



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

FLUORESCENCE PŮDNÍCH A LIGNITICKÝCH HUMINOVÝCH LÁTEK

FLUORESCENCE OF SOIL AND LIGNITE HUMIC SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. SOŇA KONEČNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. NADĚŽDA FASUROVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0309/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Bc. Soňa Konečná**
Studijní program: Spotřební chemie (N2806)
Studijní obor: Spotřební chemie (2806T002)
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Fluorescence půdních a lignitických huminových látek

Zadání diplomové práce:

Vyhodnocení synchronních fluorescenčních spekter různých půdních a lignitických huminových látek. Nalezení hlavních fluoroforních píků. Porovnání fluorescence vybraných vzorků a standardů v závislosti na jejich složení.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Soňa Konečná
Student(ka)

Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Záměrem této práce bylo nalezení hlavních fluoroforů půdních a lignitických huminových látek pomocí metody 2D synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS) a 3D SFS. Tyto metody jsou často využívány k charakterizaci multifluoroforního systému. Měřená synchronní spektra byla srovnána se standardy IHSS. Dále bylo úkolem najít případné rozdíly mezi vybranými vzorky huminových a fulvokyselin.

ABSTRACT

The purpose of the diploma thesis was to determine main fluorophores of soil and lignite humic substances using methods of 2D synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) and 3D SFS. These fluorescence methods are frequently used for characterization of multifluorophore systems. Measured synchronous spectra were compared with standards IHSS. Next to that the aim was to find differences between chosen samples of humic and fulvic acids.

KLÍČOVÁ SLOVA

půdní huminové látky, lignitické huminové látky, synchronní fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

soil humic substances, lignite humic substances, synchronous fluorescence spectra

KONEČNÁ, S. *Fluorescence půdních a lignitických huminových látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 71 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Naděžda Fasurová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Soňa Konečná

Děkuji své vedoucí diplomové práce Mgr. Naděždě Fasurové, Ph.D. za věnovaný čas, poskytnutí cenných rad, připomínek a literatury. Děkuji své rodině za podporu a děkuji i všem ostatním, kteří mi věnovali svůj čas.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Huminové látky a půdní organická hmota.....	8
2.2	Vliv matrice huminových látek na jejich vlastnosti.....	11
2.3	Vznik huminových látek.....	12
2.3.1	Prekurzory huminových látek.....	13
2.4	Luminiscenční spektrometrie.....	16
2.4.1	Fluorescence.....	16
2.4.2	Synchronní fluorescenční spektroskopie.....	16
2.4.2.1	<i>Ovlivnění fluorescence huminových látek.....</i>	<i>19</i>
2.5	Literární rešerše.....	22
3	Experimentální část.....	26
3.1	Příprava vzorků.....	26
3.1.1	Extrakce huminových kyselin.....	28
3.1.1.1	<i>Extrakce huminových kyselin z lignitu.....</i>	<i>28</i>
3.1.1.2	<i>Extrakce a izolace huminových kyselin z půd.....</i>	<i>28</i>
3.1.1.3	<i>Izolace půdní fulvokyseliny.....</i>	<i>29</i>
3.1.1.4	<i>Izolace humátů.....</i>	<i>29</i>
3.1.2	Použité chemikálie.....	29
3.1.3	Použité vzorky huminových látek.....	29
3.1.3.1	<i>Charakterizace měřených typů půd.....</i>	<i>30</i>
3.1.4	Použité přístroje a metody.....	31
3.2	Fluorescenční spektroskopie.....	32
3.2.1	Instrumentace.....	32
3.2.2	Pracovní postup.....	32
3.2.2.1	<i>Měření vzorků.....</i>	<i>32</i>
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Vliv koncentrace a pH vzorků huminových látek na fluorescenci.....	33
4.1.1	Srovnání humátů 22/11 a 04/06 o různé koncentraci.....	33
4.1.1.1	<i>Závěr:.....</i>	<i>34</i>
4.1.2	Vliv koncentrace na RFI vzorku lignitické huminové kyseliny (HAN) a její porovnání s lignitickými humáty 22/11 a 04/06.....	35
4.1.2.1	<i>Závěr:.....</i>	<i>37</i>
4.1.3	Vliv pH humátu 22/11 na relativní intenzitu fluorescence (RFI).....	38
4.1.3.1	<i>Závěr:.....</i>	<i>40</i>
4.2	Studium fluorescence půdních a lignitických huminových látek.....	41
4.2.1	Porovnání fluorescence výluhů různých typů půdních huminových látek se standardem HA Elliot.....	41
4.2.1.1	<i>Závěr:.....</i>	<i>42</i>
4.2.2	Porovnání fluorescenčního chování půdní HA typu Černozem a lignitické HA.....	43
4.2.2.1	<i>Závěr:.....</i>	<i>44</i>

4.2.3	Charakterizace huminových kyselin izolovaných z různých typů černozemí	44
	4.2.3.1 Závěr:	47
4.2.4	Porovnání synchronních spekter HA, FA a výluhu Kambizem Vatín a standardu Elliot FA a HA	47
	4.2.4.1 Závěr:	48
4.3	Charakterizace hlavních fluoroforních skupin metodou 3D SFS	49
4.3.1	Měření lignitického humátu 04/06 synchronní 3D metodou	49
	4.3.1.1 Závěr:	51
4.3.2	Měření standardu Elliotu FA II synchronní 3D metodou	52
	4.3.2.1 Závěr:	54
4.3.3	Charakterizace hlavních fluoroforů směsi HA Černozem a kompostu	55
	4.3.3.1 Závěr:	58
4.3.4	Měření HA Kambizemě Vatín synchronní 3D metodou	60
5	Závěr	63
6	Seznam symbolů	65
7	Seznam použitých zdrojů	66

1 ÚVOD

Huminové látky (HS) jsou nejvíce distribuované organické sloučeniny na zemském povrchu, které vznikají rozkladem rostlin a živočišných těl. Jsou přítomny v půdách, vodách a sedimentech, kde mají důležitou roli v podpoře růstu rostlin, stabilizace půdní struktury a ochraně před enviromentálními kontaminanty. Nicméně zde stále zůstává otázka o jejich základní chemické struktuře a konformačních vlastnostech. Jsou popsány jako supramolekulární asociáty malých a heterogenních molekul, které sami vytvářejí svou strukturu pomocí slabých vazeb, jako jsou Van der Waalsova, π - π a CH- π vazby a vodíková vazba¹.

Huminové látky (HS) jsou na základě své rozpustnosti děleny na huminové kyseliny rozpustné v alkalických roztocích, fulvokyseliny rozpustné jak v zásadách tak i v kyselém prostředí a nerozpustný humin. Fulvokyseliny jsou především hlavní složkou rozpuštěné organické hmoty v přírodních vodách, zatímco HA a humin se vyskytují především v půdách a sedimentech jako část pevné fáze².

Nejvíce zkoumanou huminovou látkou jsou huminové kyseliny (HA) jejichž rozmanitá struktura a obsah velmi různorodých funkčních skupin jednak činí tyto látky velmi vděčným studijním materiálem pro celou řadu vědeckých pracovišť, především pak zapříčiňuje celou řadu velice zajímavých vlastností huminových kyselin. Jedná se především o vlastnosti spektrální, koloidní, elektrochemické, iontově výměnné a sorpční. Huminové kyseliny mají schopnost sorbovat těžké kovy vytvářením komplexů s funkčními skupinami (-COOH; -C=O; -OH) vázanými na povrchu huminových kyselin. Jejich využití v širokém oborovém spektru (doplňky stravy zvířat, půdní kondicionery, organická hnojiva, remediátory kontaminovaných půd) je předmětem dalšího výzkumu a vývoje³.

Aby mohli být výsledky týkající se výzkumu huminových látek z jednotlivých výzkumných laboratoří správně interpretovány byla založena společnost IHSS (International Humic Substances Society), která se zaměřila na přípravu standardů huminových a fulvokyselin z lignitu, sladké vody, minerálních a organických solí a na sbírání charakteristických dat. Také normovali postupy odběru a přípravy vzorků HS.

Huminové látky pocházející z různých zdrojů se od sebe výrazně odlišují a proto je výzkum zaměřen na vysvětlení těchto odlišností. Jsou velké rozdíly mezi půdními, vodními nebo lignitickými vzorky. Povaha látek je totiž ovlivněna např. lokalitou nálezu, okolním pH, stářím, zpracováním vzorku a dalšími faktory⁴.

K charakterizaci HS se používá často fluorescenční spektroskopie, která zahrnuje více metodik měření. Například měření excitace, emise či synchronní měření při konstantním rozdílu mezi monochromátory, excitačně emisní matice (EEM). V této práci byla použita synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS), kdy je snímána závislost relativní intenzity fluorescence na emisní vlnové délce a 3D SFS, kdy je snímána závislost relativní intenzity fluorescence na emisí a konstantním rozdílu $\Delta\lambda$ ^{5,6,7}. Charakterizovány pomocí těchto dvou metod byly především půdní a dále i lignitické huminové látky.

Fluorescence FA je především zapříčiněna emisí relativně jednoduchých fenolických látek, zatímco fluorescence HA je způsobena konjugovanými fenoly, chinony a dalšími aromatickými látkami^{8,9}.

Fluorescence huminových látek je obecně závislá např. na původu zdroje, molekulové hmotnosti, koncentraci, pH, iontové síle, teplotě a s ní spojené viskozitě, redoxním potenciálu prostředí a interakcích mezi kovovými ionty a organickými látkami¹⁰.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky a půdní organická hmota

Podle Stevenson (1994) se přírodní organická hmota skládá hlavně z makroorganického materiálu ležícího na povrchu půd (tzv. lehké frakce, zbytky rostlin v půdě) dále z půdní biomasy. Tato část je tvořena převážně mikroorganismy žijícími v půdě v jejichž zaživacích traktech jsou rostlinné zbytky dokonale smíchány s minerálním podílem. Poslední složkou organické hmoty je stabilní humus¹¹. Z chemického hlediska je humus soubor tmavě zbarvených organických dusíkatých polyfunkčních látek kyselinové povahy, převážně koloidního charakteru, vysoké molekulové hmotnosti, relativně odolných vůči mikrobiálnímu rozkladu.

Humus zahrnuje půdní organickou hmotu, která se skládá jak z huminových tak z nehuminových látek jejichž složení není dosud jasně určeno. Humus obsahuje známé látky typu aminokyselin, sacharidů, nukleových kyselin, které prošly humifikačními pochody. Při jeho klasifikaci lze vzít v úvahu stupeň disperze, půdní reakci a sorpční kapacitu, vztah k minerálnímu podílu aj¹².

Huminové látky (HS) jsou stabilní, tmavě zbarvené, heterogenní organické sloučeniny, které patří k nejrozšířenějšímu organickému materiálu na planetě. Tento soubor organického „zbytku“ přispívá k životním funkcím půdy, takovým jako je sekvestrace, mobilita a oxidační nebo redukční přeměna molekul organických xenobiotik a stopových kovů¹³.

Výsledné produkty humifikace lze označit jako huminové látky, mezi něž patří fulvokyseliny, huminové kyseliny, hmatomelanové kyseliny a huminy. Všechny huminové látky mají aromatické jádro s rozdílnými periferními součástmi (peptidy, aminokyseliny, cukry aj.). Aromatická jádra mají lyofobní charakter, periferní složky jsou lyofilní (hydratované). Poměr těchto složek určuje výslednou lyofilnost, reaktivitu, kyselinový charakter a sorpční kapacitu humusu¹⁴.

Ve studii Engebretson byl pozorován vliv UV fotolýzy roztoku huminových látek a jejich molekulárních fragmentů. Bylo zjištěno, že po ozáření došlo ke změně v distribuci molekulárních hmotností a tak se předpokládalo, že došlo k rozštěpení řetězce HS. U molekulárních fragmentů huminových látek došlo k oslabení detergentních vlastností, což snížilo tendenci spojovat se s malými hydrofobními částmi, které nebyly schopné tvořit strukturované pseudomicelární domény, které mohou být odděleny nepolárními částmi¹⁵.

Tombácz a kol zaznamenal pomocí NMR spektroskopie, že HA frakce mají velký obsah uhlovodíků a mají poměrně vysokou hodnotu kritické micelární koncentrace. Předpokládali, že koloidní vlastnosti huminových asociátů jsou ovlivněny přítomností alkylových biomolekul jako jsou mastné kyseliny¹⁶.

Pro studium huminových látek (HS) je důležité, jestli jsou HS zkoumány přímo v půdě nebo jsou vyizolované z půd, protože HS v půdě se vyznačují větší závislostí na iontové síle než izolované HA. Nicméně podstatnější rozdíl je v tom, že HS v půdě mají větší tlumivou kapacitu než izolované HA při vysokém pH. Domnívali se, že za to může vyšší obsah fenolických skupin a humin přítomný v půdách¹⁷.

Humusové (huminové) složky lze izolovat pomocí řady extrakčních činidel s různým výtěžkem. Složení humusu je ovlivněno nejen podmínkami vzniku, ale i způsobem extrakce, dalšího čištění, případné frakcionace. Nejčastěji se používá k izolaci alkalická extrakce směsí (NaOH, Na₂P₂O₇) kdy se oddělí jednotlivé složky podle své rozpustnosti (huminové kyseliny, se vysráží z roztoku), fulvokyseliny přecházejí do extraktu a huminy jsou

neextrahovatelný zbytek. Okyselením alkalického extraktu na pH 1–2 zůstávají v roztoku fulvokyseliny (FA), huminové (HA) a hymatomelanové kyseliny se vysrážejí. Při extrakci sraženiny alkoholem přecházejí do alkoholového extraktu hymatomelanové kyseliny, huminové kyseliny zůstanou vysráženy^{14,18}.

V literatuře se huminové látky rozdělují dále podle své molekulové hmotnosti a podle aromaticity. Podle Praxe a kol. (Půdoznalství MZLU) je rozdíl mezi jednotlivými složkami HS tento:

Fulvokyseliny, které mají nejnižší molekulovou hmotnost (do 1 kDa) a nejsvětlejší barvu (světle žlutá), obsah C do 50 %, jsou poměrně lehce rozložitelné a zároveň se poměrně rychle obnovují v procesu mineralizace a humifikace. Z důvodu rychlé mineralizace je obsah fulvokyselin (FA) nižší v půdách s vysokou biologickou aktivitou. Jejich sorpční kapacita je asi 3000 mmol kg⁻¹.

Huminové kyseliny mají ve srovnání s fulvokyselinami tmavší zbarvení (hnědé až černé) a vyšší molekulové hmotnosti, obsah C je od 52 do 65 %. Vykazují střední až vyšší odolnost vůči rozkladu a vysokou sorpční schopnost – kolem 4000 mmol kg⁻¹. V půdách se vyskytují i ve formě solí s různými kationty. Tyto soli se označují jako humáty. Za součást těchto kyselin se považují i hymatomelanové kyseliny, které mají žluté až žlutohnědé zbarvení a nižší molekulovou hmotnost než vlastní huminové kyseliny (od několika 100 do několika 1000 Da)¹². Podle současných poznatků je struktura huminových kyselin tvořena aromatickými a hydroaromatickými di-, tri- až tetrakyselinami, které mohou být spojeny aminokyselinami, aminosacharidy, peptidy nebo alifatickými sloučeninami. Polyaniontový charakter HA je dán přítomností karboxylových a hydroxylových skupin umístěných na aromatických jádrech a způsobí, že mohou vázat ionty různými mechanismy¹⁹.

Humin má nejvyšší molekulovou hmotnost a má tmavou barvu, nejodolnější vůči mikrobiálnímu rozkladu, má rovněž koloidní vlastnosti. Někdy se do této kategorie zařazuje nejstarší složka organické půdní hmoty – **humusové uhlí**, které se již neúčastní půdotvorných procesů¹².

Humáty jsou soli huminových kyselin rozpustné ve vodě nebo v pufrech v celé škále pH.

HS jsou podle Piccola a kol. supramolekulární asociace, v níž mnoho relativně malých a chemicky odlišných organických molekul vytváří klastry spojené vodíkovými můstky a hydrofobními interakcemi. Podle této teorie vytváří HS micelární struktury s hydrofilní vnější částí a hydrofobní vnitřní částí seskupení^{20,21}.

Tato teorie zahrnuje všechny molekuly, které jsou asociovány s huminovou frakcí, zahrnující jiné biomolekuly, které jsou vázány kovalentně a proto nemohou být separovány od huminové frakce aniž by nedošlo k významným změnám chemických vlastností frakce HS. Přítomnost nehuminových látek neboli biomolekulárních fragmentů v HS se prokázalo gelovou chromatografií. Biomolekulární fragmenty hrají důležitou roli v supramolekulární asociaci huminových látek (HS) a jsou primárně odvozeny z lipidů, ligninů, neligninových aromatických druhů, sacharidů a proteinů¹³.

Supramolekulární asociace HA ve vodném roztoku byla studovaná gelovou chromatografií (HPSEC), rozptylem světla, ultrafiltrací, konduktometrií a spektrofotometrií²².

Piccolo a jeho kolegové poskytli důkaz, použitím GPC a HPSEC, že velikost huminových fragmentů se velmi mění přidáním jednoduché organické kyseliny v porovnání s přidavkem HCl. UV–VIS spektra HS v přítomnosti organických kyselin ukázala hypochromismus (pokles absorpance kvůli vzrůstu vzdálenosti mezi absorbujícími chromofory). V této práci spíše předpokládají, že ke změnám relativní molekulové hmotnosti huminového materiálu dochází spíše disagregací nebo agregací klastrů malých molekul. Předpokládali, že organická kyselina proniká do hydrofobních míst asociátů HS a separuje je na menší asociáty vázané H–můstky^{20,23}.

Ukazuje se, že HA jsou nerozpustné v kyselé oblasti, protože agregační fenomén probíhá právě při nízkém pH. Hydrodynamická velikost HA silně závisí na stupni neutralizace negativního povrchového náboje a proto se velikost HA mění s hodnotou pH, iontovou silou a stupněm komplexace.

Podle Maurice a kol. se HS chovají jako flexibilní lineární koloidy při nízké koncentraci HS a vysoké hodnotě pH²³.

Ve studii Halim a kol. bylo sledováno jaký má agregace a disagregace vliv na fluorescenci huminových vzorků. Bylo zjištěno, že aktivita fluoroforu se zvyšuje s klesající molekulovou hmotností frakce, kde menší velikosti frakcí vznikly působením kyseliny octové²⁴.

2.2 Vliv matrice huminových látek na jejich vlastnosti

HA extrahované z lignitu mají některé charakteristiky srovnatelné s HA z půd a rašelin, včetně přítomnosti polyfenolických jader, fenolových, hydroxylových a karboxylových skupin disociačně závislých na pH.

Bylo pozorováno, že HA izolované z lignitu mají vyšší hydrofobicitu než HA z kompostu. Dále půdní huminové látky jsou svým charakterem aromatictější a hydrofobnější než HS pocházející z mořského prostředí. HA rozdílného původu se liší ve svých chemických vlastnostech, což ve výsledku ovlivňuje stabilitu huminových komplexů s kovy a stejně tak mechanismy transportu kovů.

Lignitické huminové kyseliny například Leonardite HA (LHA) na rozdíl od půdních huminových kyselin (SHA) jsou vysoce kondenzované a mají méně postraních řetězců a funkčních skupin. Elementárním složením se také LHA liší od lesních a zemědělských půdních HA. Největší pozorovatelný rozdíl mezi SHA a LHA je v poklesu obsahu O a N, což souvisí s vyšším stupněm zralosti LHA a současně s nárůstem obsahu S, P a popelu směrem od SHA k LHA. Vysoké hodnoty H/C v LHA poukazují na nižší stupeň zralosti. Původ HA ovlivňuje zřejmě jejich poměr C/N, jehož nižší hodnoty obvykle poukazují na přítomnost nerozložené organické hmoty. Atomový poměr C/N je pro LHA významně vyšší než v případě SHA a indikuje relativně vyšší stupeň prouhelnění²⁵.

Výtěžnost huminových látek z lignitu se pohybuje okolo 20 až 40 % (cit.²⁶) a z půd 0,5 až několik procent.

Současná praxe v charakterizaci HS je založena na chemických parametrech popisujících kvalitu organického uhlíku, parametrech humifikace a souvislosti mezi jednotlivými atomovými poměry prvků C, H, N, O. Ke studiu strukturálních změn při humifikaci a obsahu organického uhlíku lze použít různé analytické techniky. Kvantitativní distribuce atomů vodíku získané s použitím NMR techniky může doplňovat informace o strukturních jednotkách. Diferenciální termická analýza byla navržena jako metoda k porovnání vzorků uhlí a HS izolovaných z různých prostředí, z hlediska obsahu organického uhlíku, vlhkosti a popelu²⁵.

Pro kvalitu půdy je důležité složení humusu. Složení ovlivňuje řada faktorů, zejména o jaký půdní typ se jedná a dále zaleží na způsobu hospodaření, tzn. jestli je půda lesní, pod travnatým porostem nebo zemědělská orná půda. Dále je důležité je-li daná půda osazená plodinami, ošetřuje-li se přípravky atd. Důležitá hodnota která se sleduje u půdních charakteristik je obsah oxidovatelného uhlíku (C_{ox}), protože se v určitých případech může tato hodnota výrazně změnit. Obvykle se provádí sledování změn v obsahu C_{ox} během dlouhodobějších experimentů nebo v případě změny hospodaření. Dále se studuje skupinové a frakční složení humusu apod.

2.3 Vznik huminových látek

Huminové látky vznikají, jak již bylo zmíněno humifikačním procesem, který je převážně procesem anaerobním. Je to soubor pochodů mikrobiologických, převážně enzymatických a biochemických, při nichž se z meziproduktů rozkladu organické hmoty tvoří nové látky, označované souborně jako látky huminové¹².

Humifikace organické hmoty probíhá souběžně s mineralizací a jejím výstupem jsou různé formy humusu, v konečné fázi huminové látky. V interakci s minerálním podílem půdy tyto látky významně ovlivňují veškeré okolní vlastnosti prostředí. HS se podílejí na půdní struktuře, udržují půdní reakci v rozmezí příznivém pro rostliny, ovlivňují teplotní podmínky v půdě a chrání rostliny před působením některých toxických látek. Podílejí se na biologické činnosti půdy včetně uvolňování minerálních prvků do prostředí. Ve vazbě na jílové minerály vytvářejí huminové látky huminóvilový sorpční komplex, který funguje jako zásobárna živin pro rostliny²⁷

Podle nové koncepce probíhá humifikace v půdě jako dvoukrokový proces: (1) biodegradace mrtvých buněčných komponent, (2) agregace degradačních produktů.

S ohledem na supramolekulovou teorii není pravděpodobná tvorba nových kovaletních vazeb.

Humifikace je postupná agregace hlavně hydrofobních molekul, které odolávají biodegradaci. Tyto super-struktury jsou termodynamicky separovány skrze hydrofobní efekt a sorbovány na povrchu půdních minerálních částic a případně k dalším huminovým agregátům. Nepřítomnost vody znamená snížení biodegradability a je příčinou vysoké stability huminových látek²⁸.

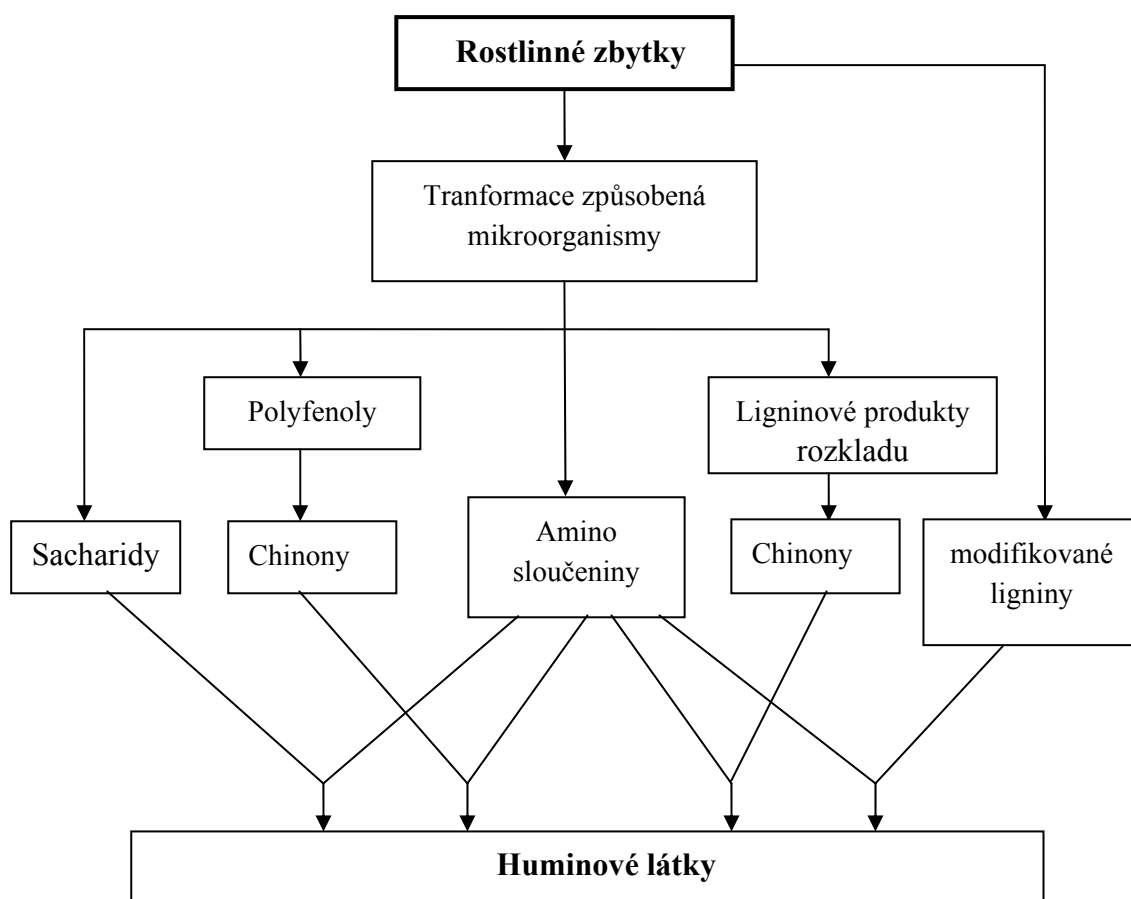
Při tvorbě humusu, ale může také dojít k dvěma extrémním procesům a tím je mineralizace a rašelinění.

Mineralizace je úplný rozklad organické hmoty, vede k přeměně organické hmoty až na jednoduché složky (CO_2 , H_2O , NH_3 , oxidy různých prvků atd.). Probíhá za vyšších teplot a nižšího obsahu vody v půdách lehčího charakteru, silně provzdušněných. Za těchto podmínek se silně rozvíjí činnost aerobních bakterií, které rozkládají organickou hmotu na výše uvedené složky. Humus se v těchto podmínkách netvoří pokud jsou dočasné podmínky pro jeho tvorbu, je rychle spalován.

Rašelinění probíhá za výrazně omezeného přístupu vzduchu, případně za výhradně anaerobních podmínek, při nedostatečné oxidaci. Při tomto procesu se uplatňuje nedostatek asimilovatelných živin, kyselá reakce prostředí, nízká teplota, vysoká vlhkost. Rašelinění a uhelnatění org. hmoty je procesem převážně enzymatickým a biochemickým. Uplatňují se anaerobní bakterie. Výsledkem jsou huminové a ulminové látky tmavohnědých až černých barev s vysokým obsahem uhlíku. dochází k nedokonalému rozkladu organických zbytků. Za extrémních podmínek dochází až ke karbonizaci, při níž vzniká tzv. humusové uhlí¹².

2.3.1 Prekurzory huminových látek

V současnosti je řada teorií vzniku huminových látek jako kondenzace sacharido-aminová, ligninová teorie, polyfenolová teorie. Polyfenoly pochází většinou z biodegradace ligninu, a hrají pravděpodobně klíčovou roli při procesu vzniku. Polyfenoly jsou tedy pokládány za hlavní činidlo při tvorbě huminových látek z rostlin, které neobsahují moc ligninu nebo z neligninových rostlin. Polyfenoly tedy mohou být považovány za prekurzory HA. Mají sami o sobě dost reaktivních míst, které dovolují další transformaci například kondenzační reakce. HA jsou tvořeny asociací různých přítomných komponent v humifikačním procesu, jako jsou aminokyseliny, ligniny, pektiny nebo sacharidy, které jsou spojeny donor-akceptorně, iontově, hydrofilně a hydrofobně²². Tvorba huminových látek se může mírně lišit, závisí to na okolnostech geografických, klimatických, fyzikálních a biologických. Navržený mechanismus vzniku huminových látek je shrnut na následujícím obrázku (Obr. 1), kde čtvrtá cesta je ligninová teorie. Podle Piccola patří lignin k alifatickým biopolymerům je považován za hlavní teorii vzniku, avšak jeho role při vzniku huminových látek v půdách byla přeceněna, protože na vzniku huminových látek se podílí i další rostlinné materiály než lignin²⁹.



Obr. 1 Cesta tvorby huminových látek podle Stevenson.

Předpokládá se, že kerogen je odvozen z biologicky syntetizované organické hmoty přes sérii převážně mikrobiálně řízených reakcí, společně označované jako diagenese. Za stavební kameny kerogenu jsou považovány nerozpustné materiály z fototrofních mikroorganismů. Syntéza huminových kyselin v terestriálním prostředí může být výsledkem kondenzačních a polymerizačních reakcí cukrů s aminokyselinami nebo proteiny. Předpokládá se, že Maillardova reakce je schůdným mechanismem pro vznik HA ve vodním ekosystému z fytoplanktonu (prekurzor aminokyselin a cukrů). Reakce je iniciována vznikem Schiffovy báze mezi karbonylem cukru a dusíkem aminokyselin nebo amoniaku. Výsledný N-substituovaný derivát následně podléhá dehydrataci, přesmyku a kondenzačním reakcím až k samotnému vzniku produktů od jednoduchých až k strukturálně složitým dusíkatým polymerům, které jsou hnědě zbarvené (hnědnoucí reakce)²⁹.

Podle Hedge je v terestriálním prostředí prekurzorem HS melanoidin jehož vznik by mohl zahrnovat kondenzační a polymerizační reakce malých reaktivních, organických molekul, které mohou být generovány kompletním mikrobiálním rozkladem vazeb mezi strukturálními jednotkami všech žijících organismů. Nicméně, mikrobiální degradace a rychlá přeměna těchto biomakromolekul může zabránit kondenzacím a tvorbě dusíkatých polymerů. Na základě ¹³C NMR spekter bylo zjištěno, že melanoidiny jsou velmi podobné huminovým kyselinám a z tohoto důvodu navržená Maillardova reakce hraje významnou roli při tvorbě struktury huminových látek. Vznik melanoidinů z polysacharidů při kyselém pH je stejně důležitý jako kyselá hydrolyza probíhající v purifikačním procesu²⁹.

V literatuře jsou za hlavní sloučeniny a biomakromolekuly v HS považovány tyto látky: alifatické uhlovodíky (alkany, alkanoly), alifatické kyseliny (mastné a dikarboxylové kyseliny), alkylaromáty (alkyl-fenoly, naftaleny, benzeny), aromatické uhlovodíky, aromatické kyseliny (benzenkarboxylové a fenolové kyseliny), další uhlovodíky jako tokoferoly, chlorofyly, terpenoidy, steroidy a biomakromolekuly k nimž patří polysacharidy, proteiny, ligniny a alifatické makromolekuly. Možným zdrojem těchto látek jsou bakterie a houby, fototrofní mikroorganismy (sinice a řasy), rostliny a zvířata²⁹.

Bakterie a houby

Tyto mikroorganismy syntetizují rozmanité materiály k nimž patří polysacharidy, nukleové kyseliny, karotenoidy, lipidy a atd.. Většina z nich je metabolizována při smrti a autolýze organismů a vstupují do uhlíkového cyklu. Zatímco některé biomakromolekuly jsou degradovatelné relativně rychle, některé odolné materiály unikají degradaci a dochází k jejich akumulaci v prostředí. Nejvíce odolný je melanin. Melaniny jsou zaznamenány jako třída pigmentů rozšířených v živočišné i rostlinné říši.

Fototrofní mikroorganismy

Fototrofní mikroorganismy (sinice a řasy) syntetizují extracelulární organické produkty podobné polysacharidům a vytvářejí spolu tzv. mikrobiální film. Syntetizované extracelulární polysacharidy tvoří 50–90% biofilmu a tyto biofilmy slouží k udržení buněk a k nevratnému navázání k povrchům. Mikrobiální filmy navíc obsahují význačné množství adsorbovaných

anorganických materiálů z půd (křemen, vápník, uhličitany, jíly) a zbytky (mrtvé buňky, mikrobiální vedlejší produkty). Tyto biofilmy podporují růst dalších heterotrofních organismů jako jsou bakterie nebo houby. Odolné materiály po rozkladu řas a sinic jsou považovány za stavební prvky kerogenu a huminu v sedimentech.

Rostliny

Vznik humusu je výsledkem rozkladu rostlinných materiálů mikroorganismy a následné resyntézy mikrobiálních komponent a akumulace selektivně uchovaných materiálů, které jsou odolné proti rozkladu (například lignin). Vznik humusu z rostlin závisí na typu vegetace a dále na klimatických podmínkách a případné erozi půd²⁹.

Tvorba organického dusíku v půdách

Dusík (N) je klíčovým prvkem při kontrolování funkčnosti dynamiky a rozmanitosti terestriálního ekosystému. Organický N se v terestriálním ekosystému půd vyskytuje v první řadě v mrtvé organické hmotě a v huminových látkách z 96 % celkového množství. Biochemický N z rostlinných a živočišných zbytků podstupuje sled transformací zprostředkovaných mikrobiálním a abiotickým procesem, které má za následek stabilizaci nemineralizované N frakce v půdách. Během tohoto stabilizačního procesu je biochemický N značně strukturně pozměněn a tvoří huminové látky. Dusík je součástí proteinů, polypeptidů a aminopolymerů. Bakteriální biomasa obsahuje 50 až 60 % dusíkatých sloučenin. Dále se N do půdy dostane rizodepozicí z kořene rostlin. V živém organismu je nejvíce organického dusíku tvořeno proteinem, který se skládá z aminokyselin. Amidový N je dominantní při tvorbě huminových látek.

O tvorbě organického N v HS je stále vedena diskuze. Stevenson a Cole pomocí chemolytických technik a analytické pyrolýzy předpokládali, že v HS je okolo 40 % N v proteinových materiálech (protein, peptidy, aminokyseliny), 5–6 % v aminosacharidech, 35 % heterocyklického N a 19 % $\text{NH}_3\text{-N}$.

V práci Nanapieri bylo zjištěno pomocí hydrolýzy, že HS obsahují 20–30 % nerozpustných dusíkatých kyselin, 20–35 % amoniakálního N ($\text{NH}_3\text{-N}$), 30–45 % aminokyselin, 5–10 % aminosacharidů a 10–20 % hydrolyzovaného neznámého N. Vysoký obsah amidových skupin v humifikovaných materiálech může být vysvětlen ochranou proteizovaných materiálů během humifikace cestou adsorpce na minerální fázi³⁰.

2.4 Luminiscenční spektrometrie

Luminiscence je emise světla látkou. Emise může nastat při návratu elektronu na základní stav z excitovaného singletového stavu. Do okruhu luminiscenční spektrometrie jsou zařazeny tři příbuzné spektrální techniky:

- molekulová fluorescenční spektrometrie
- molekulová fosforescenční spektrometrie
- chemiluminiscenční spektrometrie

2.4.1 Fluorescence

Elektronové stavy většiny organických molekul mohou být rozděleny na singletové a tripletové.

- **Singletový stav:** Elektrony v molekule tvoří páry, ve kterých mají opačný spin
- **Tripletový stav:** Jedna dvojice elektronů má stejný spin

Fluorescence je absorpce ultrafialového záření, které vede k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav.

Molekula na vysoké vibrační hladině ztrácí při kolizích s okolními molekulami rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu (tzv. vibrační relaxace molekuly). Fluorescence se projeví, nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie emisí fotonu. Hovoříme o zářivém přechodu na základní hladinu. Při nezářivém přechodu nastává intramolekulární konverze energie molekuly – elektron se vrátí na základní hladinu a odevzdanou energií rozvibruje molekulu. Ta pak přechází na základní vibrační hladinu přes řadu vibračních stavů vibrační relaxací³¹.

Platí zde několik důležitých zákonů:

- Stokesův zákon: Vlnová délka emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla.
- Vavilovův zákon: Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z něho vyplývá obecná vlastnost fluorescence: Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace jen v případě čistých látek..
- Kashovo pravidlo: Před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 (cit.³²).

2.4.2 Synchronní fluorescenční spektroskopie

Přístroj na měření fluorescence se nazývá spektrofluorimetr pomocí něhož jsou snímána excitační a emisní spektra. V této diplomové práci byla měřena synchronní fluorescenční spektra (SFS). Synchronní metoda je založena na současném běhu obou monochromátorů, přičemž je nastaven konstantní rozdíl vlnových délek mezi excitačním a emisním monochromátorem. V případě synchronního spektra můžeme pozorovat všechny excitace a odpovídající emise u směsi látek, podle volby nastavení $\Delta\lambda$. Spektra obsahují více ostřejších

píků a získáme tak kompletnější spektrum vzorku. U synchronního spektra je výhodou, že nedochází k překrývání jednotlivých emisí složek oproti běžnému emisnímu měření fluorescence a dochází k většímu rozlišení spektrálních píků. Lépe se tedy vyhodnocují. Snímáním synchronního fluorescenčního spektra zaznamenáváme závislost relativní intenzity fluorescence (RFI) na vlnové délce (nm), v našem případě emisní vlnové délce. V literatuře je tato metoda označena dvojím způsobem a to jako Synchronous fluorescence spectroscopy, již zmiňována a nebo Synchronous excitation spectroscopy (zaznamenává se závislost rel. intenzity na excitační vlnové délce). Fluorescence huminových a fulvokyselin může být metodou SFS s výhodou porovnávána^{33,32,9}.

Tento dvou-dimensionální synchronní fluorescenční sken může být ještě rozšířen o **třídimensionální synchronní fluorescenční sken (3D SFS)**, který poskytuje celkovou synchronní fluorescenční charakteristiku multifluoroforních vzorků. V tomto spektru je vynesena relativní fluorescenční intenzita v závislosti na funkci emisní vlnové délky a rozdílu mezi excitační a emisní vlnovou délkou ($\Delta\lambda$), nebo v závislosti na excitační vlnové délce v případě synchronní excitační spektroskopie. Při měření je interval $\Delta\lambda$ stále posouván, aby bylo možné charakterizovat všechny hlavní fluorofory daného vzorku. Studium HS pomocí této metody bylo použito v řadě prací^{7,34,35}.

Fluorescenční jevy vždy zahrnují elektronový přechod z nejnižší vibrační hladiny nejnižšího singletového excitovaného stavu na singletový základní stav. Je to neseperativní a nedestruktivní technika, která závisí na citlivosti jež limituje přípravu vzorků a možnost výběru $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$, která dovoluje základní spektrální separaci překrývajících se fluorescenčního signálu na individuální části. Intenzita fluorescence je funkcí λ_{em} a λ_{exc} . To je vyjádřeno následující rovnicí, kde I_S je synchronní fluorescenční intenzita, c je koncentrace fluorescenčních sloučenin, d je hustota vzorku, $E_M(\Delta\lambda_{em})$ a $E_X(\lambda_{exc}) = (\lambda_{em} - \Delta\lambda)$ jsou distribuce intenzit pro každý typ vlnové délky³⁶.

$$I_S = KcdE_X(\lambda_{em} - \Delta\lambda)E_M(\lambda_{em}) \quad (1)$$

Optimální podmínky, které poskytuje nejvíce intenzivní synchronní signál je tedy dosažen, výběrem odpovídající intervalu $\Delta\lambda$ mezi excitačním a emisním pásem. Interference multisložkových sloučenin vyplývá ze spektrálních superpozic, které budou značně redukovány. Výběr $\Delta\lambda$ ovlivňuje spektrální rozsah synchronního signálu, který může být stlačen nebo rozšířen právě snížením nebo zvýšením experimentálního parametru $\Delta\lambda$. Fluorescenční intenzita je úměrná počtu excitovaných stavů, které závisí na koncentraci absorbující látky v roztoku, podle základní rovnice, kde ϕ_f je kvantová účinnost, I_0 je intenzita záření, ε je molární absorptivita (absorpční koeficient) při excitační vlnové délce, c je molární koncentrace.

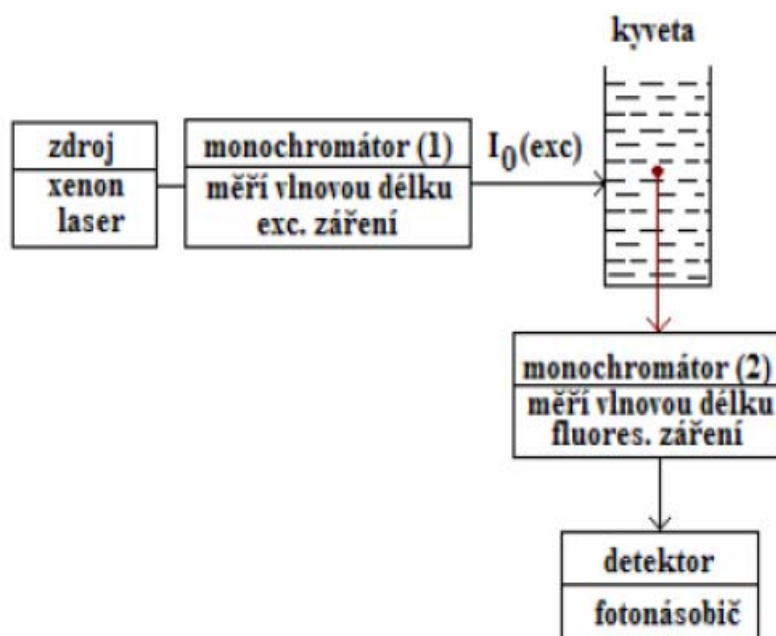
$$I_f = \phi_f I_0 [1 - \exp(-\varepsilon bc)] \quad (2)$$

Hodnota ε ovlivňuje fluorescenční intenzitu, když je molární absorptivita vyšší, tak se zvyšuje fluorescenční intenzita sloučenin. Pro velmi zředěné roztoky je součin εbc dostatečně malý, platí rovnice³⁷.

$$I_f = \phi_f I_0 \varepsilon bc \quad (3)$$

Princip spektrofluorimetru Bowman Aminco

Jako primární zdroj světla se používá vysokotlaká xenonová lampa pro měření ustálené fluorescence. Xenonová lampa jako zdroj má řadu výhod. Oproti často používané rtuťové výbojce má spojitě spektrum od ultrafialových vlnových délek po blízké infračervené vlnové délky a v oblasti viditelného světla se tato lampa velmi blíží přírodnímu dennímu světlu. Budící záření prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek (obvykle temperovaná kyveta s roztokem). Excitační monochromátor vybírá přesný rozsah vlnové délky excitovaného vzorku. Ve směru kolmém k budícímu paprsku se měří emitované fluorescenční záření, které nejprve prochází emisním monochromátorem a je detekováno pomocí fotonásobiče. Emisní monochromátor vybírá přesný rozsah vlnové délky detekující luminiscenční emisi. Měření na fluorimetru Aminco Bowman probíhalo v programu AB2, schéma tohoto přístroje je na Obr. 2. Uspořádání s jedním emisním monochromátorem je (uspořádání „L“). Měřený synchronní sken snímá excitační i emisní monochromátor při konstantním rozdílu vlnové délky³².



Obr. 2 Schéma přístroje Aminco Bowman

2.4.2.1 Ovlivnění fluorescence huminových látek.

Jedním z důležitých faktorů, který má vliv na fluorescenci HS je jejich struktura a prostředí viz dále a molekulová hmotnost (viz kapitola 2.1).

Organické molekuly, které fluoreskují s odůvodněnou účinností jsou molekuly s rozsáhlým π -systémem patří sem aromatické a nenasycené alifatické molekuly. Fluorescence se skoro vždy týká nejnižšího energetického elektronového přechodu. Jestliže molekuly neobsahují atomy s volnými elektronovými páry, jako je tomu například u kyslíku nebo dusíku, tak elektronový přechod s nejnižší energií poskytuje jeden z nevázebných n elektronových přechodů ($n \rightarrow \pi^*$). Elektronový přechod s nejnižší energií se týká přechodu elektronu přicházejícího z π -vázebného orbitalu do π^* -nevázebného orbitalu ($\pi \rightarrow \pi^*$ přechod). Výsledné fluorescenční chování primárně závisí na molekulové struktuře a jejich změnách. Například zvýšení extenze (rozsahu) π -elektronového systému a přítomnost funkčních skupin, má vliv na zvýšení fluorescence a snižování energetického rozdílu mezi základním stavem a prvním excitovaným stavem, tím se posune emisní vlnová délka směrem k vyšším hodnotám, zatímco přítomnost karbonylových a karboxylových substituentů rozsáhle redukuje relativní intenzitu fluorescence (R.F.I). Lineární kruhový systém fluoreskuje při nižší vlnové délce než systém, který lineární není. Heteroatom substituce důležitě ovlivňuje fluorescenci aromatických sloučenin. Substituovaný heteroatom na aromatickém jádře má velký vliv na fluorescenci. Substituenty, který jsou na aromatickém jádře elektronakceptorní tzn, že řídí substituci do polohy meta podstatně snižují fluorescenční intenzitu. Zatímco elektrodonorní skupiny, tj. substituenty, které řídí substituci do polohy ortho a para zvyšují účinnost RFI. Při adici substituentů karbonylových, hydroxidových, alkooxidových a amino skupin dochází k posunu fluorescence k vyšším vlnovým délkám^{9,37}.

Vyšší vlnová délka a nízká relativní intenzita fluorescenčních píků je charakteristická pro huminové kyseliny (HA) typu Paleosol (pravěké soli (HA)) dále kyseliny z půd, rašelin a HA Leonardite (lignitický standard HA). Předpokládá se, že to může být způsobeno přítomností lineárně kondenzovaných aromatických systémů s elektronakceptorními substituenty, jako jsou karboxylové nebo karbonylové skupiny a nebo další nenasycené řetězce.

Naopak nižší vlnové délky a vyšší naměřené RFI píků jsou charakteristické pro vzorky FA izolovaných z kompostu, půd a rašelin. Tyto píky odpovídají jednodušším strukturálním komponentám nízkého stupně aromatické polykondenzace. Přítomnost elektrondonorních substituentů jako jsou hydroxylové, metoxylové a aminoskupiny na FA způsobí snadnější přechod mezi singletovým a základním stavem.

Rozdělení HS podle fluorescenčního chování podle Senesi:

Fluorescenční spektra HS izolovaných z různých matric do pěti hlavních skupin.

1. třída: Praveké soli HS typu (Paleosol) jsou charakterizovány nejvyššími fluorescenčními délkami pro obě emisní maxima (> 520 nm). Hlavní excitační pík je pozorován v oblasti nad 465 nm a mají nejnižší relativní fluorescenční intenzity ($R.F.I. \leq 1$).

2. třída: Patří sem nejvíce huminových solí (HA Leonardite, HS z rašelin, typ Mollisol (půdní HA), HS soli z naplavenin, z jílu, některé Terra rossa HS aj.). Mají poměrně vyšší vlnové délky emisních maxim která jsou pozorována ve formě pásu v oblasti (500–520 nm). Tyto HS mají dva hlavní excitační píky (450 a 465 nm) s poměrně nízkými R.F.I. (2–8).

3. třída: Většina solí typu Terra rossa a některé soli z naplavenin jílu mají emisní maximum s nižší vlnovou délkou (460–500 nm) a větší R.F.I. (6–29) a jsou charakteristické jedním hlavním excitačním píkem okolo 450–440 nm.

4. třída: Pro soli z hub a kompostu jsou nejčastější nižší vlnové délky pro emisní maximum (440–470 nm) a jeden hlavní excitační pík v oblasti (385–395 nm). Intenzity pro FA jsou zde >10 ale pro HA nižší v oblasti (1–7).

5. třída: HA i FA izolované z odpadních vod či bláta jsou charakterizovány obecně nejnižšími vlnovými délkami pro emisní maximum (< 440 nm) a nízkou střední R.F.I. (4–13). Hlavní excitační pík má vlnovou délku srovnatelnou se 4.třídou (okolo 390 nm), ale má navíc typický menší pík okolo 340 nm (cit.⁹).

Vliv prostředí

K vlivům prostředí patří faktory jako teplota, rozpustnost, těžké atomy, vodíková vazba, přítomnost rozpuštěných látek, koncentrace, pH a kovové ionty mohou mít silný vliv na fluorescenci sloučenin buď ovlivněním poměru jednoho z více procesů vyplývajícího excitovaného stavu nebo při rozrušení jedné z mnoha energetických hladin zapojených do fluorescence.

Teplota ovlivňuje poměr zářivého a nezářivého rozpadu elektrochemicky excitovaných molekul v roztoku různými způsoby. Zvýšení teploty má primární efekt na zvýšení poměru srážek excitovaných stavů molekul, které zvyšují poměr vnitřní konverze potom dochází k snížení účinnosti fluorescence³⁷.

Vliv pH na fluorescenční spektra HA a FA je pravděpodobně spojený s přítomností různých funkčních skupin obzvláště fenolické hydroxylové skupiny, které podstupují postupující ionizaci se zvyšujícím pH. Toto by mohlo být příčinou rozšíření přerušeni inter a intramolekulární vodíkové vazby, která má za následek snížení asociace částic a rozvinutí makromolekulární struktury³⁶.

Ghosh a Schnitzer se zabývali měřením povrchového tlaku a viskozity huminových sloučenin. z jejich práce vyplývá, že struktura těchto látek mění v závislosti na změně prostředí, ve kterém se nacházejí. Došli k závěru, že při vysokých hodnotách pH je struktura huminových látek spíše lineární, zatímco při klesajícím pH je podobna klubku. Tento závěr by tedy mohl vysvětlovat, proč se zvyšujícím se pH zároveň dochází i k nárůstu intenzity fluorescence. Při nízkém pH mohou být totiž některé fluorofory maskovány uvnitř této struktury, kdežto při vzrůstajícím pH dochází k linearizaci makromolekulární struktury a fluorofory, které nejsou teď ničím maskované mohou fluoreskovat a zvyšují tak intenzitu fluorescence³⁸.

Vliv pH také zkoumali Marti–Neto a kol. a detekovali zvýšení hydrofobních mikropozic se snižujícím se pH pomocí elektron spinové rezonanční (ESR) spektroskopie. Šíře ESR absorpčních linií organických volných radikálů poskytla indikaci relaxačního času těchto radikálů. Šíře absorpčních linií ESR signálu je produkovaná stabilním semiquinovým volným radikálem v HS, který se snižuje s klesajícím pH, tedy v kyselé oblasti jsou chráněny hydrofobní oblasti, které zvyšují relaxační čas. Bylo prokázáno, že hydrofobní oblasti se tvoří v kyselém prostředí, ale disperze v bazickém prostředí³⁹.

Dále má důležitý vliv na fluorescenci koncentrace měřené látky v tomto případě tedy HS. Při vyšší koncentraci fluoroforů je absorbance extrémně vysoká a má za následek saturaci spektra při kratších vlnových délkách. Když je absorbance vzorku při excitační vlnové délce nízká (tj. při nízké koncentraci analytu), tak fluorescenční intenzita lineárně závisí na koncentraci. Ale, když je absorbance vysoká, jako u vzorků s vysokou koncentrací, tak nedochází ke změně intenzity v závislosti na koncentraci především z důvodu vnitřního filtr efektu (inner filter effect). Při vysoké koncentraci fluorescenčního roztoku je intenzita excitačního záření oslabena absorpcí a dochází k redukci luminiscence. Podle Divya a Mishra (2008) v této oblasti vysokých koncentrací dochází i k posunům maxima fluorescence. Při vysokých hodnotách excitační energie dochází ke vzniku pásu s přenosem energie a poloha fluoroforů se posouvá k vyšším vlnovým délkám (red shift)^{37,40}.

2.5 Literární rešerše

V současnosti jsou huminové látky stále více předmětem vědeckého výzkumu, díky jejich atraktivním vlastnostem a polyfunkčnímu charakteru. HS se nacházejí v těsné blízkosti pod povrchem, kde jsou přítomny v rozpuštěném stavu a v podobě částic tvořící půdy, vodstvo a sedimenty. Reagují s různými rozpuštěnými látkami adsorbovanými na povrchu a po interakci se zářením jsou schopné fluoreskovat. Největší důležitost je jim přikládána v zemědělství, protože mají pozitivní vliv na strukturu a kvalitu půdy, zadržení vody a nutriční charakter půd⁴¹.

Pro zvýšení půdní fertility se zejména používají soli huminových látek humáty, které mají významný stimulační účinek na růst zemědělských plodin²². Hrají důležitou roli v odstranění nebo migraci environmentálních polutantů v přírodních vodách a půdách, protože tyto polutanty jsou včleněny do matrice huminových látek díky hydrofobním interakcím, elektrostatickým interakcím, vodíkové vazbě a koordinační vazbě⁴².

Jejich heterogenní struktura je charakterizována mnoha fyzikálně chemickými metodami. Pro popis huminových látek se nejčastěji používají tyto metody: NMR (Nuclear Magnetic Resonance), FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, UV/VIS (Ultraviolet–Visible) a hmotnostní spektroskopie, EPR (Electron Paramagnetic Resonance), HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) a další^{43,44,45,46}.

Dochází i k rozšiřování technik určených ke charakterizaci huminových látek. Jedná se o rozšíření dvou-dimensionálního synchronního skenu (2D SFS) na tří-dimensionální synchronní sken (3D SFS), který poskytuje celkovou synchronní fluorescenční charakteristiku multifluoroforních vzorků. Při této metodě je vynesena fluorescenční intenzita v závislosti na emisní vlnové délce a to při různém rozdílu mezi excitační a emisní vlnovou délkou ($\Delta\lambda$). Při měření je tento interval stále posouván, aby bylo možné charakterizovat všechny fluorofory vyskytující se ve spektru⁷.

Droussi a kolektiv izolovali HA z rozemletých zbytků oliv při různém stupni kompostování a charakterizovali je metodou elementární analýzy, UV–VIS, infračervenou a fluorescenční spektroskopii. Pomocí elementární analýzy bylo zjištěno, že s postupujícím kompostováním se snižuje obsah C a H v HA a C/N poměr a dochází ke zvýšení obsahu N a O, C/H a O/C poměru. Hlavní transformace spočívala v relativním zvýšení bílkovinných materiálů, protože díky zvýšené mikrobiální aktivitě došlo k degradaci sacharidů (alifatických frakcí). Změny pozorované ve fluorescenčních spektrech jsou indikovány snížením stupně molekulární heterogenity a zvýšením nenasycených struktur, molekulární velikosti, koncentrace konjugovaných chromoforů a stupně humifikace. To se projevilo ve spektru, tak, že píky HA izolovaných na začátku procesu (okolo 330–390 nm) se s postupujícím časem kompostování vytratily a došlo ke zvýšení intenzity píky v oblasti vyšších vlnových délek při 510 nm (cit.⁴⁷).

García-Gil a kolektiv studovali fulvokyseliny (FA) izolované z městského odpadního kompostu (MWC). Jednu půdu nechali bez přídavku tohoto kompostu a k druhé tento kompost přidali v množství 20 a 80 t ha⁻¹ a nechali ho tam devět let a vyhodnotili kumulativní a residuální vliv tohoto přídavku na půdní FA. Nejprve provedli elementární analýzu a následně uplatnili metody UV–VIS, FTIR a fluorescenční spektroskopii. V porovnání s půdními FA mají FA komunálního kompostu (MWC) větší obsah N, menší obsah O a acidických skupin, větší protonovou afinitu karboxylových skupin, menší molekulární

velikost a limitovaný stupeň polykondenzace. Experiment kumulativního narozdíl od experimentu reziduálního vlivu MWC v půdách více ovlivnil elementární a funkční složení půdních FA, kdy došlo ke zvýšení N a S obsahu a protonové afinity karboxylových skupin a snížení obsahu acidických funkčních skupin. Synchronní sken byl snímán od 300 do 550 nm s $\Delta\lambda = 18$ nm. Synchronní spektrum FA s komunálním odpadem (MWC) bylo charakterizováno hlavním píkem při 432 nm. Dále fluorescenční spektrum půdních FA s residuálním (MWC) přídatkem a FA bez tohoto přídatku měli hlavní pík v 472 nm. V porovnání s touto půdou bez přídatku měli FA s kumulativním přídatkem 20 t ha⁻¹ pík při kratší vlnové délce v 447 nm a FA s kumulativním přídatkem 80 t ha⁻¹ s hlavním píkem také při kratší vlnové délce 431 nm (cit.⁴⁸).

Předmětem další studie Maia, Piccola a Mangricha byly změny v distribuci molekulových hmotností humátů odebíraného z kompostu při různých časech kompostování. Dále se zabývali vlivem konformační stability na funkce huminových kyselin při jejich neutralizaci sodnými nebo amonnými ionty. Změny v konformační struktuře humátů byly monitorovány vysokorozlišenou gelovou chromatografií (HPSEC). Porovnáním sodných a amonných humátů zjistili, že molekulová hmotnost huminových vzorků extrahovaných z kompostu je funkcí protináboje a koncentrace roztoků solí humátů. Při nízkých koncentracích humátů sodného jsou zastoupeny menší molekulární hmotnosti než v případě hydratovaných amonných solí. Při vyšší koncentraci humátů je více kompaktní konformace humátu sodného s vyšší molekulovou hmotností. Sodné ionty neutralizují rozsáhlejší množství negativních nábojů a tak dochází k větší agregaci (shlukování) částic v humátu sodném. Dále zjistili, že aktivní kompostování probíhá díky mikroorganismům, kteří selektivně stravují biolabilní a hydrofilní sloučeniny, tím více zvyšují koncentraci hydrofóbních komponent. Tyto komponenty se stávají částí huminových superstruktur jejíž molekulární velikost a konformační stabilita se postupně zvyšuje⁴⁹.

Kvalitu půdních humusových látek ze vzorků odebraných na zemědělských pozemcích střední Moravy sledovali Brtnický a Janček. Převážná část území střední Moravy je překryta spraší a mezi nejrozšířenější půdní typy patří černozem, fluvizem, hnědozem a luvizem. Odběry probíhaly v letech 2001–2003. Ve vzorcích byl obsah humusu stanoven jako oxidovatelný uhlík spálením v chromsírové směsi. Sledovali poměr HA/FA (určený z výsledků frakcionace) v závislosti na poměru Q₄/Q₆ z měření VIS, kdy při zvyšování obsahu HA vzrůstá kvalita humusu. Obsah humusu v ornici byl stanoven 2,34 % což uvedli jako průměrné množství a v podorniči byla stanovena hodnota 1,83 %. Získaný poměr C : N, který by se měl pohybovat kolem hodnoty 10, činí pro ornici 7,74. V podorniči byla zjištěná průměrná hodnota 7,45. Z průměrné hodnoty poměru HA : FA určili nízkou kvalitu půd⁵⁰.

Pospíšilová a kol., sledovali spektroskopické charakteristiky 4 půdních typů metodou UV–VIS, FTIR a spektrální fluorescenční spektroskopii (SFS) a zaměřili se na porovnání výsledků s výsledky frakcionace. Podle FTIR rozdělili spektra do dvou skupin. První zahrnovala HA izolované z černozemě a hnědozemě modální a druhá skupina obsahovala HA izolované z kambizemě modální a fluvizemě glejové, které obsahovaly méně aromatických C=C skupin a byly obohaceny o dusíkaté skupiny, alkoholové a etherické skupiny a polysacharidy. Metodou SFS zjistili pět hlavních spektrálních píků při vlnových délkách $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 467/487$, 481/501, 492/512, 450/470, 339/359. Nejvyšší relativní intenzitu fluorescence vykazoval vzorek HA u hnědozemě modální při vlnové délce 487 nm a nejnižší intenzitu měl vzorek HA fluvizemě glejové o stejné vlnové délce. Dále srovnávali fluorescenční indexy při I_{501}/I_{487} s barevnými kvocienty Q_{4/6} mezi nimiž našli lineární korelaci⁵¹.

Orazio a Senesi izolovali konvenční procedurou huminové kyseliny (HA) z rizosféry a z velkého objemu půdy, které byly analyzovány FTIR a gelovou chromatografií. Rizosféra je sféra chemického a bakteriologického působení kořenu rostliny. Byly vybrány dvě odlišné úrody a to rajčat (T) a artyčoků (A) a každá HA byla frakciována gelovou chromatografií do tří frakcí se zvyšující se molekulární velikostí. Elementární analýza indikovala větší obsah N a S v rizosféře rajčete (T–HA) než tomu bylo v rizosféře artyčoku (A–HA), to se projevilo přítomností formujících činitelů (dusíkaté a sírné sloučeniny) uvolňující se při rizodepozičním procesu. Tyto tři frakce odebrané z půdy s úrodou rajčat a artyčoků vykazují postupné zvýšení obsahu C, H a N a snížený obsah O a S a poměr C/N a C/H. Tyto výsledky ukazují, že nejnižší molekulární frakce I je bohatá na okysličené funkční skupiny a skládá z jednoduchých strukturálních jednotek pravděpodobně z quininových a fenolických jednotek s převládajícím aromatickým charakterem, zatímco vyšší molekulární frakce II a III jsou bohaté na skupiny obsahující N a na strukturální jednotky obsahující C a H a jsou charakteristické směsnou povahou alifatico-aromatickou a větší molekulární komplexitou⁵².

Pomocí metody zhášení fluorescence a adsorpce (modifikovaný Freundlichův model) popisoval Plaza a kolektiv (2009) vazby a vazebné chování polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v HA. HA byly izolované z organických substrátů při různém stupni kompostování a byly porovnány s půdní HA. Kvůli škodlivosti PAH v půdách řešili také otázku bioremediace založené na procesu kompostování a přidavku čerstvého kompostu. Vazebná kapacita PAH v čerstvém kompostu je větší než kterou mají půdní HA. Zjistili, že rychleji a efektivněji je půda vyčištěna od PAH bioremediací zrajícím kompostem než čerstvým organickým přídatkem. Bioremediací kompostováním je uvolněna směs bobtnajících činidel a organických látek, které spolu s přítomnými aktivními mikroorganismy transformují a degradují polutanty (PAH) na neškodné sloučeniny. Na této degradaci a transformaci polutantů má větší podíl kompost než přítomné organismy, které svou mikrobiální aktivitu zvyšují právě přidáním kompostu. Po aplikaci kompostu ke kontaminovaným půdám dojde ke zvýšení celkového množství a afinity půdních HA pro PAH a tím snižují jejich biologickou přístupnost a biodegradaci samozřejmě v závislosti na stabilitě kompostu a jeho zralosti⁵³.

Drosos a kolektiv se zase zabýval porovnáním vodíkových vazebných skupin v HA. Ke studiu huminových kyselin použili NMR spektroskopii. Měřili tři lignitické HA (lokality Řecko), pět půdních HA (lokality Řecko), jeden vzorek HA izolovaný z rašeliny a standard HA Leonardite. Pomocí metody H–NMR mohou být získány informace o strukturálním složení HA a to především fenolických a karboxylových skupin. Podle C¹³–NMR byly zjištěny hlavní rozdíly mezi HA půdními a HA lignitickými v množství karboxylových C (160–185 ppm) a množství aromatických C (110–160 ppm). Více aromatických skupin a zároveň větší homogenní struktura bylo nalezeno v lignitických HA vzorcích než v půdních HA. Bylo zjištěno, že půdní humifikační proces je nepřetržitý a při jakémkoliv času jsou přítomny rozdílné stupně humifikace. V případě lignitických HA se humifikace v určitém geologickém čase zastaví⁵⁴.

Vlivem globálního oteplení dochází k tání zmrzlých sedimentů a to může mít jako následek uvolnění uložené organické hmoty a ta je pak zahrnuta v biogeochemickém cyklu. Shirshova a kolektiv studovali tyto huminové látky (HS) fluorescenční spektroskopii. V práci připravili huminové frakce z polygenetického synkryogenního sedimentu v severní Yakutii. Provedli porovnání se spektry huminových látek izolovaných z odebraných půd a také měřili referenční vzorky přírodní organické hmoty (NOM). Izolace frakcí HS ze sedimentu a

půdních vzorků byla provedena metodou postupné extrakce se sulfonátovou pryskyřicí (HS–S frakce), karboxylátovou pryskyřicí (HS–C frakce) a 0,1 M NaOH (HS–A frakce). Následně byla provedena izolace HA a FA z každé frakce. Podle fluorescenčních charakteristik byly HS a HA frakce sedimentů klasifikovány do dvou skupin. První obsahující Pleistocenní sedimenty ze zmrzlého komplexu, druhá sedimenty Holocenní konzistence a Pleistocenní jílovité půdy. Podle získaných fluorescenčních dat se HS a HA první skupiny vyznačují dominantním píkem v nízké a střední spektrální vlnové oblasti, která indikuje relativně nízký stupeň humifikace a jistou podobnost k referenčním vzorkům NOM. HS a HA frakce druhé skupiny mají fluorescenční záznam signálu typicky pro nedávno získané půdy, kde je dominantní pík nalezen v dlouhovlnné oblasti, který je příznačný vysokým stupněm humifikace. Data ukazují, že HA a FA všech frakcí studovaných materiálu vykazují čtyři hlavní fluorescenční píky s maximem v 330–365 nm (a), 365–380 nm (b), 380–420 nm (c) a 480–520 nm (d), což souhlasí s literaturou (Senesi a kol. 1991). První dva píky (a) a (b) v nízkovlnné oblasti patřili FA. A pro HA byly nalezeny píky v střední a dlouhovlnné oblasti v (a), (c) a (d)⁵⁵.

Divya a kolektiv se zabývali koncentrační závislostí měřené fluorescence z hlediska možných posunů fluoroforů k vyšším vlnovým délkám. Nejprve studovali jednoduché fluorofory (chinin sulfát, rhodamin 6G, kumarin 152 a fluorescein), které mají odlišná absorpční a emisní spektra. Tyto molekuly tvoří excimery při vysokých koncentracích. Dále měřili multifluoroforní systémy jako diesel, transformátorový olej a huminové kyseliny. Úkolem této práce bylo zjistit optimální nastavení $\Delta\lambda$ při měření SFS spekter. U vybraných vzorků dokumentovali vnitřní filtr efekt⁴⁰.

Nakashima a kolektiv sledovali interakce mezi HA a těžkými kovovými ionty (Cu^{2+} a Pb^{2+}) fluorescenční spektroskopii. Fluorescenční spektra Aldrich HA (AHA – technická huminová kyselina) byla významně zhasena těmito těžkými kovy. Vazebné konstanty mezi HA a těžkými kovovými ionty byly získány Stern-Volmerovou analýzou. Fluorescenční spektra obsahovala dva intenzivní pásy, tedy dva fluorofory, které jsou ovlivněny rozdílnou komplexací kovu huminovou kyselinou. Byly určeny dvě vazebné konstanty pro pár HA–kov. První pás okolo 510 nm je charakterizován větší vazebnou konstantou než pás, který má okolo 435 nm (cit.⁴²).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Úkolem této práce je studium půdních huminových látek (HS) pomocí fluorescenční spektroskopie. Hlavní používanou metodou v této práci je synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS). Tento dvou-dimensionální synchronní sken byl ještě rozšířen o tří-dimensionální synchronní sken (3D SFS), který v emisním modu poskytuje grafické závislosti relativní intenzity emise při všech kombinacích SFS a intervalu $\Delta\lambda$ v jednoduchém tří-dimensionálním uspořádání. Interval $\Delta\lambda$ poskytuje vymezení přesného konstantního vlnového rozdílu mezi excitačním a emisním monochromátorem. Jeho posouváním získáme fluorofory vyskytující se v daném spektru.

Důležité bylo i nalezení optimálních parametrů nastavení přístroje Bowman Aminco, vyhledání vhodné koncentrace měřených vzorků a zpracování naměřených dat v 2D a 3D synchronních spektrech. U vzorků humátu byl zkoumán vliv pH na jejich fluorescenční chování a cílem bylo zjistit jak reaguje struktura humátu na změny pH. Sledovali jsem především, zda se nemění poloha hlavních a vedlejších píků a relativní intenzita fluorescence (RFI).

Dále jsme se snažili o srovnání a popis standardů HA a FA s našimi vybranými vzorky a charakterizovat všechny fluorofory vyskytující se ve spektrech huminových látek. Následně diskutovat výsledky jejich spekter, především polohu jejich hlavních píků. Dalším úkolem bylo k některým hlavním píkům přiřadit fluorofory, které mohou být ve spektrech přítomny podle literatury Senesi a kol. (1991)⁹. Zatím byly v literatuře publikovány fluorofory pouze při nižších vlnových délkách pod 500 nm.

Z některých synchronních spekter byly vypočítány tzv. fluorescenční indexy F a to z poměru relativních intenzit dvou intenzivních píků, nebo při konkrétních těchto vlnových délkách I_{487}/I_{502} , I_{400}/I_{360} , I_{360}/I_{470} , I_{465}/I_{399} .

3.1 Příprava vzorků

Příprava roztoků huminových a fulvo kyselin

Byly připraveny roztoky o výsledné koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ tak, že navážka $0,0025 \text{ g}$ kyseliny byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna po rysku $0,5 \text{ M}$ roztokem NaOH. Připravené vzorky byly ponechány 1–2 dny v lednici ke stabilizaci a před měřením byly protřepány.

Příprava roztoků humátů

Byly připraveny roztoky o výsledné koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ tak, že navážka $0,0025 \text{ g}$ izolovaného humátu byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna buď mili Qvodou nebo pufrům o pH 7 po rysku. Kvůli stabilizaci byly připravené vzorky 1–2 dny ponechány v ledničce a před měřením byly protřepány.

Příprava roztoků pH řady humátů

Byla připravena sada roztoků humátů o výsledné koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a různé hodnotě pH (3; 4; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 9) tak, že navážky $0,0025 \text{ g}$ humátů byly kvantitativně převedeny do 50 ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna pufrům s požadovaným pH po rysku. Připravené vzorky byly ponechány 1–2 dny v lednici ke stabilizaci a před měřením

byly protřepány.

Příprava roztoků pufrů s daným pH

Pufry o pH 4 a 9 byly komerčně dodané výrobcem Merck a ostatní roztoky pufrů s jinou hodnotou pH byly připraveny následovně.

Na přípravu roztoku pufru o pH 3 byl použit tlumivý systém hydrogenftalan draselný/kyselina chlorovodíková tak, že k objemu 50 ml hydrogenftalanu o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ byly pipetovány 4 ml roztoku HCl s koncentrací $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

Sada s hodnotou pH (5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 a 8) byla připravena tlumivým systémem $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tak, že ze zásobních roztoků obou složek s koncentracemi $0,067 \text{ mol dm}^{-3}$ byly pipetovány a míšeny objemy KH_2PO_4 a Na_2HPO_4 dle vztahu $x \text{ ml A} + (60 - x) \text{ ml B}$, kde látka A je Na_2HPO_4 a látka B je KH_2PO_4 .

Příprava zásobního roztoku hydrogenftalanu draselného

Byl připraven roztok o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kvantitativním převedením navážky 2,042 g komerčně dodávaného hydrogenftalanu draselného (p.a.) do 100 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Příprava zásobního roztoku kyseliny chlorovodíkové

Z normalu HCl byl připraven roztok o koncentraci $0,01 \text{ g dm}^{-3}$.

Příprava roztoku hydroxidu sodného

Byl připraven roztok o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, tak že navážka 20 g komerčně dodávaného hydroxidu sodného (p.a.) byla destilovanou vodou kvantitativně převedena 1000 ml odměrné baňky.

Příprava zásobního roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného

Byl připraven roztok o koncentraci $0,067 \text{ mol dm}^{-3}$, tak že byla navážka 1,816 g komerčně dodávaného KH_2PO_4 (p.a.) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky 200 ml a doplněna destilovanou vodou po rysku.

Příprava zásobního roztoku hydrogenfosforečnanu sodného

Byl připraven roztok Na_2HPO_4 o koncentraci $0,067 \text{ mol dm}^{-3}$ kvantitativním převedením navážky 4,778 g komerčně dodávaného $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (p.a.) do odměrné baňky 200 ml a doplněna destilovanou vodou po rysku.

3.1.1 Extrakce huminových kyselin

3.1.1.1 Extrakce huminových kyselin z lignitu

Nejprve bylo připraveno extrakční činidlo (směs) a roztok na přečištění HA, které se skládají z následujících látek.

- Extrakční činidlo:
0,5 M NaOH (40 g / 2 l) + 0,1 M Na₄P₂O₇ · 10 H₂O (89 g / 2 l)
- Roztok na přečištění HA :
HCl – HF (na 2 litry) 10 ml konc. HCl a 20 ml konc. HF, zbytek doplněn destil. vodou

Extrakce byla provedena se 100 g lignitu které byly v plastové nádobě přelity 2 l extrakčního činidla, přebytečný vzduch nad roztokem byl vytlačen proudem dusíku a nádoba byla uzavřena a třepána po dobu přibližně 24 hodin. Pak byl odstředěn pevný podíl a ke kapalné frakci byla postupně přidávána 20% HCl až do pH = 1–2. V této oblasti pH došlo k vysrážení huminových kyselin a následující den byla kapalná část suspenze odsáta. Vysrážené kyseliny byly za neustálého míchání rozpuštěny v 0,1 M roztoku NaOH alespoň na pH = 8 a znovu precipitovány a rozpuštěny ještě dvakrát. Potom byly HA přečištěny 2 l směsí HCl a HF, kdy byly v tomto roztoku ponechány přibližně 36 hodin na třepačce, během třepání probíhalo opakované odstředování a promývání vodou. Pevný podíl byl přímo v odstředovacích kyvetách promyt vodou a odstředěn. Poté byla přidána další deionizovaná voda a HA byly převedeny ve formě suspenze do dialyzačních membrán (Spectarpor 3 o molekulové hmotnosti MWCO 3500). Výměna destilované byla provedena třikrát denně po dobu jednoho týdne. Poté co roztok HA vykazoval negativní reakci na chloridy a fluoridy byl dialyzovaný roztok přelit na Petriho misky a vysušen v sušárně při teplotě 25°C.

3.1.1.2 Extrakce a izolace huminových kyselin z půd

Příprava půdy:

Půdu, z které chceme izolovat huminové kyseliny zbavíme viditelných rostlinných zbytků. Pokud půda obsahuje uhličitany, musíme uskutečnit dekalcinaci půdy s 10% HCl. Ke 100 g půdního vzorku přesátého přes 2 mm síto přidáme opatrně 1:1 10% HCl. Směs intenzivně mícháme dokud uniká CO₂ (1–2 hod.). Jakmile přestane unikat CO₂ půdu necháme usadit a roztok nad ní opatrně slijeme. Půdu promyjeme 0,05 M HCl a zjistíme přítomnost Ca²⁺ se šťavelanem amonným. Když vzniká bílá sraženina, půdu dále promýváme s 0,05 M HCl. Pokud je reakce negativní začneme půdu promývat s destilovanou vodou až do odstranění Cl⁻ iontů. Přítomnost chloridových iontů dokazujeme dusičnanem stříbrným (bílá sraženina). Takto připravená půda může být použita na extrakci huminových kyselin.

Extrakce a izolace humusových kyselin podle MZLU

Ke 100g (čtyřikrát) bylo přidáno 600 ml 0,1 M NaOH a tato směs byla protřepávána 7–8 hodin. Přes noc byla zemina ponechána k usazení v tmavém a chladném místě. Druhý den byl tmavý roztok nad zeminou slit do kádinky a ponechán na tmavém a chladném místě. Postup se opakoval a vždy byl odebírána roztok nad zeminou a všechny byly následně slity dohromady.

Takto vzniklý roztok obsahující humusové kyseliny byl odstředěn a odstředování probíhalo dokud nebyl extrakt čirý. Extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír. Dále se prováděla extrakce podle metody společnosti IHSS (Hayes 1985), kdy jako extrakční činidlo je použit roztok 0,1 M NaOH a 0,1 M roztok pyrofosforečnanu sodného. Postup vysrážení a přečištění huminových kyselin probíhal také stejně jako u lignitických huminových kyselin.

3.1.1.3 Izolace půdní fulvokyseliny

Ze vzorků půdy byl nejprve extrakcí roztokem pyrofosforečnanu sodného a hydroxidu sodného izolován vzorek huminové kyseliny, zbytek roztoku po extrakci byl zfiltrován a pomocí hydrofobní pryskyřice Supelite byl izolován vzorek fulvokyseliny v roztoku. Fulvokyselina byla přečištěna pomocí směsi HCl a HF a potom dialyzována a vymrazena.

3.1.1.4 Izolace humátů

Humát byl připraven z výchozí huminové kyseliny, která byla rozetřena tloučkem ve třecí misce a rozpuštěna v 0,5 M NaOH při pH vyšším než 12. Poté byl roztok dialyzován po dobu asi jednoho týdne a následně titrován automatickým titrátorem na hodnotu pH 7. Následně byl vzorek vymražen při teplotě -50°C a dialyzován pomocí membrány Spectrapor 3 o molekulové hmotnosti MWCO 3500.

3.1.2 Použité chemikálie

- Normanal kyseliny chlorovodíkové (p.a.), 0,1 M, Lach–Ner s.r.o., Neratovice,
- Hydroxid sodný (p.a.), Lach–Ner s.r.o., Neratovice,
- hydrogenftalan draselný (p.a.), Lach–Ner s.r.o., Neratovice,
- dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.), Lach–Ner s.r.o., Neratovice,
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (p.a.), Lach–Ner s.r.o., Neratovice,
- roztoky pufrů (pH 4 a 9), Merck KGaA, Darmstadt,

3.1.3 Použité vzorky huminových látek

- standard půdní huminové kyseliny Elliot Soil I dodávaný společností IHSS,
- standard půdní fulvokyseliny Elliot Soil II dodávaný společností IHSS,
- výluh huminových látek z půdy typu Pseudoglej (Gleyic Stagnosol) z lokality Kameničky, připraven kolektivem MZLU AF Brno,
- výluh huminových látek z půdy typu Černozem (Haplic Chernozem) z lokality Bratčice, připraven kolektivem MZLU AF Brno,
- výluh huminových látek z půdy typu hnědozem (Haplic Luvisol) z lokality Veverské Knínice, připraven kolektivem MZLU AF Brno,
- huminová kyselina typu Černozem (Haplic Chernozem) z lokality Bratčice, připraven kolektivem MZLU AF Brno, přečištění na FCH VUT v Brně

- huminová kyselina typu Kambizem (Eutric Cambisol) z lokality Vatín
- fulvokyselina typu Kambizem (Eutric Cambisol) z lokality Vatín
- lignitická huminová kyselina HAN z lokality Mikulčice, připravena Mgr. Fasurovou Ph.D.,
- humát 04/06, připraven Ing. Kučeríkem, Ph.D.,
- humát 221105, připraven Ing. Kučeríkem, Ph.D. a Ing. Čechlovskou, Ph.D.
- výluhy z půd typu Černozem Modální, Arenická, Hnědozemní, Phaeoická (Haplic, Arenic, Phaeoic) lokality MZLU jižní Morava, Vysočina.

U uvedených vzorků byla provedena elementární analýza na Analyzátoru Carlo Erba na ÚSMH AVČR Praha, u vzorku Kambizem FA byla analýza provedena na Strojírenském zkušebním ústavu v Brně. Analýzy standardu uvádí společnost IHSS na dodacích listech. Vybrané vzorky jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab.1, Tab. 2 a Tab. 3). Protože se jedná se o elementární analýzy pro bezpopelové huminové kyseliny, je zde uveden i obsah popela ve vzorcích. Výsledky elementární analýzy jsou uvedeny v hmotnostních %.

Tabulka 1 Elementární analýza a obsah popela huminových kyselin

Název HA	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
Elliot Soil HA	58,13	34,08	3,68	4,14	0,88
Pseudoglej	53,33	36,31	5,27	5,18	5,07
Černozem	53,23	37,42	4,60	4,75	9,91
HAN	57,46	34,93	5,08	2,53	15,51

Tabulka 2 Elementární analýza a obsah popela fulvokyselin

Název FA	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
Elliot Soil FA	50,12	42,61	4,28	3,75	1,00
Kambizem	56,33	34,02	4,1	5,37	17,1

Tabulka 3 Elementární analýza a obsah popela humátů

Název HA	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]	Popel [%]
Humát 04/06	41,53	28,81	2,99	0,96	25,71
Humát 22/11	58,43	35,89	4,29	1,39	18,16

3.1.3.1 Charakterizace měřených typů půd

Černozem

Hluobokohumózní půdy (> 30 cm) s tmavým černickým horizontem Ac. Vytvořily se ze spraší, písčitých spraší a slínů intenzivní akumulací a kondenzací půdní organické hmoty, v podmínkách nepromyvného vodního režimu. Půdní vegetací byly stepi a lesostepi. Obsahují v ornici 1,9 – 3,0 % humusu, $C_{HA} : C_{FA} > 1,5$. Půdní reakce je neutrální až slabě kyselá. Patří k našim nejurodnějším půdám, proto jsou využívány jako půdy orné.

Hnědozem

Vznikají typickou illimerizací, kdy jsou translokovány koloidy s malým množstvím organických látek. Pod hnědou ornici se nachází homogenně hnědý luvický horizont Bt. Vytvořily se hlavně ze spraší, sprašových hlín (prachovic) v podmínkách promyvného vodního režimu. Ornice byla vytvořena z horizontů akumulací humusu a slabě eluviovaného horizontu. Střední obsah humusu v ornici činí 1,3 – 2,5 %, poměr $C_{HA} : C_{FA}$ kolem 1. Půdní reakce je slabě kyselá až kyselá. Patří k velmi úrodným půdám, ale vyžadují vápnění a hnojení organickými hnojivy.

Kambizem

Půdy s kambickým horizontem, jenž vznikl v důsledku hnědnutí a bisialitizace. Zbarvení kambického horizontu je vždy hnědší než zbarvení půdotvorného substrátu. Vytvořily se převážně v hlavním souvrství svahovin magmatických, metamorfických a sedimentárních hornin, v podmínkách periodicky promyvného až promyvného vodního režimu. Původní porost v oblasti kambizemí nižších poloh byly doubravy a bučiny, u kambizemí vyšších poloh smíšené lesy (buk, jedle) až smrčiny. Kambizemě nižších poloh obsahují v ornici méně humusu (probíhá rychlejší mineralizace), do 3 % v ornici (horské 3–6 %), ale mají více jílu než horské půdy. Hodnota reakce pH_{KCl} je nad 5. Kvalita humusu je velmi rozdílná, směrem do nižších oblastí vzrůstá.

Pseudoglej

Půdy s výrazným mramorovým redoximorfním Bm horizontem. Vytvářejí se buď z pedogenně (z luvizemí) nebo z litogenně zvrstvených případně nerozpustných (jílovité, písčitojílovité) substátů. *Pseudoglejový proces (oglejení)*: v důsledku periodicky zvýšené vlhkosti dochází za účasti nízkomolekulárních organických látek k mobilitě, redukci a migraci Fe a Mn. V ornici se obsah humusu pohybuje v rozmezí 2,5–3,5 %. Pseudogleje jsou pokládány za půdy méně úrodné. Jejich produkční potenciál je ovlivněn zvláště v jarních měsících, protože dochází k nadměrné vlhkosti a snížení provzdušenosti a redukčně-oxidačního potenciálu, což vede k hromadění toxických látek, které ovlivňují metabolismus rostlin.

3.1.4 Použité přístroje a metody

- spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2, program AB2 pro fluorescenční spektroskopii,
- pH metr Gryf 107 L a Hanna pH 212, (dvoudobá kalibrace),
- Analyzátor Carlo Erba (elementární analýza na ÚSMH AVČR Praha), CHN analyzátor (Strojírenský zkušební ústav Brno),
- OriginPro 6.1 (zpracování dat).

3.2 Fluorescenční spektroskopie

3.2.1 Instrumentace

Zdrojem světla je xenonová lampa. Světelný paprsek vyprodukovaný xenonovou lampou projde nejprve prvním monochromátorem (excitačním), dopadne na vzorek. Následně se v kolmém směru (od dopadu záření) vede emisní záření do druhého monochromátoru (emisní), projde jím a nakonec je zachyceno detektorem. Získaná data jsou vyhodnocena pomocí programu AB2.

3.2.2 Pracovní postup

Podmínky měření:

- šířka štěrbin obou monochromátorů 4 nm,
- teplota měření stále 20 °C (byla kontrolována termostatem),
- nastavení monochromátorů (360//520 nebo 350//397),
- vzorky měřené v kyvetě ze skla Spectrosil o tloušťce 1 mm,
- synchronní 2D sken v rozmezí 200–600 nm, s nejčastějším vlnovým rozdílem $\Delta\lambda = 20$ nm,
- synchronní 3D sken v rozmezí 200–600 nm, s postupným zvyšováním $\Delta\lambda$ od 15 po 80 nebo 150 nm,
- citlivost přístroje byla 60 %,
- budící napětí nejčastěji v rozmezí 800–1000 V.

Experimentální měření

- zkoušení různých nastavení přístroje (autorange, šířka štěrbin, různé budící napětí nastavení monochromátorů, rozdílné rozmezí skenů),
- měření synchronních 2D spekter o $\Delta\lambda = 20$ nm a $\Delta\lambda = 40$ nm,
- měření synchronních 3D spekter s různou $\Delta\lambda$.

3.2.2.1 Měření vzorků

Připravené vzorky huminových látek a humátů byly měřeny v křemenné kyvetě, která propouští elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 195–2700 nm. Měření probíhá v řídicím programu AB2, kde se nastavují parametry měření (šířka štěrbin, napětí, monochromátory atd.), parametry pro export dat získáme díky převodu do ASCII formátu, kde se datové soubory ukládají v podobě textových souborů, které jsou následně importovány do excelovského souboru nebo do programu Origin.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv koncentrace a pH vzorků huminových látek na fluorescenci

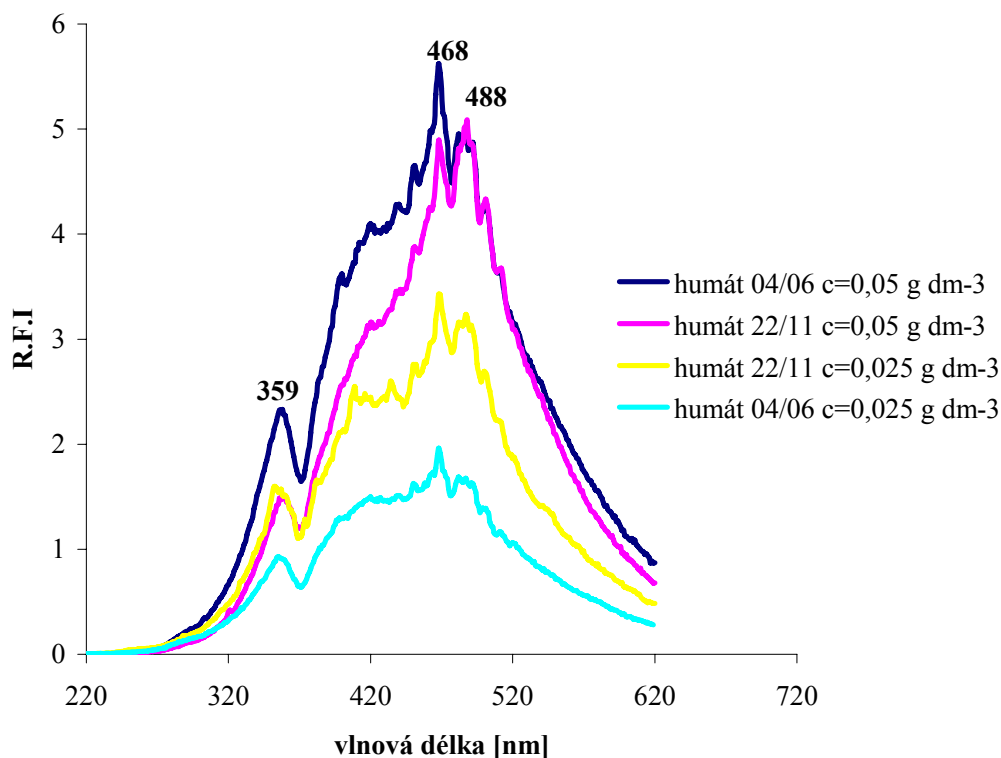
Je obecně známo, že relativní intenzita fluorescence vzorků aromatických látek závisí hlavně na těchto parametrech: koncentrace, teplota, hodnota pH, použitý typ rozpouštědla, přítomnost solí aj.

Podle údajů v literatuře může důsledkem těchto vlivů docházet kromě snížení nebo zvýšení RFI také k posunům některých píků. Tyto posuny lze zaznamenat hlavně v synchronním modu měření, nebo v 3D skenu v excitačně–emisním modu (EEM). V této práci byly tyto možné změny zjišťovány pomocí 2D synchronního skenu.

Z důvodu vzniku soli (NaCl) při rozpouštění huminové kyseliny v hydroxidu sodném, byly experimenty provedeny i s humátem sodným, který je rozpustný při jakémkoliv pH a odpadá problém se vznikem soli, která způsobuje zhášení fluorescence. Tento proces zhášení fluorescence huminových kyselin v přítomnosti NaCl byl již dříve potvrzen i experimentálně. Čerstvě upravené vzorky HA s obsahem NaCl nebylo možno měřit hned po jejich přípravě.

4.1.1 Srovnání humátů 22/11 a 04/06 o různé koncentraci

V této práci byly sledovány dva lignitické humáty rozpuštěné v miliQvodě o koncentracích $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a $0,025 \text{ g dm}^{-3}$. Záměrem práce bylo sledování, jestli dochází ke změně polohy píků a relativní intenzity fluorescence se změnou koncentrace těchto humátů. Synchronní spektrum bylo měřené při napětí 800 V a je znázorněno na Obr. 3. Spektra byla snímána s konstantním vlnovým rozdílem mezi excitačním a emisním monochromátorem $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$. Ve spektru jsou zjevné dva dominantní píky (maximum 1 a maximum 2) a v oblasti vyšších emisních délek lze ještě tušit přítomnost třetího píku, který ovšem není moc patrný. Také v oblasti nízkých vlnových délek je vidět intenzivní pík v 359 nm. Vynesené synchronní spektrum představuje závislost RFI na emisní vlnové délce, přičemž lze určit také excitační vlnovou délku, odečtením konstantního vlnového intervalu $\Delta\lambda$ od emisní vlnové délky. Fluorescenční maximum 1 těchto vzorků bylo zjištěno při $\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$: 448/468 a fluorescenční maximum 2 při $\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$: 468/488.



Obr. 3 Synchronní spektrum humátu 22/11 a 04/06 o koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a $0,025 \text{ g dm}^{-3}$.

4.1.1.1 Závěr

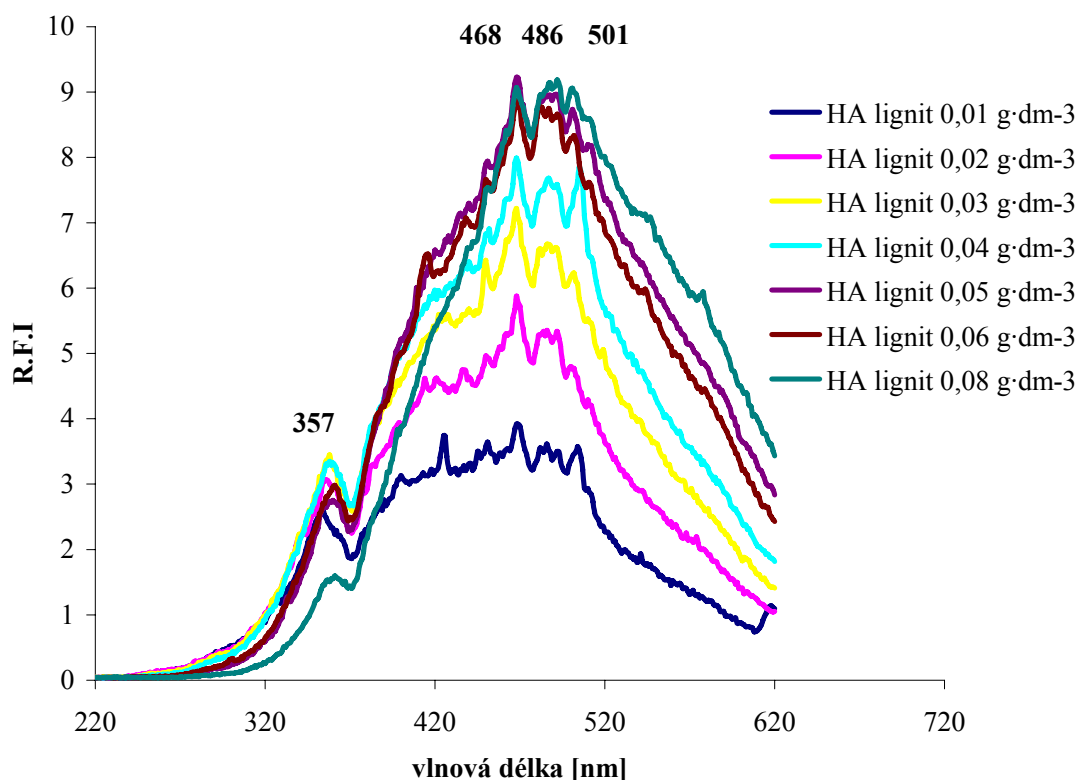
Z naměřených spekter vyplývá, že se změnou koncentrace nedošlo k rozdílům v poloze hlavních píků humátů. Oba lignitické humáty měly shodné polohy hlavních píků, což dokazuje, že pocházejí ze shodné matrice, tedy jsou lignitického původu. Byly zjištěny rozdíly v naměřených intenzitách hlavních píků, kdy vzorek humátu 22/11 měl při vyšší koncentraci intenzivnější pík v maximu 2; v oblasti $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 468/488. Rozdíly mezi maximem 1 a 2 nejsou tak významné jako v případě porovnání vzorků humátu 04/06. Tudíž z toho nemůžeme usuzovat, že by změna koncentrace měla vliv na polohu hlavních píků. Obecně při porovnání těchto spekter měl nejvyšší hodnotu RFI (5,62) humát 04/06. Bylo zjištěno, že se snížením koncentrace obou vzorků dochází ke snížení RFI. Na základě Obr. 3 lze konstatovat, že je lépe měřit při koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$, protože lze lépe odečíst hlavní fluorescenční maxima. Předpokládá se, že pokud bychom zvyšovali koncentraci nad $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ bude docházet k odchýlkám naměřených intenzit a nebude platit lineární odezva měřené intenzity na koncentraci. Při měření jakýchkoliv vzorků huminových látek je vždy že nutné nejprve proměřit si koncentrační řadu daného vzorku a vybrat optimální koncentraci pro další experimenty.

4.1.2 Vliv koncentrace na RFI vzorku lignitické huminové kyseliny (HAN) a její porovnání s lignitickými humáty 22/11 a 04/06.

Jelikož bylo zjištěno viz výše, že zvolená koncentrace humátů neovlivňuje polohu hlavních píků, ale relativní intenzitu fluorescence, byl uskutečněn další experiment. Byla provedena měření lignitické huminové kyseliny (HAN), ze které byl humát následně připraven. Cílem práce bylo zjistit, jestli budou nalezeny nějaké rozdíly ve spektrech humátů a huminové kyseliny připravené ze stejné matrice. Dále bylo úkolem zjistit, jestli bude mít vzorek humátů vyšší rel. intenzitu než vzorek HAN.

Nejprve byla připravena a proměřena sada vzorků huminové kyseliny v rozmezí koncentrace od $0,01 \text{ g dm}^{-3}$ do $0,08 \text{ g dm}^{-3}$. Pro každou zvolenou koncentraci byl synchronní sken měřen jednotlivě při stejné hodnotě napětí (950 V) a výsledná spektra byla spojena do jednoho kombinovaného grafu s konstantním vlnovým rozdílem $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$. Předpokladem bylo, že při nízké koncentraci fluorescenční látky v našem případě lignitické huminové kyseliny (HAN) je fluorescenční intenzita lineárně závislá na koncentraci. Ale při vysoké koncentraci vzorku nedochází ke změně intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci především z důvodu vnitřního filtr efektu (inner filter effect).

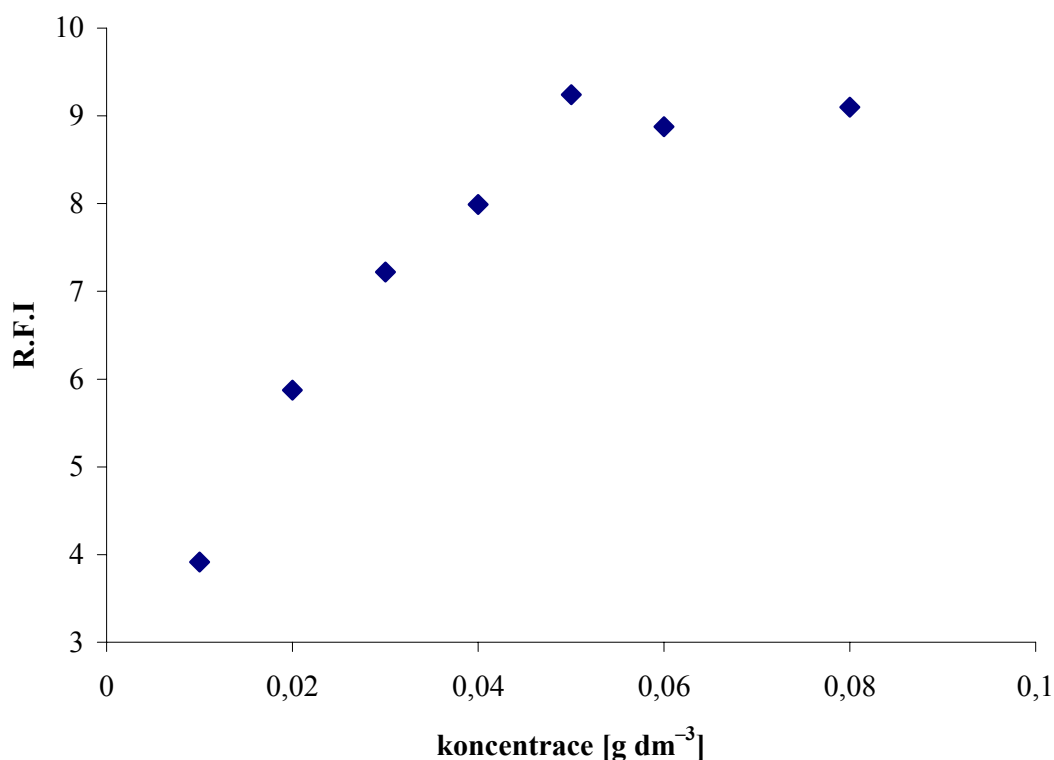
Charakterizace naměřených spekter spočívala v určení hlavních píků vyskytující se ve spektru lignitické HAN a porovnat je s píky lignitických humátů 04/06 a 22/11. Předpokladem bylo, že se tyto vzorky stejného původu budou shodovat v polohách hlavních píků, to znamená, že budou obsahovat shodné hlavní fluorofory.



Obr. 4 Synchronní sken HAN lignitické o různé koncentraci rozpuštěné v 0,5 M NaOH.

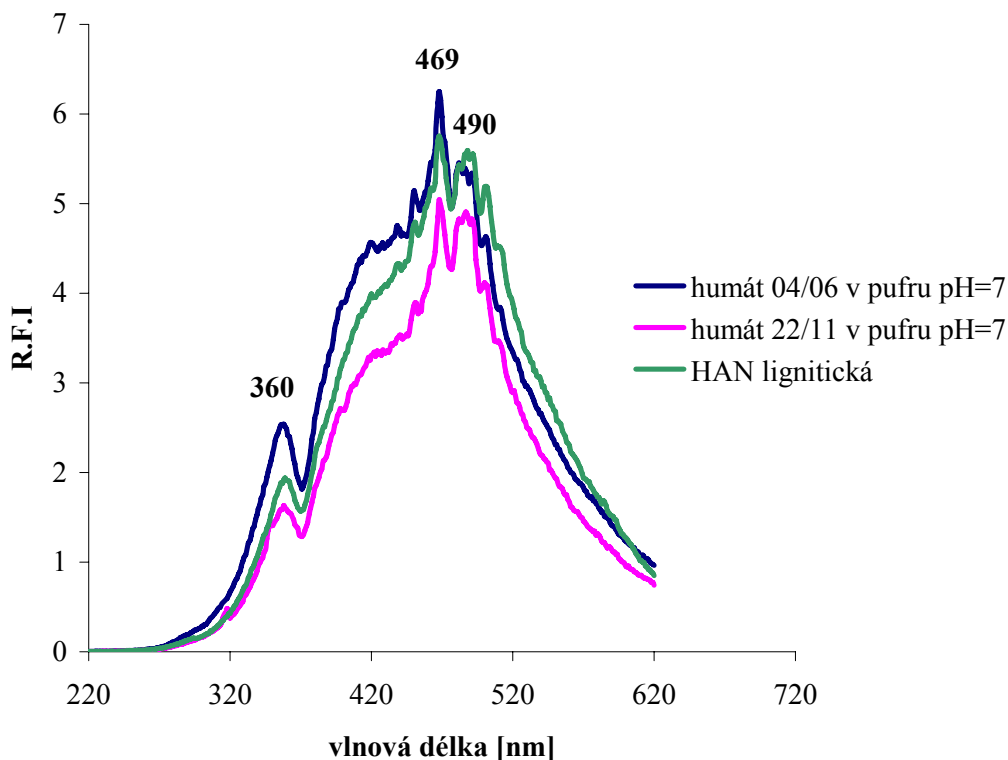
Po změření všech SFS spekter bylo provedeno vyhodnocení tak, že byl sledován vliv koncentrace na polohu maximálního píku 468 nm a na odpovídající hodnotu relativní intenzity fluorescence. Maximum relativní intenzity fluorescence bylo pozorováno u všech vzorků při stejné vlnové délce emise 468 nm. Byly nalezeny celkem 4 píky v oblastech ($\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$) 337/357, 448/468, 466/486, 481/501 nm. Při porovnání měřených 7 vzorků měla nejvyšší relativní intenzitu HAN lignitická o $c=0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a nejméně intenzivní HAN lignitická o $c=0,01 \text{ g dm}^{-3}$. Z Obr. 4 plyne, že zvolená koncentrace výrazně ovlivňuje relativní intenzitu fluorescence ne však polohu maximálního píku. Se zvyšující se koncentrací vzorků se lineárně zvyšuje relativní intenzita fluorescence až do koncentrace $0,05 \text{ g dm}^{-3}$, tzn., že optimální koncentrace vzorku je do $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a nad touto koncentrací je už závislost nelineární, protože dochází k částečnému pohlcení emitovaného záření.

Pro ilustraci byla vynesena závislost RFI odečtené při 468 nm na koncentraci lignitické huminové kyseliny na Obr. 5.



Obr. 5 Závislost relativní intenzity fluorescence na zvolené koncentraci u HA lignitické.

Z uvedené grafické závislosti na (Obr. 5) plyne, že v oblasti vyšších koncentrací nad $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ nelze spektra korigovat, protože se dopouštíme chyby ve stanovení relativní intenzity fluorescence (RFI). Tuto koncentrační sadu je třeba proměřit vždy pro zvolený typ huminových látek, protože tím zjistíme při které koncentraci je nejlépe měřit. Obecně se v literatuře píše, že tato koncentrace bývá do $0,05 \text{ g dm}^{-3}$, ale záleží také na zvoleném typu spektrofluorimetru a jeho možnostech měření.



Obr. 6 Synchronní spektrum lignitických humátů 04/06, 22/11 a lignitické HAN o stejné koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$.

V tomto experimentu byly porovnány vzorky humátů a huminové kyseliny, které byly izolovány ze shodné matrice při stejné koncentraci. Lignitické humáty byly rozpuštěny v pufru o pH 7 a lignitická HAN v 0,5 M NaOH ($c = 0,05 \text{ g dm}^{-3}$).

Při porovnání spekter SFS (při napětí 800 V) lignitické HAN a humátů 04/06 a 22/11 bylo zjištěno, že spektra obsahují tři hlavní píky při stejných vlnových délkách.

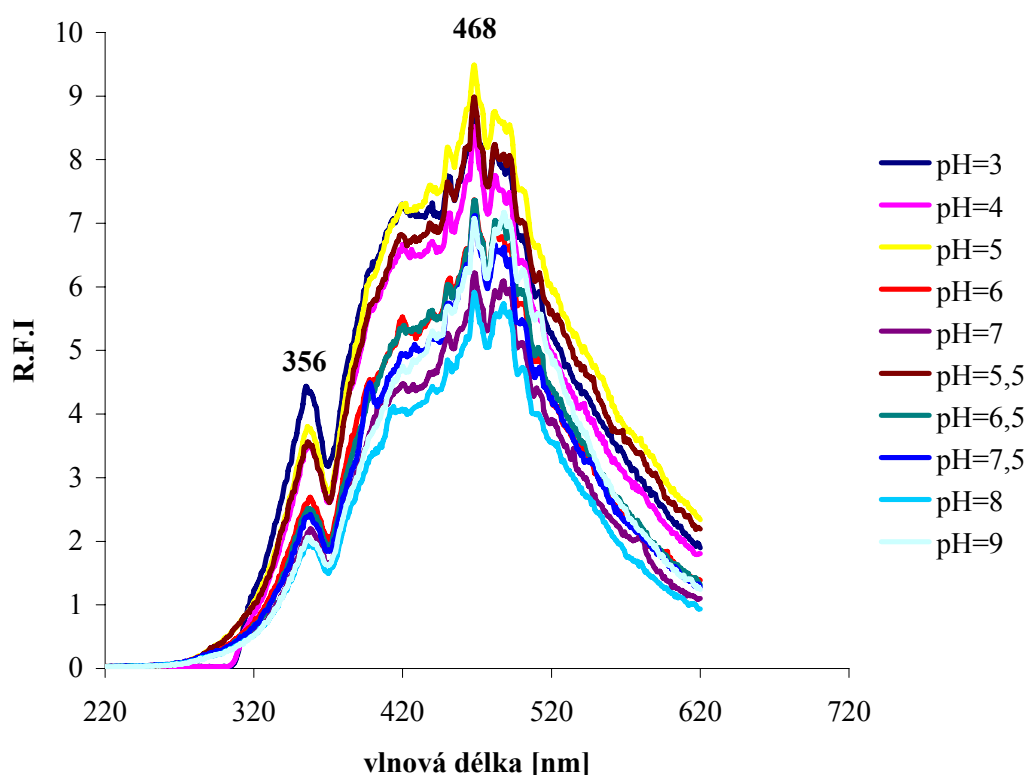
Kombinovaný graf je znázorněn na Obr. 6, kde jsou tučně zvýrazněny hlavní píky.

4.1.2.1 Závěr

Z výsledků měření koncentrační sady plyne, že nalezená optimální koncentrace vzorku lignitické huminové kyseliny (HAN) je $0,05 \text{ g dm}^{-3}$. Srovnáním lignitických humátů a vzorku HAN bylo zjištěno, že se shodují. Byly nalezeny tři hlavní píky v oblastech 340/360, **449/469**, **470/490** ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$). Hlavní pík byl u všech vzorků pozorován při emisní vlnové délce 469 nm, ikdyž mezi tímto maximálním a dalším nejintenzivnějším píkem není velký rozdíl v hodnotách RFI. Tyto vzorky byly porovnány s fluorescenčním chováním (excitační a emisní píky) huminových kyselin podle Senesi a kol. tak, že byla nalezena příslušná charakteristická skupina měřených vzorků. Podle Senesiho⁹ patří lignitická HAN a lignitické humáty do druhé skupiny, kdy vzorky mají vždy dva excitační hlavní píky v oblasti 450 a 470 nm, které byly pozorovány i u našich vzorků. Podle literatury maximum nalezené okolo 460 nm značí polycyklické aromatické sloučeniny obsahující sedm spojených benzenových kruhů.

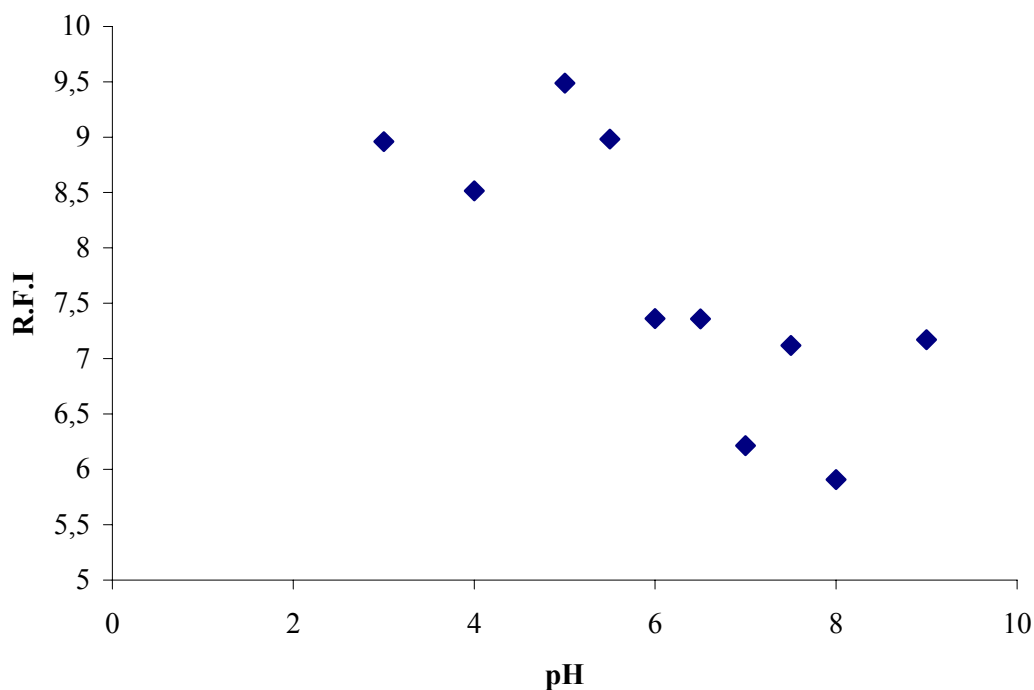
4.1.3 Vliv pH humátu 22/11 na relativní intenzitu fluorescence (RFI)

Úkolem bylo zjistit, jestli struktura HA respektive humátu reaguje na změny pH. Z předchozích měření 3D-EEM metodou v práci Mlčocha³⁸, bylo zjištěno, že HA reaguje na změny pH nejvíce v oblasti pH 5 a 7. V případě této práce bylo úkolem použít jinou metodu (synchronní) a výsledky porovnat s metodou emisně-excitační. Metoda SFS umožňuje určení píků jednotlivých fluoroforních skupin s vyšším rozlišením a proto byla použita tato metoda. Pokud by se sledovala závislost fluorescence na pH u vzorků huminových kyselin rozpuštěných v alkalickém prostředí, pak jejich hodnota pH je upravena pomocí kyseliny za současného vzniku soli (NaCl). V tomto experimentu byla připravena sada humátů o různé hodnotě pH a byl sledován vliv hodnoty pH na RFI a dále na polohu hlavních píků.



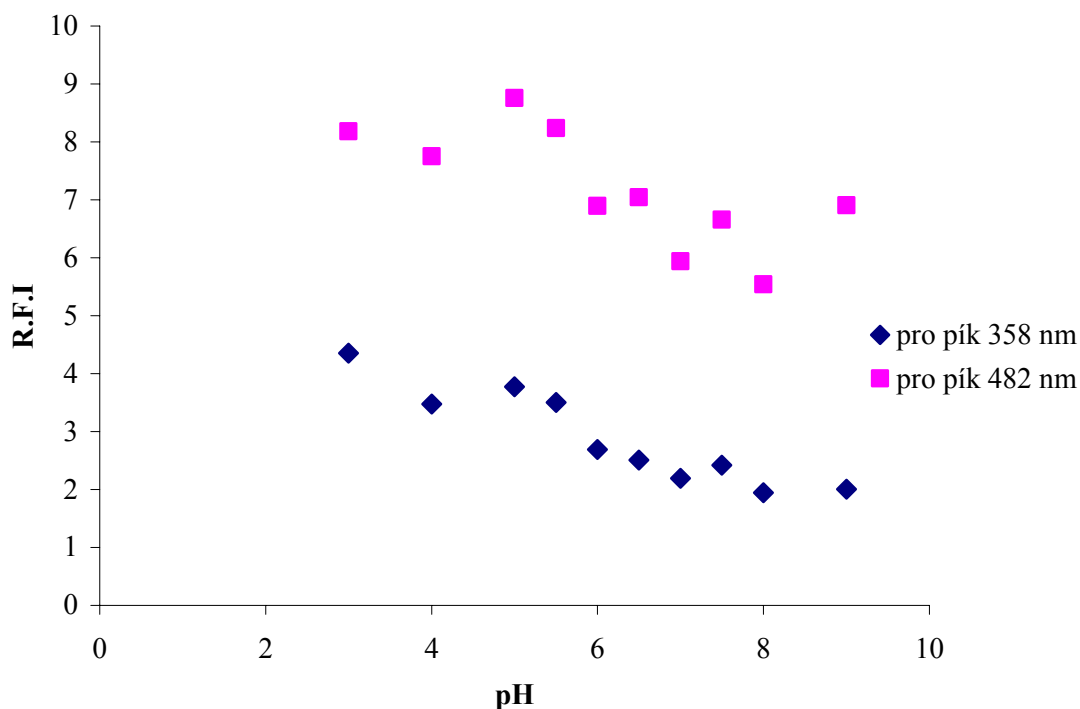
Obr. 7 Synchronní sken sady humátů 22/11 o různém pH, měřeno při stejném napětí $U=900V$.

Sada humátu 22/11 byla připravena rozpuštěním v pufrech o různém pH. Z (Obr. 7) je vidět, že hlavní pík při 468 nm je pozorován u všech vzorků, mění se však hodnota RFI při tomto hlavním píku a při vedlejším (356 nm). Nejvyšší intenzitu fluorescence hlavního maxima (RFI=9,488) měl humát 22/11 o pH=5 a intenzitně nejnižší byl humát o pH=8. Na následujícím obrázku jsou vyneseny hodnoty relativních intenzit určených při vlnové délce 468 nm.



Obr. 8 Závislost relativní intenzity fluorescence při 468 nm na hodnotě pH.

Bylo zjištěno, že při nastavení $\Delta\lambda = 20$ nm mezi excitačním a emisním monochromátorem nedochází vlivem změny hodnoty pH k žádným posunům vybraného fluoroforu při vlnových délkách $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 448/468$ nm. Dále bylo zjištěno, že se zvyšující se hodnotou pH v oblasti od 3 do 9 dochází k postupnému snižování rel. intenzity fluorescence (RFI) humátu. K určitým malým výkyvům hodnot RFI došlo při pH 5 a 7. Změny RFI byly pozorovány také při 482 nm a 358 nm (Obr. 9).



Obr. 9 Závislost relativní intenzity fluorescence na pH pro pík 482 nm 358 nm.

4.1.3.1 Závěr

Při nízkých hodnotách pH dochází k ionizaci struktury humátu sodného. Předpokládá se, že struktura humátu bude v oblasti nižších hodnot pH zaujímat jinou konformaci než při vyšších pH prostředí. Předpoklad, že při nižším pH dochází ke svinutí struktury humátu a zároveň ke snížení intenzity emise, nebo hodnoty RFI se nepodařilo potvrdit. Zhášení fluorescence, tedy snížení hodnot RFI by mohlo být vysvětleno tím, že některé fluorofory se vlivem svinuté struktury neprojeví, jsou totiž blokovány ionty v roztoku. V námi studovaném systému dochází k jinému efektu. Huminové kyseliny, resp. humáty obsahují různé aromatické látky které mají navázány kyselé a bazické funkční skupiny, které jsou citlivé na pH. Jejich množství hraje velkou roli v tom, jestli bude v systému velká protonizace nebo bude minimální. Tyto funkční skupiny (karboxylové a fenolické) ovlivňují pak fluorescenční chování humátu. Podle Senesiho 1990 (cit.³⁷) substituovaný heteroatom na aromatickém jádře má velký vliv na fluorescenci. Substituenty, který jsou na aromatickém jádře elektronakceptorní tzn, že řídí substituci do polohy meta podstatně snižují fluorescenční intenzitu. Zatímco elektrodonorní skupiny, tj. substituenty, které řídí substituci do polohy ortho a para zvyšují účinnost RFI. Při adici substituentů karboxylových, hydroxidových, alkoxidových a amino- skupin dochází k posunu fluorescence k vyšším vlnovým délkám.

SFS spektra jsou často snímána při nastavení $\Delta\lambda = 18, 20, 55$ a 80 nm, kdy nejčastější bývá 20 nm (Senesi 1990, Pullin 1995). V tomto případě se sledují chromofory které mají rozdíl mezi excitací a emisí jen 20 nm.

Chen a kol. zjistili při SFS ($\Delta\lambda = 20$ nm), že dochází vlivem pH ke změnám RFI píků v oblasti kolem 370 – 470 nm (cit.⁵⁶), což odpovídá našim výsledkům. Dále se studiem vlivu pH na hodnotu intenzity RFI vzorků fulvokyselin zabýval Senesi, kdy zjistil, že se vzrůstající

hodnotou pH (4,5 až 10,0) při $\Delta\lambda = 18$ nm dochází k posunům hlavních píků směrem k vyšším vlnovým délkám (Senesi 1990). Ve studii Miano, Senesi³⁶ byly zkoumány vzorky půdních FA i HA metodou SFS při různých nastaveních $\Delta\lambda$ (12 až 90 nm) a byl sledován vliv koncentrace a pH při nastavení $\Delta\lambda = 18$ nm na intenzitu a polohu hlavních píků.

4.2 Studium fluorescence půdních a lignitických huminových látek

4.2.1 Porovnání fluorescence výluhů různých typů půdních huminových látek se standardem HA Elliot

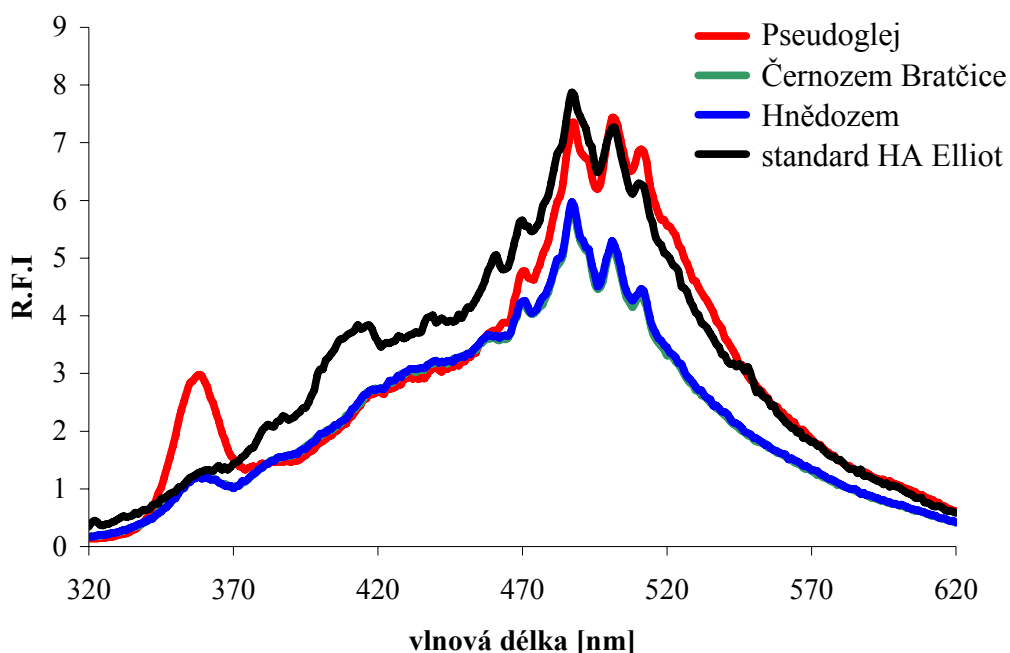
V práci byla měřena SFS spektra tří půdních vzorků huminových látek a jednoho vzorku standardu půdní HA (Elliot Soil HA). Byly připraveny vzorky huminových látek (HS), tedy výluhů z Černozemě (lokalita Bratčice), Hnědozemě (Veverské Knínice), Pseudogleje (Kameničky) a vzorek standardu Elliot HA (IHSS). Vzorky půd byly odebrány v hloubce 0–25 cm. Výluhy byly připraveny zalitím půdy směsí 0,1 M pyrofosforečnanu sodného a 0,1 M NaOH o hodnotě pH 12,5. Vzorek standardu HA Elliot byl rozpuštěn v této směsi na konečnou koncentraci 0,05 g dm⁻³. Analýza frakčního složení vzorků půd byla provedena na MZLU v Brně a výsledky jsou uvedeny v následující Tabulka 4. Vzorky výluhů byly měřeny od 300 po 600 nm s konstantním vlnovým rozdílem $\Delta\lambda = 20$ nm při napětí 845 V. Jelikož se jedná o výluhy půd, tak obsahují jak FA tak i HA, samozřejmě kromě standardu Elliota HA s kterými byly tyto půdní vzorky srovnávány. Z poměru intenzit dvou hlavních píků při vlnových délkách 487 a 502 nm byl vypočítán fluorescenční index F (I_{487}/I_{502}). Dále byl zjištěn poměr HA/FA a humifikační stupeň, které slouží pro posouzení kvality humusu. Kvalita humusu vzrůstá se zvyšováním obsahu HA, takže podle tabulky je nejkvalitnější Černozem (Bratčice).

Tabulka 4 Výsledky frakčního složení vybraných půd, parametr kvality půdy (HA/FA), stupeň humifikace a fluorescenční index výluhu huminových látek.

Vzorek (Lokalita)	HA (mg kg ⁻¹)	FA (mg kg ⁻¹)	Σ HL (mg kg ⁻¹)	HA/FA	Stupeň humifikace (%)	F
	(%)	(%)	(%)			
Černozem (Bratčice)	4	1	5	4,0	17	1,14
	17	5,5	22,2			
Hnědozem (V. Knínice)	3	2	5	1,5	14,3	1,13
	14,3	9,5	23,8			
Pseudoglej (Kameničky)	10	6,5	16,5	1,5	27,4	0,99
	27,4	17,8	45,2			

V SFS grafu (Obr. 10) byly sledovány hlavní a vedlejší píky a také jejich rel. intenzity. U všech vzorků bylo nalezeno 5 hlavních spektrálních píků při: 488, 502, 512, 471, 359. Hlavní maximum bylo pozorováno při vlnové délce 488 nm u všech zvolených vzorků.

Nejvyšší hodnotu relativní intenzity fluorescence měl standard HA Elliot a nejnižší hodnotu relativní intenzity fluorescence jsme zaznamenaly u černozemě a hnědozemě. Tyto dvě spektra černozemě a hnědozemě mají přibližně stejný průběh.



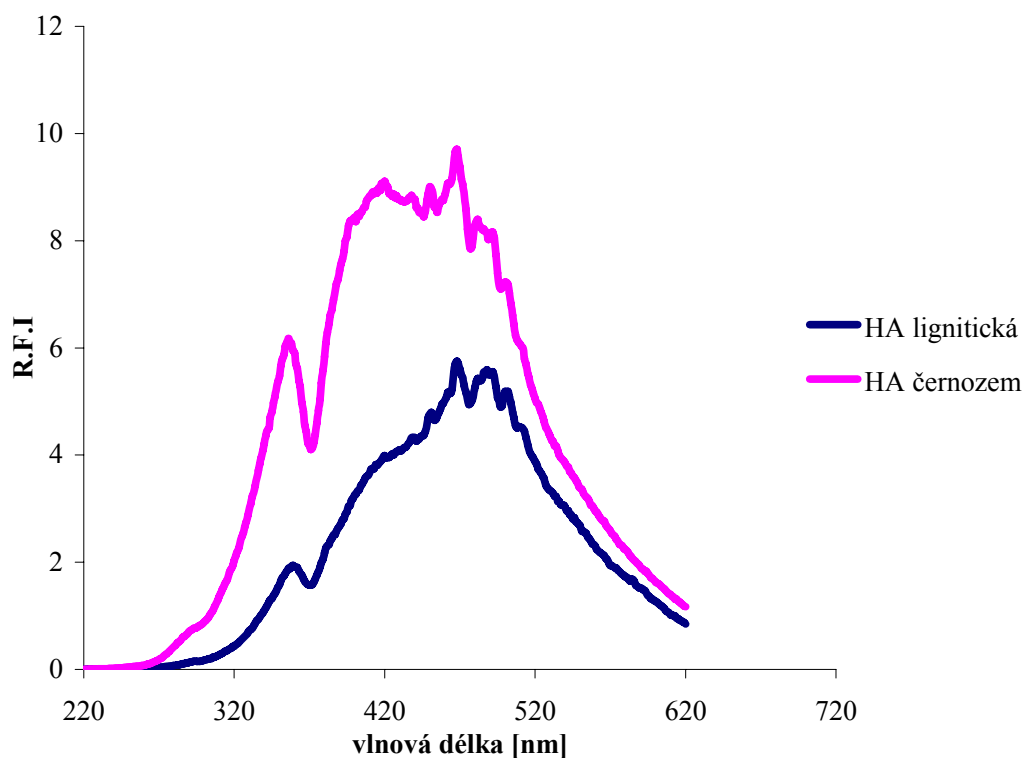
Obr. 10 Synchronní spektrum výluhů půdních vzorků HS.

4.2.1.1 Závěr

Po porovnání SFS spekter se standardem HA Elliot bylo zjištěno, že všechny spektra mají podobný průběh. Spektra černozemě a hnědozemě se dokonce částečně překrývají. Obsah FA ve výlužích půd ovlivňuje emisní pík při 360 nm a rameno při 420 nm díky přítomnosti jednoduchých fenolických sloučenin. Nejvyšší RFI v maximu měl po standardu vzorek Pseudoglej, tento vzorek tedy z ostatních vybraných půd má nejvíce fluoroforní skupiny při $\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$: 468/488. U všech vzorků jsou patrné dvě hlavní maxima při $\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$: 468/488 (maximum 1) a při $\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$: 482/502 (maximum 2), což značí přítomnost vysoce kondenzovaných struktur a aromatických kruhů. Vysoký obsah FA ve vzorku Pseudoglej (17,8 %) koresponduje s vysokou hodnotou RFI při 360 nm. Byl vypočítán fluorescenční index F při poměru relativních intenzit u vlnových délek I_{487}/I_{502} . Pokud by jsme měli k dispozici více vzorků mohli bychom porovnat výsledky fluorescenčních indexů s výsledky frakcionace, nebo se zjištěným stupněm humifikace. U Černozemě Bratčice je tento poměr F (1,14), Hnědozemě (1,13), Pseudogleje (0,99) a u Elliotu (1,08).

4.2.2 Porovnání fluorescenčního chování půdní HA typu Černozem a lignitické HA.

V této části práce bylo úkolem porovnání huminové kyseliny izolované z půdy Černozem a lignitické HA při stejné koncentraci a hodnotě pH. Vzorek Černozemě modální pochází z lokality Bratčice a lignitický vzorek pochází z lokality Mikulčice. Koncentrace vzorků byla $c=0,05 \text{ g dm}^{-3}$, hodnota pH byla 13. Vzorky byly připraveny rozpuštěním huminových kyselin v 0,5 M NaOH na koncentraci $c=0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a pH nebylo nikterak upravováno, pouze byla změřena jeho hodnota. Jelikož se jedná o vzorky izolované z odlišných typu matric huminových látek, domnívali jsme, že se výsledná spektra budou výrazně lišit. To znamená, že maxima budou u vzorků pozorovány v jiných oblastech. Výsledná SFS spektra byla měřená v oblasti od 200 do 600 nm při $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ při (850 V) jsou uvedena na Obr. 11.



Obr. 11 Synchronní spektrum HA lignitu a Černozemě o stejné koncentraci $c=0,05 \text{ g dm}^{-3}$.

Z grafu je patrné, že vyšší intenzitu relativní fluorescence ($\text{RFI}=9,708$) měla HA izolovaná z Černozemě. Půdní HA Černozem a lignitická HA měly stejné hlavní maximum při vlnové délce emise 468 nm, čemuž odpovídá excitace 448 nm při $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$. Další píky, které byly ve spektrech nalezeny jsou znázorněny v následující tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5 Píky pozorované ve spektru HA lignitu a černozemě

Huminové kyseliny (Lokalita)	Pozorované píky při vlnové délce emise [nm]
černozem (Bratčice)	468, 356, 450, 482, 500
lignit (Mikulčice)	468, 359, 488, 501

4.2.2.1 Závěr

Domněnka, že se výsledná spektra budou výrazně lišit se nepotvrdil. Rozdíly v SFS spektru byly pozorovány pouze v oblasti nižších vlnových délek (360 nm), kdy v této oblasti u vzorku půdní HA je vyšší RFI než u HA lignitické. Podle literatury Senesi a kol. (1991) (cit.⁹) patří tyto vzorky do druhé skupiny huminových látek, kde byly specifikovány hlavní excitační píky při 450, 465 a emisní maximum okolo 500–520 nm. Z toho můžeme usuzovat, že i vzorky HA Černozem a HA lignitická do této skupiny patří.

4.2.3 Charakterizace huminových kyselin izolovaných z různých typů černozemí

Záměrem této práce bylo vyhodnocení SFS spekter celkem 10 vzorků černozemí izolovaných z lokalit Vysočiny a Jižní Moravy (pokusné plochy MZLU). V tabulce (Tabulka 6) je přehled měřených vzorků.

Byly navrženy konkrétní vlnové délky, z jejichž hodnot relativních intenzit fluorescence byly vypočteny různé fluorescenční indexy. Celkem byly navrženy tyto fluorescenční indexy: $F = I_{400}/I_{360}$, $F = I_{470}/I_{360}$, $F = I_{465}/I_{399}$. Jako neoptimálnější poměr vlnových délek byl vybrán poměr $F = I_{470}/I_{360}$. Práce směřovala k tomu, abychom navrhli metodu, jak lze pomocí měření fluorescence určit humifikační stupeň. Tento humifikační stupeň je jedním z kritérií kvality huminových látek. Běžně se určuje z frakčního složení (*Sh*) vzorků a dopočítává se. Pro výpočet *Sh* platí:

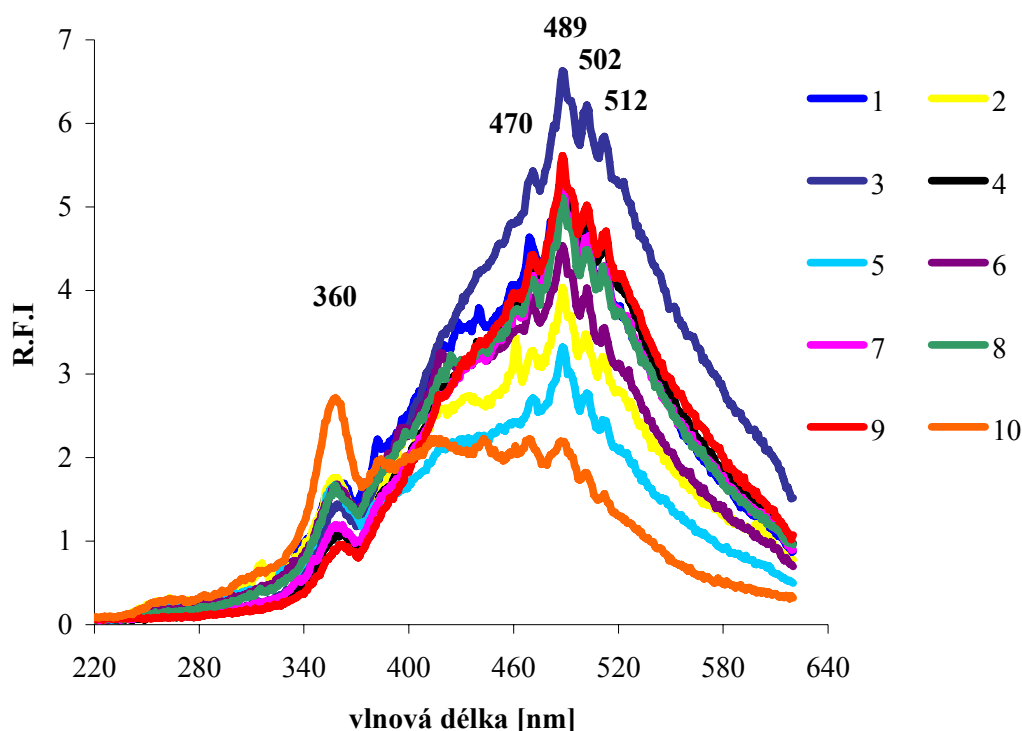
$$Sh = \frac{\Sigma HA}{C_{org}} \cdot 100 \quad (4)$$

Dále byl určen stupeň humifikace Sh^* měřením fluorescence ze SFS spekter při ($\Delta\lambda = 20$ nm). Následně byla provedena korelace mezi fluorescenčním indexem vypočítaným z poměru RFI při vlnových délkách (470/360 nm) a vypočítaným stupněm humifikace *Sh*. Byl nalezen vztah mezi oběma parametry (*F* a *Sh*) a navržena rovnice pro výpočet stupně humifikace z měření fluorescence (metodou SFS). Hodnota vypočítaného stupně humifikace byla určena z následující rovnice: $Sh^* = (0,83 - F)/0,02$. Všechny zjištěné fluorescenční indexy a humifikační stupně Sh^* jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 6 Tabulka měřených půd a lokalit odběru vzorků

Seznam měřených černozezí
1. černozem modální (Bořetice)
2. černozem arenická (Břeží)
3. černozem phaeoic (Dubany)
4. černozem hnědozemní (Kašenec)
5. černozem modální (Ostrožská Lhota)
6. černozem modální (Práce)
7. černozem modální (Syrovice)
8. černozem modální (Zeleč)
9. černozem modální (Hrušovany)
10. černozem hnědozemní (Unčovice)

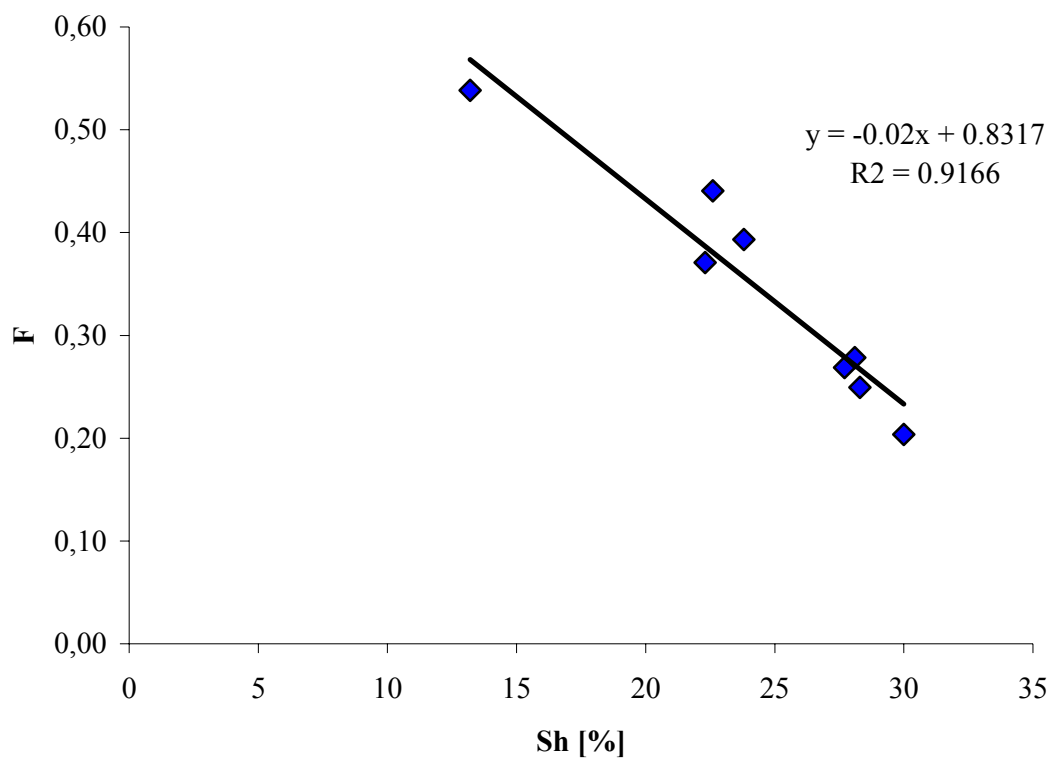
Měřeny byly výluhy vzorků černozezí ve směsi 0,1 M NaOH a 0,1 M roztoku pyrofosfátu, které byly pro měření desetkrát zředěny, hodnota pH byla 12. Všechna synchronní spektra byla snímána při $\Delta\lambda = 20$ nm a při stejné hodnotě napětí 845 V (Obr. 12).



Obr. 12 SFS spektrum vzorků výluhů černozezí o koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a hodnotě pH 12.

Na následujícím grafu (Obr. 13) je uvedena závislost fluorescenčních indexů vypočítaných z poměru vlnových délek $F = I_{470}/I_{360}$ na humifikačním stupni Sh . Mezi tímto fluorescenčním indexem a humifikačním stupněm Sh byla nalezena korelace s $R^2 = 0,92$ pro osm vzorků. Tato závislost posloužila k zjištění humifikačního stupně Sh^* , který byl

vypočítán z rovnice regrese.



Obr. 13 Závislost fluorescenčního indexu $F=I_{470}/I_{360}$ na stupni humifikace u 8 vzorků černozemí

Tabulka 7 Tabulka s uvedeným celkovým obsahem uhlíku C_{org} a obsahu HA s fluorescenčními indexy a stupni humifikace pro 10 vzorků černozemí.

Vzorek	C_{org} [%]	ΣHA [mg/kg]	Sh [%]	Sh* [%]	F [I_{470}/I_{360}]	F [I_{400}/I_{360}]	F [I_{465}/I_{399}]
1.	1,84	4,10	22,3	23	0,37	1,471	1,643
2.	1,51	2	13,2	14,5	0,54	1,343	1,257
3.	2,67	7,4	27,7	28	0,27	1,664	2,092
4.	2,12	6,0	28,3	29	0,25	1,933	1,943
5.	1,25	2,4	19,2	10,5	0,62	1,018	1,506
6.	1,45	3,3	22,6	19,5	0,44	1,444	1,564
7.	1,60	4,5	28,1	27,5	0,28	1,063	1,922
8.	1,64	3,9	23,8	22	0,39	1,455	1,639
9.	2,00	6,0	30	31,5	0,20	1,926	2,112
10.	1,30	3,5	26,9	19,5	0,44	1,388	0,497

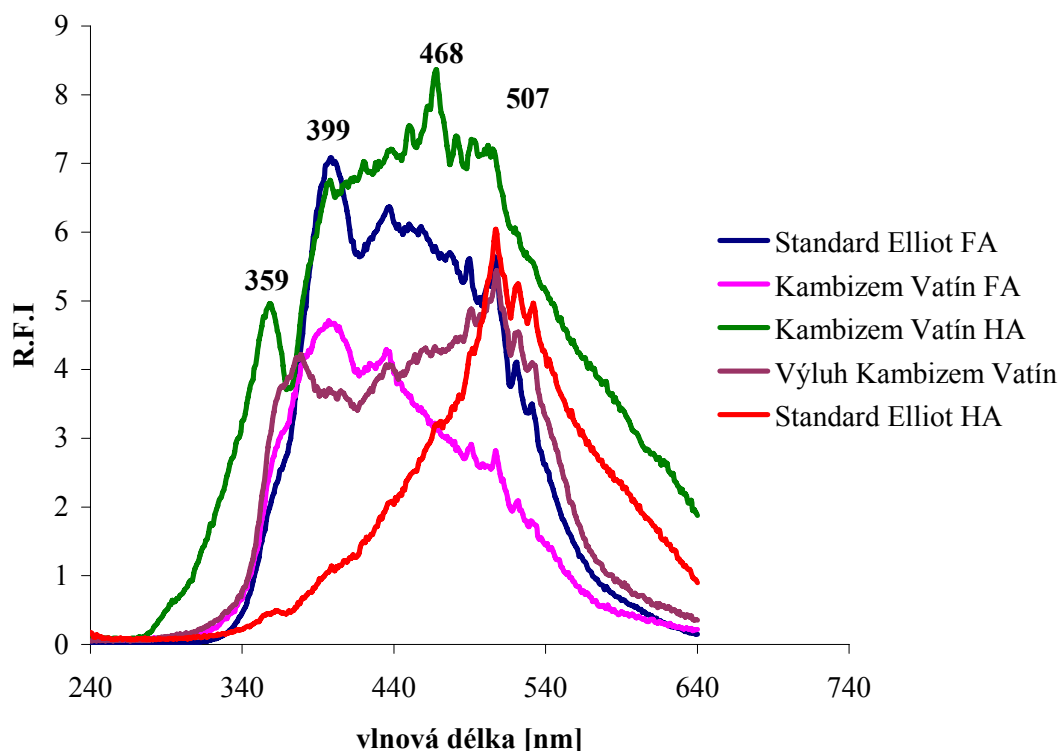
4.2.3.1 Závěr

Při porovnání SFS spekter výluhů huminových látek z černozemí bylo ve všech spektrech identifikováno 5 hlavních píků při: $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$. 340/360, 450/470, **469/489**, 482/502, 492/512 nm. Jako hlavní emisní maximum ve spektru byl nalezen pík s nejvyšší hodnotou RFI při vlnové délce 489 nm a ten byl nejintenzivnější u všech měřených vzorků až na vzorek Unčovice, který měl hodnotu maxima při nižší vlnové délce 360 nm. Vzorek černozemě Dubany měl nejvyšší hodnotu RFI při excitaci 469 nm a emisi při 489 nm, to je způsobeno vysokým obsahem aromatických sloučenin v molekule HA. Předpokládaná emisní vlnová délka větší než 480 nm je spojována s přítomností 5 a více kondenzovaných aromatických kruhů, jako indeno[1,2,3]pyrenu (Kumke a kol. 1995) (cit.⁵⁷). Hodnota humifikačního stupně byla střední v rozmezí od 13,2–30 %. Nejvyšší stupeň humifikace (větší než 27 %) a vysokou hodnotu RFI a zároveň nízký fluorescenční index měly vzorky černozemí Dubany, Kašenec, Hrušovany a Syrovice. Nejnižší hodnota F indexu byla určena u vzorku černozemě Dubany, který byl vyhodnocen jako nejkvalitnější půda z měřených vzorků. Výsledky této práce byly použity pro stanovení humifikačního stupně a bylo zjištěno následně, že výsledky vypočítaného fluorescenčního indexu korelují s hodnotou humifikačního stupně určeného z frakcionace. Tato práce byla součástí výzkumného projektu FCH VUT a MZLU.

4.2.4 Porovnání synchronních spekter HA, FA a výluhu Kambizem Vatín a standardu Elliot FA a HA.

Toto porovnání bylo provedeno z důvodu zjištění, jak se od sebe liší spektra FA a HA kyselin. Dále bylo cílem práce připravit výluh (tedy směs HA a FA) a porovnat výsledky fluorescence se samotnými substancemi. Výsledky spekter HA a FA Kambizem byly srovnány s vzorky standardů u nichž se předpokládala přítomnost stejných hlavních píků.

Výluh Kambizemě Vatín byl připraven ve směsi pyrofosforečnanu a hydroxidu sodného a pro měření byl takto připravený roztok desetkrát zředěn. Ostatní vzorky a standardy HA, FA Elliot byly rozpuštěny v 0,5 M NaOH. Koncentrace vzorků byla $0,05 \text{ g dm}^{-3}$. Synchronní sken všech pěti vzorků byl měřen při napětí 1000V, při konstantním rozdílu mezi excitačním a emisním monochromátorem $\Delta\lambda = 40 \text{ nm}$ v rozsahu od 200 do 600 nm. V synchronním skenu je zaznamenána závislost relativní intenzity fluorescence na vlnové délce (nm) v této práci na emisní vlnové délce. Emisní vlnová délka byla při měnění od 240 po 640 nm, jak je vidět v následujícím obrázku (Obr. 14).



Obr. 14 Synchronní sken huminových látek HA, FA, výluhu Kambizem Vatín a standardů HA, FA Elliot ($\Delta\lambda = 40$ nm).

4.2.4.1 Závěr:

Z uvedeného synchronního kombinovaného grafu bylo zjištěno, že standard Elliot FA a FA Kambizem mají stejný průběh spektra s maximem při $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 359/399$ nm, tedy při nižší vlnové délce než huminové kyseliny HA Kambizem a standard HA Elliot. Pro FA je charakteristické, že hlavní fluorofor je pozorován při nižších vlnových délkách (zpravidla pod 450 nm) než u HA. V případě porovnání výsledků huminových kyselin, byly zjištěny rozdíly ve spektrech. Vzorek HA Kambizem vykazoval maximum intenzity fluorescence při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$. 428/468 a další intenzivní pík při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$. = 319/359. Standard HA Elliot měl hlavní pík při vlnových délkách $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$. = 467/507, podobně jako výluh Kambizem. Dále bylo zjištěno, že vzorek výluhu měl ve spektru celkem dva dominantní píky při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$. = 467/507 nm, 339/379 nm. Tato maxima odpovídají obsahu jak FA tak i HA ve vzorku a proto SFS spektrum obsahuje pík v krátkovlnné (přítomnost FA) i v dlouhovlnné oblasti (přítomnost HA). Fluorescence FA je dána především přítomností relativně jednoduchých fenolických látek, zatímco fluorescence HA je způsobena přítomností kojugovaných fenolických skupin a chinoidů ⁸.

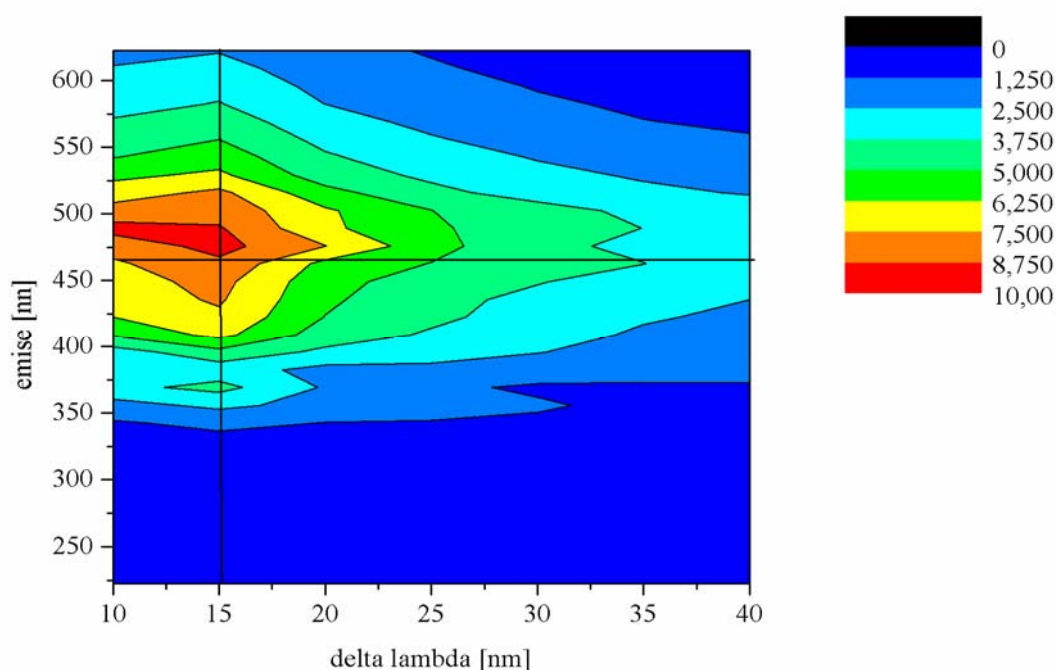
Porovnáním synchronního skenu s $\Delta\lambda = 40$ nm a synchronního 3D skenu HA Kambizem Vatín bylo zjištěno, že emisní pík v 468 nm se shoduje s prvním fluoroforem nalezeným v 3D synchronním spektru (viz kapitola 4.3.4) a i druhý intenzivní emisní pík 507 nm byl nalezen ve vlnové oblasti druhého fluoroforu při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: (401/491–507) nm.

4.3 Charakterizace hlavních fluoroforních skupin metodou 3D SFS

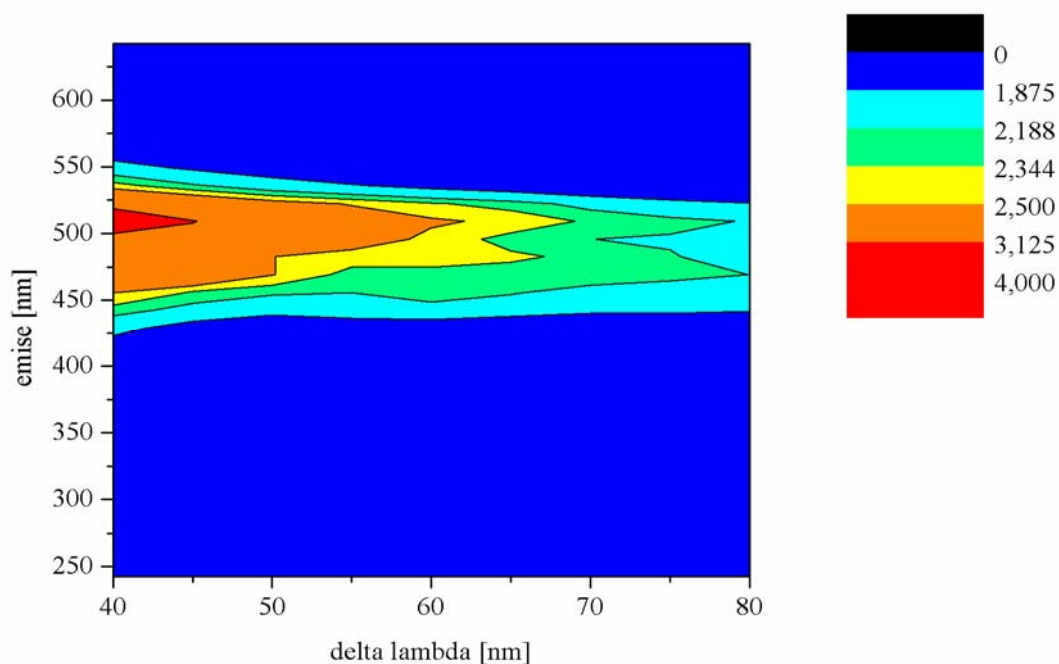
4.3.1 Měření lignitického humátu 04/06 synchronní 3D metodou

Cílem měření synchronním 3D skenem bylo nalézt a identifikovat hlavní píky, které se ve vzorku vyskytují. U 3D synchronní metody se jedná o zpracování synchronních spekter, které se měří při různém $\Delta\lambda$, kdy se postupně mění hodnoty vlnových délek excitace a emise podle vybraného rozdílu $\Delta\lambda$. Naměřená data se pak zpracují v Originu tak, že se vynese závislost RFI na emisní vlnové délce a na rozdílu delta lambda. Vynesením této závislosti získáme emisní maxima a odečtením $\Delta\lambda$ získáme také excitační maxima. Tyto grafy se pak upraví do formy vrstevnicového diagramu (viz. Obr. 15, Obr. 16), kde pak jsou vidět hlavní maxima která odpovídají hlavním fluoroforům. Při postupném zvyšování $\Delta\lambda$ dochází ke změnám intenzity a poloh sledovaných píků.

Vzorek humátu byl rozpuštěn v miliQ vodě na konečnou koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$. 3D sken byl snímán při napětí 850 V za postupného zvyšování konstantní vlnové délky od $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$ do $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$ s krokem 5 nm. Na následujících obrázcích je zobrazen řez spektra, tedy závislost intenzity na $\Delta\lambda$ a emisní vlnové délce.

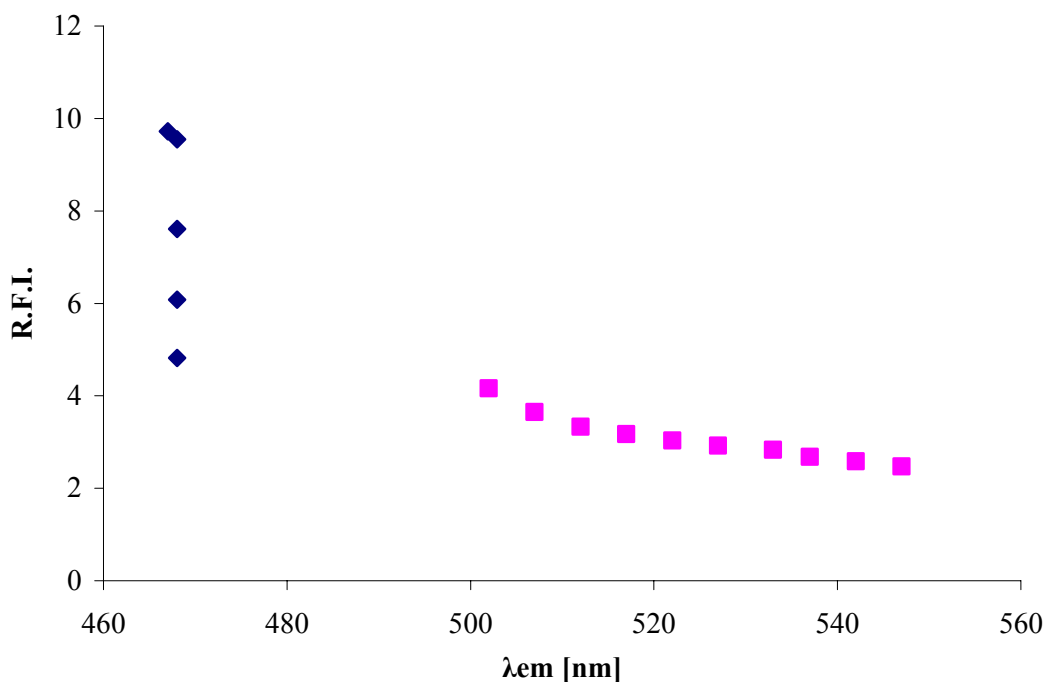


Obr. 15 Vrstevnicový řez synchronního 3D spektra humátu 04/06 o koncentraci $c = 0,05 \text{ g dm}^{-3}$, poloha emisního maxima v 467 nm.



Obr. 16 Vrstevníkový řez synchronního 3D spektra humátu 04/06 o koncentraci $c = 0,05 \text{ g dm}^{-3}$, poloha emisního maxima v 502 nm .

Byly nalezeny dvě hlavní skupiny fluoroforů a to od $\Delta\lambda = 10$ do 30 nm s maximem lokalizovaným při 452/467 nm ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$), další pak od $\Delta\lambda = 35$ do 80 nm s hlavním maximem nalezeným při 467/502 nm ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$). Pak byla vynesena závislost RFI na maximu emisní vlnové délky (Obr. 17) z které je možno vidět, že lignitický humát 04/06 obsahoval dva fluorofory, které jsou znázorněny odlišnými barvami.



Obr. 17 Závislost RFI na maximu emisní vlnové délky [nm] u vzorku lignitického humátu 04/06.

4.3.1.1 Závěr:

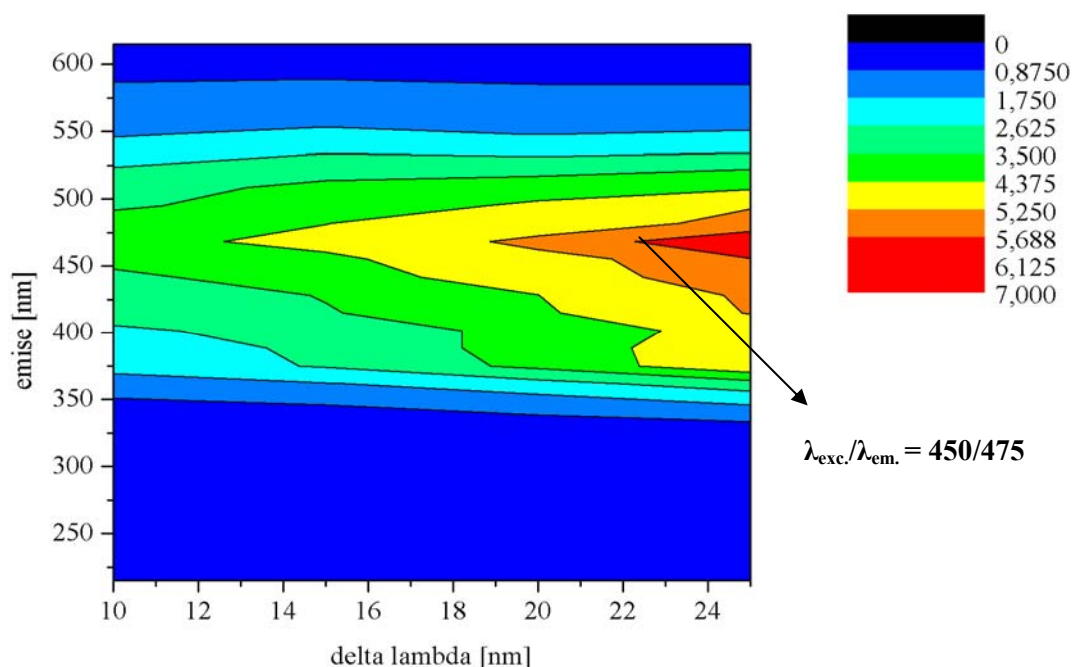
Jelikož tento humát je stejného původu jako lignitická huminová kyselina HAN, chtěli jsme také porovnat jejich fluorescenční maxima zjištěná z SFS při $\Delta\lambda = 20$ nm s výsledky zjištěnými metodou 3D SFS, kde by byly zhodnoceny všechny vlnové délky excitace a emise v oblasti od 200 až 600 nm. Konstantní rozdíl byl v měřené oblasti měněn od $\Delta\lambda$ 10 do 80 nm. Při porovnání výsledků s metodou 2D bylo zjištěno, že tento fluorofor určený při 469 nm emisní vlnové délky a 449 nm excitační vlnové délky je totožný s prvním fluoroforem určeným z tohoto 3D SFS měření.

Změřené spektrum 3D SFS obsahovalo celkem dva hlavní fluorofory. První fluorofor byl nalezen v oblasti konstantní vlnové délky $\Delta\lambda = 10$ nm až do $\Delta\lambda = 30$ nm při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 438\text{--}458/468$. Druhý fluorofor byl nalezen při $\Delta\lambda = 35$ nm až $\Delta\lambda = 80$ nm a to při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 467/502\text{--}547$ nm. První fluorofor má nejvyšší intenzitu fluorescence při $\Delta\lambda$ (15 nm), je nejvíce patrný a proto se nejlépe odečítá. Pokud chceme detekovat druhý fluorofor neoptimálnější je to při $\Delta\lambda = 35$ nm. Tyto hodnoty se s vybraným typem vzorku různí. Znamená to, že při měření neznámého vzorku, je třeba tuto odpovídající hodnotu $\Delta\lambda$.

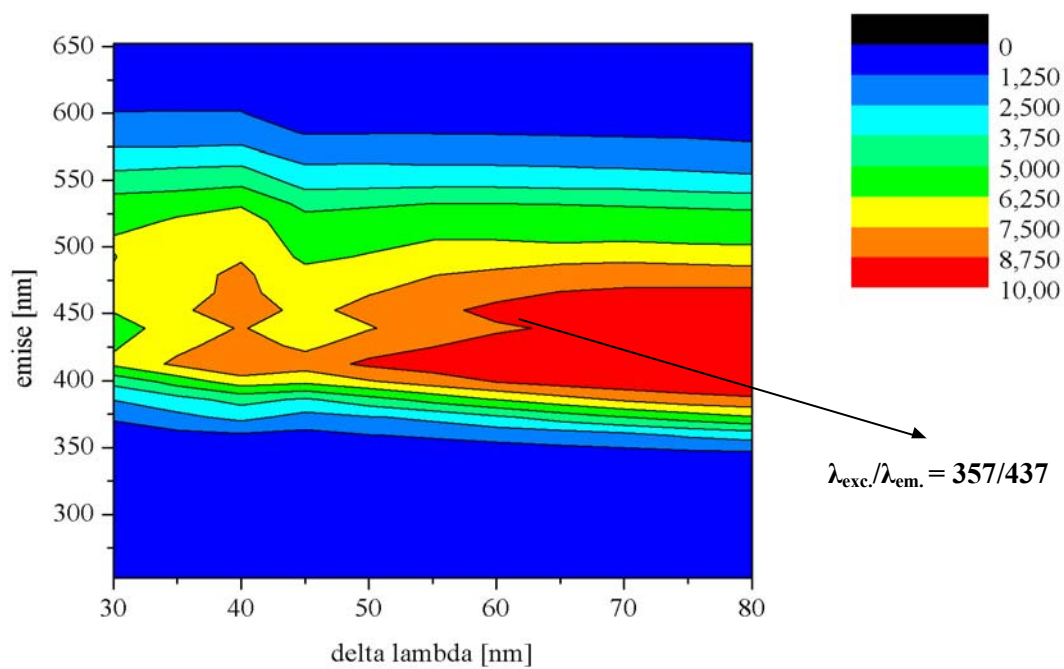
4.3.2 Měření standardu Elliotu FA II synchronní 3D metodou

Měření bylo provedeno obdobným způsobem jako v kapitole 4.3.1. Úkolem tohoto měření bylo zjistit hlavní píky vyskytující se v 3D synchronním spektru standardu FA Elliot. Při měření byla postupně zvyšována hodnota $\Delta\lambda$, což způsobí odkrytí dříve nerozlišených píků v emisním spektru a dochází k změnám poloh píků a jejich hodnot RFI.

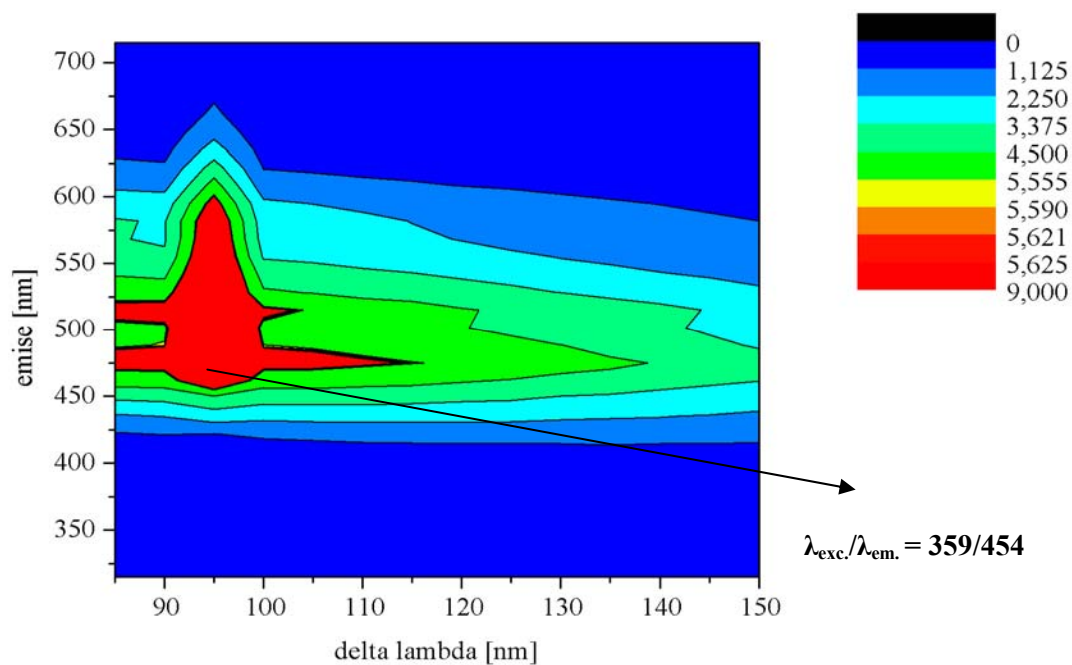
Synchronní sken byl snímán od 200 po 600 nm s postupným zvyšováním $\Delta\lambda$ od 10 do 150 nm s krokem 5 nm při napětí 900 V. U dvou-dimensionálního synchronního skenu je vynesena závislost RFI na emisní vlnové délce a tří-dimensionálního synchronního skenu představuje závislost RFI na emisní vlnové délce a na rozdílu delta lambda ($\Delta\lambda$). Tyto grafy jsou zpracovány v programu OriginPro 6.1. Takto vytvořená synchronní 3D spektra jsou znázorněna Obr. 18 s $\Delta\lambda$ od 10 do 25 nm, Obr. 19 s $\Delta\lambda$ od 30 do 80 nm a Obr. 19 s $\Delta\lambda$ 85 o 150 nm.



Obr. 18 Vrstevnicový diagram synchronního 3D spektra standardu Elliot FA s prvním fluoroforem od $\Delta\lambda$ 10 po 25 nm.

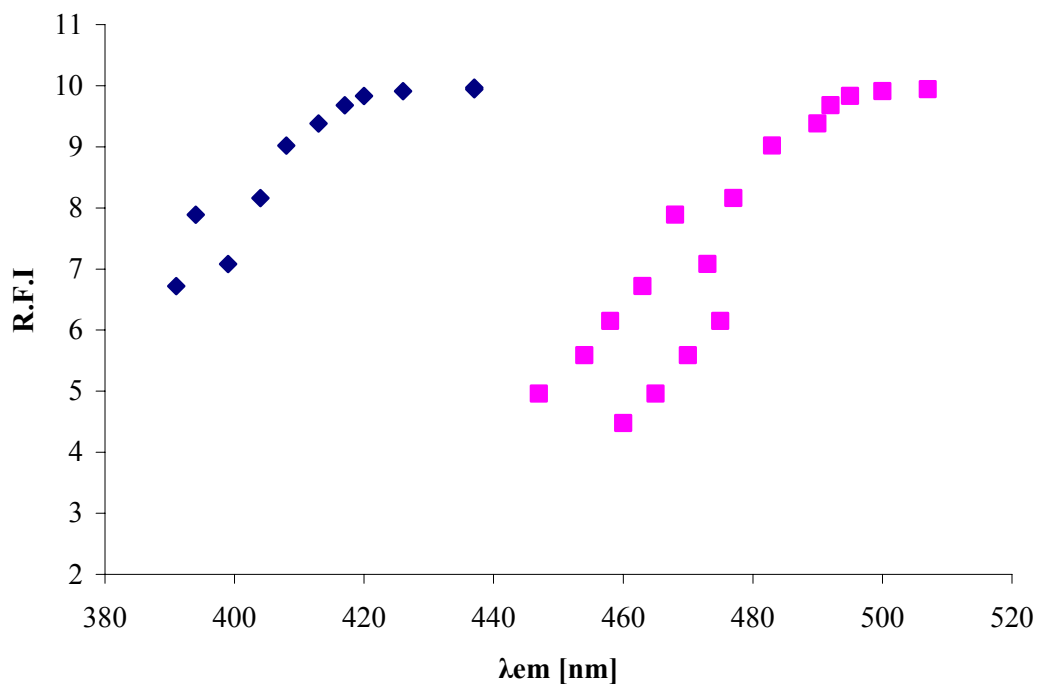


Obr. 19 Vrstevnicový diagram synchronního 3D spektra standardu Elliot FA s druhým fluoroforem při $\Delta\lambda$ 30 až 80 nm.



Obr. 20 Vrstevnicový diagram synchronního 3D spektra standardu Elliot FA s třetím fluoroforem od $\Delta\lambda$ 85 do 150 nm.

Měřená spektra v rozsahu od $\Delta\lambda$ 10 po 150 nm sebou přinesla charakterizaci tří zcela odlišných fluoroforů, což je patrné z uvedených obrázků. Proto byly spektra rozděleny do tří různých vlnových oblastí, které jsou charakteristické jedním fluoroforním centrem. Fluoroforní centrum je v obrázku znázorněno maximem o nejvyšší intenzitě (červená oblast). První oblast pro nalezení hlavního fluoroforu byla vybrána od $\Delta\lambda$ 10 do 25 nm a odpovídala maximumu při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 450/475$. Druhá oblast od $\Delta\lambda$ 30 do 80 nm obsahovalo maximum při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 357/437$ a třetí oblast od $\Delta\lambda$ 85 po 150 nm měla maximum určeno při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 359/454$ nm. Ačkoliv jsou v standardu Elliot FA přítomny tři fluoroforní centra zařazujeme je pouze do dvou skupin. Toto rozdělení znázorňuje Obr. 21, kdy byla vynesena závislost RFI na emisní vlnové délce.



Obr. 21 Závislost RFI na maximu emisní vlnové délky standardu FA Elliotu.

4.3.2.1 Závěr:

Ve spektru byly tedy nalezeny celkem dvě fluoroforní skupiny. První fluorofor byl nalezen při $\Delta\lambda = 10$ nm až $\Delta\lambda = 25$ nm a to při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 450/460–475 a k této skupině patří i fluorofor, který je ve vlnové oblasti od $\Delta\lambda$ 85 nm do 150 nm při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 357/442–507. Získané výsledky ze skenu $\Delta\lambda$ 85 nm do 150 nm (fluorofor 357/442 nm) považujeme za přesnější než první sadu měření a výsledky jsou v souladu s literárními údaji (Senesi 1991) (cit.⁹). Druhý fluorofor byl nalezen při $\Delta\lambda = 30$ nm až 80 nm a to okolo $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 360/390–437. První fluorofor měl nejvyšší intenzitu fluorescence při $\Delta\lambda = 25$ nm a $\Delta\lambda = 80$ nm. Druhý fluorofor má nejvyšší intenzitu při $\Delta\lambda = 150$ nm a tedy druhý fluorofor je nejlépe měřitelný při tomto konstantním vlnovém rozdílu.

Vzorek standardu Elliot Soil FA II byl objednan od společnosti IHSS. Fluorescenční

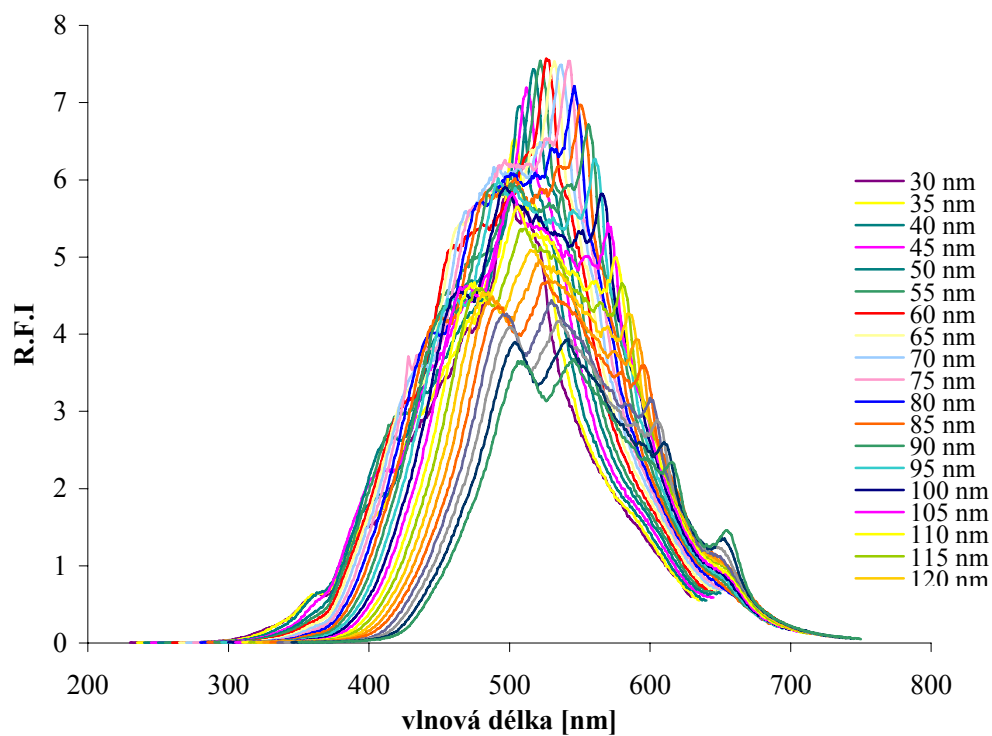
spektra tohoto a jiných standardů jsou popsána v práci Alberts a Takács⁵⁸, kde lokalizovali dvě maxima. Maximum 1 při $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 226/432$, tedy v oblasti nízkých vlnových délek a maximum 2 při $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 322/434$. Tyto píky byly získány odlišnou metodou než která, byla použita v tomto experimentu a to z 3D excitačně-emisního spektra, kdy je narozdíl od našeho měření místo závislosti RFI na emisi a na $\Delta\lambda$ vynesena závislost RFI na excitační a emisní vlnové délce.

Porovnáním našich výsledků a výsledků Alberts bylo zjištěno, že druhé nalezené maximum v oblasti $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 322/434$ nm je přibližně stejné s naší hodnotou nalezeného druhého emisního maxima v 437 nm. Dále porovnáním výsledků z tohoto 3D SFS s výsledky SFS vzorku fulvokyseliny Kambizem bylo zjištěno, že oba vzorky obsahují první pík při shodných vlnových délkách excitace (359 nm).

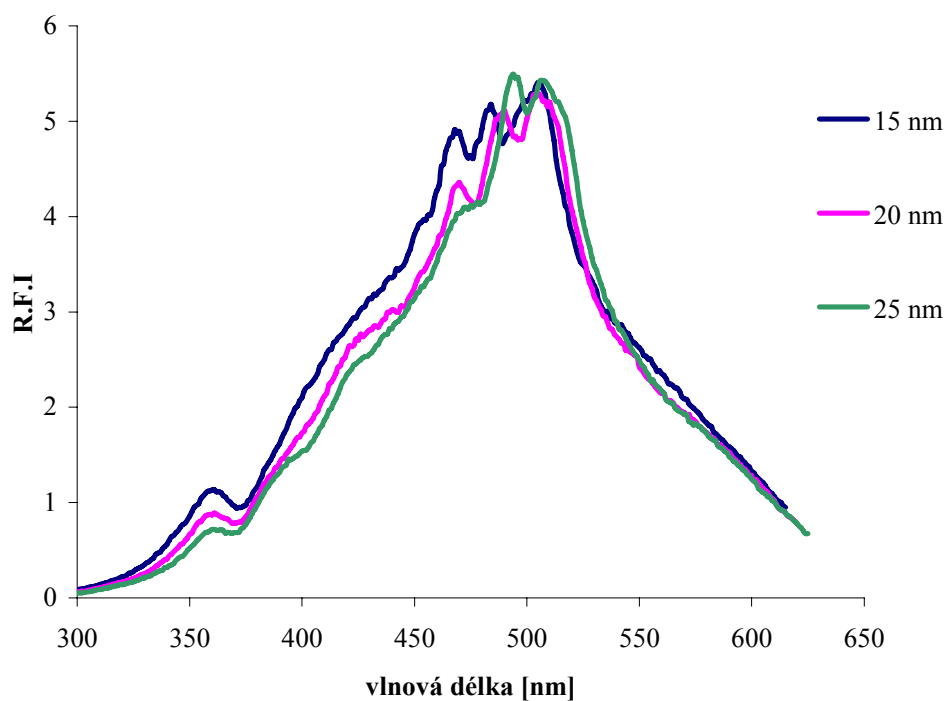
4.3.3 Charakterizace hlavních fluoroforů směsi HA Černozem a kompostu

Charakterizována byla směs HA Černozem a kompost. Vzorek půdy je typu Černozem hnědozemní a kompost byl připraven z listů a trávy, kdy lokalita odběru byla Praha Ruzyně. Stejně jako u předešlého měření bylo úkolem zjistit všechny fluorofory, které se vyskytují v této směsi, přičemž hlavní maximum by mělo odpovídat HA Černozem a druhé vedlejší maximum kompostu. Dále bylo záměrem zjistit při které $\Delta\lambda$ je vhodné měřit, tzn. při které $\Delta\lambda$ byla nejvyšší intenzita hledaného fluoroforu. Na identifikaci hlavních fluoroforů byla použita metoda 3D synchronní fluorescenční spektroskopie s postupným zvyšováním $\Delta\lambda$ od 15 nm do 150 nm s krokem 5 nm. 3D spektrum pro tento vzorek nebylo zpracováno v Originu, ale v programu Excel, kdy byly vybrány podle maxim řady synchronního skenu s různou hodnotou rozdílu $\Delta\lambda$.

Vzorek kompostu byl rozpuštěn v 0,5 M NaOH na konečnou koncentraci 0,05 g dm⁻³. Synchronní sken byl snímán při napětí 800 V a nastavení štěrbin 8 nm. Řada naměřených spekter s různou hodnotou $\Delta\lambda$ byla rozdělena do následujících grafů (Obr. 22 a 23). Byly nalezeny dvě hlavní skupiny fluoroforů. Obr. 22 obsahuje synchronní spektra od $\Delta\lambda$ 30 do 150 nm a druhý graf (Obr. 23) obsahuje synchronní spektra s $\Delta\lambda$ od 15 nm do 25 nm .



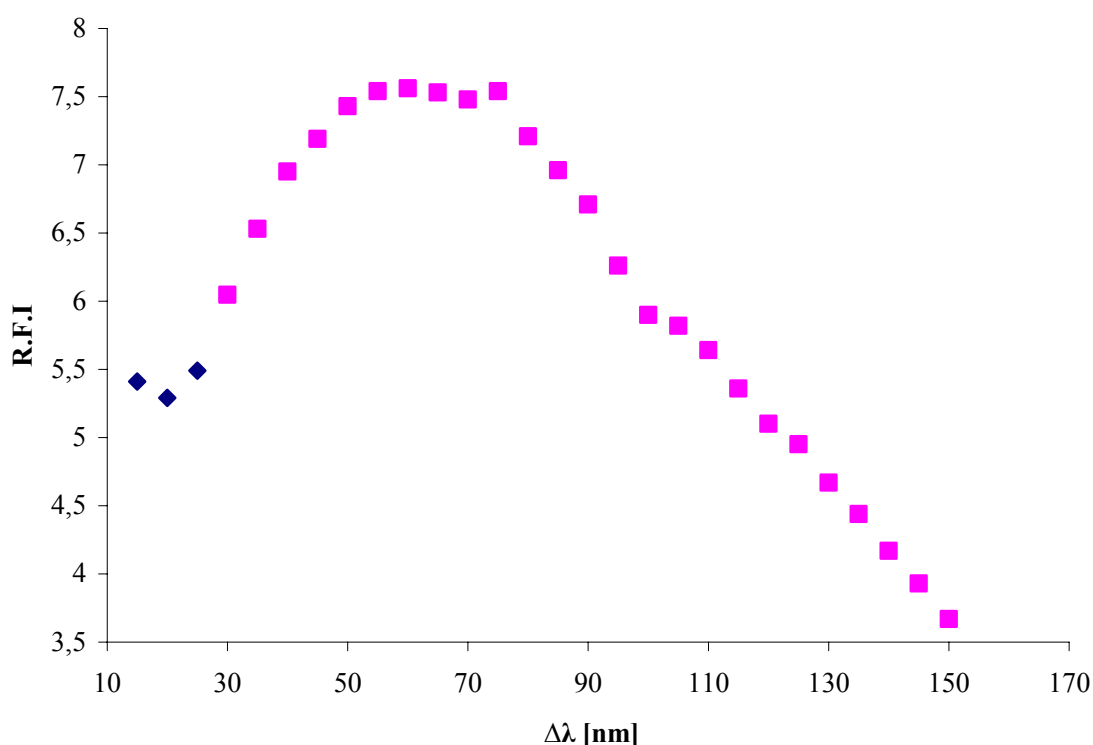
Obr. 22 Synchronní spektrum směsi HA Černozem a kompost (první fluorofor).



Obr. 23 Synchronní spektrum směsi HA Černozem a kompost (druhý fluorofor).

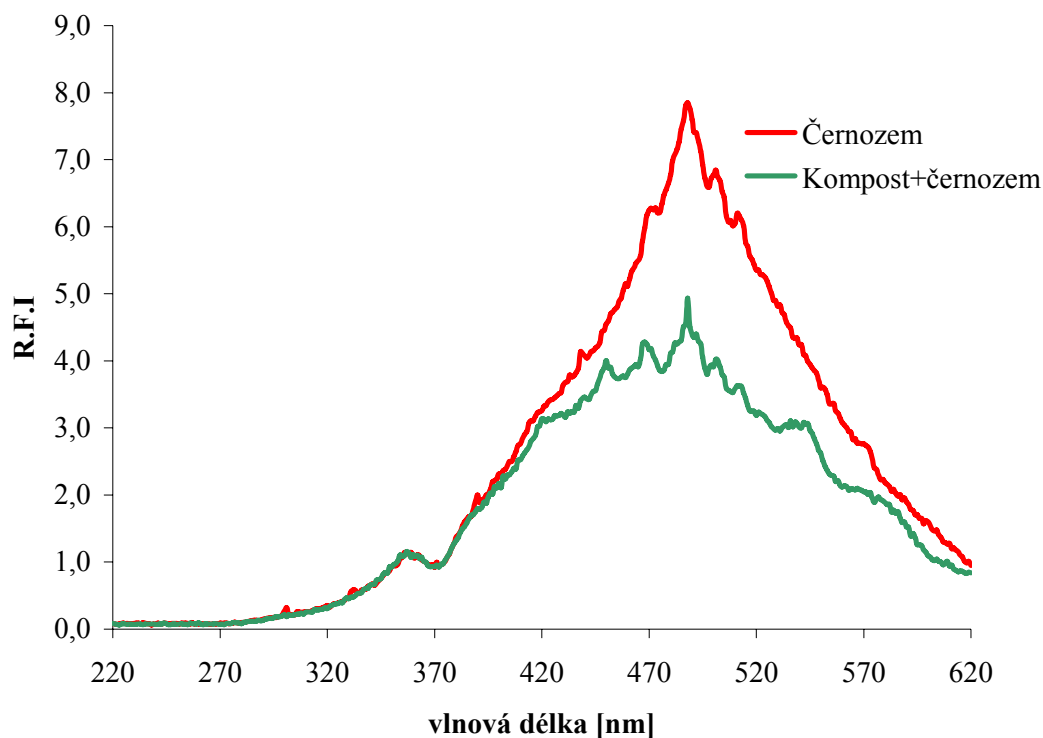
Ze synchronní spekter byly pro jednotlivé $\Delta\lambda$ odečteny polohy maximálních píků vyskytujících se fluoroforů. SFS spektrum měřené v emisním modu je vyjádřeno závislostí relativní intenzity fluorescence RFI na emisní vlnové délce a excitaci zjistíme odečtením $\Delta\lambda$ od emisní vlnové délky. Tímto způsobem byly pro jednotlivé skupiny fluoroforů odečteny fluorescenční maxima. Pro první skupinu fluoroforů od $\Delta\lambda$ 30 až 150 nm byla lokalizována maxima v oblasti vlnových délek 466/526–550 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$). Pro druhou skupinu do níž patří oblast od $\Delta\lambda$ 15 až 25 s maximem lokalizovaným ve vlnové oblasti 485/505 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$).

Aby bylo patrné, že se ve spektru vyskytují dvě skupiny fluoroforů, uvedla jsem následující Obr. 24 na němž je znázorněna závislost relativní intenzity fluorescence na konstantním vlnovém rozdílu $\Delta\lambda$. Tyto dvě skupiny fluoroforu jsem od sebe odlišila dvěma různými barvami.



Obr. 24 Závislost relativní intenzity fluorescence na konstantní vlnové délce $\Delta\lambda$ směsi HA Černozem a kompostu Praha.

Jelikož jsme z tohoto měření nedokázali rozlišit jaké maximum patří půdě a jaké směsi kompostu a půdy a protože nebyla k dispozici čistá HA z kompostu, bylo ještě dodatečně vyneseno synchronní spektrum těchto vzorků samostatně při $\Delta\lambda = 20$ nm. Z následujícího obrázku plyne (Obr. 25), že nebyl nalezen rozdíl mezi hlavními píky měřených vzorků. Hlavní pík obou vzorků byl určen při stejné vlnové délce 488 nm, což znamená, že se neprojevil v případě tohoto typu měření vliv kompostu. Spektrum směsi HA Černozemě a kompostu obsahovalo ještě dva píky, které byly pozorovány při 450 a 470 nm.



Obr. 25 Synchronní spektrum HA Černozem a směsi HA Černozem a kompost při $\Delta\lambda = 20$ nm.

4.3.3.1 Závěr

Měřením 3D synchronních spekter jsme zjistili, že směs HA Černozem a kompost Praha obsahovala dvě hlavní fluoroforní skupiny. První byla nalezena v oblasti od $\Delta\lambda$ 30 až 150 nm a to při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 466–465/526-550 a druhé fluoroforní maximum v oblasti $\Delta\lambda$ od 15 do 25 nm při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 485–490/505. První fluorofor je neoptimálnější měřit při $\Delta\lambda = 60$ nm a druhý při $\Delta\lambda = 25$ nm, protože v této oblasti byly tyto fluorofory nejvýraznější a nejlépe se odečítaly.

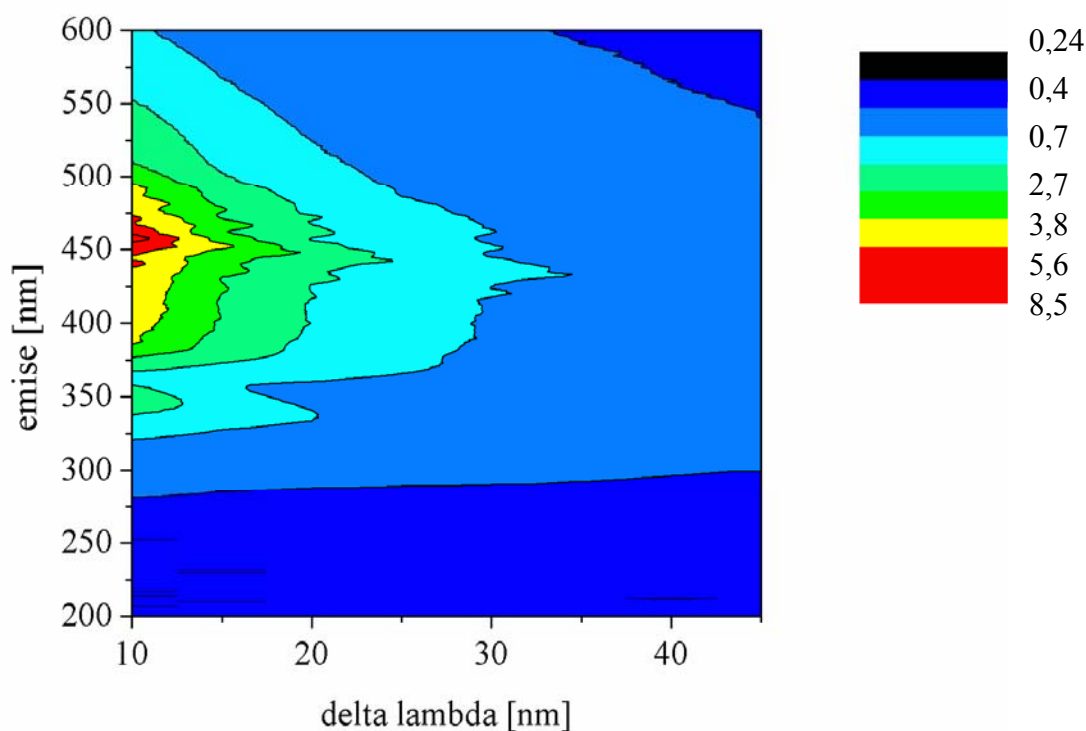
K charakterizaci fluorescenčních maxim 2D synchronním skenem při $\Delta\lambda = 20$ nm jsme měli k dispozici pouze HA izolovanou z Černozemě a HA izolovanou ze směsi Černozem a kompost. Kdyby byl k dispozici vzorek HA izolovaný z kompostu mohli bychom tyto vzorky lépe porovnat a najít případné rozdíly. Měření při zvoleném nastavení mezi monochromátory $\Delta\lambda = 20$ nm není optimální pro rozlišení těchto vzorků a nebyl zjištěn vliv kompostu. Z různých studií víme, že HA izolované z kompostu mají maximum při nízkých vlnových délkách, což dokazuje studie Pedry a kolektivu⁴⁴, kteří sledovali vliv přídavku kompostu k půdám. Měřili 3D EEM spektrum, kdy charakterizovali hlavní fluoroforní centrum pro HA komunálního kompostu při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$ vlnovém páru 340/440 nm, zatímco HA u půdy Haplic Podzol a Calcic Vertisol určili maximum při vyšších vlnových délkách a to při $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$: 440/513 nm a rameno při kratší excitační a emisní vlnové délce.

Převaha fluorescenčních píků a pásů s vysokou relativní intenzitou při kratších vlnových délkách naměřených u komunálního kompostu může být způsobena přítomností jednoduchých strukturálních jednotek široké molekulární heterogenity a malé molekulové hmotnosti, nízkého stupně aromatické polykondenzace a nízkého humifikačního stupně.

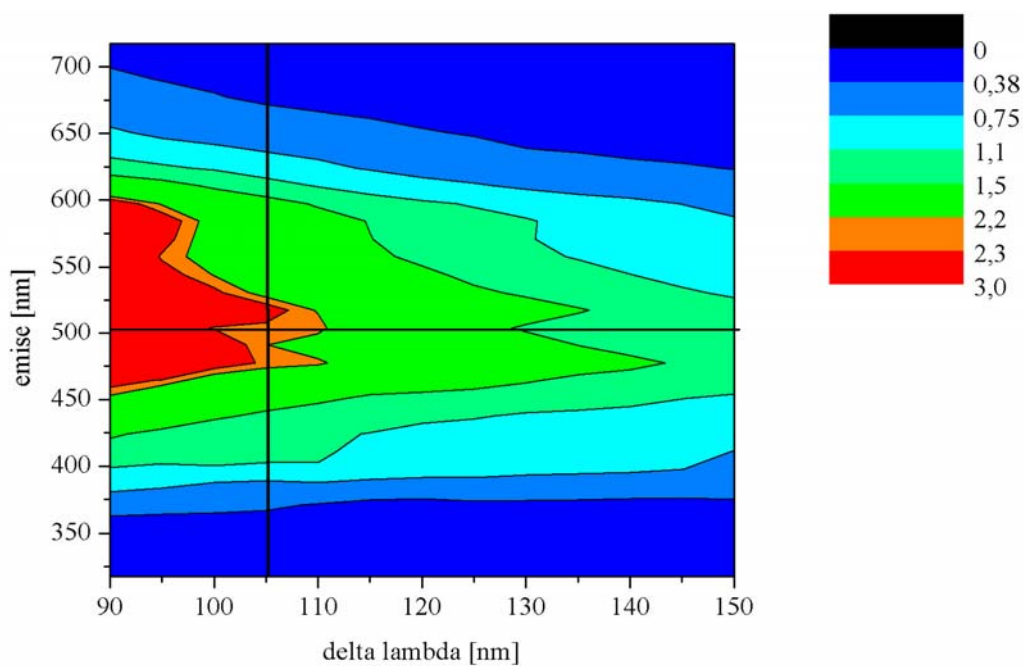
Podle Senesiho je zde uvedeno několik fluoroforu, které mají hlavní molekulární jednotky přispívající k fluorescenci v tomto rozsahu excitačně–emisních délek. Například je to hydroxykumarin (320–343/415–475 nm), deriváty chromonu při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ vlnovém páru (320–346/409–490 nm), flavonu a isoflavonu při $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 313–365/415–475 nm a další. Naproti tomu převaha fluorescenčních pásů s vysokou relativní intenzitou při dlouhých vlnových délkách naměřených u HA půd Haplic Podzol a především Calcic Vertisol je přisuzována přítomnosti lineárně-kondensovaných sítí aromatických kruhů. Aplikace komunálního kompostu do půd způsobila v excitačním spektru mírné zvýšení relativní intenzity fluorescence ramen a pásů při kratších vlnových délkách a mírné snížení excitačních a emisních vlnových délek hlavních fluoroforu v (EEM), pouze o 2 nebo 3 nm

4.3.4 Měření HA Kambizemě Vatín synchronní 3D metodou

Stejně jako předchozí vzorky byla i HA Kambizemě Vatín charakterizována synchronní 3D metodou. Byl připraven vzorek o koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ a měřen při napětí 800 V. Měřená spektra byla v rozsahu 200–600 nm a nastavení $\Delta\lambda$ bylo měněno od 10 do 150 nm. Cílem práce bylo nalezení hlavních fluoroforů vzorku HA Kambizemě Vatín. Synchronním měřením při jednom nastavení $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ nebylo tyto hlavní fluorofory možné určit. Nejprve byla hledána optimální hodnota $\Delta\lambda$. Ze získaných dat bylo zjištěno, že při postupném zvyšování $\Delta\lambda$ dochází ke změnám poloh sledovaných píků a také ke změnám relativní intenzity fluorescence. Ve vzorku HA Kambizem (Vatín) byly zjištěny dvě hlavní fluoroforní skupiny, které byly lokalizovány ve dvou 3D spekter (Obr. 26, Obr. 27). První 3D synchronní spektrum bylo zaznamenáno od $\Delta\lambda$ 10 až 85 nm s polohou maxima lokalizovaného v 458/468 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$) a druhé synchronní 3D spektrum je zobrazeno od $\Delta\lambda$ 90 po 150 nm s polohou maxima při 396/501 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$).

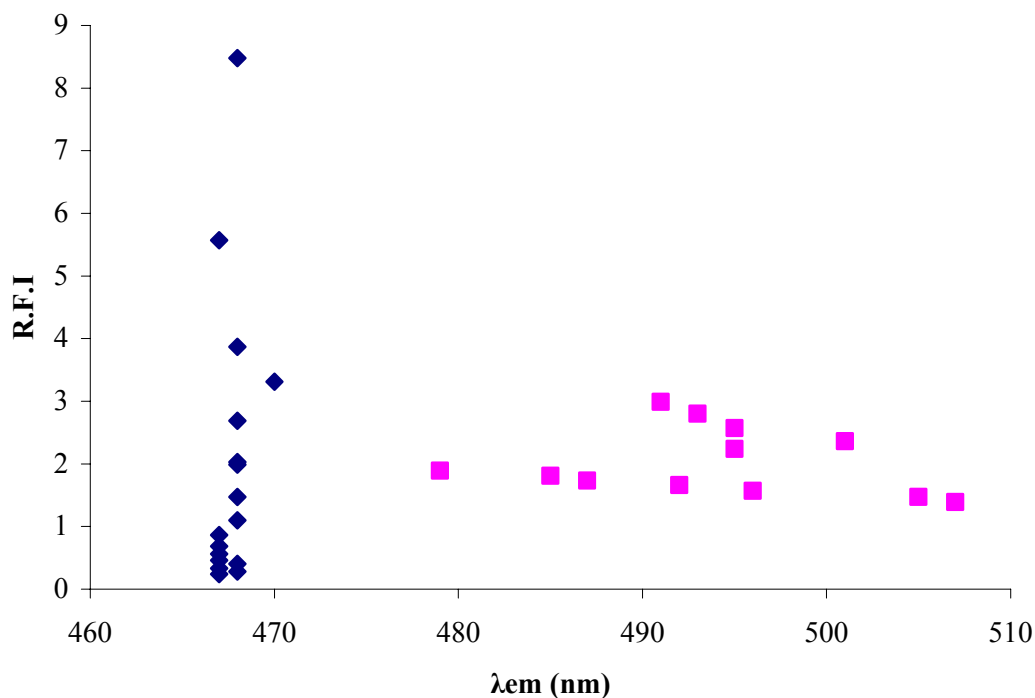


Obr. 26 Vrstevnicový řez synchronního 3D spektra HA Kambizemě Vatín od $\Delta\lambda = 10$ do 85 nm s polohou maxima při 458/468 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em.}$).



Obr. 27 Vrstevnicový řez synchronního 3D spektra HA Kambizemě Vatín od $\Delta\lambda = 90$ do 150 nm s polohou maxima při 396/501 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$).

Pro ilustraci výběru hodnot $\Delta\lambda$ pro vrstevnicový diagram byla sestrojena závislosti RFI na konstantním vlnové délce emise (Obr. 28). Z následujícího grafu je patrná přítomnost dvou fluoroformních skupin.



Obr. 28 Závislost RFI na maximu emisní vlnové délky HA Kambizemě Vatín o koncentraci $0,05 \text{ g dm}^{-3}$.

Závěr:

Nalezené fluoroformní skupiny v 3D SFS spektru HA Kambizemě Vatín byly v následujících oblastech. První skupina fluoroforů byla lokalizována v oblasti 458/467–468 ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$) a druhá skupina fluoroforů v oblasti 357–401/491–507 ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$). Nejvyšší intenzitu fluorescence mělo emisní maximum při $\Delta\lambda$ 10 a 105 nm. Podle těchto výsledků bylo zjištěno, že optimální hodnota $\Delta\lambda$ je právě 10 a 105 nm. Při těchto hodnotách je optimální měřit 2D SFS spektra, z důvodu nejvyšších intenzit hlavních píků. Zjištěné první maximum při 458/468 ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$) bylo podobné jako maximum nalezené u lignitického humátu 04/06 při 452/467 nm ($\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$). V případě druhého maxima byla shodná pouze emisní vlnová délka při 501 nm, zatímco excitační vlnová délka se již výrazně lišila.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na měření fluorescence jak lignitických tak i půdních huminových látek. Výsledky fluorescenčních spekter vzorků byly porovnány se standardy IHSS (FA Elliot a HA Elliot). Půdní vzorky HA, FA byly izolovány z půdních typů: černozem, hnědozem, pseudoglej, kambizem. Hlavním záměrem práce bylo rozlišení hlavních píků synchronní metodou. V této práci byla zvolena metoda synchronní fluorescenční spektroskopie (SFS) a metoda 3D synchronní spektroskopie (3D SFS). SFS metoda je založena na měření při jednom zvoleném rozdílu vlnových délek mezi monochromátory a proto lze pozorovat jen fluorofory které mají mezi excitací a emisí tento zvolený interval (např. $\Delta\lambda = 20$ nm). Proto byla k charakterizaci hlavních přítomných fluoroforů v HS zvolena následně i metoda 3D SFS, která je založena na zpracování synchronních spekter, která se měří při různém nastavení $\Delta\lambda$. Naměřená data se následně zpracují do matice a vytvoří se prostorový graf (např. v programu Origin), kde je vynesena závislost relativní intenzity fluorescence na emisní vlnové délce (v našem případě) a na rozdílu $\Delta\lambda$. Z vytvořených 3D spekter je následně vytvořen řez spektra, který je v této práci uveden. Při měření 3D SFS je postupně zvyšována hodnota intervalu $\Delta\lambda$ mezi excitačním a emisním monochromátorem, což způsobí odkrytí dříve nerozlišených píků. Ve 2D SFS spektrech huminových látek se nachází píky a pásy emisních (nebo excitačních maxim) podle zvoleného modu měření, které odpovídají přítomnosti více fluoroforů v závislosti na použitém nastavení $\Delta\lambda$. To je v souladu s tvrzením, že HS jsou směsí látek.

Z prvních experimentů bylo zjištěno, že optimální hodnota koncentrace pro vzorky lignitických huminových kyselin pro měření fluorescence je $0,05 \text{ g dm}^{-3}$. V případě měření vzorků půdních huminových látek byla zvolena stejná koncentrace.

V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty nalezených maxim jednotlivých vzorků pomocí dvou metod měření fluorescence (Tabulka 8, Tabulka 9).

Tabulka 8 Souhrnná tabulka polohy fluorescenčních maxim při $\Delta\lambda = 20$ nm.

	SFS $\Delta\lambda = 20$ nm	
	Maximum 1	Maximum 2
Název vzorku	$(\lambda_{exc}/\lambda_{em.})$	$(\lambda_{exc}/\lambda_{em.})$
humát 22/11	448/468	468/488
lignitická HAN	448/468	468/488
výluh HS Černozem (Bratčice)	468/488	482/502
výluh HS Pseudoglej (Kameničky)	468/488	482/502
výluh HS Hnědozem (Veverské Knínice)	468/488	482/502
HA Černozem (Bratčice)	448/468	
Výluhy z půd typu černozem (Vysočina a Jižní Morava)	469/489	482/502
Černozem hnědozemní (Praha)	468/488	

Tabulka 9 Souhrnná tabulka poloh 3D SFS maxim a SFS maxim při $\Delta\lambda = 20$ a 40 nm.

Název vzorku	3D SFS		2D SFS $\Delta\lambda = 20$ [nm]	2D SFS $\Delta\lambda = 40$ [nm]
	Maximum 1 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$)	Maximum 2 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$)	Maximum 1 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$)	Maximum 1 ($\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$)
humát 04/06	452/467	467/502	448/468	
HA Kambizem	458/468	396/501		428/468
Elliot HA			468/488	467/507
FA Kambizem				359/399
Elliot FA	357/437	450/475		359/399
směs HA Černozem a kompost (Praha)	466/526–550	485/505		

Z uvedených výsledků 2D SFS poloh hlavních piků plyne, že chování všech sledovaných půdních huminových kyselin je podobné, to znamená, že byla nalezena maxima při stejných vlnových délkách emise. Předpokládá se, že vzorky HA obsahují více aromatické látky a proto fluoreskují při vyšších vlnových délkách než fulvokyseliny. V případě vzorků FA, které měly maxima při nižších vlnových délkách se předpokládá, že obsahují jednoduché fenolické látky. Protože spektra 2D SFS obsahují větší počet piků, než emisní spektra bylo cílem této práce najít hlavní fluorofory přítomné ve vybraných vzorcích metodou 3D SFS.

V této části práce bylo zjištěno, že nalezené hlavní fluorofory studovaných huminových látek odpovídají literárním údajům Alberts a Takács (2004)⁵⁸.

U prvních dvou vzorků, tedy u lignitického humátu 04/06 a HA Kambizemě byl nalezen hlavní pik při vlnových délkách excitace/emise $\sim 450/470$ nm. Zatímco při porovnání jejich druhého maxima došlo k výraznému posunu píku v oblasti excitace. Tyto změny byly pozorovány jen u tohoto píku. V případě vzorku Elliot HA nebylo 3D SFS měřeno. Tento vzorek však má podle literatury hlavní fluorofor při stejné vlnové délce excitace 467 nm jako výsledek při měření 2D SFS. Hodnota pozice píku při emisní vlnové délce je posunuta k vyšší vlnové délce (534 nm)³⁸.

Pokud porovnáme výsledky 3D SFS a SFS vzorku fulvokyseliny Kambizem se standardem FA, pak lze konstatovat, že byl nalezen první pik při shodných vlnových délkách excitace.

Z výsledků 3D SFS vzorku směs HA Černozem a kompost byly lokalizovány dva fluorofory při excitaci $\sim 466\text{--}465/526\text{--}550$ nm a 485/505 nm. Vliv kompostu na posun píků nebyl ověřen, protože nebyl k dispozici samotný kompost.

V práci byly shrnuty výsledky měření fluorescence výluhů půdních vzorků černozemí, kde devět vzorků z deseti mělo stejnou hodnotu emisního maxima při 489 nm. U všech vzorků byl vypočítán fluorescenční a humifikační index mezi nimiž byla nalezena korelace pro osm vzorků.

6 SEZNAM SYMBOLŮ

HA – huminová kyselina

FA – fulvokyselina

2D SFS – dvou-dimensionální synchronní fluorescenční spektroskopie

3D SFS – tří-dimensionální synchronní fluorescenční spektroskopie

RFI – relativní intenzita fluorescence

SHA – půdní huminová kyselina

LHA – lignitická huminová kyselina

$\Delta\lambda$ – konstantní vlnový rozdíl mezi excitačním a emisním monochromátorem

π, σ – typy elektronů

F – fluorescenční index

I_s – synchronní fluorescenční intenzita

ϕ_f – kvantová účinnost

c – molární koncentrace

ε – molární absorpční koeficient

$\lambda_{em.}$ – emisní vlnová délka

$\lambda_{exc.}$ – excitační vlnová délka

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

¹ KUČERÍK, J., et al. Conformational behavior of Lignite humic Fractions separated by sequential pH-extractions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, vol. 12, no. 7, s. 683–688.

² COOKE, J., HAMILTON-TAYLOR, J., TIPPING, E. Cation Binding by Soil Humic Substances in situ. FRIMMEL, F.H., ABBT-BRAUN, G. *Humic substances–Linking Structure to Functions*. 45th edition. Karlsruhe, 2006. Physico-Chemical Aspects. s. 125–129.

³ *Huminové látky* [online]. c2005–2009 [cit.2008-12-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.humatex.cz/huminove-latky.html>>.

⁴ ZSOLNAY, A., et al. Differentiating with fluorescence Spectroscopy the Sources of dissolved organic Matter in Soils subjected to drying. *Chemosphere*, 1999, vol. 38, s. 45–50.

⁵ BERTONCINI, E.I., et al. Fluorescence Analysis of Humic and Fulvic Acids from two brazilian Oxisols as affected by biosolid Amendment. *Anal Bional Chem*, 2005, no. 381, s. 1281–1288.

⁶ YAN, Y., LI, H., MYRICK, M.L. Fluorescence Fingerprint of Waters: Excitation-Emission Matrix spectroscopy as a Tracking Tool. *Society for Applied spectroscopy*, 2000, vol. 54, no. 10, s. 1539–1542.

⁷ PATRA, D., MISHRA, A.K. Total synchronous fluorescence scan Spectra of petroleum Products. *Anal Bional Chem*, 2002, no. 373, s. 304–309.

⁸ SHIRSHOVA, L.T., et al. Fluorescence spectroscopy studies of Humic Substance fractions isolated from permanently frozen Sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma*, 2009, vol. 149, s. 116–123.

⁹ SENESI, N., MIANO, T.M., PROVENZANO, M.R. *Humic Substances in the aquatic and terrestrial Sources*. Boren H, Grimvall A. Italy, 1991. Fluorescence Spectroscopy as a Means of Distinguishing Fulvic and Humic Acids from dissolved and sedimentary aquatic Sources and terrestrial Sources, s. 63–73.

¹⁰ NOVOTNÁ, I. *Sledování vlastností solí huminových kyselin metodou synchronní fluorescenční spektroskopie*, 2006. 73 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Purkyňova 118, 612 00 Brno. Vedoucí diplomové práce Naděžda Fasurová.

¹¹ STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reaction*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd. New York: 1994. 300 s.

¹² JANDÁK, J., PRAX, A., POKORNÝ, E. Půdoznalectví. Brno: MZLU v Brně, 2001. 142 s. ISBN 978-80-7157-559-7.

¹³ SUTTON, R., SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science Technology*, 2005, vol. 39, no. 23, s. 9009–9015.

¹⁴ *Přednáška č.4 LS* [online]. [cit.2009-01-20]. Dostupný z WWW: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kpu/vyuka/pu/skripta_geologie/web-prednasky/ls/predn-04_ls.pdf>.

¹⁵ ENGEBRETSON, R.R., VON WANDRUSZKA, R. The Effect of molecular size on Humic Acid associations. *Organic Geochemistry*. 1997, vol. 26, no. 11–12, s. 759–767.

¹⁶ TOMBACZ, E. Colloidal Properties of Humic Acids and spontaneous Changes of their colloidal State under variable Solution Conditions. *Soil science*. 1999, vol. 164, no. 11, s. 814–824.

¹⁷ COOKE, J., HAMILTON-TAYLOR, J., TIPPING, E. Cation Binding by Soil Humic Substances in situ. FRIMMEL, F.H., ABBT-BRAUN, G. *Humic substances – Linking Structure to Functions*. 45th edition. Karlsruhe, 2006. Physico-Chemical Aspects. s. 125–129.

¹⁸ PICCOLO, A., MIRABELLA, A. Molecular weight distribution of Peat Humic Substances extracted with different inorganic and organic Solutions. *Science of The Total Environment*. 1987, vol. 62, s. 39–46.

¹⁹ HOMOLA, F., KUDRLIČKA, L., KOZLER, J. Stanovení adsorpčních kapacit materiálů s obsahem huminových látek v roztocích solí těžkých kovů. *Aprochem* [online]. 2008. [cit. 2008-03-15], s. 4326–4329. Dostupný z WWW: <http://www.odpadoveforum.cz/symposium/TextyOF/548.pdf>.

²⁰ PICCOLO, A.: The Supromolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. 2002, [cit. 2008-10-10]. Dostupné z: <<http://www.suprahumic.unina.it/pages/2002pag.html>>.

²¹ PICCOLO, A., et al. *Humic Substances and Chemical Contaminants*. C.E. Clapp, M.H.B. Hayes, N. Senesi, P. Bloom, and P.M. Jardine.: Soil Science Society of America, 2001. Molecular Sizes and Association Forces of Humic Substances in Solution, s. 89-118.

²² PENA-MÉNDEZ, Eladia M., HAVEL, J., PATOČKA, J. Humic substances–compounds of still unknown structure: Applications in Agriculture, Industry, Environment, and Biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 2005, vol. 3, s. 13–24.

-
- ²³ CHEN, Ch., et al. Direct Observation of macromolecular Structures of Humic Acid by AFM and SEM. *Colloids and Surfaces*, 2007, vol. 302, s. 121–125.
- ²⁴ HALIM, H., PICCOLO, A., CONTE, C. Fluorescence of Soil Humic Acid and its Size-fractions separated by size Exclusion chromatography. FRIMMEL, F.H., ABBT-BRAUN, G. *Humic substances–Linking Structure to Functions*. Universität Karlsruhe, 2006. New Analytical Aspects. s. 253–257.
- ²⁵ ZÁVODSKÁ, L., LESNÝ, J. Recent development in Lignite Investigation.[online]. 2006 [cit. 2009-02-15], s. 1–15. ISSN 1418–7108.
- ²⁶ PEKAŘ, M., KLUČÁKOVÁ, M. Alternativní, neenergetické aplikace lignitu. CHEMagazín [online]. 2003, roč. 8, č. 1 [cit. 2008-09-02], s. 8–10.
- ²⁷ VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík: Humus–půda–rostlina (1) Funkce humusu v ekosystému. Biom.cz [online]. 2006-09-04 [cit. 2009-05-07]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-1-funkce-humusu-v-ekosystemu>>. ISSN: 1801–2655.
- ²⁸ KUČERÍK, J. *Huminové látky* [online]. [cit. 2009-04-30]. Dostupný z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=49538>>.
- ²⁹ SAIZ-JIMENEZ, C. *Humic Substances in terrestrial Ecosystems*. Piccolo A.. New York : Elsevier, 1996. The Chemical Structure of Humic Substances: Recent Advances, s.1–44.
- ³⁰ KÖGEL-KNABNER, I. *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. P. Nannipieri, K. Smalla: Springer, 2006. Chemical Structure of Organic N and organic P in Soil, vol. 8, s. 25–48.
- ³¹ KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. dopl. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s.
- ³² FIŠAR, Z.. *Fluorescenční spektroskopie* [online]. 2004 , [cit. 2008-10-25]. Dostupný z WWW: <http://www1.lfl.cuni.cz/%7Ezfishar/fluorescence/Default.htm>.
- ³³ FASUROVÁ, N. Synchronní fluorescenční spektroskopie huminových kyselin. *Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. MU Brno 2006: 2006. s. 24–25. Dostupný z WWW: <<http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/Setkani05/Sbornik2005.pdf>>.
- ³⁴ PATRA, D., MISHRA, A. K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002, vol. 21, no. 12, s. 787–798.

-
- ³⁵ POULLI, K. I., MOUSDIS, G. A., GEORGIU, C. A. Classification of edible and lampante virgin olive Oil based on synchronous fluorescence and total luminiscence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2005, vol. 542, s. 151–156.
- ³⁶ MIANO, T.M., SENESI, N. Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil Humic Substances Chemistry. *Science of The Total Environment*, 1992, vol. 117–118, s. 41–51.
- ³⁷ SENESI, N. Molecular and quantitative Aspects of the chemistry of Fulvic Acid and its interactions with metal Ions and organic Chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, 1990, vol. 232, s. 77–106.
- ³⁸ MLČOCH, T. *Fluorescence huminových kyselin 3D excitačně emisní metodou*, 2008. 81 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Purkyňova 118, 612 00 Brno. Vedoucí diplomové práce Naděžda Fasurová.
- ³⁹ MARTIN-NETO, L., et al. On the interaction of mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. *J. Environ. Qual.*. 2001, vol. 30, s. 520–525.
- ⁴⁰ DIVYA, O., MISHRA, A. K. Understanding the Concept of concentration-dependent red-shift in synchronous fluorescence Spectra: Prediction of λ_{\max} and optimization of $\Delta\lambda$ for synchronous fluorescence scan. *Analytica Chimica Acta*, 2008, vol. 630, s. 47–56.
- ⁴¹ TIPPING, E. *Cation binding by Humic Substances*. Cambridge University Press, 2002. 434 s.
- ⁴² NAKASHIMA, K., et al. Characterization of Humic Acids by two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 2008, s. 155–159.
- ⁴³ SENESI, N., D'ORAZIO, V., RICCA, G. Humic acids in the first generation of Eurosoils. *Geoderma*, 2003, vol. 116, s. 325–344.
- ⁴⁴ PEDRA, F., et al. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on chemical and spectroscopic properties of Humic Acids from a sandy Haplic Podzol and a clay loam Calcic Vertisol in Portugal. *Waste Management*, 2008, no. 28, s. 2183–2191.
- ⁴⁵ COCOZZA, C., et al. Charakterization of solid and aqueous phases of peat bog profile using molecular fluorescence spectroscopy, ESR and FTIR, and comparison with physical properties. *Organic Geochemistry*, 2003, vol. 34, s. 49–60.
- ⁴⁶ CONTE, P., et al. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite Humic Acid: *Chemosphere*. 2007, vol. 69, s. 1032–1039.

⁴⁷ DROUSSI, Z., et al. Elemental and spectroscopic Characterization of humic-acid-like compounds during composting of olive mill by-products. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, vol. 163, s. 1289–1297.

⁴⁸ GARCÍA-GIL, J.C., et al. Soil fulvic acid Characteristics and proton binding behavior as affected by long-term municipal waste Compost Amendment under semi-arid environment. *Geoderma*, 2008, vol. 146, s. 363–369.

⁴⁹ MAIA, Claudia M.B.F., PICCOLO, A., MANGRICH, A. S. Molecular size distribution of compost-derived humates as a function of concentration and different counterions. *Chemosphere*, 2008.

⁵⁰ BRTNICKÝ, M., JANČEK, M. Obsah a kvalita humusu v půdách střední Moravy. 8. vědecká konference doktorandů a mladých vědeckých pracovníků. FPV UKF Nitra: 2007, s. 208–215.

⁵¹ POSPÍŠILOVÁ, L., FASUROVÁ, N., JURICA, L. Fractionation of humus and optical Properties of Humic Acids originating from different soil types. *Sborník Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*, 2006. s. 45–52

⁵² D'ORAZIO, V., SENESI, N. Spectroscopic properties of Humic Acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, s. 1–7.

⁵³ PLAZA, C., et al. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environmental Pollution*, 2009, vol. 157, s. 257–263.

⁵⁴ DROSOS, M., JERZYKIEWICZ, M., DELIGIANNAKIS, Y. H-binding groups in lignite vs. soil humic acids: NICA-Donnan and spectroscopic parameters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, vol. 332, s. 78–84.

⁵⁵ SHIRSHOVA, L.T., et al. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma*, 2009, vol. 149, s. 116–123.

⁵⁶ CHEN, J., et al. Spectroscopic characterization of structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* [online]. 2002, vol. 48 [cit. 2002-01-21], s. 59–68.

⁵⁷ KUMKE, M.U., et al. Fluorescence spectroscopy of polynuclear aromatic Compounds in environmental monitoring. *Journal of Fluorescence*. 1995, vol. 5, no. 2, s. 139–153.

⁵⁸ ALBERTS , J. J., TAKÁCS, M. 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*, 2004, vol. 35, s. 243–256.