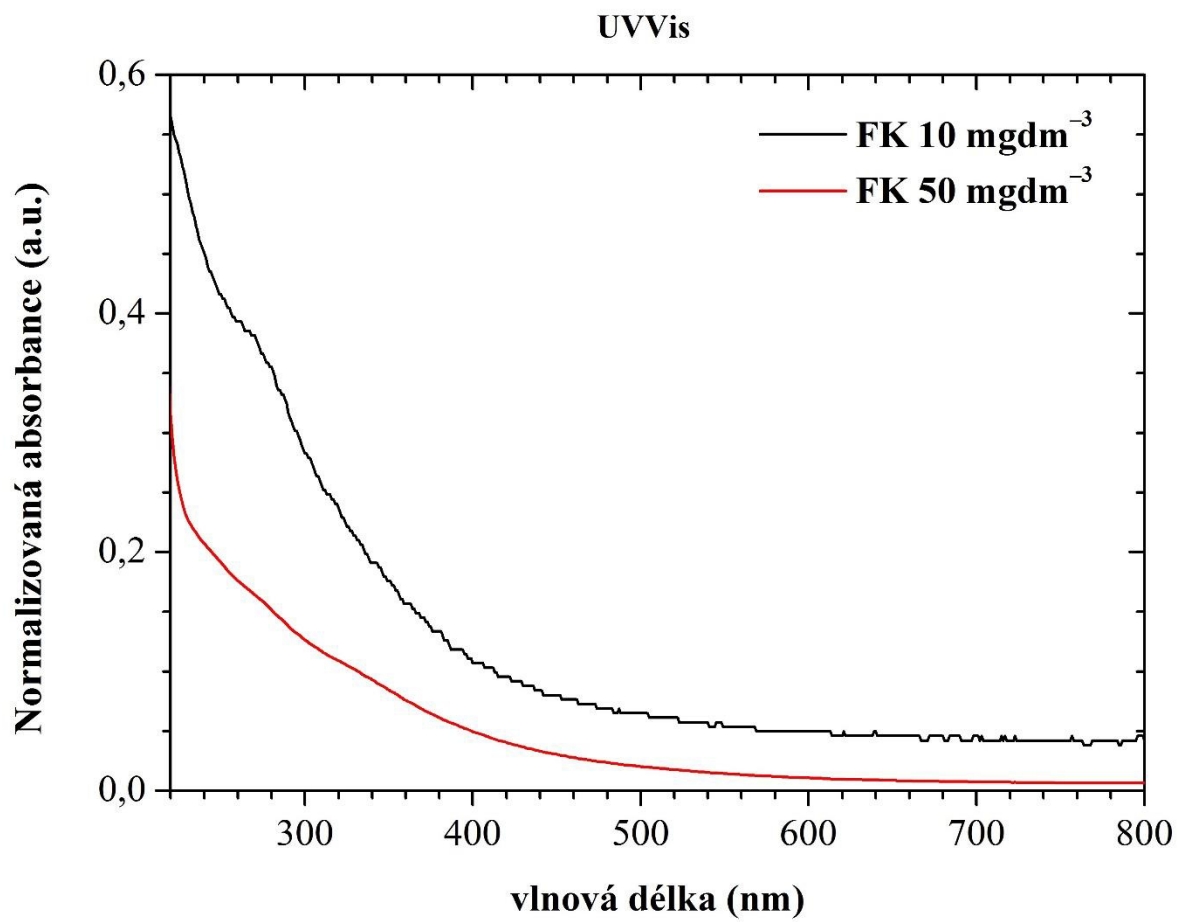
3.3 UV/VIS spektrometrie HL izolovaných z vermikompostu

HL použité v této bakalářské práci byly podrobeny základnímu screeningu pomocí UV/Vis spektrometrie. Z naměřených absorpčních spekter HL byly vypočteny vybrané absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , $\Delta \log K$ a E_{ET}/E_{Bz} , které můžeme považovat za dobré indikátory stupně humifikace, aromaticity či obsahu kyslíku u obsahujících funkčních skupin. Vypočtené absorpční koeficienty jsou uvedeny v Tab. 6.

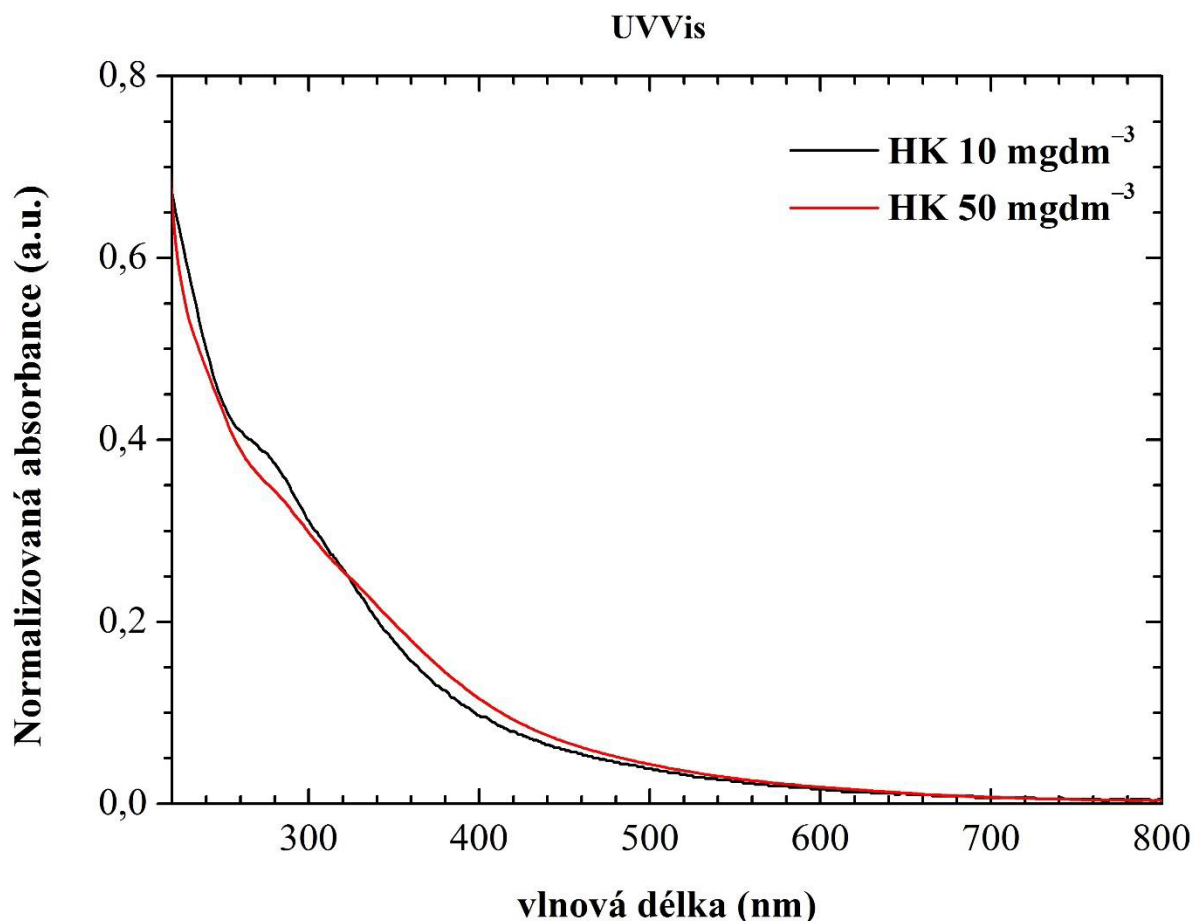
Tab. 6: Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů použitých HL izolovaných z vermikompostu

| vzorek | absorpční koeficienty | | | | $\Delta \log K$ |
|--------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| | E_{ET}/E_{Bz} | E_4/E_6 | E_2/E_4 | E_2/E_3 | |
| HK | 0,64 | 6,73 | 8,41 | 3,05 | 0,83 |
| FK | 0,70 | 10,00 | 11,25 | 3,38 | 0,95 |

Naměřená UV/Vis spektra HL jsou uvedena na Obr. 5 a 6. Z výsledků uvedených v Tab. 6 je patrné, že použité vzorky HL izolovaných z vermikompostu vykazují typické hodnoty absorpčních koeficientů HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. Tento absorpční koeficient E_{ET}/E_{Bz} je výrazně citlivý na přítomnost polárních funkčních skupin na aromátech HL a dokonce i rozpuštěné organické hmoty. Obecně platí, že s rostoucí mírou substituce aromatických struktur těmito funkčními skupinami roste i hodnota tohoto absorpčního koeficientu. Díky vypočteným hodnotám absorpčních koeficientů E_{ET}/E_{Bz} můžeme konstatovat, že FK jsou v porovnání s HK charakterizovány vyšší mírou substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami. Především se jedná o karboxylové a –H fenolické funkční skupiny a funkční skupiny odvozené od aryl-etherů (Ar–O–R). Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry, které byly pořízenými pomocí FTIR spektrometrie. Mezi další strukturální parametry, které jsou v této bakalářské práci diskutovány, jsou následující absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 a $\Delta \log K$. Tyto absorpční koeficienty můžeme považovat za dobré indikátory odhadu stupně humifikace, aromaticity a střední molekulové hmotnosti HL. Na základě výsledků uvedených v Tab. 6 je zřejmé, že HK byly v porovnání s FK charakterizovány nižšími hodnotami těchto absorpčních koeficientů. V souvislosti s těmito výsledky můžeme říci, že HK jsou charakterizovány jak vyšším stupněm humifikace, tak aromaticitou, a v neposlední řadě i střední molekulovou hmotností. Nicméně FK byly charakterizovány vyššími hodnotami těchto absorpčních koeficientů, a to především v případě humifikačního indexu E_4/E_6 a E_2/E_4 . Můžeme tedy tvrdit, že FK jsou v porovnání s HK tvořeny nižší aromaticitou, stupněm humifikace a střední molekulovou hmotností. Výše uvedené závěry jsou v dobré shodě s výsledky, jež byly publikovány Stevensonem [26]. Kumada [28] na základě hodnot $\Delta \log K$ rozdělil HL do tří skupin. Typ „A“ reprezentuje huminové látky s vysokým stupněm humifikace ($\Delta \log K < 0,6$). Typ „B“ představuje skupinu HL, jejichž hodnota $\Delta \log K$ se nachází v rozmezí 0,60–80. Tyto HL jsou charakteristické nižším stupněm humifikace a střední molekulovou hmotností. Poslední skupinou je skupina HL, která je označovaná jako „Rp“ s hodnotou $\Delta \log K > 0,80$. HL, které jsou zařazeny do uvedené skupiny a jsou charakterizovány nejnižším stupněm humifikace a vysokým obsahem alifatických funkčních skupin ve struktuře těchto biokoloidních látek. Na základě vypočtených koeficientů $\Delta \log K$ můžeme prohlásit, že HL izolované z vermikompostu jsou charakterizovány nižším stupněm humifikace, aromaticitou a taktéž střední molekulovou hmotností v porovnání s HL pocházejících z kaustobiolitů, půd a sedimentů [21]. Uvedené závěry jsou v dobré shodě s průběhem geneze těchto biokoloidních sloučenin během vermikompostovacího procesu, kdy přírodní organická hmota je v prvotní fázi kompostování transformována na tzv. „mladé“ HL, které se vyznačují nižším stupněm humifikace a střední molekulovou hmotností.



Obr. 5: UV/Vis spektra FK



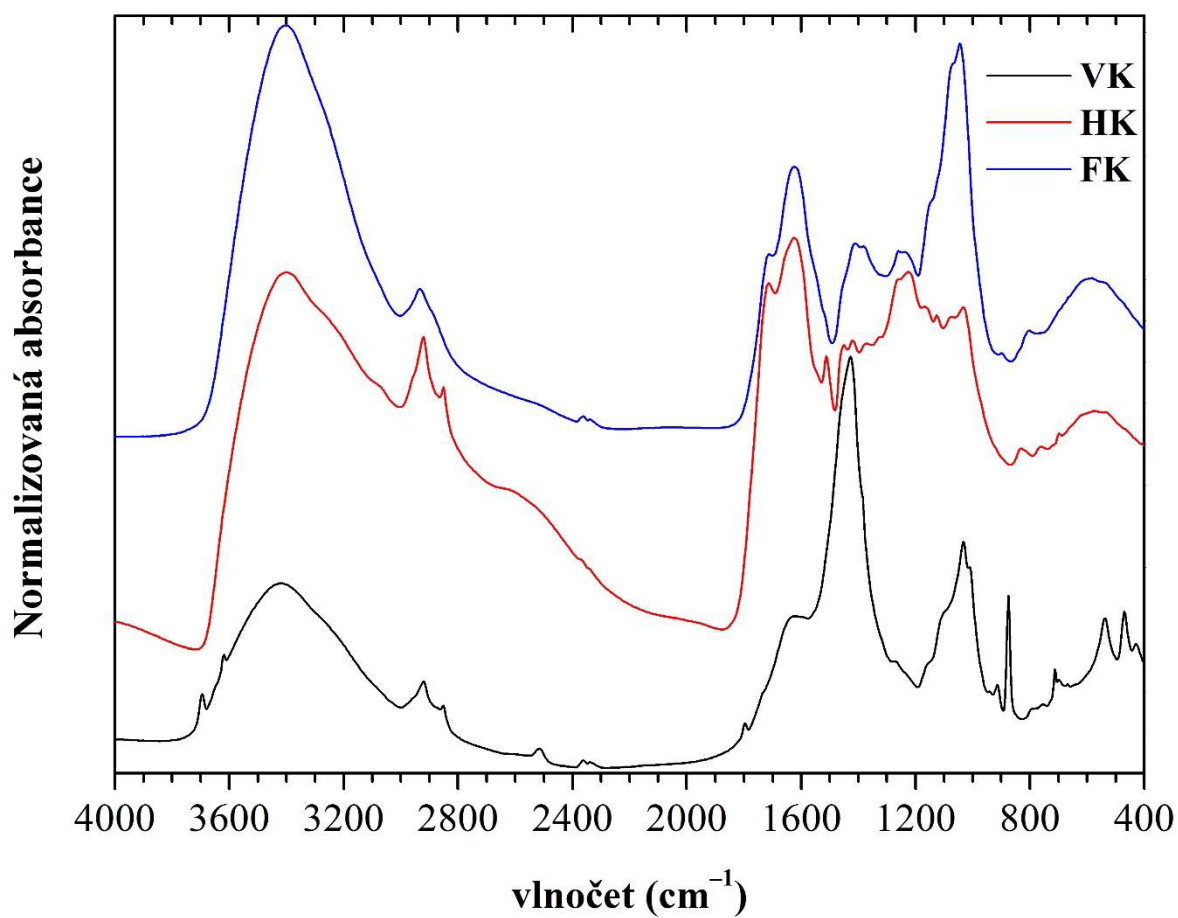
Obr. 6: UV/Vis spektra HK

3.4 FTIR spektrometrie HL a vermikompostu

Typická FTIR spektra HL a přírodní matrice vermikompostu, ze které byly tyto HL izolovány, jsou uvedena na Obr. 7. Valenčním vibracím O–H a N–H vazeb v karboxylových kyselinách, fenolech, alifatických alkoholech, amidech aj. odpovídá široký absorpční pás v oblasti 3420–3399 cm^{-1} . Kromě vzorku FK byly v jejich FTIR spektrech lokalizovány absorpční pásy v oblastech 2933–2921 cm^{-1} a $2850 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ připadající asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb v methylenových skupinách. Deformační vibrace C–H vazeb v methylenových a methylových skupinách jsou lokalizovány v absorpčním pásu při $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$, který byl pozorován pouze u vzorku HK. S výjimkou vzorku vermikompostu byl v jejich infračervených spektrech lokalizován absorpční pás v oblasti vlnů 1382–1372 cm^{-1} , který je zpravidla připisován symetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Mimo vzorek vermikompostu byl v jejich FTIR spektrech lokalizován relativně intenzivní absorpční pás při $\sim 1712 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, jež je výhradně připisován valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových skupinách. Absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnů 1428–1411 cm^{-1} , jež odpovídá symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO^-), potvrzuje přítomnost karboxylových skupin. V případě vzorku vermikompostu se bude spíše jednat o absorpční pás odpovídající valenční vibraci C=O vazeb v uhličitánovém anionu. Tato

domněnka byla právě tak potvrzena přítomností absorpčního pásu při $\sim 875 \text{ cm}^{-1}$, který je běžně připisován deformační vibraci C=O vazeb v uhličitanech. Až na vzorek vermikompostu byl v jejich IČ spektrech lokalizován absorpční pás při $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$, tento absorpční pás je obvykle přisuzován symetrické valenční vibraci $\dots\text{C}=\text{C}=\text{C}\dots$ vazeb v aromátech. V případě tohoto absorpčního pásu však nelze s jistotou vyloučit ani příspěvek symetrické valenční vibrace C=O vazeb v sekundárních amidech ($-\text{NH}-\text{CO}-$). Stejně tak i tato hypotéza byla potvrzena přítomností méně intenzivního absorpčního pásu při $\sim 1511 \text{ cm}^{-1}$ připadajícího valenční skeletální vibraci $\dots\text{C}=\text{C}=\text{C}\dots$ vazeb v aromátech. V případě vzorku vermikompostu byl v jeho FTIR spektru lokalizován poměrně široký absorpční pás při $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$, který bývá pravidelně přiřazován symetrické valenční vibraci C=O vazeb v sekundárních amidech ($-\text{NH}-\text{CO}-$). Asymetrická vibrace C–O–C vazeb v aryl etherech, byla identifikována pouze u vzorku FK v jejím IR spektru, tato specifická absorpce je vymezena oblastí $1270\text{--}1240 \text{ cm}^{-1}$. Mimo jiné byl v FTIR spektru vzorku HK lokalizován absorpční pás při $\sim 1225 \text{ cm}^{-1}$, který je standardně přikládán valenční asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a –OH fenolických skupinách. Taktéž v tomto IR spektru byly identifikovány absorpční pásy při $\sim 1170 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1125 \text{ cm}^{-1}$, které jsou mnohdy připisovány valenční asymetrické a symetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alkyl-etherech a sekundárních alkoholech. V infračervených spektrech byl u všech vzorků lokalizován v oblasti vlnočtů $1044\text{--}1032 \text{ cm}^{-1}$ absorpční pás, který je obvykle připisován valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech.

FTIR



Obr. 7: FTIR spektra HK, FK a vermikomostu

4 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zaměřuje na fyzikálně-chemickou charakterizaci HL a vermikompostu pomocí elementární analýzy (EA), emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), UV/Vis spektrometrie a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat HL izolované z vermikompostovaného přírodního odpadu podle výše uvedených instrumentálních technik. Nezbytnou součástí byla izolace HL z vermikompostu pomocí alkalické extrakce. Izolovány byly HK a FK, které byly následně podrobeny již zmiňované fyzikálně-chemické charakterizaci.

Pomocí elementární analýzy bylo zjištěno, že HK obsahují v porovnání s FK více uhlíku, dusíku a vodíku. Naproti tomu byla FK charakterizována vyšším obsahem kyslíku. Tento výsledek byl rovněž potvrzen i vyšší hodnotou vypočteného atomového poměru O/C, který nám naznačuje, že FK je v porovnání s HK během humifikačního procesu více oxidována a tedy obsahuje vyšší množství kyslík obsahujících funkčních skupin, jako jsou zejména reaktivní kyselé funkční skupiny tzn. karboxylové a –OH fenolické funkční skupiny. I když byla HK oproti FK charakterizována vyšším obsahem vodíku, tak atomový poměr H/C odhalil, že HK obsahuje vyšší množství aromatických struktur. Vzorek vermikompostu byl charakterizován obvyklým obsahem biogenních prvků, který je příznačný pro přírodní matrice tohoto charakteru.

Tyto závěry byly mimo jiné podpořeny i výsledky z UV/Vis spektrometrie. V širším pohledu na prezentované výsledky absorpčních koeficientů E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 a $\Delta \log K$ můžeme říci, že HK jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšším stupněm humifikace, aromaticity a střední molekulovou hmotností. Vypočtené hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} HL byly ve velmi dobré shodě s výsledky z elementární analýzy, kdy FK se oproti HK vyznačovala vyšší hodnotou tohoto absorpčního koeficientu, a proto můžeme konstatovat, že FK obsahuje vyšší množství polárních substituentů na aromatických jádrech.

Pomocí FTIR spektrometrie bylo zjištěno, že HK je v porovnání s FK charakterizována vyšším obsahem alkyl-etherů a sekundárních amidů. Tento výsledek je rovněž podpořen i vyšší hodnotou dusíku v HK, jež byl stanoven pomocí elementární analýzy. Přítomnost absorpčního pásu odpovídajícího valenčním vibracím v amidových skupinách jsou dobrým indikátorem bílkovinných prekurzorů, které jsou zapojovány do humifikačního procesu a tedy i do geneze HK. Mimo jiné můžeme říci, že v FTIR spektrech HL byly lokalizovány a identifikovány obvyklé absorpční pásy, které se v těchto *biokoloidních* látkách vyskytují.

Pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem bylo zjištěno, že vzorek vermikompostu obsahuje vhodná množství výživových prvků, kam zpravidla řadíme vápník, draslík, sodík a hořčík. Rovněž tento vzorek obsahuje i stopová množství prvků, které hrají klíčovou roli v metabolismu a výživě rostlin. Cenným výsledkem je mimo jiné i fakt, že vzorek vermikompostu neobsahuje nežádoucí prvky, které by mohli z toxikologického hlediska představovat jistá rizika.

5 LITERATURA

- [1] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Povôd a štruktury. Chemické listy [online]. 2008, **2008**(102), 262-268 [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2008_04_262-268.pdf
- [2] Humínové kyseliny v chove exotických vtákov. EXOTA [online]. 2011, **2011**(7-8), 55-59 [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: <http://www.novaexota.eu/files/43/HUMAC.pdf>
- [3] PITTER, Pavel. Hydrochemie. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9
- [4] JANDÁK, Jiří, Eduard POKORNÝ a Alois PRAX. Půdoznalství. Vyd. 3., přeprac. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. ISBN 978-80-7375-445-7.
- [5] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. Chemické listy [online]. 2008, **2008**(102), 338-345 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_338-345.pdf
- [6] WAGNER, Martin, Wido SCHMIDT, Lutz IMHOF, Anika GRÜBEL, Camilla JÄHN, Denise GEORGI a Heike PETZOLDT. Characterization and quantification of humic substances 2D-Fluorescence by usage of extended size exclusion chromatography. Water Research [online]. 2016, **93**, 98-109 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1016/j.watres.2016.01.050. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416300495>
- [7] ŠARAPATKA, Bořivoj. Vybrané kapitoly z pedologie a ochrany půdy. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3476-6.
- [8] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. Chemické listy [online]. 2010, (104), 1015-1025 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [9] MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK. Lignit - struktura, vlastnosti a použití. Chemické listy [online]. 1997, (91), 160-168 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_03_160-168.pdf
- [10] ZHAO, Pin-Yi, Yan GUO, Bao-Jun YU, Jie ZHANG a Cheng-Yang WANG. Biotechnology humic acids-based electrospun carbon nanofibers as cost-efficient electrodes for lithium-ion batteries. Electrochimica Acta [online]. 2016, **203**, 66-73 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.03.109. ISSN 00134686. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468616306508>
- [11] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Solubility and dissociation of lignitic humic acids in water suspension. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2005, **252**(2-3), 157-163. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.10.019.

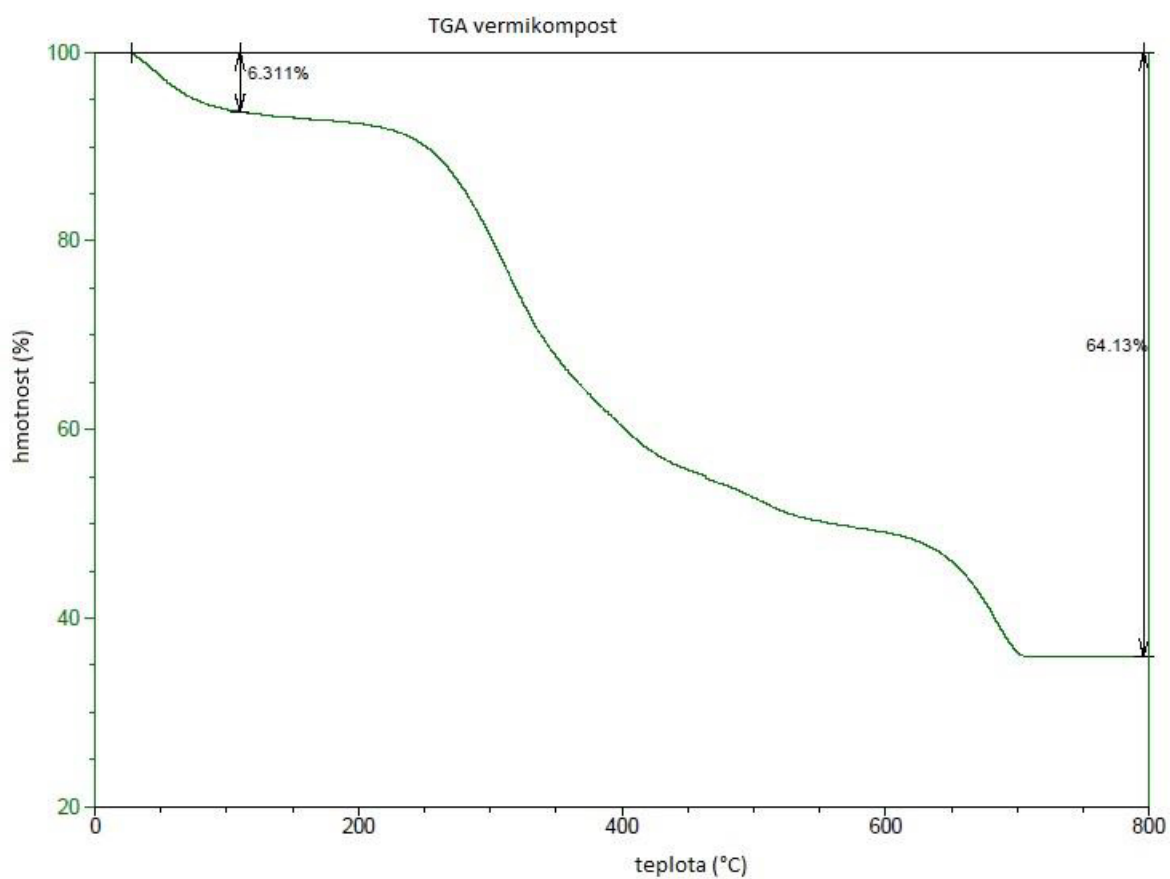
- [12] INCAN nutrition s.r.o. Incan: Huminové látky [online]. 2012 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.incan.cz/index.php/huminove-latky>.
- [13] Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.
- [14] BRUCKIN, Vitaly, Breda O'DRISCOLL a Cormac SMYTH. Ultrasonic spectroscopy for material analysis: Recent advances. Spectroscopy Europe [online]. 2003, (15/1), 20-25 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/applications/pdf/spectroscopyeurope.pdf>
- [15] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [16] VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík: Humus - půda - rostlina (1) Funkce humusu v ekosystému. Biom.cz [online]. 2006-09-04 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-1-funkce-humusu-v-ekosystemu>>. ISSN: 1801-2655
- [17] JNOVÁK, František a Martina ŠESTAUBEROVÁ. *Huminové látky v povodí Rašeliníku (obora Fláje, Krušné hory)*. České Budějovice: Biologické centrum AV ČR, 2013. ISBN 978-80-86525-27-3.
- [18] CHEN, Jie, Baohua GU, Eugene J. LEBOEUF, Hongjun PAN a Sheng DAI. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* [online]. 2002, **48**(1), 59-68 [cit. 2016-12-24]. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00041-3. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653502000413>
- [19] NOVÁK, František a Richard HRABAL. KVANTITATIVNÍ ¹³C NMR SPEKTROSKOPIE HUMINOVÝCH LÁTEK. *Chemické listy* [online]. 2011, (105), 752–760 [cit. 2016-12-21]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_10_752-760.pdf
- [20] BARANČÍKOVÁ, G., N. SENESI a G. BRUNETTI. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma* [online]. 1997, **78**(3-4), 251-266 [cit. 2016-12-24]. DOI: 10.1016/S0016-7061(97)00033-5. ISSN 00167061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706197000335>
- [21] KORSHIN, Gregory V., Chi-Wang LI a Mark M. BENJAMIN. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research* [online]. 1997, **31**(7), 1787-1795 [cit. 2016-12-24]. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00006-7. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135497000067>
- [22] AIT BADDI, Ghita, Mohamed HAFIDI, Juan CEGARRA, José Antonio ALBURQUERQUE, José GONZÁLVEZ, Véronique GILARD a Jean-Claude REVEL. Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and ¹³C-NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. *Bioresource*

- Technology* [online]. 2004, **93**(3), 285-290 [cit. 2017-01-07]. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.10.026. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403003298>
- [23] HANČ, Aleš a Petr PLÍVA. *Vermikompostování bioodpadů: (certifikovaná metodika)*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2013. ISBN 978-80-213-2422-0.
- [24] VÁŇA, Jaroslav: Kompostování odpadů. *Biom.cz* [online]. 2002-01-14 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/kompostovani-odpadu>>. ISSN: 1801-2655.
- [25] KÁRA, Jaroslav, PASTOREK, Zdeněk, JELÍNEK, Antonín: Kompostování zbytkové biomasy. *Biom.cz* [online]. 2002-01-31 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/kompostovani-zbytkove-biomasy>>. ISSN: 1801-2655.
- [26] KORSHIN, Gregory V., Chi-Wang LI a Mark M. BENJAMIN. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research* [online]. 1997, **31**(7), 1787-1795 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00006-7. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135497000067>
- [27] HELAL, Aly A. G.A. MURAD a A.A. HELAL. Characterization of different humic materials by various analytical techniques. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2011, **4**(1), 51-54 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.06.018. ISSN 18785352. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535210000705>
- [28] KUWATSUKA, Shozo, Kiyoshi TSUTSUKI a Kyoichi KUMADA. Chemical studies on soil humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 1978, **24**(3), 337-347 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1080/00380768.1978.10433113. ISSN 0038-0768. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00380768.1978.10433113>
- [29] CHEFETZ, Benny, Yona CHEN, Yitzhak HADAR a Patrick G. HATCHER. Characterization of Dissolved Organic Matter Extracted from Composted Municipal Solid Waste. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 1998, **62**(2), 326- [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.2136/sssaj1998.03615995006200020005x. ISSN 0361-5995. Dostupné z: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/62/2/SS0620020326>
- [30] TAN, Kim H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. Second edition. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 9781482234459.

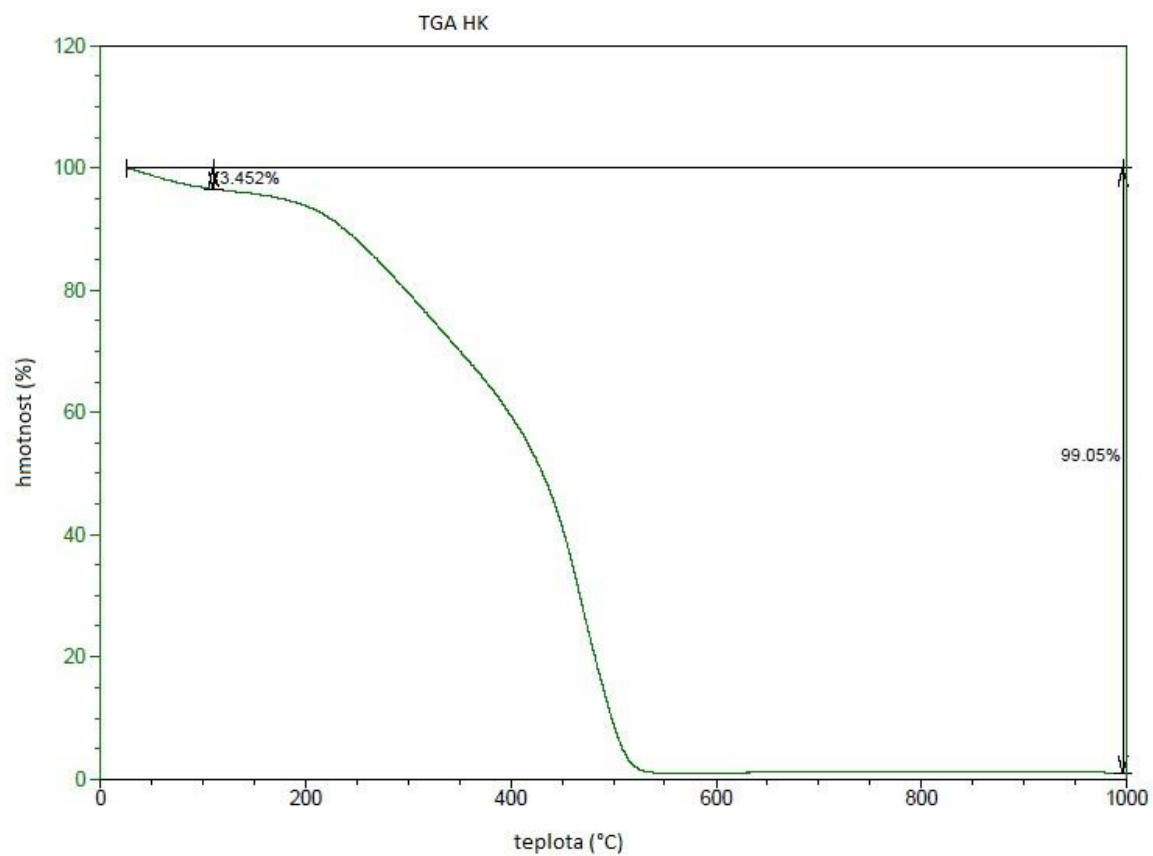
6 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|---------------------|--|
| HL | humínové látky |
| HK | humínové kyseliny |
| HF | fulvíkové kyseliny |
| FTIR | infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací |
| UV/Vis | molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření |
| EA | elementární analýza |
| ICP-OES | emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem |
| TGA | termogravimetrická analýza |
| ¹³ C NMR | ¹³ C spektrometrie nukleární magnetické resonance |

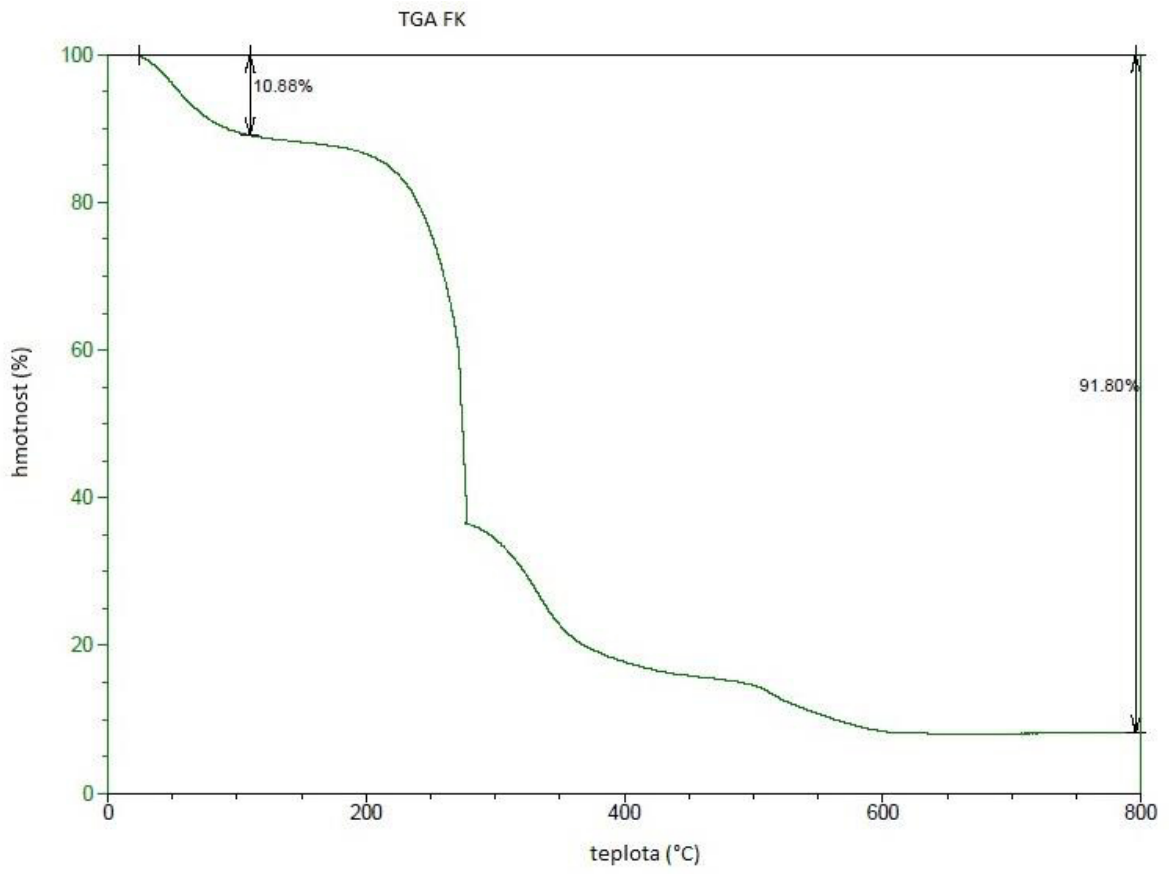
7 PŘÍLOHY



Obr. p. 8: TGA vermikompost



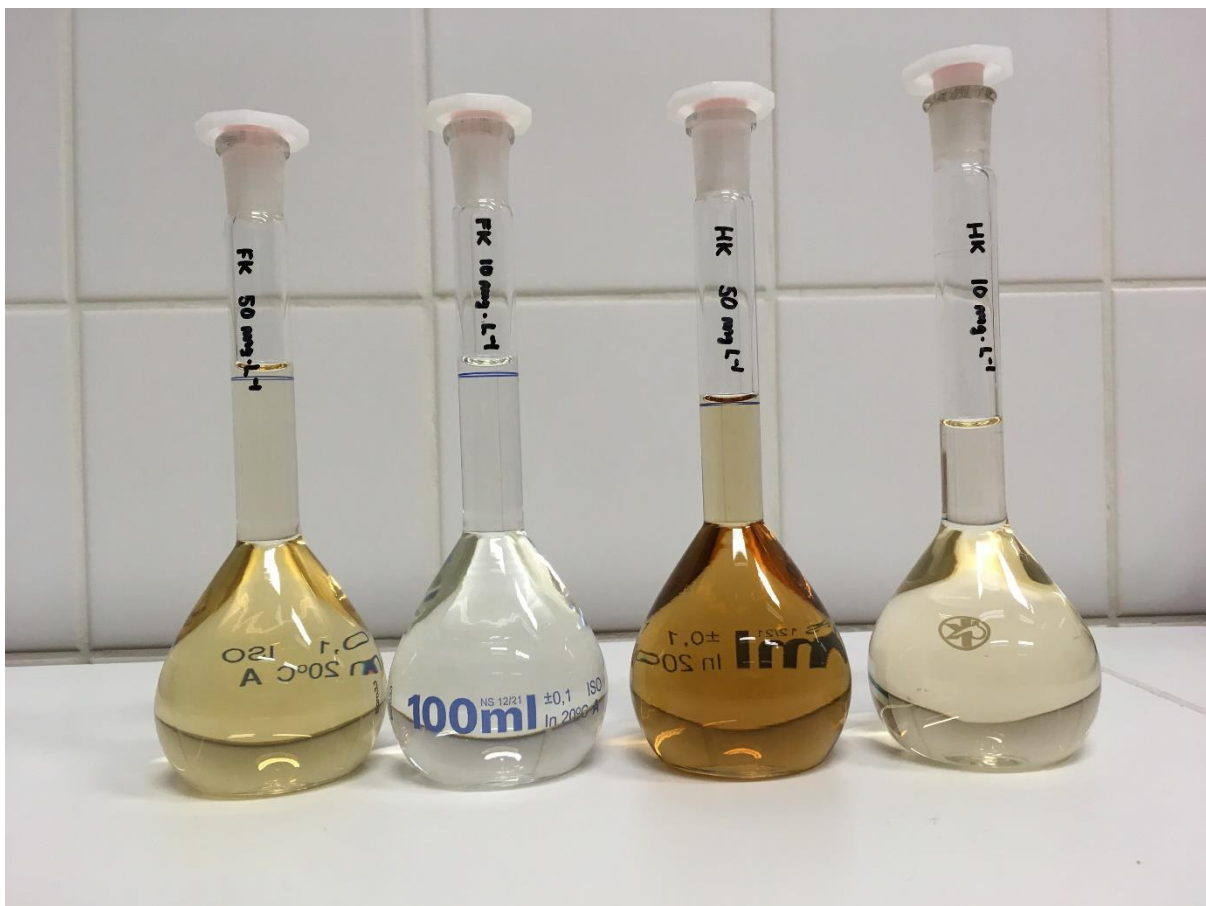
Obr. p. 9: TGA HK



Obr. p. 10: TGA FK



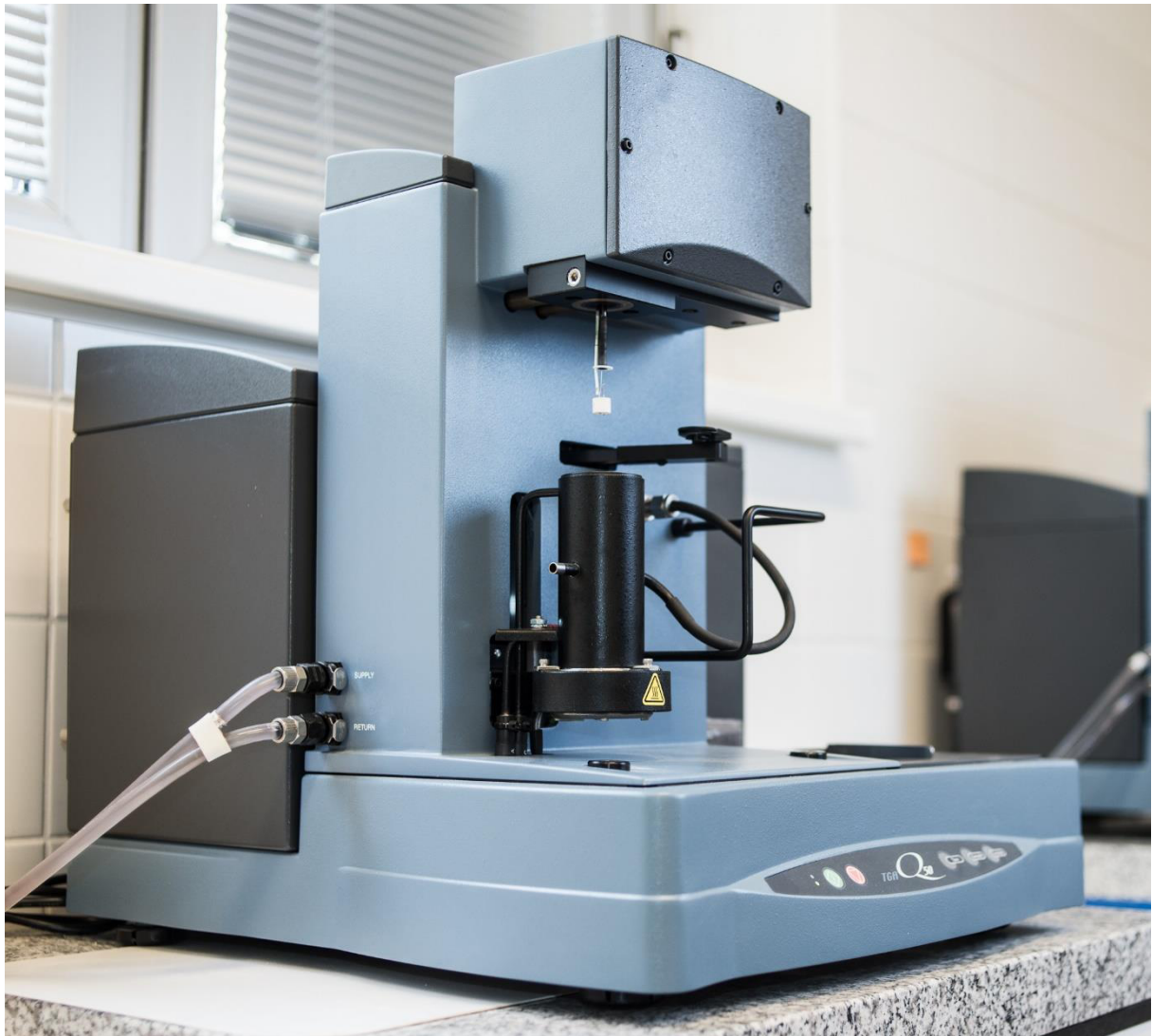
Obr. p. 41: Zásobní roztoky HK a FK pro UV/Vis



Obr. p. 52: Roztoky HK a FK pro UV/Vis



Obr. p. 63: Tablety pro FTIR



Obr. p. 74: TGA Q5000