



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍRODNÍ ORGANICKÁ HMOTA POHLEDEM  
FYZIKÁLNÍ CHEMIE: *GENEZE, STRUKTURA, CHEMICKÉ  
A BIOLOGICKÉ ASPEKTY HUMIFIKACE***

NATURAL ORGANIC MATTER FROM PERSPECTIVE OF PHYSICAL CHEMISTRY: *GENESIS, STRUCTURE,  
CHEMICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS OF HUMIFICATION*

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

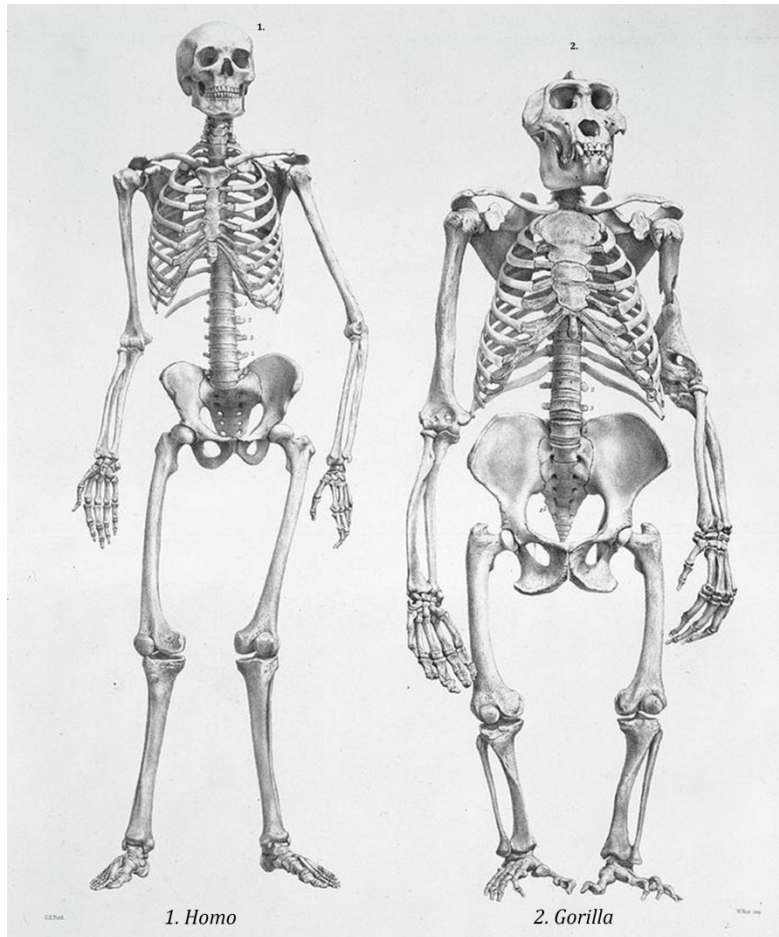
HABILITATION THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

**BRNO 2022**



*„Člověk je první propuštěnec přírody, jež je vyvážen ze svého okolí – příroda není ani tak naše matka, jako spíše macecha“ (stepmother).*

**Marek Orko Vácha** (volná parafráze Johann Gottfried Herder & Max Scheler & Immanuel Kant).

# PODĚKOVÁNÍ

Tento krátký odstavec bych velmi rád věnoval poděkování nejen svým blízkým, ale především všem kolegům, se kterými jsem měl tu čest se na FCH VUT v Brně setkat. V některých poděkováních si dovoluji být osobní, a proto mi prosím nemějte za zlé, že celá řada skvělých kolegů zde nebude jmenovitě zmíněna.

I když od mého studia na FCH VUT v Brně uplynula celá řada let, tak bych velmi rád poděkoval všem pedagogům, kteří mi v rámci svých přednášek či specifických cvičeních předali mnohé znalosti, které jsem mohl dále využít v rámci svého postgraduálního studia. Nicméně celá řada těchto znalostí vytváří pevné základy pro moji pedagogickou činnost, díky kterým se v rámci svého působení na FCH VUT cítím jistým vyučujícím. Jmenovitě se jedná o předměty fyzikální chemie, chemie makromolekulárních soustav a biopolymerů, biochemie, matematiky, transportních systémů, reologie atd.

Doposud vzpomínám na situaci, která se s ubývajícím léty přetavila z „beznaděje“ do velmi humorné vzpomínky. V rámci předmětu cvičení fyzikální chemie II jsme byli prof. Ladislavem Omelkou z dílčích písemných prací zahrnujících výpočty z kinetiky chemických reakcí a koloidní chemie striktně hodnoceni známkami „výborně“ (1 bod) a nedostatečně (0 bodů), přičemž abychom nemuseli absolvovat celkový zápočtový test (zahrnující veškerou probranou látku), tak jsme museli dosáhnout určité procentuální úspěšnosti. Dílčí zápočtové testy byly hodnoceny pouze na základě správnosti dvakrát podtrženého výsledku. Po posledním testu, ze kterého jsem musel dosáhnout hodnocení „výborně“, abych se tak „vyhnul“ studenty obávané zápočtové práci, bylo mi po konzultaci s ostatními studenty jasné, že můj dvakrát podtržený výsledek není správný. Následující týden jsem se smířoval s faktem, že mě souhrnná zápočtová písemná práce nemine. Avšak na posledním cvičení mi prof. Omelka předal opravenou písemnou práci s hodnocením 0,5 bodů doplněnou „zašifrovanou“ zprávou stávající se ze třech písmen ZBM. Po skončení hodiny jsem se byl prof. Omelky zeptat, co tato šifra znamená. Na moji otázku mi prof. Omelka odpověděl: „z Boží milosti!“, a tudíž jsem byl uchráněn obávaného zápočtového testu. Aniž bych si to v té chvíli uvědomoval, tak díky hodnocení prof. Omelky jsme byli vychováni k jisté obecné pečlivosti, kterou si od té doby v sobě ponosu.

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., a to jak z pohledu studenta, tak i kolegy působícího na Ústavu fyzikální a spotřební chemie. I když mi v tuto chvíli vytanulo na mysli mnohé, za co bych rád poděkoval, dovoluji si zmínit jen malou část. Tak jak je malé dítě ovlivňováno svým nejbližším okolím, ve kterém si hledá své vzory, tak mohu bez zaváhání říct, že mým pedagogickým a vědeckým vzorem se stal prof. Pekař, a to z mnoha důvodů. Své odborné znalosti a zkušenosti prof. Pekař předává s nebyvalou lehkostí, přičemž své náměty k vědeckému směřování svých „mladších“ kolegů v rámci výzkumné skupiny BioKol předkládá ve formě: *nevnučuji, zvažte*, a tudíž jsou nám vytvořeny podmínky pro samostatnou vědeckou seberealizaci s jeho nápomocným odborným dohledem. Dále bych rád poděkoval panu prof. Pekařovi především za to, že v průběhu mého působení na Ústavu fyzikální a spotřební chemie si na mě vždy našel čas, ve kterém jsme mohli diskutovat nad různými vědeckými aspekty, z nichž vzešlo mnoho zajímavých odborných publikací či námětů pro mou další odbornou činnost. To vše lze mimo jiné spatřit i v tom, že díky těmto krátkým „brainstormingům“ byly studentům předkládány velmi zajímavá témata, které řešili v rámci svých

bakalářských a diplomových prací. V osobní rovině bych velmi rád poděkoval za jeho neutuchající entuziasmus, vstřícnost, osobní nadhled nad některými problémy a mnoho osobních rozhovorů, které nebyly věnovány jen pracovním povinnostem, ale i tématům dotýkajících se literatury, filozofie, umění, kultury apod.

V posledních řádcích si dovoluji poděkovat mé milé kolegyni paní Leoně Kubíkové, která se obětavě stará o bezproblémový chod laboratoří, čímž nám vytváří vynikající podmínky pro naše vědecké bádání a pedagogické působení na ÚFSCH FCH VUT v Brně.



# OBSAH

<b>1</b>	<b>PROLOG</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>(BIO) CHEMIE ORGANICKÉHO UHLÍKU A HUMINOVÝCH LÁTEK</b> .....	<b>6</b>
2.1	Huminové látky a organická hmota .....	6
2.1.1	<i>Rozdělení huminových látek</i> .....	7
2.1.2	<i>Geneze huminových látek</i> .....	9
2.1.3	<i>Nový koncept geneze HL – polyketidová teorie</i> .....	13
2.1.4	<i>Vazebné možnosti HL – organominerální komplex</i> .....	16
2.1.5	<i>Půdní agregáty</i> .....	18
<b>3</b>	<b>METODY IZOLACE A FRAKCIONACE HUMINOVÝCH LÁTEK</b> .....	<b>23</b>
3.1	Standardní postup izolace HL dle společnosti IHSS .....	23
3.1.1	<i>Standardní postup izolace HL z „solid-state“ přírodních matric</i> .....	23
3.1.2	<i>Standardní postup izolace HL z „liquid-state“ přírodních matric</i> .....	27
3.2	Metody frakcionace HL .....	29
3.2.1	<i>Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)</i> .....	30
3.2.2	<i>Sekvenční frakcionace HL na základě rozdílné polariry</i> .....	32
<b>4</b>	<b>INTERMEZZO I</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ METODY PRO VÝZKUM HUMINOVÝCH LÁTEK A DOM</b> .....	<b>41</b>
5.1	Termické metody pro výzkum HL a DOM .....	41
5.1.1	<i>Elementární analýza (CHNS/O)</i> .....	41
5.1.2	<i>Termogravimetrická analýza TGA a DTG</i> .....	45
5.2	Spektrometrické metody pro výzkum HL a DOM.....	47
5.2.1	<i>UV/Vis spektrometrie</i> .....	47
5.2.2	<i>Infračervená spektrometrie a její techniky</i> .....	50
5.2.3	<i>Steady-state fluorescenční spektrometrie</i> .....	54
5.2.4	<i><sup>13</sup>C NMR spektrometrie</i> .....	62
5.2.5	<i>Analýza hlavních komponent (PCA) vs. shluková analýza (CA)</i> .....	65
<b>6</b>	<b>INTERMEZZO II</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>EPILOG</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCE</b> .....	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY – RUKOPISY DOPLNĚNÉ O KOMENTÁŘE</b> .....	<b>88</b>

# 1 PROLOG

**A**niž bychom si to dnes uvědomovali, tak lidská bytost tj. člověk explicitně vychází z termínů označujících půdu či zemi. Přímý odkaz můžeme nalézt v knize Genesis, která pojednává o mytickém příběhu stvoření světa, kde první bytost Adam je eponymem člověka. Hebrejské slovo *Ādām* etymologicky souvisí s výrazem pro hlínu *ādāmāh*, a tudíž je přímým odkazem Adamova původu. Člověk je tedy utvořen z hlíny země, a proto je jeho doslovným českým překladem výraz *pozemšťan*. Obdobná je i etymologie anglického výrazu *human(e)* tzn. člověk resp. lidský vycházejícího z latinského slova *humus*, jež je výrazem pro zemi, půdu, atd. V této souvislosti je nutné zmínit i řecké kořenové slovo *antrop*, jež je přímým termínem označujícím člověka či lidskou bytost.

Tímto je člověk předurčen k hledání odpovědí na různé otázky, které by vedly nejen k širšímu poznání, ale také ve schopnosti je aplikovat k ochraně naší planety Zemi. Jinými slovy, pokud nám tato planeta byla propůjčena, tak jsme povinni ji spravovat po vzoru dobrého hospodáře, jež má na zřeteli i budoucí generace.

Jak již bylo zmíněno výše, lidské bytí je na planetě Zemi neoddělitelně spjato s organickou hmotou, ať už máme, na mysli případy, kdy jsou tyto organické sloučeniny vázány v živých systémech (flora a fauna) anebo jsou součástí „neživé“ přírody, kam zpravidla řadíme odumřelé části rostlinných a živočišných těl, které jsou klíčovými surovinami vstupujícími do složitějšího procesu jejich transformace na stabilní složky organické hmoty. Na tomto místě je nutné si uvědomit, že determinujícím milníkem existence života na planetě Zemi je okamžik, kdy fotosyntetizující bakterie (*Cyanobacteria*) byla pohlcena *prae*eukaryotickou buňkou, ve které se tento endosymbiont transformoval v semiautonomní organelu tzv. plastid, lépe řečeno chloroplast. V tuto chvíli je nadmíru jasné, že právě vznik rostlinných buněk resp. v nich probíhající fotosyntéza odstartovala kaskádu evolučních dějů, které jsou patrné až do dnešní doby. Pohled fyzikálního chemika, zabývajícího se přírodním cyklem organického uhlíku, je právě fokusován na ty děje fotosyntézy, které vedou k syntéze energeticky bohatých organických sloučenin. Je zajímavé, že z celkového počtu šesti molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu jen jedna z nich opouští Calvinův cyklus a stává se tak prekurzorem pro syntézu složitějších organických sloučenin, jako jsou sacharidy, polypeptidy, lipidy atd. Buněčná stěna je charakteristickým znakem všech suchozemských rostlin, avšak tyto struktury můžeme nalézt i v případě ostatních organismů, jako jsou bakterie, archea, houby a řasy. Přesné chemické složení buněčných stěn je primárně determinováno taxonomickým zařazením sledovaného organismu. Tato skutečnost může být spatřena již při srovnání chemického složení buněčných stěn prokaryotické a eukaryotické buňky. Buněčné stěny prokaryotických organismů jsou převážně tvořeny peptidoglykanem, zatímco pro výstavbu buněčných stěn hub je použita biopolymerní sloučenina chitinu. Buněčné stěny řas jsou primárně tvořeny polysacharidy, kam zpravidla řadíme karagenan, agar atd. Naproti tomu buněčné stěny vyšších rostlin jsou těchto polysacharidů výlučně prosté. U těchto organismů se evolučně vyvinuly dva typy buněčných stěn, které jsou označovány jako primární

a sekundární. Primární buněčná stěna suchozemských rostlin je převážně tvořena homomerním polysacharidem celulózou s menším obsahem ostatních polysacharidů jako je hemicelulóza a pektin. Naproti tomu, sekundární buněčná stěna je obohacena o další biopolymerní sloučeniny, a to zejména o lignin, kutin, suberin aj. V tuto chvíli, aniž bychom to tušili, se nám podařilo definovat jmenný seznam majoritních komponent, které vstupují do složitého procesu geneze huminových látek v terestriálních ekosystémech. Musíme mít však na paměti, že do tohoto procesu vstupuje i ta organická hmota, jež je produkována metabolickými ději nesčetných druhů rostlin, živočichů a mikroorganismů. Po odumření těchto forem života se jejich těla stávají rovněž klíčovými složkami organické hmoty, která vstupuje do složitého procesu humifikace.

Počátky vědního oboru, který dnes můžeme nazývat: „Chemii huminových látek“ byl odstartován celou řadou monografií, z nichž nejvýznamnější je práce, jež byla publikována v roce 1844: *Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden, nebst einer vollständigen Anleitung zur chemischen Analyse der Ackererden*; německého botanika Karla Sprengela. Nicméně, koncept huminových látek, tak jak ho „známe“ doposud, se plně rozvinul až ve druhé polovině 20. století.

Teorie vycházející z faktické existence huminových látek mohou být rozděleny do dvou základních kategorií, z nichž první a historicky starší pohlíží na tyto biokoloidní sloučeniny jako na biomakromolekuly, které vznikají postupnou degradací biopolymerních sloučenin na základní stavební kameny, ze kterých jsou následně tyto biokoloidní sloučeniny syntetizovány resp. polymerovány. Výše zmíněná teorie geneze HL je ve své celistvosti tvořena mnohými hypotetickými cestami, které jsou označovány podle toho, jaké prekuzory a mechanismy v daných cestách převažují. Tyto cesty jsou známé jako teorie *ligninová*, *polyfenolová* a *kondenzace sacharidů s aminy*. V nedávné době byla publikována tzv. *polyketidová teorie*, jež je ve své podstatě přímým odrazem polymerního konceptu, avšak s doposud nebývalou fokusací na aspekty mikrobiální činnosti, které hrají jednu z klíčových rolí v průběhu geneze těchto biokoloidních sloučenin v přírodních ekosystémech. V opozici, k výše zmíněným polymerním modelům stojí tzv. *supramolekulární teorie*, která byla navržena a detailně rozpracována A. Piccolem na počátku 21. století. Tato teorie nahlíží na HL jako na tzv. supramolekuly resp. supramolekulární asociace, jež jsou tvořeny heterogenními a relativně malými organickými sloučeninami, které se do těchto podivuhodných struktur organizují samovolně. Jednotlivé stavební kameny nejsou v tyto struktury spojeny kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány prostřednictvím slabých vazebných interakcí, jako jsou vodíkové můstky a disperzní hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  a  $-\text{CH}_3$ - $\pi$ ). Tento koncept byl stejným autorem použit k navržení frakcionačního postupu HL a půdní organické hmoty na tzv. *humeomika*.

Je poměrně zajímavé, že i v dnešní době je vědecká společnost silně polarizovaná na dva tábory, mezi nimiž je vystavena pomyslná zeď skládající se z výše zmíněných teorií geneze a strukturních formulací. Aniž by to tušili, tak tato hradba byla částečně zbořena odborným článkem *Lehmann & Kleber (2015)*<sup>1</sup>, kteří popřeli existenci těchto biokoloidních sloučenin tvrzením, že HL resp. půdní organická hmota je kontinuem postupné dekompozice organické hmoty, jejímž konečným produktem je molekula  $\text{CO}_2$

<sup>1</sup> Lehmann, J.; Kleber, M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* **2015**, *528*, 60–68.

a specifická sorpce částečně degradovaných biopolymerních sloučenin na minerální podíl půdy. Je nadmíru jasné, že část pozornosti obou nesmiřitelných táborů byla fokusována právě k těmto dvěma „huminovým heretikům“. Tímto poněkud kontroverzním názorem byl odstartován přátelský a konstruktivní dialog napříč vědeckými skupinami zabývajícími se studiem těchto unikátních sloučenin. Ačkoliv, ani já nemohu být ztotožněn s tímto konceptem, na druhou stranu musím konstatovat, že tato hypotéza v sobě skrývá mnoho vědeckých námětů a postřehů, které by mohly být následně podrobně rozpracovány. V této souvislosti by se mohlo především jednat o studium organické hmoty bez předešlého působení jakéhokoliv extrakčního činidla, které bychom mohli označit za matriční xenobiotikum. Jinými slovy, v této situaci bychom byli omezeni na použití dešťové vody či její laboratorní „modelové“ variantě, jakož to vhodného extrakčního činidla. V případě studia půdní organické hmoty byla Grossmanem a následně Fedotovem vyvinuta metoda izolace tzv. půdního gelu, jež je ve svém důsledku mobilním organominerálním komplexem. Podrobným studiem a strukturní charakterizací tohoto vzorku by se dalo jednoduše dokázat, zda adsorbovaná organická hmota je anebo není chemicky pozměněna v důsledku procesu humifikace. Jinými slovy, půdní gel se zdá být jako vhodná matrice ke studiu neporušeného vzorku organické hmoty.

Na tomto místě se nabízí otázka, jakým způsobem lze tuto úvodní část habilitační práce krátce a výstižně ukončit. Musíme mít na paměti, že jakýkoliv přírodní ekosystém se vyznačuje silně dynamickým charakterem s mnoha komplikovanými vazbami na jednotlivé složky organické hmoty, ať už máme na mysli ty, které můžeme považovat za stabilní anebo ty, jež do těchto ekosystémů vstupují v podobě odumřelých částí rostlinných a živočišných těl. V této souvislosti přicházejí v úvahu i ty organismy, které pouhým okem nevidíme. Jedná se především o zástupce nesčetných druhů bakterií, virů, mikromycet, prvoků, řas atd. I přesto, že mikroedafon představuje v celkové bilanci organické hmoty jen minoritní část (v případě půd se jedná asi o 4 hm. %), je jeho funkce v rozličných ekosystémech nepostradatelná. Jednou z hlavních úloh mikroedafonu je jejich podivuhodná schopnost primárně se podílet na dekompozici nejrůznějších organických sloučenin včetně biopolymerů, jako je celulóza, lignin atd. Jinými slovy, tyto mikroorganismy, zvláště pak zástupci rozličných bakterií a hub jsou nepostradatelnými segmenty vstupujícími do složitého procesu geneze HL. I když by se na první pohled mohlo zdát, že výše zmíněné skupiny organismů plní jen funkci rozkladačů, tak by to nebyla v žádném případě pravda. Na tomto místě je nutné říci, že pokud náš pohled fokusujeme na pozoruhodné prostředí půdy, tak jsme schopni vypořádat celou řadu zajímavých úloh, které tyto mikroorganismy jsou schopny v ní zprostředkovat. Jedná se především ve schopnosti fixace dusíku v podobě rozsáhlé skupiny sloučenin, jež jsou v přímé souvislosti s litotrofním metabolismem či tzv. bakteriální respirační denitrifikací. Mimo jiné, celá řada autotrofních a heterotrofních mikroorganismů patří mezi ty, které jsou prvními osidlovateli půdotvorných substrátů (minerálních částic), a tudíž se tak primárně podílí na vzniku půdy. O schopnosti složitých symbiotických vazeb ani nemluvě.

Na závěr mi dovoluťe snad jen podotknout, že pro správné uchopení této problematiky je zapotřebí nejen pohled „huminového“ chemika, ale i dalších odborníků z ostatních

vědních oborů, jako je mikrobiologie, pedologie, botanika, zoologie, evoluční biologie atd.

## 2 (BIO) CHEMIE ORGANICKÉHO UHLÍKU A HUMINOVÝCH LÁTEK

V úvodních částech tematických monografií a odborných publikací budeme velmi často konfrontováni s výroky, že organický uhlík vázaný v terestriálních ekosystémech představuje podstatnou část tohoto biogenního prvku nacházejícího se na zemském povrchu. Toto tvrzení nabývá dogmatického rozměru, pokud si uvědomíme, že přibližně  $3,2 \cdot 10^{12}$  tun organického uhlíku je vázáno ve formě organické hmoty (OM)<sup>2</sup>, kam zpravidla řadíme rozpuštěnou (DOM)<sup>3</sup> a suspendovanou (POM)<sup>4</sup> organickou hmotu. Z tohoto množství celkového organického uhlíku se asi 80 % nachází v půdě, což přibližně odpovídá  $2,4 \cdot 10^{12}$  tun  $C_{org}$  [1]. Pro lepší a ucelenou představu o bilanci  $C_{org}$  na naší planetě lze rovněž uvést, že množství tohoto biogenního prvku v živých organismech tzn. mikrobiální flóra, rostlinné a živočišné společenstva je poměrně malé, což odpovídá přibližně  $0,6 \cdot 10^{12}$  tun  $C_{org}$ . Jinými slovy celkové množství organického uhlíku vázaného v živých organismech je zhruba  $5 \times$  nižší, než je tomu v případě neživých terestriálních ekosystémů. Na tomto místě stojí rovněž uvést, že pouze v oceánu je vázáno podstatně větší množství uhlíku ( $38 \cdot 10^{12}$  tun), avšak z velké části je tento prvek zastoupen v anorganických formách sedimentárních hornin, jako je kalcit, dolomit a v neposlední řadě i sádrovec.

### 2.1 Huminové látky a organická hmota

Obecně můžeme definovat huminové látky (HL) jako neoddělitelnou podskupinu přírodní organické hmoty (NOM)<sup>5</sup>, jež se prolíná napříč taxonomickými skupinami, které jsou definovány jako DOM a POM. Poměrné zastoupení těchto unikátních *biokoloidních* látek v jednotlivých taxonomických třídách je převážně spjato s místem jejich geneze v rozličných přírodních ekosystémech. HL jsou majoritní součástí kaustobiolitů<sup>6</sup>, půdní organické hmoty a dalších terestriálních matric. V nižších hmotnostních koncentracích se vyskytují ve vodách sladkovodních i mořských a rovněž jsou významnou součástí pobřežních sedimentárních hornin [2, 3]. Přítomnost těchto *biokoloidních* látek byla prokázána v gastrointestinálních trakttech a krvi zejména teplokrevných živočichů, avšak je nutné poznamenat, že tyto sloučeniny jsou v živočišných tělech identifikovány na základě její bio dostupnosti v přírodních ekosystémech, a tedy mají povahu „přírodního xenobiotika“ [4, 5]. V důsledku výše zmíněných sdělení lze konstatovat, že HL jsou součástí živé a neživé přírody.

---

<sup>2</sup> Organic matter (angl.)

<sup>3</sup> Dissolved organic matter (angl.)

<sup>4</sup> Particulate organic matter (angl.)

<sup>5</sup> Natural organic matter (angl.)

<sup>6</sup> Sedimenty s vysokým obsahem organických látek (rašelina, lignit, oxyhumolit, uhlí, kerogen, atd.).



Obecně můžeme definovat HL jako přírodní organické sloučeniny, které vznikají v chemicky složitém procesu, který nazýváme odborným termínem *humifikace*<sup>7</sup>. Hmotnostní zastoupení těchto organických látek v přírodních matricích kolísá od stopových množství (písky, jíly, podzemní a sladkovodní vody a také vody mořské) přes jednotky hmotnostních procent (sedimenty a běžné zeminy) až k desítkám procent (kaustobiolity a rašelina) [6].

### 2.1.1 Rozdělení huminových látek

Tradiční a doposud stále tolerovaná klasifikace HL se opírá o tak základní fyzikálně-chemický děj jako je jejich rozpustnost při určitých hodnotách pH použitého rozpouštědla. Na základě jejich acidobazické rozpustnosti resp. nerozpustnosti jsou tyto biokoloidní látky rozděleny do tří základních kategorií, které odpovídají jednotlivým frakcím HL:

*fulvinové kyseliny* (FK), tato frakce HL zůstává v okyseleném roztoku vodného výluhu, tzn., jsou rozpustné v celém rozsahu pH hodnot;

*humínové kyseliny* (HK), jsou nerozpustné za silně kyselých podmínek, kdy hodnota pH roztoku je < 2, s rostoucí hodnotou pH se stávají omezeně rozpustné a v silně bazickém prostředí jsou HK rozpustné;

*huminy* (HU), jsou nerozpustné, a tudíž je nelze převést do roztoku silnými minerálními kyselinami ani zásadami [7].

Již při tomto elementárním rozdělení HL lze jednotlivé frakce efektivně diferencovat na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností, kam zpravidla řadíme jejich barvu, obsah biogenních prvků, množství kyselých funkčních skupin zejména karboxylových a aryl hydroxylových a střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_w$ .

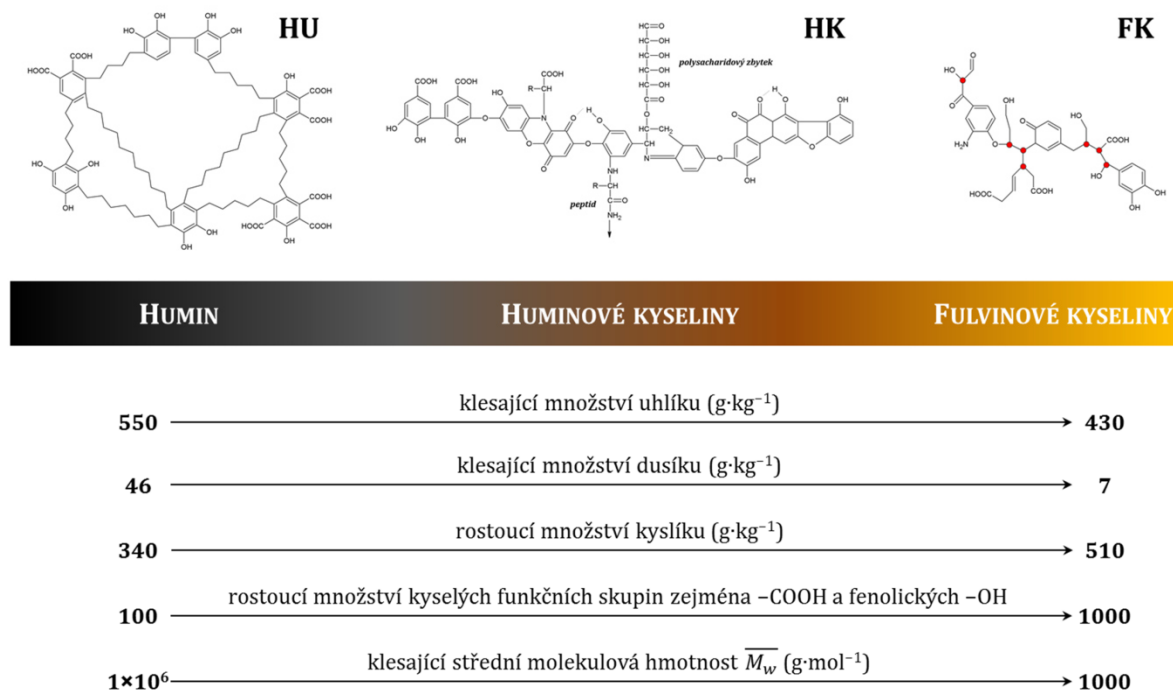
Jak je uvedeno na Obrázku 1, výše zmíněné fundamentální frakce HL se navzájem liší svou barvou (FK jsou žluté, HK jsou hnědé až hnědočerné a HU jsou černé). Vysokomolekulární frakce HL mohou být rozděleny na *hnědé* HK (takové frakce HK, které s přidavkem silného elektrolytu v bazickém prostředí nekoagulují) a *šedé* HK (s přidavkem silného elektrolytu koagulují). Na tomto místě je nutné podotknout, že mnohými autory jsou do skupiny HL řazeny i takové frakce HK, které jsou rozpustné v alkoholu. V případě HK se jedná o tzv. *hymatomelanové kyseliny*<sup>8</sup>[8].

S ohledem na tzv. *polymerní model*<sup>9</sup> vzniku HL je jejich specifické zbarvení v přímé souvislosti s jejich střední molekulovou hmotností  $\overline{M}_w$ , avšak přicházejí v úvahu i další strukturální difference ve smyslu rozdílného množství a substituce konjugovaných systémů dvojných vazeb (aromatické sloučeniny či lineární řetězce s různou mírou konjugace) elektron-donorními či elektron-akceptorními funkčními skupinami. V obecném přiblížení lze konstatovat, že nízkomolekulární frakce HL se vyznačují nižším obsahem uhlíku a dusíku, přičemž jejich celková acidita výrazně roste v porovnání s HK.

<sup>7</sup> Proces, ve kterém je rozložená OM transformována prostřednictvím určitého sledu (bio)chemických a abiotických reakcí ve strukturně složitější huminové látky.

<sup>8</sup> Frakce HK rozpustné v protických rozpouštědlech alkoholů (methanol, ethanol, n-propanol atd.).

<sup>9</sup> Model geneze HL předpokládající vznik kovalentních vazeb mezi jednotlivými stavebními jednotkami těchto biokoloidních sloučenin.



Obrázek 1: Rozdělení HL na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností; převzato upraveno [7].

Hmotnostní podíl jednotlivých frakcí HL se výrazně liší podle druhu a typu přírodní matrice (*kaustobiolity* > *půdy* > *komposty* > *vodní zdroje* > *sedimenty* aj.). Mimo jiné je jejich celkový obsah do značné míry ovlivněn i způsobem a zvolenou metodikou izolace, při které může docházet zejména k nadhodnocení získaných extrakčních výtěžků. Tato problematika bude blíže diskutována v subkapitole věnované metodám izolace HL. Z hlediska minoritního zastoupení nízkomolekulárních frakcí HL v některých přírodních matricích, jako jsou především hnědá uhlí v různém stupni oxidace či olejové sedimentární břidlice<sup>10</sup> jsou tyto frakce doposud ne zcela probádané a stojí tak na okraji vědeckého zájmu nemalého počtu výzkumných týmů. Naproti tomu si nelze nepovšimnout poměrně velké pozornosti, která je věnována studiu a charakterizaci antropogenních půdních kondicionérů na bázi HL, kam zpravidla řadíme *lignosulfonany* a *lignohumáty* [9, 10]. Tento nebývalý zájem je iniciován zejména environmentálními a globálními aspekty vycházejících z celosvětových změn klimatu a v neposlední řadě i z neutěšené situace zemědělské produkce na naší planetě.

Huminové (HK, FK a HU) a ne-huminové<sup>11</sup> (polysacharidy, proteiny, lipidy, vosky, ligniny) látky spolu vytvářejí množinu organických sloučenin, které jsou běžně označovány jako rozpuštěný organický uhlík (DOC)<sup>12</sup>, jež je podmnožinou výše zmíněné organické hmoty DOM. Podle velikosti částic resp. jejich rozpustnosti lze celkovou organickou hmotu (TOM)<sup>13</sup> rozdělit do dvou výše zmíněných klastrů DOM a POM. Dohodou, která v sobě odráží dotyk koloidní chemie, byla velikostní hranice mezi těmito skupinami stanovena na  $0,45\ \mu\text{m}$  [11]. Dále rozpuštěný organický uhlík můžeme rozdělit

<sup>10</sup> Sedimentární hornina obsahující vysokomolekulární organické sloučeniny tj. kerogen a bitumen.

<sup>11</sup> Doposud nehumifikované fragmenty rozložené OM a rostlinné a mikrobiální exsudáty.

<sup>12</sup> Dissolved organic carbon (angl.)

<sup>13</sup> Total organic matter (angl.)



na dvě podskupiny, které v sobě zrcadlí původ a způsob jejich geneze v terestriálních ekosystémech. Jedná se tedy o sloučeniny alochtonního a autochtonního původu. Mezi alochtonní DOC řadíme lignin, celulózu, fotolytické sloučeniny, detrit<sup>14</sup> aj., který pochází z fotické zóny přírodních ekosystémů. Naproti tomu autochtonní DOC v sobě odráží takové organické sloučeniny, které jsou klasifikovány jako primární produkty heterotrofních mikroorganismů resp. bioty v afotické zóně příslušného životního prostředí [12–14].

### 2.1.2 Geneze huminových látek

Bohužel, i v dnešní době není mechanismus geneze HL zcela objasněný, avšak můžeme vysledovat dvě základní teorie, které se svou podstatou opírají o způsob nahlížení na „molekulární“ strukturu těchto biokoloidních látek. Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že v oblasti huminové chemie se asi nenajde více exponované téma, které je předmětem mnoha rozvášněných diskuzí mezi čím dál více se polarizujícími vědeckými týmy.

Přibližně do počátku 21. století byly tzv. *spojené teorie* (ligninová, polyfenolová a teorie kondenzace aminů se sacharidy) považovány za nejpravděpodobnější modely popisující genezi HL v terestriálních ekosystémech [7, 15–18].

#### Ligninová teorie

Podle této teorie je lignin neúplně degradován půdními mikroorganismy a jeho zbytková část se stává součástí půdního humusu. Jinými slovy, v průběhu houbové degradace dřevní hmoty (lignocelulózová pletiva) je celulóza metabolizována půdními mikroorganismy a ligninové jednotky se stávají prekurzory HL. Tento model předpokládá vznik tří typů fenylypropanoidových jednotek, které jsou navzájem vázány  $\sigma$ -vazbami mezi uhlíky anebo etyl oxidovými vazbami. Následně modifikované stavební jednotky ligninu reagují s dusíkatými sloučeninami proteinového typu, které jsou syntetizovány mikrobiální aktivitou půdní bioty [19]. Pro názornost můžeme tento mechanismus vzniku HL popsat obecnou chemickou rovnicí 1:



#### Polyfenolová teorie

Tato teorie představuje podrobněji rozpracovaný model vzniku HL, která ve své podstatě vychází z dříve navržené ligninové teorie. Podle polyfenolové teorie lze na HL nahlížet jako na makromolekulární sloučeniny vzniklé degradací odumřelých rostlinných těl a dalších organických složek, které jsou přirozeně dostupné v půdním ekosystému. I v tomto případě je geneze HL silně ovlivněna transformačními dráhami indukovanými mikrobiální aktivitou. Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že tato teorie zohledňuje vznik HL i z organické hmoty, která primárně neobsahuje lignin, jež je zdrojem monolignolových stavebních jednotek. Tyto prekurzory HL jsou syntetizovány mikrobiální aktivitou půdní bioty [20].

Lignin uvolněný z lignocelulózových pletiv je podroben degradaci na základní stavební jednotky – fenylypropanoidy. Následně jsou tyto prekurzory demetylovány

<sup>14</sup> Odumřelá OM, stávající se z rostlinných, živočišných a mikrobiálních tkání.

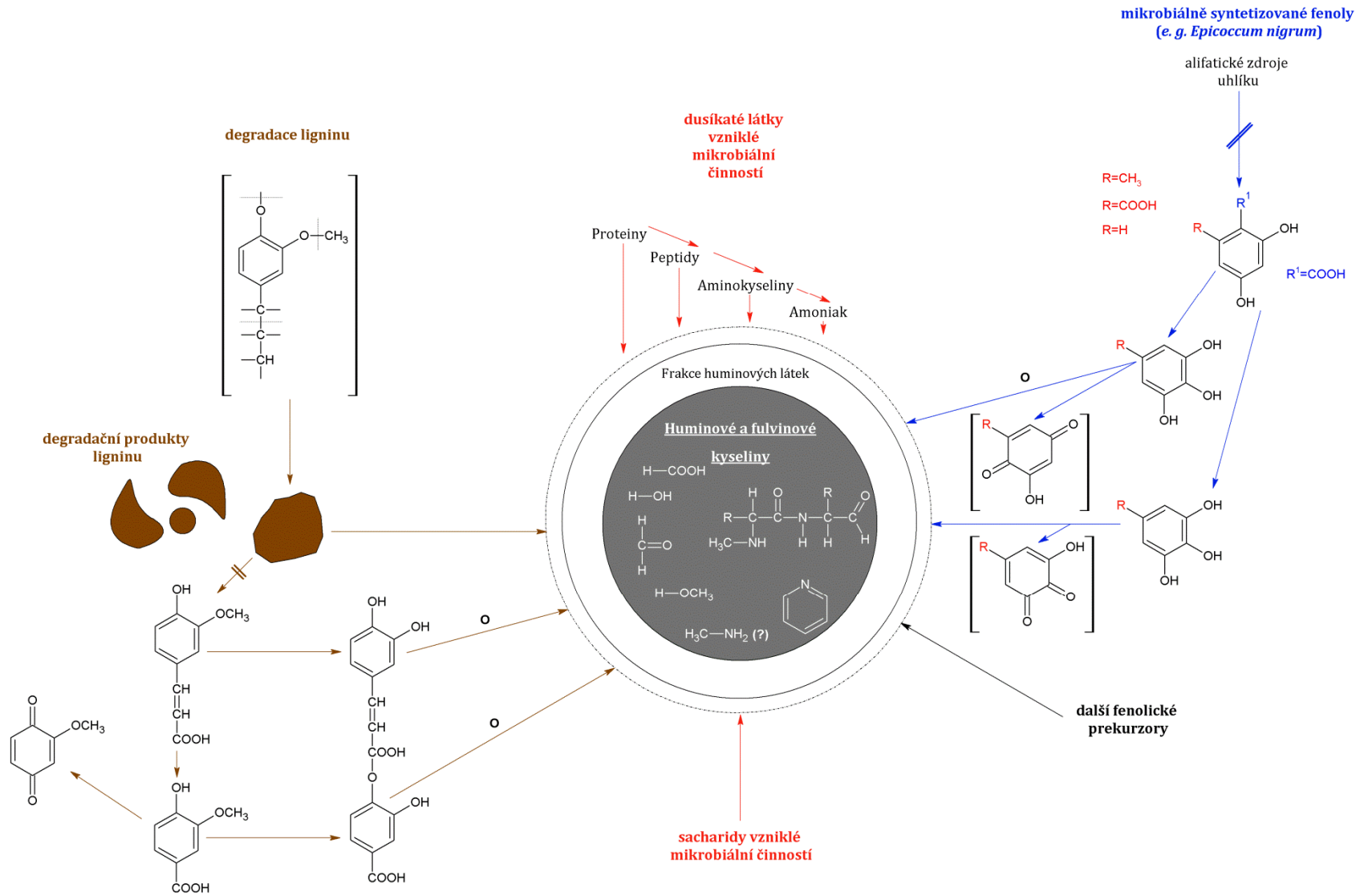
a oxidovány na polyfenolické sloučeniny s různou mírou substituce aromatických struktur hydroxylovými skupinami. Lehce hydrolyzovatelné organické kyseliny a fenolické aldehydy, které jsou výsledkem mikrobiální činnosti, jsou následně transformovány na chinony. Tato transformace je zprostředkována působením specifických enzymů (např. polyfenoloxydázy), které jsou schopny eliminace vodíku na aryl hydroxylových funkčních skupinách. Vzniklé chinoidní jednotky reagují s N-obsahujícími sloučeninami v polymerizačních a rekombinačních reakčních schématech za vzniku huminových „makromolekul“. V případě rostlinných těl postrádající lignocelulózové pletiva jsou bakteriální polyfenolické sloučeniny rovněž oxidovány na chinony, jež jsou vstupními komponenty budoucích HL.

#### *Teorie kondenzace aminů se sacharidy*

Poslední diskutovanou teorií, jež se snaží o přiblížení a osvětlení mechanismu vzniku HL je model, který se výhradně opírá o reakce redukujících cukrů s aminy, které jsou všeobecně známy jako *Maillardovy reakce*. Jedná se především o komplexní reakce organických prekurzorů<sup>15</sup> a aminosloučenin, které jsou schopny vytvářet barevné aromatické sloučeniny. Prekurzory, které obsahují reaktivní karbonylové skupiny, mají svůj původ zejména v polysacharidech a rovněž mohou být odvozeny z lipidických sloučenin, které podléhají oxidačním změnám. Naproti tomu, aminové funkční skupiny (primární aminy) pocházejí ze samotných aminokyselin resp. sloučenin bílkovinné povahy a také nelze opomenout příspěvek dusíkatých sloučenin exogenní povahy [21]. Výše zmíněné stavební kameny, které jsou přednostně produkovány metabolismem rozličných bakterií, jsou v konečné fázi tohoto procesu vzniku HL polymerovány tzv. *abiotickou kondenzací*.

---

<sup>15</sup> Redukující sacharidy.



Obrázek 2: Polymerová teorie vzniku HL dle Flaiga; převzato upraveno [6]

*Supramolekulární pohled na vznik HL*

V úvodní části této subkapitoly je nutné poznamenat, že supramolekulární model popisující vznik HL a jejich strukturu jako supramolekulární asociace heterogenních molekul o relativně nízké  $\overline{M}_w$  nikterak nepopírá dříve publikované teorie a modely geneze těchto biokoloidních látek, ale je jejím logickým vyústěním [22]. Toto tvrzení přichází v platnosti, pokud si uvědomíme, že supramolekulární konformace HL mohou být stabilizovány nejen slabými vazebnými interakcemi<sup>16</sup>, ale i kovalentními vazbami. Vznik těchto vazeb je katalyzován působením tzv. exoenzymů, kam zpravidla řadíme oxidoreduktázy a fenoloxidázy. Obecně, ale tato teorie upřednostňuje stabilizaci jednotlivých stavebních jednotek tvořících supramolekulární strukturu HL pomocí výše zmíněných slabých disperzních sil. Podle této teorie jsou supramolekulární konformace HL mimo jiné stabilizovány pomocí kovalentně vázaných polyvalentních kovů jako jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ . V této souvislosti je nutné poznamenat, že jak komplexace kationtů tak i případná sorpce HL na minerální částice zvyšuje jejich odolnost vůči degradaci v důsledku působení půdních mikroorganismů a hub [22–26].

Supramolekulární model HL popisuje tyto biokoloidní látky jako agregáty, které jsou tvořeny jednoduchými stavebními fragmenty organické hmoty. Tyto heterogenní komponenty vznikají jako v předcházejícím případě (viz. polymerové teorie vzniku HL) z dekompozice odumřelých rostlinných a živočišných těl. Jedná se především o fenylpropanové jednotky a fenoly pocházející z ligninu případně jeho residua, dále pak polysacharidy, polypeptidy a alifatické sloučeniny nacházející se v různém stupni dekompozice tzn. reálné hodnotě  $\overline{M}_w$ . Jak již bylo nastíněno výše, supramolekulární model nahlíží na HL jako na heterogenní agregáty, jejichž střední molekulová hmotnost je na horní hranici limitována hodnotou 6 000 Da<sup>17</sup> [25]. Rovněž musíme mít na paměti, že vyšší  $\overline{M}_w$  HL, které jsou publikovány některými renomovanými vědeckými týmy, nemusí nutně odporovat tomuto modelu. Jednou z možných hypotéz k osvětlení tohoto nesouladu může být vyšší aktivita katalyzátorů polymeračních reakcí, které jsou obecně známi jako peroxidázy.

Předpokladem této teorie je samovolná organizace relativně malých heterogenních molekul různého biotického původu v supramolekulární celky. Jak již bylo řečeno dříve, jednotlivé stavební kameny vytvářející tyto obdivuhodné struktury nejsou spojovány kovalentními vazbami, ale jsou stabilizovány disperzními hydrofobními interakcemi. Při nižších hodnotách pH jsou tyto suprastruktury stabilizovány především vodíkovými můstky, které svým počtem významně převyšují ostatní slabé vazebné interakce. Spontánní mechanismus organizace jednotlivých stavebních bloků v supramolekulární struktury indukuje vznik hydrofilních a hydrofobních domén v těchto strukturách. Rovněž se předpokládá, že hydratační voda tvoří nemalou část těchto unikátních asociací. Z takto definovaného konceptu vyplývá, že mezimolekulární síly hrají klíčovou roli v architektuře a složitosti supramolekulárních organizací HL, přičemž jsou schopny i kontroly její environmentální reaktivity. Z tohoto důvodu můžeme na HL aplikovat obecnou definici supramolekulární struktury, která říká, že: supramolekulární struktury jsou molekulární entity vzniklé ze spontánního sdružení blíže nedefinovaného

<sup>16</sup> Hydrofobní interakce (van der Waalsovy,  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$ ) a vodíkové můstky.

<sup>17</sup> Unifikovaná atomová hmotnostní jednotka – dalton; 1 Da  $\cong$   $1,66 \times 10^{-27}$  kg.

počtu komponent do konkrétní fáze s více či méně definovanou mikroskopickou strukturou a makroskopickými vlastnostmi odrážející se v jejich povaze, jako jsou filmy, vrstvy, membrány, vezikuly, micely, mezomorfní fáze aj [26].

Z hlediska jednotlivých frakcí HL lze *fulvinové kyseliny* považovat za kompilát malých hydrofilních molekul bohatě substituovaných kyselými funkčními skupinami, jež jsou udržovány v koloidní formě při jakékoliv hodnotě pH disperzního prostředí. Naproti tomu, na *huminové kyseliny* lze nahlížet jako na sdružení převážně hydrofobních molekul (polymethylenické řetězce, mastné kyseliny, steroidy atd.) stabilizovaných hydrofobními disperzními silami v prostředí o neutrální hodnotě pH [22, 23]. Tento z termodynamického hlediska výhodný stav je narušen v případě, kdy je supramolekula HK vystavena prostředí o nižší hodnotě pH. V této situaci jsou v strukturách HK indukovány mezimolekulární vodíkové vazby, jejichž zvýšení má za následek konformační agregaci supramolekulárních struktur až do doby, jež jsou v disperzním prostředí flokulovány.

### 2.1.3 Nový koncept geneze HL – polyketidová teorie

Polyketidová teorie je logickým vyústěním nového pohledu na genezi HL a půdní organické hmoty, která se nicméně ve své podstatě opírá o již známé koncepty vzniku HL a SOM<sup>18</sup> avšak s intenzivnější fokusací na problematiku půdní mikrobiologie, jež je neoddělitelnou součástí tohoto procesu.

Tento model popisuje vznik HL jako dvoufázový proces, ve kterém jsou nejprve rostlinné a mikrobiální polymerní směsi degradovány na základní stavební jednotky, které jsou v konečné fázi mikrobiální aktivitou transformovány na rozmanité *polyketidy* (PK) z nichž jsou syntetizovány HL resp. SOM [27].

#### *První fáze (degradace polymerních směsí)*

Hlavními vstupními komponenty vzniku HL jsou rostlinné, živočišné a mikrobiální polymerní směsi jako jsou lignin a lipidy (n-mastné kyseliny, n-alkylmono- a diestery a v neposlední řadě i n-alkany). Majoritními stavebními kameny HL jsou produkty degradace ligninů (benzen, naftalen, fenanthren, aj.). Naproti tomu, hlavními produkty degradace lipidů, které se účastní vzniku HL, jsou alkany, které mají svůj původ v mastných kyselinách, jež jsou v tomto procesu dekarboxylovány. Následně mezi těmito látkami může vznikat kovalentní vazba, přičemž se vytvářejí alkyl- substituované aromatické sloučeniny. Výše zmíněné sloučeniny mohou rovněž vznikat prostou alkylací aromatických struktur, jež je výhradně indukována přítomností volných radikálů na Ar-jednotce. Polysacharidy a bílkovinné sloučeniny resp. polypeptidy nelze považovat za chemicky či mikrobiálně syntetizované komponenty HL. Obecně jsou tyto stavební jednotky fyzikálně anebo elektrostaticky adsorbovány na povrch alkyl- substituovaných aromatických jednotek, které vytvářejí tzv. alkyl-aromatickou strukturní síť těchto *biokoloidních látek*. Tyto sorbované bio-polymerní látky jsou hlavními zdroji uhlíku, dusíku a energie pro syntetickou činnost mikroorganismů [27, 28].

---

<sup>18</sup> Soil organic matter (angl.)

*Druhá fáze (syntéza polyketidů a HL)*

Výše zmíněné sloučeniny jsou prostřednictvím složitých enzymatických reakcí tj. *humifikace* transformovány na relativně komplexní a rozmanité molekuly polyketidů, kam zpravidla řadíme polyfenolické, alkyl- a polyaromatické sloučeniny. Obecně lze říci, že půdní PK jsou vyloučené sekundární metabolity rostlin a půdních mikroorganismů tzn. bakterií a prvoků.

O složitosti této problematiky vypovídá ohromný počet doposud analyzovaných sekundárních metabolitů, který převyšuje  $1 \cdot 10^5$  známých molekul o  $\overline{M}_w < 2\,500$  Da, z nichž asi  $5 \cdot 10^4$  připadá mikrobiální aktivitě půdní bioty [29]. Polyketidy jsou jednou z největších a strukturně nejrozmanitějších tříd přirozeně se vyskytujících sloučenin v mnoha ekosystémech. Tyto sloučeniny hrají v přírodních prostředích nezastupitelnou roli prostřednictvím svých unikátních vlastností, jako jsou anthelmintické<sup>19</sup>, antibiotické, insekticidní a antienzymatické. Mimo jiné je na tomto místě nutné zmínit, že tato chemická diverzita PK je částečně způsobena evolučním procesem, kdy jednotlivé organismy si tak vytvářely strategie v boji proti mikrobiální, entomologické a animální predaci.

Velké množství polyketidů, které jsou syntetizovány rostlinami anebo mikroorganismy jsou velmi dobře rozpustné ve vodě, a tudíž se nacházejí ve vysokých koncentracích v příslušných prostředích, kde tyto organismy žijí. Z chemického hlediska jsou tyto biomolekuly klasifikovány jako polyaromatické, alkylaromatické a alkylované sloučeniny, které svojí podstatou spadají mezi polyfenoly, makrolidy<sup>20</sup>, polyeny, enedieny a polyethery. Rostliny, živočichové a zejména půdní mikroorganismy syntetizují ve vodě omezeně rozpustné polyfenolické látky, které jsou tvořeny pěti až sedmi aromatickými jednotkami, jež mohou být substituovány poměrně variabilním počtem hydroxylových funkčních skupin, avšak tento počet bývá vždy  $> 12$ . Výše zmíněné sloučeniny jsou obvykle charakterizovány  $\overline{M}_w$ , která je dána rozmezím 500–4000 Da [30, 31]. Makrolidy jsou tvořeny laktonovými kruhy s jedním anebo více jednotkami deoxy-sacharidových sloučenin (D-kaladinosa). Mimo jiné jsou laktonové struktury velmi často substituovány i desosaminem. Dalšími sloučeninami, které jsou syntetizovány v půdních ekosystémech jsou tzv. polyeny. Jedná se především o dlouhé alkylované sloučeniny, v jejichž strukturách se navzájem střídají jednoduché a dvojně vazby a zároveň obsahují určitý počet Ar jednotek. Makrolidy a polyeny jsou biosyntetizovány několika kmeny *Streptomyces* jako organické sloučeniny s profylaktickým účinkem [32, 33]. Poslední zmíněnou kategorií PK jsou enedieny, které se vyznačují obsahem 9-ti a 10-ti členných kruhů. Tyto struktury jsou zpravidla charakterizovány přítomností dvou trojných vazeb oddělených vazbou dvojnou.

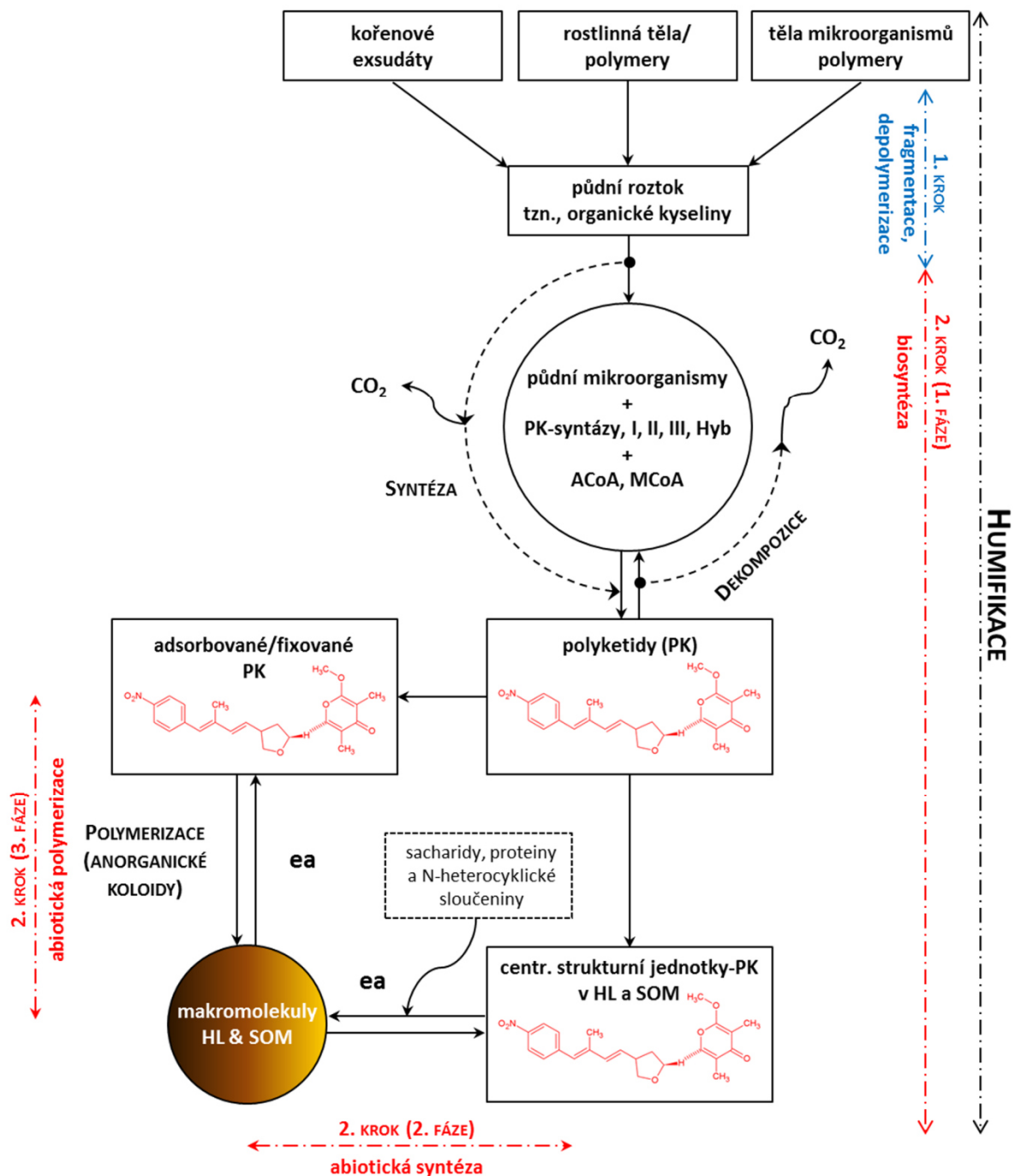
Z environmentálního hlediska můžeme PK definovat jako organické sloučeniny, které poskytují ochranu půdním mikroorganismům a rostlinám v období abiotického stresu. Klíčová úloha těchto regulačních molekul spočívá ve schopnosti se účastnit důležitých procesů spojených s diferenciací buněk spojených se vznikem spor tj. *proces sporulace*. Na tomto místě je nutné říci, že energetický obsah uložený v podobě chemických vazeb v případě PK je vysoký a to díky jejich molekulární struktuře. Naproti tomu se

<sup>19</sup> Působící proti parazitickým helmintům (hlístice, motolice, tasemnice, atd.).

<sup>20</sup> Bakteriostatická antibiotika.



z termodynamického hlediska nejeví jako nejlepší zdroje uhlíku a energie pro mikrobiální aktivitu v půdních ekosystémech.



Obrázek 3: Schéma vzniku HL na základě abiotických a biotických procesů humifikace oxokyselin a následná jejich transformace v polyketidy; převzato upraveno [27].

Mnoho publikovaných prací naznačují, že molekuly PK jsou velmi rychle a silně adsorbovány na půdní minerální koloidy, jakmile jsou uvolněny do půdního roztoku mikroorganismy či kořenovým systémem rostlin. Tento abiotický proces spolu s antimikrobiálními vlastnostmi biosyntetizovaných PK a v neposlední řadě i vysoký obsah energie akumulovaný v jejich strukturách je pravděpodobně překážkou následného metabolického využití půdními mikroorganismy, prvky, hlídicemi aj. živočichy. Z pohledu chemika zabývajícího se huminovými látkami by tyto biotické a abiotické procesy upřednostňovaly dlouhodobou stabilizaci PK v půdě. Pyrolytické produkty SOM poskytují nepřímé důkazy o existenci PK, jakož to stabilní půdní OM. Radiouhlíková analýza pyrolyzních produktů SOM naznačuje, že většina organických látek přítomných v jílových částicích je stáří převyšujícího 1 000 let [34]. Nedávné studie naznačují, že produkce a akumulace PK v sub-ekosystému půda-rostlina je nepřetržitým dějem během pedogeneze.

Jak již bylo diskutováno dříve, proces humifikace resp. geneze HL se skládá ze dvou základních kroků tzn. depolymerizace (1. krok) a syntézy (2. krok). Fáze syntézy může být rozdělena do tří dílčích kroků, z nichž první je krokem biokatalytickým a následující kroky jsou povahy abiotické katalýzy. Biokatalytická syntéza je klíčovým krokem procesu humifikace resp. vzniku HL. Tento komplexní proces biosyntézy, katalyzovaný půdními mikroorganismy je zprostředkován nepostradatelnými molekulami, jako jsou polyketidové syntázy (typu I, II a III), malonyl-CoA a acetyl-CoA. Produkované PK jsou rychle a silně adsorbovány na povrch půdních anorganických koloidních částic, a tudíž dochází k eliminaci jejich případné mikrobiální degradaci. Biosyntetizované PK mohou tedy přispívat k tvorbě centrální strukturní jednotky HL a SOM. Na centrální strukturní jednotky HL mohou být následně slabými disperzními silami sorbovány polysacharidy, proteiny a dusíkaté heterocyklické sloučeniny. V důsledku tohoto procesu jsou generovány makromolekulární soustavy HL a SOM. Ve třetím abiotickém kroku jsou adsorbované PK a makromolekulární struktury polymerovány prostřednictvím katalyticky aktivních povrchů anorganických koloidů do ještě objemnějších struktur humifikované HL a SOM. Podrobnější informace o vzniku HL resp. SOM přinášejí reference [27, 35–37].

#### 2.1.4 Vazebné možnosti HL – organominerální komplex

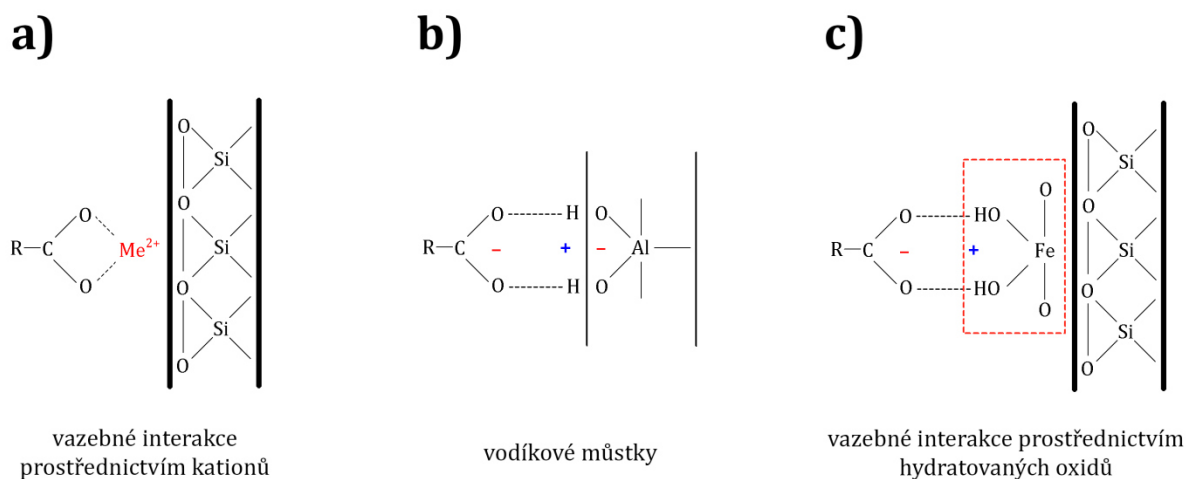
V dnešní době je již dobře známo, že organická hmota a její eminentní část HL jsou v přírodním prostředí vázány na minerální částice, se kterými vytvářejí tzv. *organominerální komplex*, a tudíž jen velmi malý počet se jich může nacházet ve volné (neimobilizované) formě. Rozlišujeme čtyři základní typy interakcí těchto biokoloidů s anorganickými ionty a minerálními částicemi. Výše zmíněné sloučeniny se v přírodních ekosystémech mohou vyskytovat jako soli alkalických kationů (humáty, fulváty, acetáty, oxaláty, laktáty atd.) případně jako chelátové sloučeniny s ionty těžkých kovů. Nicméně z environmentálního hlediska jsou nejvýznamnějšími interakcemi ty, při kterých jsou HL adsorbovány na povrchu minerálních částic, s kterými tvoří tzv. partikulární organickou hmotu POM<sup>21</sup>.

---

<sup>21</sup> Particulate organic matter (angl.)



Mechanismus vzniku POM je silně ovlivněn fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi obou komponent, ze kterých výše zmíněné organominerální komplexy vznikají. Klíčovou úlohu zde hrají slabé disperzní interakce, jako jsou van der Waalsovy síly, kationové a vodíkové můstky a v neposlední řadě i interakce, jež jsou zprostředkovány adsorpčními mechanismy [38]. Obecně lze konstatovat, že při adsorpci organických sloučenin na povrch jílových minerálů se uplatňují hydratované oxidy či interlaminární prostory anorganických částic. Hypoteticky možné interakce mezi organickými sloučeninami a minerálními částicemi jsou schematicky znázorněny na Obrázku 4.



Obrázek 4: Vazebné možnosti půdní organické hmoty a HL.

### *Van der Waalsovy přitažlivé síly*

Tyto slabé disperzní interakce jsou generovány mezi všemi molekulami organominerálního komplexu, avšak vazebná energie těchto přitažlivých sil mezi jednotlivými atomy je poměrně nízká tj.  $\sim 4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Van der Waalsovy přitažlivé síly jsou indukovány fluktuací hustoty elektrického náboje, zatímco jsou interagující atomy k sobě elektrostaticky přitahovány vzniklými indukovanými dipóly. Tyto zcela nespecifické interakce hrají klíčovou roli při stabilizaci struktury HL a SOM.

### *Vazebné interakce prostřednictvím kationů*

V půdním prostředí jsou organické anionty odpuzovány od negativně nabitých povrchů jílových minerálů. Aby mohlo dojít k adsorpci HL na tyto anorganické povrchy jako je např. montmorillonit je zapotřebí přítomnosti polyvalentního kationu na výměnném komplexu. Na rozdíl od monovalentních kationů ( $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ ) jsou vícemocné kationy schopny udržovat neutrální náboj na povrchu interagujících komponent v důsledku kompenzace náboje jílové částice a organické hmoty. Hlavními polyvalentními kationy, které jsou přímo zodpovědné za vazbu HL a SOM na minerální částice jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ , přičemž  $\text{Ca}^{2+}$  ionty tvoří s výše zmíněnými organickými sloučeninami nejméně stabilní komplexy. Naproti tomu, trojmocné ionty tvoří velmi silné koordinační komplexy s těmito biokoloidními látkami. Na tomto místě je nutné podotknout, že v případě organických sloučenin s dlouhými řetězci

substituovanými reaktivními funkčními skupinami je velmi pravděpodobné, že vazebný mechanismus bude zprostředkován na několika místech minerální částice. V porovnání s ostatními interakcemi je vazebná energie těchto přitažlivých sil poměrně vysoká, jejíž hodnota může dosahovat až  $80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

#### *Vodíkové můstky*

Z architektonického uspořádání této interakce se jedná o vzájemné působení přitažlivých sil mezi polárními skupinami OM a adsorbovanými molekulami vody na povrchu minerálních částic anebo kyslíkem obsaženým v křemičitanech s přispěním jediného iontu  $\text{H}^+$ . Vazebná energie jednotlivých vazeb H-můstků je relativně nízká, avšak v důsledku aditivního chování lze předpokládat, že celková adsorpční energie může být znatelná. Rovněž lze předpokládat, že odstranění přebytečné hydratační vody bude mít za následek zvýšení tohoto vazebného mechanismu v důsledku prostorového přiblížení HL k povrchu minerální částice.

#### *Vazebné interakce prostřednictvím hydratovaných oxidů*

Hydratované oxidy hrají v půdním prostředí nezastupitelnou úlohu v mechanismu sorpce HL a SOM, a to v případě, že je povrch jílových částic pokryt vrstvami těchto hydratovaných sloučenin. Organické aniony jsou k těmto povrchům přitahovány coulombickými silami. V tomto případě by bylo možné adsorbované organické sloučeniny snadno odstranit působením roztoků solí alkalických zemin anebo zvýšením hodnoty pH půdního roztoku. Skutečnost je však odlišná, jelikož výše zmíněnými postupy lze z půdní matrice získat jen omezené množství organických sloučenin, a tudíž je zřejmé, že majoritní část adsorbované OM je vázána ostatními vazebnými mechanismy. Tato vazebná interakce je realizována koordinací anebo výměnou ligandu v případě, kdy anionové skupiny proniknou do sféry iontu kovu a následně se tak stanou součástí povrchové vrstvy hydratovaného oxidu. Sorpční mechanismus FK na povrch hydratovaného oxidu je vždy doprovázen eliminací  $-\text{OH}$  skupin karboxylovými aniony.

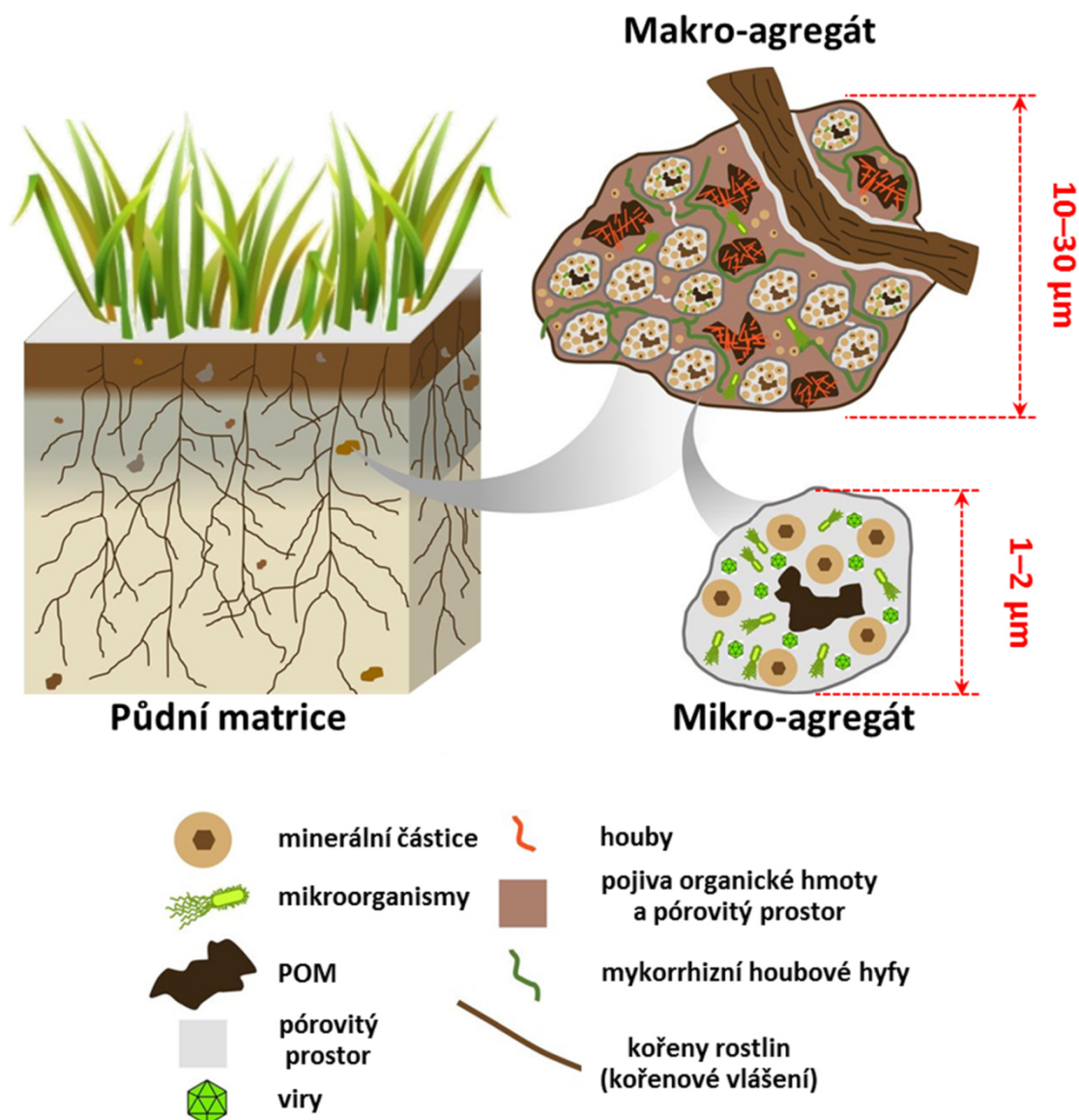
#### *Vazebné interakce prostřednictvím interlamelárních prostor jílových minerálů*

V tomto případě existují značné rozpory a nejasnosti ohledně toho, zda jsou HL a SOM v půdním prostředí vázány prostřednictvím tohoto vazebného mechanismu.

### *2.1.5 Půdní agregáty*

Půdy jakož to složité přírodní matrice lze v obecném přiblížení považovat za komplikované trojrozměrné struktury, které jsou vytvořeny nahromaděnými půdními agregáty s variabilním stupněm pórovitosti. Půdní agregáty jsou tvořeny klastry minerálních částic a organické hmoty, ve kterých jsou přitažlivé síly, jimiž jsou tyto organominerální kompozity stabilizovány mnohem silnější, nežli síly působící mezi sousedními částicemi. Toto uspořádání umožňuje půdním agregátům přetrvávat i v místech, které jsou vystaveny smáčení a mechanickému namáhání [39]. V půdním prostředí jsou tyto agregáty samovolně a hierarchicky formovány do prostorové sítě, která hraje nezastupitelnou roli v dostupnosti vody a živin pro rostliny a mikroorganismy. V tomto ohledu lze konstatovat, že architektura konkrétní půdy ovlivňuje interakce mezi rostlinami, mikroorganismy a půdní matricí.

## Zjednodušené schéma půdního horizontu



Obrázek 5: Zjednodušené schéma půdního horizontu, převzato upraveno [40]

Půdní agregáty mohou být klasifikovány na základě jejich velikosti na mikro-agregáty (< 250 μm) a makro-agregáty, jejichž rozměr je dán rozmezím 0,25–2 mm. Půdní částice se samy organizují z jílu, uhličitanů a jiných minerálů pocházejících ze zvětralých hornin, přičemž jsou navzájem formovány do větších shluků prostřednictvím elektrostatických sil [40, 41]. Na tomto místě je nutné říci, že tyto struktury jsou rovněž tvořeny adsorbovanými fragmenty POM. Mikro-agregáty se vyznačují silnou odolností vůči mechanickému a fyzikálně-chemickému namáhání, což jim umožňuje přetrvávat v půdě celá desetiletí. Malé mikro-agregáty jsou postupně formovány do větších makro-agregátů, které jsou stabilizovány organominerálními komplexy hub, kořenovým vlášením a fragmenty OM. Výsledná morfologie půdních agregátů tzn. tvar a velikost

průtokových kanálků procházejících skrz ně, ale také kolem nich, respektive i obsah OM spoluvytvářejí jednotku strukturně-funkčních vztahů ovlivňujících fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti většiny půd [42].

Mimo jiné distribuce a relativní hojnost půdních agregátů ovlivňuje objemové vlastnosti půdy, obsah organického uhlíku, ale i vody a v neposlední řadě i místa, jež mohou být obsazována půdními mikroorganismy. Výše zmíněné faktory jsou určujícími aspekty pro „životní prostředí“ mikrobiálních komunit, které jsou přímo ovlivněny těmito abiotickými vlivy, a tudíž může docházet k jejich různorodým metabolickým aktivitám [43]. V půdním prostředí jsou asociace s agregovanými půdními částicemi spíše pravidlem než výjimkou. Většina půdních bakterií se sdružuje v okolí makro-agregátů, přičemž jejich nezanedbatelná část je přímo deponována v mikro-agregátech, kde tyto mikroorganismy žijí. Půdní mikroorganismy mají tendenci se shlukovat navzájem tzn. tvořit kolonie, avšak pouze 1 % nejsvrchnější vrstvy rhizosféry<sup>22</sup> je kolonizováno půdními mikroorganismy [44]. Některé buňky se v průběhu geneze agregátů zachytí v minerální matici, zatímco jiné kolonizují půdní částici z vnějšku prostřednictvím kapilární elevace. Výsledná pórovitost a propojení půdních agregátů je ovlivněna pestrostí bakterií a hub, které jsou přítomny v průběhu jejich formace. Z výše zmíněného závěru lze usuzovat, že výsledná struktura půdní matrice vytváří zpětnou vazbu mezi stanovištěm a obyvatelům [45].

Půdní mikro- a makro-agregáty slouží především jako funkční jednotky půdního ekosystému. V tuto chvíli je bezesporu jasné, že rozličné mikrobiální interakce ovlivňují nejen prostou geochemii, ale i koloběh anorganických a organických nutrientů v půdních ekosystémech. Jednotlivé interakce mezi mikroorganismy mohou mít neaditivní účinek na geochemické procesy, a tudíž synergické anebo konkurenční interakce mezi jednotlivými taxony ovlivňují metabolické funkce vzhledem k mikroorganismům jednoho druhu. Například mikrobiální kokultury mohou degradovat lignocelulózovou biomasu podstatně efektivněji než by tomu bylo v případě stejného druhu. Účinnost degradace biopolymerních sloučenin může být v prostředí mikrobiální kokultury až 18× vyšší, v porovnání s monokulturami [46].

#### *Vliv struktury půdních agregátů na mikrobiální společenství*

Musíme mít na paměti, že společenstva mikroorganismů se v půdním prostředí nevyskytují jako homogenní vzorky či monokulturální izoláty, nýbrž v nich vytvářejí komplikované systémy vazeb, které jsou determinovány jejich vzájemnou spoluprací a komunikací [47]. Tyto interakce mohou výrazně ovlivnit jejich komunitní metabolismus a také koloběh živin v důsledku rozdílného mechanismu pro expresi jejich genů. Jednotlivé diference v genové expresi jsou vyvolány geochemickými procesy, a také vedlejšími produkty, které jsou generovány sousedními mikroorganismy jako sekundární metabolity. Na tomto místě je nutné poznamenat, že výše zmíněné metabolity mohou hrát úlohu signálních molekul v rámci jejich kooperace v daném mikroprostředí. Tuto spolupráci lze velmi dobře ilustrovat na příkladu syntrofie<sup>23</sup> mezi fermentačními bakteriemi a methanogenními archeami, které jsou schopny

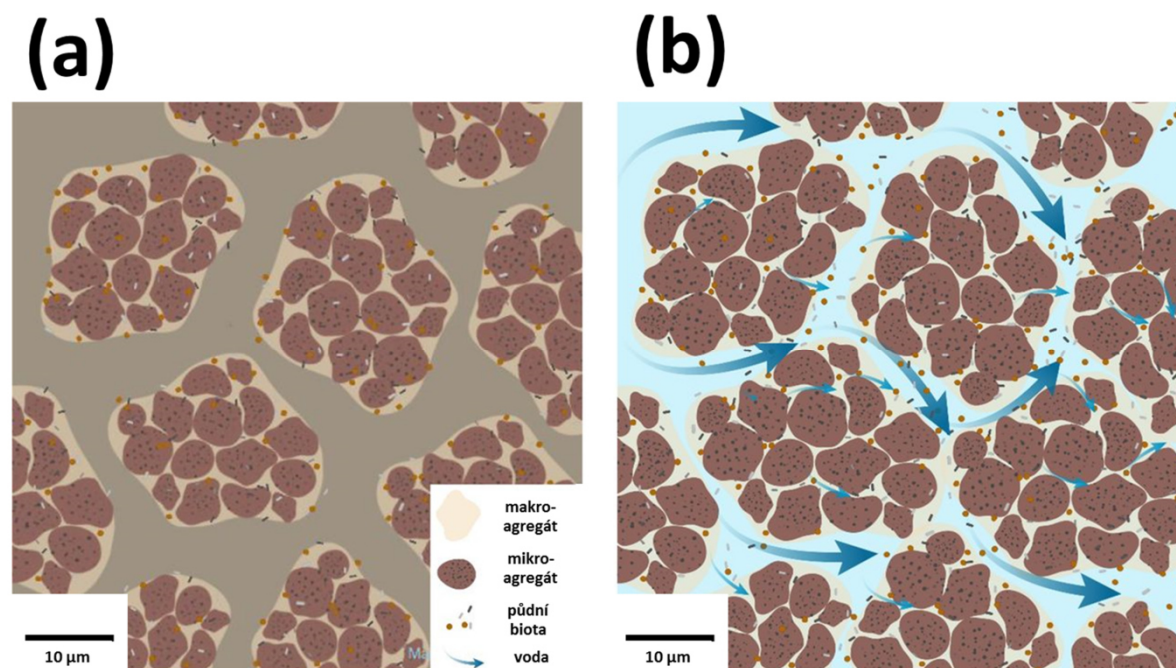
<sup>22</sup> Oblast nejbližšího okolí půdy prostoupená kořenovým systémem rostlin resp. životní prostředí půdních mikroorganismů.

<sup>23</sup> Kooperace dvou nebo více mikroorganismů v rámci bonifikace svých metabolických drah.



katabolizovat biopolymerní makromolekuly OM, čímž přispívají k optimální bilanci organického uhlíku v uhlíkovém cyklu. Předpokladem syntrofické spolupráce půdních mikroorganismů je jejich vzájemný kontakt v půdním prostředí, přičemž vzdálenost mezi koexistujícími mikroorganismy nesmí klesnout pod určitou mezní hranici [48].

Architektura půdních agregátů je determinujícím prvkem mechanismu stabilizace mikrobiální komunity a zároveň je faktorem ovlivňujícím interakce mezi jednotlivými členy půdní bioty. Jednu z nejvýznamnějších funkcí půdních agregátů zaujímají jejich póry, které mohou být lokalizovány v meziprostorech tzv. inter-agregované póry (10–30  $\mu\text{m}$ ) anebo uvnitř těchto struktur tzv. intra-agregované póry (1–2  $\mu\text{m}$ ) [49]. V této souvislosti je zřejmé, že velikost a objemová hustota pórů bude určujícím prvkem difuze plynů a rozpuštěných látek v půdním prostředí. Efektivní difuzní koeficient plynu je silně závislý na velikosti pórů, přičemž jeho hodnota poměrně rychle klesá se snižující se velikostí těchto struktur. Transport rozpuštěných látek je obvykle vyšší v nasycených půdách, avšak opačné podmínky tj. sucho, mohou účinně izolovat půdní mikroorganismy v pórech, přičemž se stávají izolovanými „solitéry“ od dostupných živin či mikrobiálních signálních molekul. Toto prostorové omezení může vykonávat důležitou kontrolu v mechanismu dostupnosti živin v půdních agregátech a také může být nástrojem k pochopení rozličných metabolických cest odehrávajících se v půdním ekosystému [40].



Obrázek 6: Vliv vlhkostních podmínek na architekturu osídlení půdních agregátů mikroorganismy a (an)organickými látkami (výživové prvky, signální molekuly, SOM atd.): **(a)** suché podmínky; **(b)** vlhké podmínky, převzato upraveno [40].

Morfologie půdních agregátů je schopna významně ovlivnit hydrologickou konektivitu půdy, která má zásadní vliv na mikrobiální komunitu [50]. Dále lze předpokládat, že výše zmíněný faktor hraje klíčovou roli v transportu metabolitů, signálních molekul, genetického materiálu a v neposlední řadě i virových částic v mikroprostředích, ve

kterých se nacházejí intra-agregátní komunity mikroorganismů. Tyto mikrobiální komunity se pak mohou chovat jako nezávislé společenstva, ve kterých jsou dostupné všechny nezbytné nutrienty. Pokud jsou tyto izolované společenstva vystaveny stresujícím podmínkám, období sucha apod., tak každá agregovaná komunita je schopna nezávislého života na ostatních. V tomto případě jsou potřebné živiny uvolňovány prostřednictvím rezidentních mikroorganismů a buněk, které se nacházejí ve fázi lýzy [51]. Rozpuštěný organický uhlík je v tomto prostředí mobilizován procesem smáčení, který rovněž umožňuje transport metabolitů a genetického materiálu.

Z výše zmíněných závěrů vyplývá, že diskontinuální propojení mezi nezávislými společenstvy půdních agregátů má nezanedbatelný vliv na ekologii a vývoj půdní bioty. Dále lze předpokládat, že tímto způsobem je v půdním ekosystému udržována vyšší genetická variabilita, než by tomu bylo v případě smíšené populace o stejné velikosti [52]. V případě, kdy jsou půdy narušeny, tak v nich může docházet k přeskupení celých půdních agregátů, čímž je rovněž usnadněn přenos genů resp. genové variability mezi různorodými komunitami.

## 3 METODY IZOLACE A FRAKCIONACE HUMINOVÝCH LÁTEK

Jak již bylo uvedeno v subkapitole 2.1.1, jednotlivé frakce HL mohou být rozděleny do tří základních kategorií na základě jejich rozpustnosti resp. nerozpustnosti v alkalickém či kyselém prostředí. Těto fundamentální vlastnosti je s výhodou využíváno při izolaci a následné frakcionaci těchto *biokoloidních* sloučenin. V dnešní době je publikována celá řada izolačních metod, které se mohou navzájem lišit, avšak lze v nich vysledovat jistou podobnost, která obecně vytváří páteřní schéma všech těchto navržených postupů. Zvolený postup izolace obvykle bývá odrazem přírodní matrice, ze které jsou HL macerovány či extrahovány. To znamená, že jiná metoda je použita pro pevné resp. sypké přírodní matrice (hnědé uhlí, rašelina, půda, kompost, sediment, alginit, sypké komerční přípravky na bázi lignohumátu aj.) a jiná pro ty, které se nacházejí v kapalném stavu (sladkovodní a mořské vody, podzemní vody, roztoky půdních kondicionérů atd.).

### 3.1 Standardní postup izolace HL dle společnosti IHSS

Jak název této subkapitoly napovídá, metoda izolace HL navržená mezinárodní asociací IHSS<sup>24</sup> je širokou vědeckou společností brána jako standardní postup, v důsledku něhož mohou být jednotlivé vzorky HL navzájem kvantifikovány a porovnávány. Na tomto místě je nutné podotknout, že tato metoda izolace a frakcionace HL byla navržena jak pro pevné, tak i pro kapalné přírodní matrice [53–56].

#### 3.1.1 Standardní postup izolace HL z „solid-state“ přírodních matric

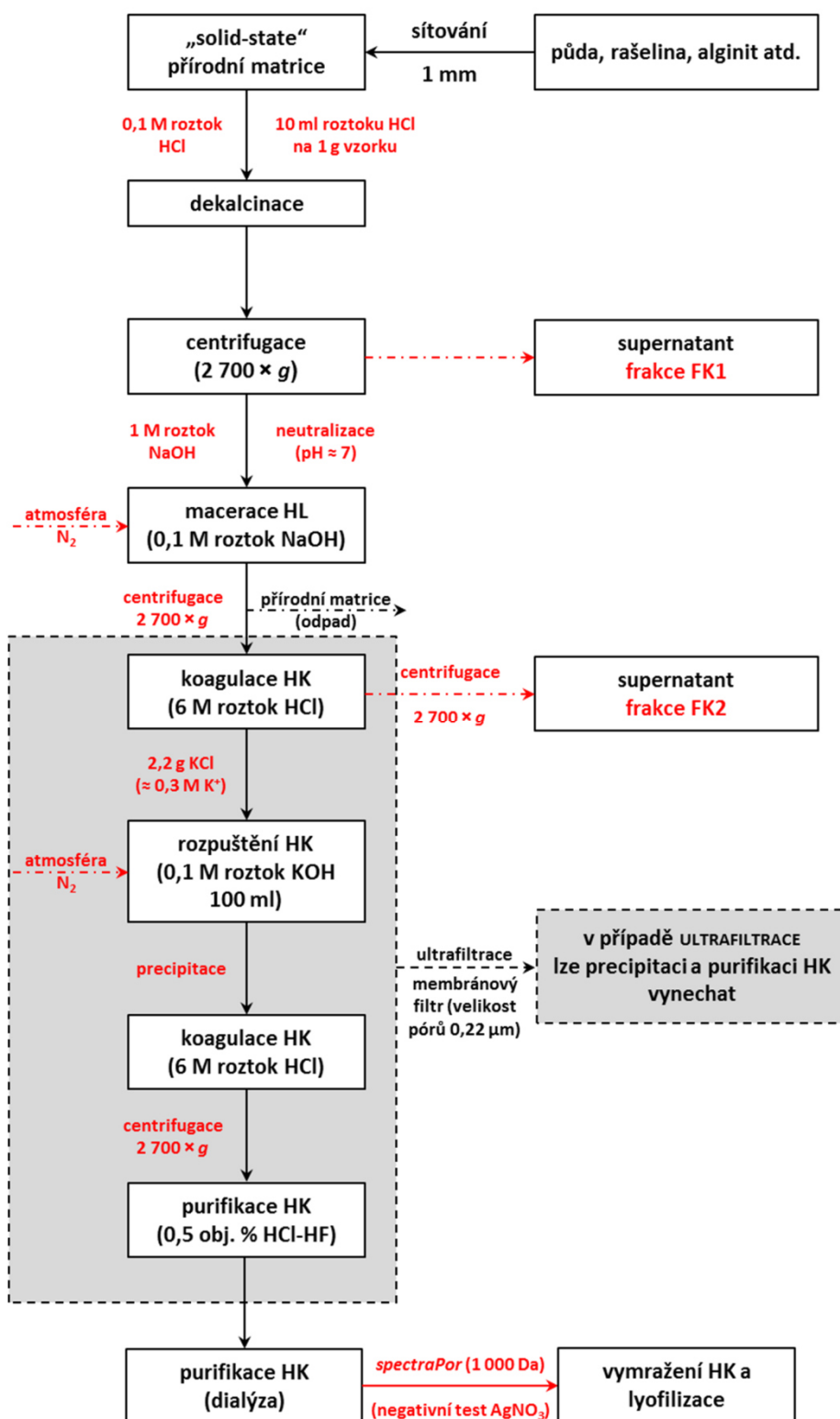
Primárně je tato metoda založena na postupu alkalické macerace HL z „solid-state“ přírodní matrice, kdy po odstranění nerozpustného podílu jsou z alkalického roztoku vysráženy HK pomocí silné minerální kyseliny. Detailní schéma tohoto standardního postupu je znázorněno na Obr. 7. V této souvislosti budou diskutovány pouze kritické body, které hrají klíčovou roli v předloženém postupu a zároveň jsou schopny významně ovlivnit kvalitu izolovaných HL. Před samotnou alkalickou extrakcí je nutné podrobit přírodní matici prvnímu purifikačnímu kroku tzv. dekalcinaci<sup>25</sup> prostřednictvím 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové. V důsledku tohoto purifikačního kroku mají izolované HL nižší obsah anorganických příměsí tj. popela. Na tomto místě je nutné podotknout, že tento roztok obsahuje již první frakce FK<sup>26</sup>, které mohou být z něho následně izolovány na hydrofobních pryskyřicích. Vlastní alkalická extrakce resp. macerace OM probíhá v inertní atmosféře dusíku. Působením této atmosféry jsou zabezpečeny takové podmínky, při kterých nedochází k autooxidaci některých organických složek OM

<sup>24</sup> Mezinárodní společnost pro výzkum huminových látek.

<sup>25</sup> Odstranění iontů Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, atd.

<sup>26</sup> Frakce FK1 s obsahem fulvinových kyselin a lehce hydrolyzovatelné OM.

a zároveň jsou tím eliminovány i kondenzační reakce, které mohou teoreticky probíhat mezi přítomnými aminokyselinami, redukujícími sacharidy a chinony, jež jsou substituovány reaktivními C=O funkčními skupinami.



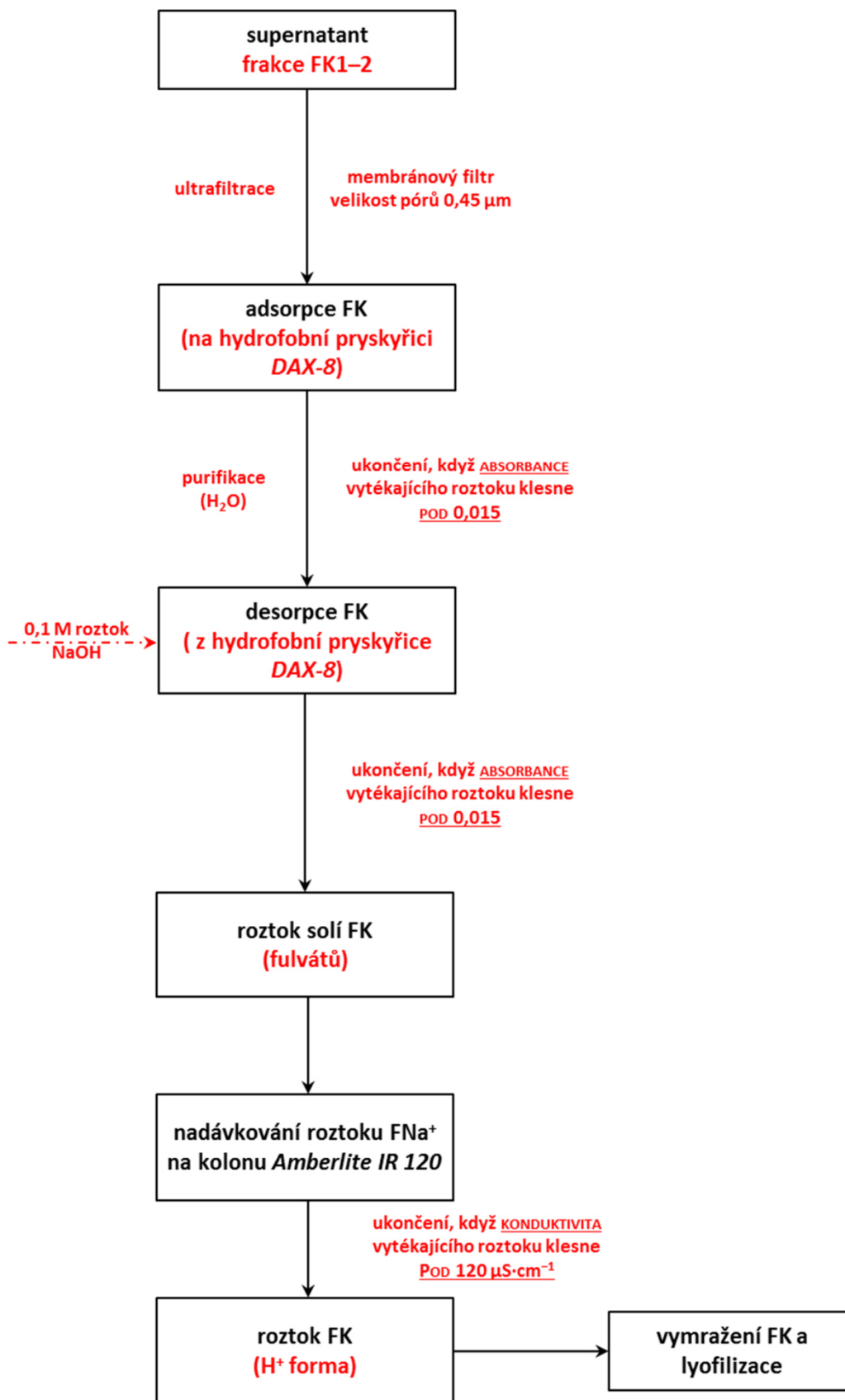
Obrázek 7: Schématické znázornění izolace HK z „solid-state“ přírodních matic.



V průběhu koagulace HK obvykle dochází k intra- a interadsorpci nerozpustných frakcí tj. huminů (HU) a jílových minerálů prostřednictvím elektrostatických sil. Tyto kontaminanty negativně ovlivňují rozpustnost, obsah popela a kvalitativní složení izolovaných HK. Tento problém lze vyřešit dvěma způsoby, a to buď precipitací již koagulovaných HK v prostředí silného elektrolytu, anebo zfiltrovat alkalický roztok obsahující veškerou OM přes membránový filtr o průměru ok 0,22  $\mu\text{m}$ . Tímto způsobem jsou na membráně zachyceny nerozpustné HU a jílové částice. V obou těchto případech je supernatant zdrojem nízkomolekulárních FK, které jsou v izolačním schématu označovány jako druhá frakce FK. V posledním purifikačním kroku jsou precipitované HK přečištěny pomocí roztoku s obsahem 0,5 obj. % HCl a HF. Působením tohoto roztoku jsou z HK odstraněny adsorbované silikáty a ionty těžkých kovů tj.  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  atd. V případě HK, které byly přečištěny pomocí ultrafiltrace (0,22  $\mu\text{m}$ ) lze tento purifikační krok vynechat. Tímto standardním postupem izolace HL jsou získány hydrofilní i hydrofobní frakce HK.

Jak je uvedeno výše, v průběhu izolace HK jsou získány dvě na sobě nezávislé frakce FK, které je však zapotřebí dále izolovat a purifikovat pomocí specifické adsorpce na hydrofobní pryskyřici DAX-8. Je zřejmé, že jednotlivé frakce obsahují nejen nízkomolekulární FK, ale i různorodé organické sloučeniny autochtonního a alochtonního původu. Jedná se především o snadno hydrolyzovatelné alifatické a aromatické organické kyseliny. Tyto strukturně jednoduché biomolekuly jsou hlavními komponenty rozpuštěné organické hmoty přítomné v přírodní matici. Standardní metodu izolace FK můžeme rozdělit na dvě části, a to podle toho, jakých fyzikálně-chemických dějů je v těchto separačních postupech využíváno. Jedná se především o specifickou adsorpci nízkomolekulárních FK na hydrofobní pryskyřici a jejich následnou protonizaci pomocí vhodně zvoleného katexu. Podrobné schéma izolace FK dle standardního postupu IHSS je uvedeno na Obr. 8.

V tuto chvíli je nutné zmínit, že před samotným nadávkováním veškerých FK na kolonu naplněnou hydrofobní pryskyřicí DAX-8 je zapotřebí tento roztok podrobit ultrafiltraci přes membránový filtr o průměru pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Tímto způsobem jsou odstraněny případné kontaminace roztoku FK od vysokomolekulárních frakcí HL, které nemusely být kvantitativně odstraněny při centrifugaci koagulovaných HK. Jedná se především vždy o stopové množství v řádu několika mg. Dříve než se přistoupí k vlastnímu naplnění skleněné kolony touto hydrofobní pryskyřicí je zapotřebí ji nejdříve přečistit organickými rozpouštědly ( $\text{Et}_2\text{O}$ , MeOH, aj.) a aktivovat pomocí 0,1 M roztoků HCl a NaOH.



Obrázek 8: Schématické znázornění izolace FK z „solid-state“ přírodních matic.

Na takto připravenou kolonu se nadávkují veškeré frakce FK, které byly získány během izolace HK. Jakmile je celý objem FK nadávkován, tak lze přistoupit k promytí kolony destilovanou vodou. Touto purifikační procedurou se zajistí, že izolované vzorky FK nebudou kontaminovány nehuminovými biomolekulami, které můžeme souhrnně označit jako lehce hydrolyzovatelné organické kyseliny. Aby bylo zajištěno kvalitativních podmínek tohoto purifikačního procesu, tak lze s výhodou využít identifikace těchto biomolekul v odcházejícím eluátu pomocí UV/Vis spektrometrie. Podstatou tohoto screeningu je měření absorbance při vlnové délce 350 nm, jelikož výše zmíněné organické sloučeniny se při této vlnové délce vyznačují eminentní absorbcí. Kritériem k ukončení tohoto purifikačního procesu je zjištěná hodnota absorbance eluátu, která by neměla být vyšší než 0,015. V dalším kroku se může přistoupit k vlastní desorpci adsorbovaných FK pomocí 0,1 M roztoku NaOH. Jako v předešlém případě je desorpce FK ukončena, když hodnota absorbance eluovaného roztoku klesne pod mezní hodnotu 0,015. Musíme mít na paměti, že izolované FK se nacházejí ve formě fulvátů tj. solí fulvinových kyselin. Abychom získali FK v kyselé formě, tak je třeba získané vzorky znovu naprotonovat. Za tímto účelem lze použít skleněnou kolonu naplněnou katexem Amberlite IR 120, případně jinou iontově-výměnnou pryskyřicí, která je schopna výměny  $\text{Na}^+$  iontů za  $\text{H}^+$ . Roztok se nechává opakovaně protékat přes náplň kolony, v důsledku čehož dochází ke kationové výměně mezi kyselými funkčními skupinami katexu ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) a nízkomolekulárními FK. Zpětná protonace je ukončena až ve chvíli, kdy hodnota konduktivity vytékajícího roztoku klesne pod hranici  $120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Následně může být vzorek FK vymražen a lyofilizován. Takto izolované FK jsou označovány jako hydrofobní frakce nízkomolekulárních HL. Jestliže je u vzorku FK očekáván abnormálně vysoký obsah anorganických příměsí tj. popela lze ho purifikovat, jako v případě HK tzn. pomocí směsného roztoku HCl-HF.

Po tomto purifikačním postupu je nutné izolované HL dále dialyzovat. K tomuto účelu lze s výhodou použít dialyzační membrány o velikosti pórů 1 000 Da. Suspenze HK a roztoky FK jsou dialyzovány proti destilované vodě, kdy do okolního roztoku přecházejí  $\text{Cl}^-$  a  $\text{F}^-$  ionty. Proces dialýzy je obvykle ukončen v případě negativní zkoušky na přítomnost těchto anionů v dialyzačním roztoku. Nejjednodušším provedením této zkoušky je sledování případné sraženiny pomocí  $\text{AgNO}_3$ .

### 3.1.2 Standardní postup izolace HL z „liquid-state“ přírodních matric

Standardní metoda izolace HL z kapalných přírodních matric (sladkovodní a mořské zdroje, podzemní vody, případně roztoky komerčních půdních a rostlinných kondicionérů) vychází z již diskutované metody, která byla navržena pro separaci FK.

Jako v případě izolace FK z „solid-state“ přírodní matrice je zapotřebí vzorek přírodní vody<sup>25</sup> upravit, nežli ji je možné nadávkovat na kolonu naplněnou hydrofobní pryskyřicí DAX-8. Jedná se především o ultrafiltraci přes membránový filtr o velikosti pórů  $0,45 \mu\text{m}$ , kdy jsou ze vzorku přírodní vody odstraněny nerozpustné částice, jako jsou anorganické částice, řasy, sinice, zooplankton atd. Takto před upravený vzorek přírodní vody je okyselen na hodnotu  $\text{pH} > 2$ . V tuto chvíli se vzorek přírodní vody nadávkuje na kolonu naplněnou pryskyřicí, kdy dochází k selektivní adsorpci veškerých HL obsažených ve zdrojové matrici. Adsorbované HL jsou z kolony eluovány pomocí 0,1 M roztoku NaOH. Na tomto místě je nutné říci, že bezprostředně po eluci HL je zapotřebí

roztok okyselit, aby nedocházelo k autooxidaci získaných HK. Koagulované HK se odstraní od původního roztoku obsahujícího FK a snadno hydrolyzující organické kyseliny centrifugací. V tuto chvíli lze přistoupit k purifikaci získaných HK prostřednictvím sekvenčního promývání a dekantace. Purifikační procedura je ukončena v případě negativní zkoušky na přítomnost  $\text{Cl}^-$  iontů. Následně jsou přečištěné HK rozpuštěny pomocí 0,1 M roztoku NaOH. Takto získaný roztok solí HK tzn. humátů je podroben zpětné protonaci na ionto-výměnné koloně naplněné katexem Amberlite IR 120.

K izolaci FK je v tomto případě přístupováno obdobně ne-li stejně, jako by byly izolovány z „solid-state“ přírodních matric.

Dále se můžeme v odborných publikacích setkat s tvrzením, že HL lze z přírodních matric extrahovat pomocí směšného roztoku  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  a NaOH [57]. I když se obecně uvádí, že tímto postupem jsme schopni dosáhnout podstatně vyšších výtěžků izolovaných HL resp. HK, tak na druhou stranu musíme konstatovat, že tato procedura v sobě skrývá více problémů než pozitiv. Jedná se především o vyšší obsah anorganických příměsí tj. popela, který však nelze odstranit výše zmíněnými purifikačními kroky, aniž bychom negativně neovlivnili kvalitativní stránku izolovaných HL. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že pyrofosfát vytváří během macerace silné organominerální komplexy s HL, a proto ho lze odstranit jen s velkými obtížemi. Mimo jiné se zdá, že toto činidlo je více selektivní pro nehumínové biomolekuly přítomné v OM, a tudíž mohou být izolované HL lehce kontaminovány těmito organickými sloučeninami.

Výše zmíněné izolační metody jsou ve své podstatě fokusovány na získání organické hmoty, která je determinována snahou o dosažení co nejvyšší čistoty extrahovaných HL resp. DOM. Obecně lze říci, že měřítkem k posouzení vhodnosti zvoleného izolačního postupu je obsah popela tzn. množství nespalitelného podílu v izolovaných HL a DOM. Mimo jiné je i vidět, že určitá váha je kladena na extrakční účinnost použité metody, tedy jinými slovy, snahu o dosažení co nejvyšších výtěžků izolovaných HL. V tomto kontextu přichází v úvahu myšlenka, zda těmito izolačními postupy nedochází k faktickému zkreslení naší představy o HL, jelikož tyto unikátní *biokoloidní* sloučeniny jsou přinejmenším v půdním prostředí silně vázány na povrchu minerálních částic. V tuto chvíli může být vznesena otázka: „Jaké organické sloučeniny jsou extrahovány z přírodních matric prostřednictvím roztoků silných zásad a odpovídají svými kvalitativními vlastnostmi reálným HL a DOM přítomným v in-situ?“ Jednou z možných cest jak se s touto problematikou vyrovnat je studium organických sloučenin v přítomnosti organominerálního komplexu. Jak již bylo diskutováno výše, v půdní matrici je organická hmota adsorbována na povrchu minerálních částic, s kterými vytváří zmíněný „kompozitní“ komplex. Jednotlivé shluky jílových částic s adsorbovanými molekulami OM málokdy přesahují koloidní rozměry, avšak jejich typická velikost se pohybuje v rozmezí 100–200 nm. Pokud jsou tyto „kompozitní“ částice smáčeny vodou obvykle se reorganizují do klastrů fraktální podoby za vzniku tzv. *půdního huminového gelu* [58], který se obecně vyznačuje vysokou mobilitou v půdním profilu. Této vlastnosti lze s výhodou využít k izolaci neporušeného půdního gelu z přírodní matrice. Půdní huminový gel je obvykle izolován principem vzlínání vody přes vrstvu půdní matrice. Po převrstvení celého objemu půdní matrice stoupající vodou je

na její hladině přítomna vrstva půdního gelu ve formě tenké opalescentní vrstvy. Ať už si to ovědomujeme nebo ne, tak s tímto fenoménem se můžeme běžně setkat v přírodě, kdy po vydatnějších dešťových srážkách a vhodných podmínkách je tento film přítomen na většině hladin doposud půdou nevsáklé vody.

Jak již bylo diskutováno dříve, tak adsorbované supramolekuly HL resp. jejich konstituční jednotky jsou z termodynamického hlediska uspořádány do hydrofilních a hydrofobních podoblastí, které se od sebe liší svým stupněm lokální hydrofility, a proto často mluvíme o jejich amfifilních<sup>27</sup> vlastnostech. Z této prostorové reorganizace HL vyplývá, že jejich povrchové oblasti obsahují silně polární karboxylové skupiny, které jsou obklopeny iontovou atmosférou, jejíž překryv je z termodynamického hlediska nevýhodný. Naproti tomu se předpokládá, že hydrofobní oblasti HL budou mít tendenci k prostorové reorganizaci, tak aby se snížil jejich kontakt s vodou. Tyto konformační změny v supramolekulárním uspořádání jsou doprovázeny zvýšením translační entropie molekul vody a v neposlední řadě i celého koexistujícího systému. V důsledku výše zmíněných intra- a intermolekulárních interakcí doprovázených pulzováním iontové atmosféry kolem hydrofilních domén jsou supramolekulární struktury HL vzájemně formovány do klastrů fraktální podoby. Tento proces je doprovázen lokálním zvýšením koncentrace fraktálních shluků, v důsledku čehož se tyto shluky navzájem pronikají, a to kvůli nízkému stupni naplnění jejich objemů částicemi HL. Mimo jiné, tyto překrývající se fraktální shluky na sebe vzájemně působí prostřednictvím hydrofobních domén, které jsou orientovány z vnější strany, a proto je tento proces z termodynamického hlediska příznivý. Na tomto místě můžeme bez zjevného zaváhání konstatovat, že půdní huminový gel hraje klíčovou roli v kontrole vlhkostního hospodaření ve vlhkých či aridních<sup>28</sup> půdách v důsledku hydrofobních a hydrofilních interakcí mezi jílovými částicemi a supramolekulami HL [59–63].

## 3.2 Metody frakcionace HL

V úvodní části této subkapitoly je dobré zmínit, že snaha o objasnění molekulárního složení HL byla v širším měřítku iniciována až v době, kdy se na tyto biokoloidní látky začalo nahlížet jako na supramolekulární struktury skládající se z relativně malých molekul stabilizovaných slabými vazebnými interakcemi, jako jsou van der Waalovy síly aj. Toto pojetí motivovalo určitou část vědecké společnosti zabývající se chemií HL resp. DOM, zda by nebylo možné tyto supramolekuly destabilizovat a získat tak jejich jednotlivé stavební kameny, které by bylo možné následně identifikovat a kvantifikovat. Je zřejmé, že tento výzkumný směr byl do značné míry determinován okamžikem, kdy na rozdíl od tradičního makro-polymerního modelu skýtajícího nepřehledné množství hypotetických struktur bylo v tomto případě dosaženo jisté, avšak do posud „křehké“ shody, a to napříč širokou vědeckou komunitou. Dále je na tomto místě nutné podotknout, že této konzistence v chápání struktury HL bylo dosaženo především faktem, kterého nebylo možné doposud snadno rozporovat, a to zejména, že supramolekuly HL jsou ve vodě schopny vytvářet meta-stabilní konformace, které

<sup>27</sup> Obojaké, molekuly či strukturální útvary mající hydrofilní a hydrofobní vlastnosti.

<sup>28</sup> Velmi suché klima s nedostatečnými sezónními dešťovými srážkami.



mohou být narušeny interakcemi s amfifilickými organickými kyselinami. Této vlastnosti destabilizace supramolekulární struktury HL bylo s výhodou využito při separaci a následné kvantifikaci jednotlivých stavebních bloků pomocí velikostně vylučovací chromatografie a její sofistikované metody SEC-MALLS.

Dřívější snahy o získání jednotlivých fragmentů spoluvytvářejících molekulární strukturu HL v sobě skrývaly poměrně tvrdé frakcionační postupy, jako jsou oxidační a redukční degradace jednoduchých vazeb uhlík-uhlík, které však vyvolávají nežádoucí molekulární modifikaci či aromatizaci získaných organických molekul. Použití těchto „drastických“ metod jde v přímé souvislosti s dříve akceptovaným strukturním modelem, který výlučně předpokládal přítomnost pouze kovalentních vazeb mezi jednotlivými stavebními jednotkami HL. Naproti tomu, byly vyvinuty frakcionační postupy, které zohledňovaly mírné štěpení intra- a intermolekulárních interakcí, kterými jsou stabilizovány supramolekuly HL. V současnosti je tato frakcionační metoda dobře známa jako tzv. *humeomika* [64]. Tato frakcionační procedura je tvořena sekvenčním štěpením mezimolekulárních vazeb a interakcí, jako jsou slabé vazebné interakce, perzistentní a slabé esterové vazby a v neposlední řadě i vazby etherové a glykosidické [65–67]. Obecně lze konstatovat, že sekvenční frakcionace HL na tzv. *humeomika* vede k získání jednotlivých fragmentů organických sloučenin, které jsou uvolněny ze supramolekulárních asociací, a tím bezesporu dochází k významnému snížení stupně polydisperzity resp. heterogenity analyzovaných HL. V této souvislosti je dobré poznamenat, že v průběhu destabilizace supramolekulární struktury HL jsou případné chemické resp. strukturní změny tímto postupem eliminovány, a tudíž získané fragmenty přímo odpovídají jednotlivým stavebním blokům vytvářejících tyto asociace. Není divu, že tato frakcionační metoda významně přispívá k detailnějšímu popisu chemické variability huminové OM, v důsledku čehož můžeme predikovat jejich význam a úlohu při stabilizaci huminových supramolekulárních struktur.

Je zřejmé, že výše diskutovaný postup frakcionace OM je determinován povahou analyzovaného vzorku. Jinými slovy, sekvenční frakcionaci OM na tzv. *humeomika* lze použít pouze v případě, kdy během frakcionačního postupu resp. v jednotlivých sekvenčních krocích nedochází k celkovému rozpuštění residuální matrice. V důsledku to znamená, že jsme ve výběru vzorku omezeni buď na HK anebo na tzv. neporušené přírodní matrice, kam zpravidla řadíme vzorky, které přirozeně obsahují OM resp. HL. Lze tedy uvažovat o přírodních matricích, jako jsou kaustobiolity, rašelina, půdy, sedimenty, komposty a antropogenní půdní kondicionéry (biouhly). V tuto chvíli je očividné, že tuto frakcionační metodu nelze použít v případě takových frakcí OM, která je rozpustná ve vodě anebo v širokém rozmezí hodnot relativních polarit použitých organických rozpouštědel. Do této kategorie obecně spadají FK, DOM a půdní pomocné látky, jako jsou lignohumáty.

### 3.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Jednou z možných cest, jak se pokusit o snížení molekulární heterogenity HL a přitom nebyť omezeni, jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi se zdá být jako vhodnou a experimentálně jednoduchou metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [68, 69]. Tato principiálně jednoduchá separační technika v sobě skrývá mnoho pozitivních aspektů, jenž jí dává poměrně širokou experimentální robustnost. Na tomto místě je

nutné říci, že ostatní a do jisté míry i experimentálně sofistikovanější separační resp. frakcionační techniky, jako je chromatografie HPLC s reversní (převrácenou) fází, velikostně vylučovací chromatografie (SEC), ultrafiltrace, frakcionace tokem ve fokusujících polích (FFF), kapilární elektroforéza a techniky hmotnostní spektrometrie (CE/MS a LC/MS) jsou schopny významného snížení polydisperzity studovaných HL, avšak obvykle poskytují širokopásmovou separaci jednotlivých frakcí. Tato očividná nevýhoda je způsobena především silnou afinitou separujících se složek k chromatografické koloně anebo stacionární fázi, v důsledku čehož je významně potlačena separační účinnost, která se projeví jako kontinuální chromatogram bez přítomnosti separovaných píků. Jednotlivé frakce se pak v těchto záznamech jeví jako méně výrazná ramena. Mimo jiné to vyplývá i z faktu, že v případě těchto instrumentálních technik jsme limitováni druhem resp. chemismem použité mobilní fáze.

Použití chromatografie na tenké vrstvě k frakcionaci HL v sobě skrývá mnoho výhod. Navzdory tomu je tato separační technika v dnešní době využívána stále méně, a to proto, že je zde kladen jistý požadavek na experimentální dovednost a v neposlední řadě doposud nebyla vyvinuta automatizace některých experimentálních kroků, jako je např. automatické nanesení vzorku či kontrolovaný eluční gradient. Asi jednou z nejvýznamnějších výhod této frakcionační metody je možnost použití co nejvariabilnějších druhů mobilních fází, za účelem efektivní separace organických sloučenin spoluvytvářejících supramolekulární asociace HL. V této souvislosti je zřejmé, že složení mobilní fáze může být takřka „ušito na míru“ požadavkům analyzovaných vzorků HL resp. DOM, které jsou dány jejich základními fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou hydrofobicita vs. hydrofilita, obsah kyselých či nepolárních funkčních skupin, rozpustnost aj. Jako mobilní fáze je obvykle zvolena směs navzájem mísitelných organických rozpouštědel ve snaze o co nejširší pokrytí polarit. V případě frakcionace HL je prvním krokem použití mobilní fáze směs ethylacetátu a methanolu v objemovém zastoupení 1:2 obj. % [68]. Je zřejmé, že po prvotních experimentech lze složení mobilní fáze dále upravit, a to z hlediska jednotlivých obsahů organických rozpouštědel či jejich objemových poměrů. Je dobře známo, že ke zvýšení rozpustnosti některých HK, a to zejména těch, které byly izolovány z kaustobiolitických přírodních matric významně přispívá přídavek aprotického rozpouštědla např. acetonu. Mezi další nesporné výhody chromatografie na tenké vrstvě oproti moderním instrumentálním technikám patří velká vzorkovací robustnost, možnost kvalitativní analýzy jednotlivých zón resp. organických frakcí před vlastní desorcí z povrchu TLC destičky, kvalitativní zhodnocení zón pomocí CIELAB barevného prostoru, jednoduché vybavení, snadná experimentální proveditelnost a také i ekonomická nenáročnost. Z důvodů autofluorescence HL a DOM je bezvýhradně nutné pro frakcionaci používat TLC destičky bez fluorescenčních indikátorů. V opačném případě by mohlo dojít k nežádoucí interferenci mezi emitujícími fluorofory OM a fluorescenčním indikátorem. K vlastní desorpci organických frakcí, které jsou reprezentovány příslušnými zónami přítomnými na TLC destičce lze s výhodou použít středně až silně polárních organických rozpouštědel anebo  $1 \cdot 10^{-3}$  M roztoku NaOH. S ohledem na další experimentální činnost má volba příslušného extrakčního činidla přímou souvislost. V této chvíli je třeba zmínit, že k vizualizaci čirých resp. barvy nemajících frakcí lze využít pozorovacích boxů s UVB a UVA lampami. Nespornou výhodou, kdy jsou jednotlivé frakce OM z povrchu silikagelu

( $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) anebo aluminy ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) desorbovány pomocí roztoku NaOH spočívá především v tom, že takto získané vzorky lze velmi rychle upravit k dalším analýzám, jako jsou např. spektrometrické metody. Obecně se však jedná o úpravu koncentrace a výsledné hodnoty pH, při kterých jsou získané vzorky dále analyzovány. Tyto korekce vyplývají hlavně z obecně známých pravidel, které musí být při spektrometrickém stanovení zohledněny. V této souvislosti máme především na mysli vliv pH na absorpční resp. fluorescenční koeficienty, které jsou vypočteny z příslušných UV/Vis a emisních spekter. Nelze však ani opomenout tzv. vnitřní filtrační efekt, který způsobuje výrazné odchylky od linearit mezi intenzitou fluorescence ( $I_F$ ) a koncentrací vzorku. Obvykle se nám nabízejí dvě cesty, jak se s tímto problémem vypořádat, a to buď snížením koncentrace analyzovaného vzorku, kdy optická hustota (O. D.) ve své maximální hodnotě by měla být  $\leq 0,05$  anebo použít nějakého matematického korekčního vztahu.

Jednotlivé frakce OM jsou rozděleny na základě jejich afinity k povrchu adsorbentu resp. stacionární fázi. Klíčovou úlohu zde hraje velikost intermolekulárních sil mezi povrchovými silanolovými skupinami (Si-OH) silikagelu a rozličnými funkčními skupinami, kterými jsou substituovány frakcionované fragmenty OM. Jinými slovy, to po jakou dobu setrvává organická sloučenina v objemu mobilní fáze, je přednostně určeno její afinitou k povrchu adsorbentu, a tudíž se více polární sloučeniny vyznačují obvykle nižšími hodnotami retenčních faktorů  $R_f$ . Obecně lze říci, že jednotlivé konstituční jednotky spoluvytvářející supramolekulární asociace HL jsou frakcionovány na základě obsahu polárních funkčních skupin, jako jsou karboxylové, hydroxylové a amidové. Bezpochyby je zjevné, že tyto reaktivní funkční skupiny jsou schopny s povrchem stacionární fáze vytvářet četné vodíkové vazby resp. můstky. Naproti tomu, fragmenty o přibližně stejné velikosti, avšak s vyšším obsahem nepolárních funkčních skupin, budou při interakci se stacionární fází uplatňovat tzv. Londonovy disperzní síly. Je tedy velmi pravděpodobné, že tyto organické sloučeniny se budou vykazovat podstatně vyšší mobilitou resp. eluční rychlostí reprezentovanou hodnotami  $R_f$ . Na tomto místě je nutné říci, že výsledné hodnoty retenčních faktorů separujících se molekul lze ovlivnit volbou polarit mobilní fáze. Povšechně je v platnosti, že v případě zvýšení polarit mobilní fáze se zvýší i hodnoty  $R_f$  separovaných molekul. Této vlastnosti lze s výhodou využít ke zvýšení efektivity separace jednotlivých složek majících buď nízké, anebo příliš blízké hodnoty  $R_f$ .

### 3.2.2 Sekvenční frakcionace HL na základě rozdílné polarit

Jednou z možných cest jak významně snížit molekulární složitost HL resp. OM je využití tzv. sekvenční frakcionace na základě rozdílné polarit použitých organických rozpouštědel. Dříve než se budeme zabývat výše zmíněnou metodou frakcionace, je třeba poznamenat, že tento originální postup vzešel v podstatě z náhodné myšlenky, kdy prvotně byla použita Soxhletova extrakce k izolaci bitumenů z hnědého uhlí, které bylo determinováno především svým geologickým původem tzn. rozličnými typy uhelných pánví, které se vyskytují v různých částech evropského kontinentu (Česká republika, Bulharsko, Srbsko a Polsko) [70]. Hydrofobní frakce odpovídající lipidickým sloučeninám byly z hnědého uhlí extrahovány pomocí silně nepolárního rozpouštědla tzn. chloroformu, jehož relativní polaritní index je přibližně 0,26.



Na tomto místě je nutné říci, že tato frakcionační metoda v sobě skrývá mnoho výhod v porovnání s ostatními navrženými postupy, ať už se jedná o sekvenční frakcionaci OM na tzv. humeomika [65] anebo postupy využívající rozdílné rozpustnosti HK při definovaných hodnotách pH [71]. Na základě celé řady odborných publikací můžeme konstatovat, že frakcionační postup OM na tzv. humeomika je schopen významně snížit molekulární heterogenitu analyzovaných vzorků, avšak v průběhu tohoto postupu dochází k destrukci esterových a etherových vazeb mezi jednotlivými konstituenty, jež jsou organizovány do supramolekulárních struktur a konformací. Tato metoda se v podstatě skládá ze čtyř hlavních frakcionačních kroků, které můžeme rozdělit na extrakci nevázaných složek OM tzn. unbounded a na izolaci vázaných složek, při které dochází k rozvolnění esterových a etherových vazeb v následujícím pořadí. Ve druhém kroku tohoto postupu jsou působením 12% roztoku  $\text{BF}_3$  rozvolňovány slabé esterové vazby, kdy dochází k tzv. *transesterifikaci*. Následuje krok, při kterém jsou eliminovány silné esterové vazby, a to působením tzv. methanolové alkalické hydrolýzy reprezentované 1 M roztokem KOH v MeOH. V posledním extrakčním kroku jsou rozvolňovány etherové vazby připadající alkyl/aryl-oxy konstituentům a rovněž nesmíme zapomenout na glykosidické vazby přítomné v polysacharidových residuích. V tomto kontextu přichází do úvahy otázka, zda tyto frakcionační kroky splňují prvotní ideu, že HL jsou SUPRAMOLEKULY tzn. asociáty relativně malých organických molekul, které jsou stabilizovány pouze slabými disperzními silami, jako jsou van der Waalsovy síly, CH- $\pi$  vazby atd.

V případě frakcionace HK na základě jejich rozpustnosti při určitých hodnotách pH musíme mít zvláště na paměti, že při krajních hodnotách pH nejsme schopni vyloučit nežádoucí vliv kyselé či bazické hydrolýzy. Naproti tomu, případnou oxidaci frakcionovaných fragmentů v průběhu tohoto postupu jsme schopni snadno vyřešit, a to tak, že celá procedura bude realizována v atmosféře netoxického inertního plynu tzn.  $\text{N}_2$ , He atd.

V tuto chvíli je nadevše jasné, že navržený postup sekvenční frakcionace dle polaritativního použitého organického rozpouštědla bude mít za následek snížení molekulární složitosti analyzovaných HL resp. OM, aniž by docházelo k nežádoucí eliminaci jakéhokoliv typu chemické vazby [72]. Na tomto místě je nutné podotknout, že řada vybraných organických rozpouštědel je zvolena nejen na základě hodnot jejich relativních polaritativních indexů, ale současně musíme brát v potaz i ostatní fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je teplota varu, dielektrická konstanta, dipólový moment aj. Jinými slovy, naší snahou je vybrat taková organická rozpouštědla, která se budou co nejvíce navzájem lišit ve výše zmíněných vlastnostech. Z tohoto důvodu se zdá být jako vhodná eluotropní řada následující série organických rozpouštědel: trichlormethan, ethyl acetát, aceton, acetonitril, n-propanol a methanol. Z výše zmíněného výčtu organických látek vyplývá, že v následujícím postupu sekvenční frakcionace jsme schopni získat celkem šest organických frakcí, které lze následně kvalitativně a kvantitativně analyzovat. Bezesporu, jedna z hlavních výhod této metody spočívá v tom, že získané organické frakce lze analyzovat takřka hned bez jakéhokoliv dalšího experimentálního zásahu, jako je např. purifikace, zpětná protonace atd. Je nadmíru jasné, že celková doba extrakce jednotlivých organických frakcí bude prioritně svázána s jejich obsahem v původním organickém materiálu. Celkový obsah prvních dvou frakcí (hm. %) bývá v případě HK

oproti ostatním až 20× nižší. Tento problém lze snadno vyřešit odpovídajícím zvýšením navážky původní HK, avšak za cenu podstatného prodloužení časové náročnosti extrakční procedury. Velkou experimentální výhodou tohoto postupu je, že jsme schopni snadno detekovat konec extrakce a následně tak přistoupit k dalšímu extrakčnímu kroku ve schématu sekvenční macerace HL resp. OM. Pokud máme pochybnosti, zda můžeme přistoupit k dalšímu extrakčnímu kroku, je vhodné čirý extrakt podrobit rychlé analýze na ATR-FTIR spektrometrii.

Obecně můžeme říci, že zvolený experimentální přístup sekvenční frakcionace HL je vhodným aparátem ke snížení jejich molekulární složitosti resp. heterogenity. Tímto postupem jsme schopni získat takové organické frakce, které se spolupodílejí na supramolekulární struktuře těchto unikátních biokoloidních sloučenin. Jedná se především o sloučeniny, které můžeme z kvalitativního hlediska klasifikovat jako deriváty lipidických sloučenin (mastné kyseliny, estery mastných kyselin, vosky atd.), fragmenty polypeptidů, polysacharidů, ligninu a v neposlední řadě i deriváty steroidů a rostlinných pigmentů (feofytin aj.). Za zmínku stojí i fakt, že polární organické frakce se svými kvalitativními vlastnostmi blíží původnímu organickému materiálu, s výjimkou vzorku extrahovaného acetonitrilem. Tato organická frakce se vyznačuje ryze bílkovinným charakterem, a tudíž ji lze pokládat za indikátor autochtonního původu OM. Jinými slovy, tato frakce v sobě odráží vliv mikroorganismů v průběhu geneze HL. Závěrem, přítomnost zbytkové resp. residuální HK nám obecně otevírá dvě hypotetické myšlenky, z nichž první by se týkala otázky, zda by bylo možné získat další organické frakce opětovnou sekvenční extrakcí. To by v důsledku mohlo znamenat, že většina organických sloučenin je ve struktuře HK poutána pouze slabými disperzními silami. Naproti tomu, v případě, kdy by již nedocházelo k významnému snížení její heterogenity, mohlo by to čistě hypoteticky znamenat, že tyto biokoloidní sloučeniny jsou tvořeny makromolekulárním jádrem, které je schopno interagovat s ostatními stavebními jednotkami. V tomto kontextu bychom mohli mluvit o spojení makromolekulárního a supramolekulárního strukturního modelu HL.

## 4 INTERMEZZO I

Úvodem bych rád podotknul, že jednotlivé mezihry, které jsou vloženy do této habilitační práce, budou krátkou reflexí vyplývající z experimentální a publikační činnosti, jež je výhradně fokusována na problematiku studia HL a přírodní organické hmoty. Jsem zcela přesvědčen, že zde je to pravé místo k vyřčení některých myšlenek, které by mohly vést k dalšímu rozvoji tohoto širokého, a svým způsobem i stále neutěšeného tématu. Tato věta nabývá dogmatického rozměru, pokud si uvědomíme, že ani dnes nepanuje názorový konsensus, tak v marginálních oblastech, jako je geneze či „molekulární“ struktura.

V současnosti je nejen mnohými vědeckými týmy, ale i mezinárodní společností pro výzkum huminových látek IHSS kladen stále větší důraz na unifikaci izolačního postupu. Z pohledu vědce zabývajícího se strukturou HL je to logickým vyústěním, které přednostně vede k jednotné kvalitativní charakterizaci, a to bez nežádoucích vlivů spojených s rozličnými způsoby jejich izolace. V této souvislosti máme především na mysli dopady ovlivňující heterogenitu, chemickou neměnnost v průběhu izolačního postupu, kontaminaci ne-huminovými frakcemi OM apod. Na druhou stranu se v některých specifických případech zdá být výhodné použít ty metody, které jsou určitým způsobem modifikovány, nicméně je u nich stále patrný otisk původně navrženého postupu IHSS. Jak bylo uvedeno výše (viz. subkapitola 3.1), použití směsného roztoku NaOH a  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  vede obvykle k podstatně vyšší macerační účinnosti, avšak za cenu nižší čistoty izolovaných HK, ve smyslu vyššího obsahu anorganických příměsí tj. popela. Naproti tomu, použití tohoto činidla se zdá být vhodné, a to zejména v případech, pokud je očekávaný obsah popelovin a HL v substrátu nízký. Tyto podmínky obvykle splňují takové přírodní matrice, které můžeme klasifikovat jako substráty semiantropogenního původu. Do této skupiny bychom mohli zařadit statkové a průmyslové komposty, vermikomposty, případně půdní kondicionéry na bázi lignohumátů atd. V tuto chvíli se pokusme o relevantní zhodnocení výše zmíněného postupu, který byl použit k maceraci HK pocházejících z různých druhů kompostů<sup>29, 30</sup>. Jak již bylo diskutováno dříve, kritika tohoto modifikovaného postupu spočívá především v možnosti kontaminace izolovaných HL *seskvioxydy* ( $\text{Me}_2\text{O}_3$ ), které jsou schopny vytvářet s těmito biokoloidními sloučeninami velmi silné organominerální komplexy. Mimo jiné se uvádí, že pyrofosfát vytváří s reaktivními skupinami HL silné chelátové vazby, které znesnadňují jeho následné odstranění při jejich purifikaci. Obavy, které jsou spojeny s jistou možností kontaminace izolovaných HL *seskvioxydy* či samotným extrakčním činidlem se z našeho pohledu zdají být neopodstatněné. Jinými slovy, standardní purifikační kroky, které jsou navrženy mezinárodní společností IHSS se zdají být plně dostačující k získání „čistých“ HK s obvyklými obsahy anorganických příměsí. Pro lepší ilustraci lze uvést, že obsah nespalitelného podílu nepřevýšil u izolovaných HK limitní hodnotu 3,1 hm. %. V porovnání se standardy HK

<sup>29</sup> Enev, V.; Doskočil, L.; Kubíková, L.; Klučáková, M. The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils. *J. Agric. Sci.* **2018**, *156*, 877–887.

<sup>30</sup> Hanc, A.; Enev, V.; Hrebeckova, T.; Klucakova, M.; Pekar, M. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *Waste Manag.* **2019**, *99*, 1–11.

produkovaných společností IHSS jde o srovnatelné hodnoty, které jsou vymezeny rozpětím 0,4–4,6 hm. %. Avšak, co sledujeme jako determinující, je skutečnost, že tento postup se vyznačuje nebývale dobrou selektivitou a účinností macerace huminových látek resp. HK. Tyto postuláty by mohly být shrnuty do následujících kategorií, a to: (i) mimořádná extrakční účinnost; (ii) velmi dobrá extrakční specifita.

Ukázalo se, že tento modifikovaný postup izolace vyniká svojí extrakční účinností, a proto ho lze s výhodou použít k maceraci HL z takových přírodních matric, ve kterých je jejich obsah poněkud nízký. Jedná se především o komposty *nízké zralosti*, u nichž dekompozice a následná transformace OM není doposud ukončena. Tento fakt je doložen extrakčními výtěžky HK izolovaných ze surového a kompostovaného koňského hnoje za použití kalifornských žížal (*Eisenia andrei*)<sup>30</sup>.

Na tomto místě je nutné říci, že použití tohoto postupu vede nejen k izolaci již dobře známých stavebních jednotek HK, jako jsou fluorofory A ( $\alpha$ ) – fulvic-like, ale také těch, jejichž přítomnost se v průběhu vermikompostování dynamicky měnila, tzn. T ( $\delta$ ) – tryptofan-like a C<sub>1; 2</sub> ( $\alpha_1; 2$ ) – humic-like. Naproti tomu můžeme říci, že izolované HK nebyly nikterak kontaminovány NE-huminovými sloučeninami, které by odpovídaly pouze organickým sloučeninám vzniklých při dekompozici původní OM. V této souvislosti by přicházely v úvahu makrobiopolymerní látky a jejich produkty prosté dekompozice tzn. celulóza, hemi-celulóza, bilirubin<sup>31</sup> atd. Jelikož hranice mezi organickými sloučeninami, které jsou produkty prosté dekompozice a těch, které již můžeme považovat za stabilní frakce HL, není vždy úplně jasná, tak jsme v odborných publikacích poměrně často konfrontováni s nepříliš konzistentní terminologií, kterou autoři nevolí pokaždé stejně. Nicméně, v posledních pár letech se zdá, že v komunitě vědeckých týmů panuje jistý konsensus o zavedení jednotné nomenklatury. Pokud máme na mysli organické sloučeniny, které doposud nebyly transformovány v humifikačním procesu, avšak mohou být součástí supramolekulárních asociací HL, mluvíme o nich jako o residuích původní organické hmoty. Aby byla splněna podmínka této klasifikace, je zapotřebí říci, že tato sloučenina si musí zachovávat takové kvalitativní vlastnosti, díky kterým, by jí bylo možné spojit s původním druhem biopolymeru. Jedná se především o residua ligninu, celulózy, hemi-celulózy, kutinu, polypeptidů atd. Naproti tomu, v průběhu geneze HL dochází k významným strukturním změnám původních prekurzorů, a proto o jejich původu může být usuzováno pouze na základě nepřímých indicií. Tyto heterogenní sloučeniny nepřímo vypovídají o svém původu jsou označovány přídomkem "like". Jako vhodný příklad, můžeme na tomto místě uvést absorpční pás, který je v infračerveném spektru bez výjimky lokalizován při  $1040 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  a přímo tak odkazuje na stavební jednotky pocházející z celulózy, hemi-celulózy atd. Tento absorpční pás je marker tzv. "polysaccharide-like" stavebních jednotek.

I když by se na první pohled mohlo zdát, že se v tuto chvíli dopustíme odbočení od již diskutovaného tématu, v následujícím odstavci uvidíme, že to nebude až taková pravda.

---

<sup>31</sup> Rodríguez, F.J.; Schlenger, P.; García-Valverde, M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Sci. Total Environ.* **2014**, 476–477, 718–730.

Asi každý z nás se již setkal s negativními vlivy klimatických změn, jejichž dopady jsou stále patrnější i v České republice. Na tomto místě máme především na mysli situace, kdy se nám v jarních a letních měsících nedostává potřebné vláhy v podobě dešťových srážek. To má za následek významné disbalance ve stavech sladkovodních a podzemních vod. O hodnotách trvalého nasycení půdy vodou ani nemluvě. Již dnes, můžeme z úst českých klimatologů a pedologů slyšet, o čím dál více se rozšiřujících oblastech, které jsou postiženy semiaridním podnebím. Především se jedná o oblasti jižní Moravy a Polabské nížiny. Není divu, že půda, jež je vystavena těmto nepříznivým vlivům často trpí erozí a desertifikací. K dobré kondici ji ani nepřidá tlak, který je na ni vyvíjen prostřednictvím zemědělské výroby. Tak jak trpí na povrchu rostliny, to samé zažívá půdní biota, jež je neoddelitelně spjata s půdní organickou hmotou. K odražení těchto negativních vlivů by mohla přispět aplikace lignitu či oxyhumolitu, jakožto vhodného půdního kondicionéru<sup>32, 33, 34</sup>. V tuto chvíli se můžeme vrátit k chemii HL a půdní organické hmoty.

Představitelem geologicky nejmladšího a také nejméně karbonizovaného hnědého uhlí je *lignit*. Tento kaustobiolit je výhradně využíván jako palivo, avšak pro vysoký obsah jaloviny a vody je jeho výhřevnost poměrně nízká. Hodnota jeho spalného tepla se pohybuje v rozmezí 6000–7000 MJ·kg<sup>-1</sup>. Z tohoto hlediska se jeví spalování lignitu jako energeticky nevýhodné, přičemž rizika spojená s emisemi skleníkových plynů mnohonásobně převyšují jeho průmyslové použití. Nicméně, pro vysoký obsah HK, které mohou být v této přírodní matici zastoupeny až z 80 hm. % (vztaženo na obsah celkové OM) se zdá být jako vhodnější jeho neenergetické využití, a to především, jako vhodného půdního kondicionéru. Na tomto místě je nutné říci, že lignit obsahuje nejen HK, ale také organické sloučeniny, které mohou být snadno vyluhovatelné vodou. Pravděpodobně se jedná o takové organické sloučeniny, které lze podle jejich fluorescenčního chování klasifikovat jako *fulvic-like*. Mimo jiné, lze v EEM spektrech vodných výluhů JML<sup>34</sup> spatřit i fluorescenční domény, které jsou terminologicky označovány jako *humic-like*. Na základě provedené termochemolýzy<sup>34</sup> jsme schopni nepřímé identifikace potencionálních strukturních jednotek daných fluoroforů. Nejvíce zastoupenými organickými sloučeninami byly deriváty benzoové kyseliny (4-methoxybenzoová kyselina, 3-hydroxymandlová kyselina, 3,4-dimethoxybenzoová kyselina, apod.), alifatické karboxylové kyseliny, aromatické polyalkoholy atd. Výše zmíněné organické sloučeniny lze považovat za prekurzory ligninu, polysacharidů a taninů. Naproti tomu, alifatické dikarboxylové kyseliny mají svůj původ v huminových látkách, kde plní úlohu vzájemných vazeb mezi aromatickými jednotkami. Symetrické dikarboxylové kyseliny tzn. kyselina *jantarová*, *glutarová*, *adipová* atd. jsou obvykle považovány za produkty mikrobiální degradace.

<sup>32</sup> Salaš, P.; Vymyslický, T.; Lošák, M.; Pekař, M.; Burgová, J.; Chovančíková, E.; Enev, V.; Knotová, D.; Rožnovský, J.; Frydrych, J.; Kalina, M.; Pelikán, J. Využití půdních pomocných látek pro zlepšení vitality extenzivně využívaných ploch v suchem ohrožených oblastech ČR: Certifikovaná metodika. Brno, Mendelova univerzita v Brně, **2020**, 1–78. ISBN: 978-80-7509-768-2.

<sup>33</sup> Salaš, P.; Lošák, M.; Vymyslický, T.; Pekař, M.; Rožnovský, J.; Raab, S.; Enev, V.; Knotová, D.; Vlk, R.; Ševčíková, B.; Kalina, M.; Pelikán, J. Využití obalovaného osiva pro zakládání porostů trav a jetelovin: Certifikovaná metodika. Brno, Mendelova univerzita v Brně, **2020**, 1–53. ISBN: 978-80-7509-752-1.

<sup>34</sup> Doskočil, L.; Grasset, L.; Enev, V.; Kalina, L.; Pekař, M. Study of water - extractable fractions from South Moravian lignite. *Environ. Earth Sci.* **2015**, 73, 3873–3885.



Většinu těchto organických sloučenin se podařilo identifikovat v chloroformových extraktech lyofilizovaných výluhů. Za tímto účelem byla použita plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Je poměrně zajímavé, že z celkového počtu identifikovaných molekul jich 72 % připadalo výhradně aromatickým sloučeninám s minoritním přispěním strukturně jednoduchých alifatických sloučenin. Přítomnost kyseliny benzoové (nikterak nesubstituované) pravděpodobně souvisí s mikrobiální degradací ligninu. Takto vzniklé produkty jednosytných aryl-karboxylových kyselin jsou obvykle adsorbovány na povrchu lignitu, jenž je primárně vystaven mikrobiálnímu napadení. Identifikované deriváty aromatických sloučenin můžeme rozdělit do třech základních kategorií: (i) koniferylové (guaiacylové) monomerní jednotky (*isovanilová* kyselina, 3-vanilpropanol); (ii) p-kumarylové (p-hydroxyfenylové) monomerní jednotky (4-hydroxybenzoová kyselina); (iii) sinapylové (syringylové) monomerní jednotky (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová kyselina). Kvantitativní převaha koniferylových jednotek naznačuje, že lignit je tvořen dřevní hmotou nahosemenných rostlin tzn. *Gymnospermae*.

Zbýlých 28 % analyzovaných molekul odpovídá alifatickým sloučeninám, jako jsou estery vyšších mastných kyselin a vícesytné alkoholy, z nichž majoritní podíl zaujímal glycerol. Nejvíce zastoupenými hydrofobními sloučeninami byly kyselina pelargonová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová a v neposlední řadě i stearová.

Na tomto místě je nutné říci, že celá řada těchto organických sloučenin hraje v půdním prostředí nezastupitelnou roli, a to zejména v podobě signálních molekul. Jinými slovy, tyto sloučeniny jsou podivuhodným jazykem komunikace všech zúčastněných organismů půdního ekosystému, ať už máme na mysli půdní biotu či rostlinou říši. Mimo jiné, jak z *polyketidové* teorie vzniku HL vyplývá, tak výše zmíněné organické sloučeniny mají potenciál stát se buď prekurzory těchto unikátních biokoloidní sloučenin, anebo mohou být uchovány jako palivo resp. potrava, k pozdějšímu metabolickému použití.

Jednou z možností, jak významně snížit molekulární složitost HK je použití frakcionačního postupu, jehož předpokladem se stalo progresivní, avšak mírné štěpení inter- a intramolekulárních interakcí, jimiž jsou HK stabilizovány v supramolekulární struktury. Je očividné, že tato frakcionační metoda je determinována supramolekulárním pojetím vzniku a struktury těchto unikátních sloučenin. Tato frakcionační metoda byla autory pojmenována jako *humeomika*. Sekvenční frakcionace HK na tzv. *humeomika* zahrnuje postupné štěpení následujících mezimolekulárních vazeb: (i) nekovalentních interakcí; (ii) slabých esterových vazeb; (iii) perzistentních esterových vazeb; (iv) etherových a glykosidických vazeb. Dozajista, co o této metodě můžeme konstatovat, je nevyvratitelný fakt, že v průběhu tohoto postupu dochází k významnému a také účinnému snížení molekulární složitosti HK. Jinými slovy, identifikované sloučeniny jsou přímým vodítkem ke kvalitativní analýze původních stavebních jednotek, jako jsou residua ligninu, polysacharidů, bílkovin, lipidů, terpenů, steroidů atd. Nicméně, jistou kontroverzi tohoto postupu lze spatřit právě v experimentální potřebě štěpení rozličných vazeb. Pokud odhlédneme od toho, zda jsme příznivci polymerní či supramolekulární teorie, tak nám na mysli může vytanout provokativní myšlenka, a to: „Můžeme si i dnes být stoprocentně jistí, zda strukturní teorie, které z různých důvodů nejsme nakloněni, nenese nakonec nějaké zrnko opravdového poznání?“ Pokud ne, tak bychom měli ke studiu HL přistupovat, jako by



byly v platnosti obě zmíněné teorie. V případě platného biopolymerního modelu by bylo toto pravidlo porušeno, a to z důvodu výše zmíněného štěpení esterových a etherových vazeb.

Jedním z možných řešení, jak přistoupit k problematice snížení molekulární složitosti HL, a to bez nežádoucího štěpení jakýchkoliv vazeb je použití sekvenční frakcionace na základě rozdílné polaritní organického rozpouštědla<sup>35</sup>. Na tomto místě je nutné říci, že tento postup byl inspirován extrakční procedurou, která byla použita k izolaci bitumenů resp. lipidických sloučenin z lignitů pocházejících z rozličných evropských nalezišť<sup>36</sup> resp. uhelných pánví tzn. Jižní Maritza (Bulharsko), Krepoljin a Kostolac (Srbsko), Konin (Polsko) a v neposlední řadě i Jihomoravský revír vídeňské pánve, Mikulčice (Česká republika).

Na tomto místě je nutné říci, že eluotropní řada organických rozpouštědel by měla být volena ve snaze o co nejširšího pokrytí polaritní, kdy tento výběr lze lépe určit na základě jejich hodnot relativního polaritního indexu, dielektrické konstanty a dipólového momentu. Nicméně, dalším determinujícím faktorem výběru je i teplota varu organického rozpouštědla, kdy při vyšších teplotách varu by mohlo docházet k negativním kvalitativním změnám organických frakcí HL. Postupem sekvenční frakcionace bylo celkově extrahováno přibližně 57 hm. % z původní organické hmoty rašeliništní HK. Jinými slovy, asi 43 hm. % připadalo residuální HK, která zůstala v extrakční patroně Soxhletova přístroje. Otázkou zůstává, zda by došlo k významnému snížení hmotnosti residuální HK, pokud bychom ji vystavili opětovné polaritní frakcionaci. Pokud by opětovná frakcionace residuální resp. zbytkové HK nevedla k získání dalších organických frakcí, tak by to do jisté míry mohlo znamenat, že HK jsou tvořeny jádrem biopolymerního charakteru, které je obklopeno strukturně jednoduššími organickými sloučeninami spoluvytvářejícími supramolekulární obal výše zmíněného jádra. V opačném případě by se dozajista jednalo o potvrzení supramolekulární teorie geneze HL. Na základě těchto výsledků bychom mohli mluvit o tzv. *kvazi- anebo semisupramolekulární teorii* HL.

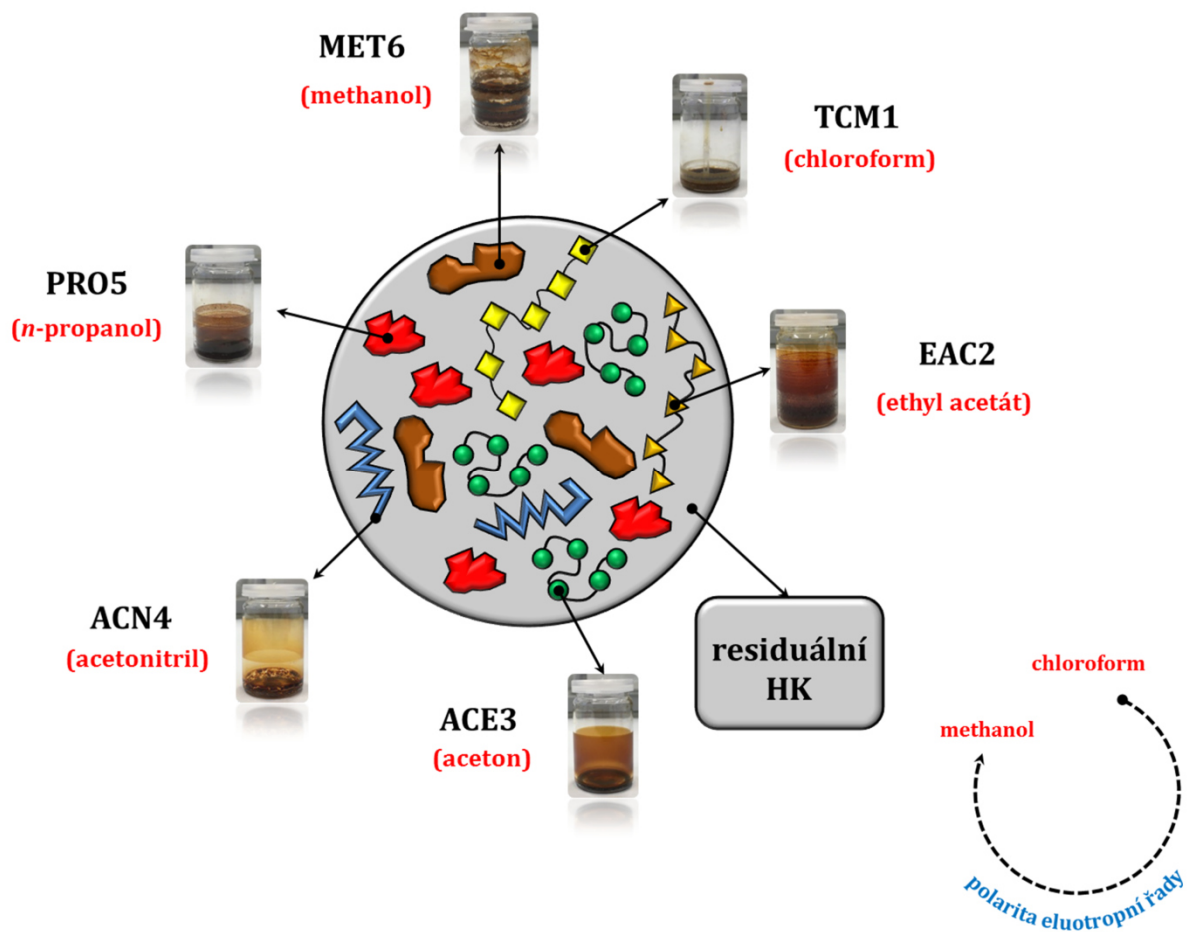
Polaritní (sekvenční) frakcionace představuje jednoduchou, avšak účinnou metodu ke kvalitativní analýze, tak složitých a heterogenních systémů, jakými jsou HL resp. HK. Nicméně je zapotřebí i kritického názoru, a to, že pro zobecnění některých prekurziv vyplývajících z tohoto frakcionačního postupu je nutné podrobit tuto metodu dalšímu systematickému zhodnocení. Aby bylo možné kriticky vyhodnotit některá úskalí spojená s tímto postupem, tak je zapotřebí následné experimenty zaměřit nejen na HK, ale i na ostatní frakce HL, které mohou být izolovány z různých přírodních zdrojů, jako jsou kaustobiolity, půdy, sladkovodní zdroje apod. Budoucí náměty vycházející z této metody lze spatřit v experimentální činnosti, kterou můžeme rozdělit do dvou oblastí: (i) kvalitativní analýza residuální HK; (ii) tzv. syntetická perspektiva, která by vedla k získání kompozičních a strukturních parametrů s ohledem na relevantní obsah

---

<sup>35</sup> Enev, V.; Sedláček, P.; Kubíková, L.; Sovová, Š.; Doskočil, L.; Klučáková, M.; Pekař, M. Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids. *Agronomy* **2021**, *11*, 1–19.

<sup>36</sup> Doskočil, L.; Enev, V.; Pekař, M.; Wasserbauer, J. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. *Org. Geochem.* **2016**, *95*, 34–40.

jednotlivých extrahovaných frakcí, v důsledku čehož, by tyto znovu sestavené charakteristiky mohly být porovnány s „rodičovskou“ HK.



Obrázek I-1: Schématické znázornění extrakce organických frakcí HK na základě rozdílné polarity eluotropní řady použitých organických rozpouštědel.

# 5 EXPERIMENTÁLNÍ METODY PRO VÝZKUM HUMINOVÝCH LÁTEK A DOM

## 5.1 Termické metody pro výzkum HL a DOM

### 5.1.1 Elementární analýza (CHNS/O)

Již obecná definice<sup>37</sup> předurčuje tyto biokoloidní sloučeniny k tomu, aby je bylo možné studovat z hlediska obsahu biogenních prvků tzn. uhlíku, vodíku, kyslíku, dusíku a v neposlední řadě i síry, vzhledem k tomu, že tyto atomy tvoří majoritní část skeletu těchto unikátních sloučenin, ať už na ně pohlížíme jako na biomakromolekuly anebo supramolekulární asociace. I když by se na první pohled mohlo zdát, že elementární analýza nám poskytuje pouze informace o hmotnostním zastoupení jednotlivých prvků, tak by to z velké části nebyla pravda. Na tomto místě je nutné říci, že tato instrumentální technika nám nepřímo poskytuje informace o stupni humifikace, podílu aromatických resp. alifatických strukturních jednotek, míry (de)hydrogenace, oxidace a v neposlední řadě i dekarboxylace. K predikci těchto vlastností lze s výhodou použít atomových poměrů H/C a O/C, které jsou hlavními proměnnými v tzv. van Kreveleného diagramu. V nedávné době, kdy ještě převažovala polymerní teorie nad dnes již všeobecně přijímaným pohledem, že HL jsou především supramolekulární asociáty, byla právě elementární analýza nástrojem k rychlému a poměrně přesnému stanovení sumárního vzorce těchto biokoloidních sloučenin.

V krátkosti lze tuto kvantitativní instrumentální techniku popsat následujícím způsobem. Tato metoda je principiálně založena na katalytickém spalování vzorku v nástřiku omezeného objemu velmi čistého kyslíku, který se zde uplatňuje jako silné oxidační činidlo. Již tuto chvíli se ocitáme v důležitém bodě instrumentace, a to zejména proto, že zbytkový obsah oxidačního média, který nebyl spotřebován v průběhu spalování analyzovaného vzorku, obvykle reaguje s náplní spalovacího reaktoru, v důsledku čehož se významně zkracuje jeho životnost. Obvykle můžeme tento problém vyřešit buď úpravou hmotnosti navažovaného vzorku, která je determinována odhadovaným obsahem spalitelných látek, anebo snížením nástřikovaného množství oxidačního média. Po spálení vzorku jsou plynné produkty působením oxidačně-redukčních dějů převedeny na detekovatelné plyny tzn. CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub> a SO<sub>2</sub>. Následně jsou tyto produkty v chromatografické koloně od sebe separovány a v poměrně přesných retenčních časech jsou kvantitativně analyzovány pomocí teplotně-vodivostního detektoru. Na tomto místě je nutné podotknout, že celková analýza probíhá v prostředí inertního plynu např. helia. Příslušné hmotnostní zlomky jednotlivých prvků jsou vyhodnoceny na základě jejich plošných integrálů v naměřeném chromatogramu. Obsah kyslíku je zpravidla stanoven v odlišném instrumentálním

<sup>37</sup> Huminové látky a DOM jsou přírodní *organické sloučeniny*, které vznikají chemickým a biologickým rozkladem OM (tj. odumřelých částí rostlinných a živočišných těl) a syntetickou činností mikroorganismů.

uspořádání vyžadujícím speciální náplň reaktoru. Je očividné, že toto oddělení na dvě nezávislá stanovení značně prodlužuje dobou celkové kvantitativní analýzy. Tato nevýhoda může být řešena pomocí tzv. nepřímého stanovení, kdy po velmi přesném určení obsahu nespalitelného podílu tj. popela a sorbované vlhkosti lze hmotnostní zlomek kyslíku dopočítat podle rovnice:

$$w_{O_2} = 100 - (w_C + w_{H_2} + w_{N_2} + w_S + w_{H_2O} + w_{popel}) \quad (2)$$

kde,  $w_C$  je hmotnostní zlomek uhlíku,  $w_{H_2}$  je hmotnostní zlomek vodíku,  $w_{N_2}$  je hmotnostní zlomek dusíku,  $w_S$  je hmotnostní zlomek síry,  $w_{H_2O}$  je hmotnostní zlomek sorbované vlhkosti odpovídající volně vázané vodě a  $w_{popel}$  je hmotnostní zlomek popela tzn. anorganické příměsi ve vzorku.

Hmotnostní podíl resp. obsah sorbované vlhkosti a popela lze určit na základě termogravimetrické analýzy. V této souvislosti je nutné podotknout, že výše zmíněné hm. podíly je zapotřebí velmi pečlivě a uvážlivě odečíst nejlépe s účastí derivovaného průběhu TG křivky.

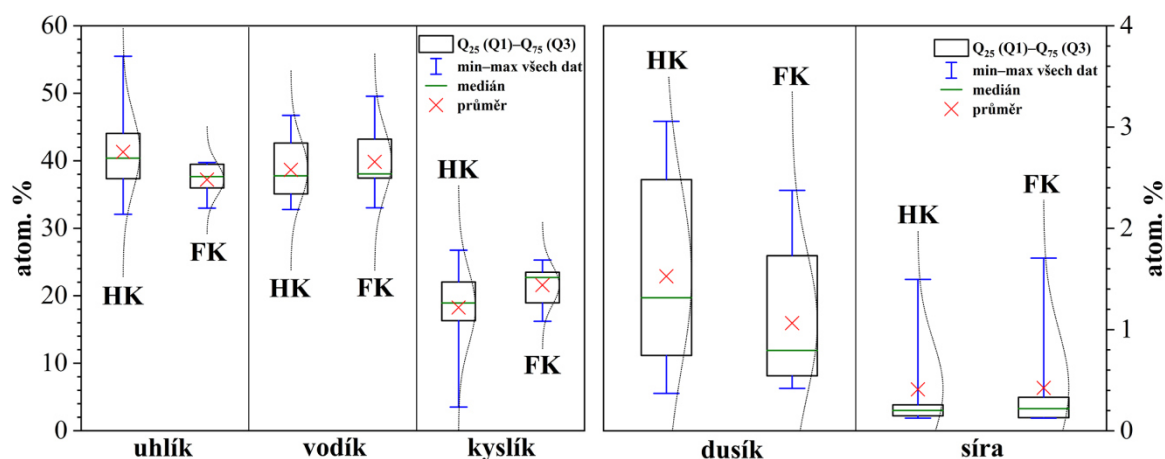
Prvkové složení HL resp. jakékoliv OM je vhodné uvádět v atomových procentech (atom. %), a to především v důsledku toho, že v případě procent hmotnostních (hm. %) je silně podhodnocen obsah vodíku, v důsledku jeho nízké atomové hmotnosti. Jinými slovy, hmotnostní podíl vodíku a z něj vypočtené indexy či koeficienty se pak stávají očividně méně senzitivní. Tento fakt je zvláště patrný v případě, když jsou těmito parametry navzájem porovnávány jednotlivé analyzované vzorky těchto biokoloidních látek.

Jednou z možností, jak názorně ilustrovat poměrně širokou variabilitu v obsahu biogenních prvků HL ve snaze o zapojení co největšího souboru dat determinovaného fundamentální klasifikací a původem tzn. druhem přírodní matrice, je použití grafického znázornění pomocí tzv. *boxplot*. Na Obr. 9 jsou sumarizovány krabicové grafy obsahu jednotlivých biogenních prvků HL, které byly izolovány z rozličných přírodních matric, jako jsou kaustobiolity, půdy, sladkovodní zdroje (řeky a jezera), komposty (nativní a vermikompostované<sup>38</sup>) a v neposlední řadě i z rostlinných pletiv hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. Na tomto místě je nutné říci, že do výše zmíněného souboru dat byly zařazeny i HL antropogenního původu tzn. humáty a lignohumáty. Jednotlivé frakce antropogenních HK a FK byly získány standardním postupem izolace a frakcionace navrženým mezinárodní společností pro výzkum HL.

V této části habilitační práce bych se rád věnoval spíše komplexnějšímu pohledu na prezentované výsledky s ohledem na všeobecnější ráz edukace. Aniž bychom se zaměřili na podrobnou interpretaci jednotlivých rozdílů, tak si v uvedených krabicových grafech nelze nepovšimnout dvou zajímavých diferencí. Z porovnání krabicových grafů vyplývá, že HK se vyznačují poměrně širšími hodnotami mezikvartilového rozpětí<sup>39</sup> oproti FK, avšak tento hodnotící parametr byl v případě obsahu síry srovnatelný pro obě dvě frakce HL.

<sup>38</sup> Kompostování OM za účasti žížal rodu *Eisenia andrei*.

<sup>39</sup> Mezikvartilové rozpětí (mezikvartilová šíře) představuje rozdíl mezi třetím a prvním kvantilem resp. mezi 75. a 25. percentilem.

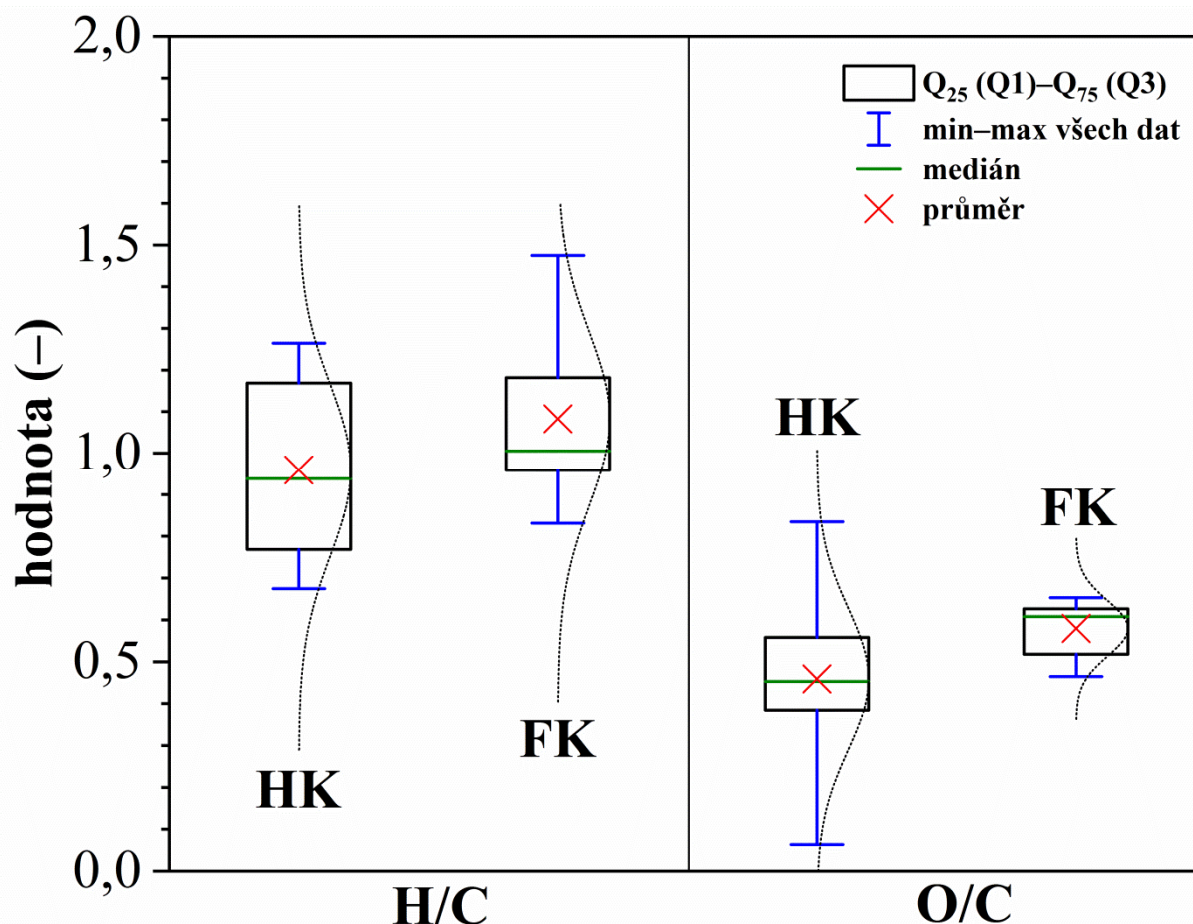


Obrázek 9: Obsah jednotlivých biogenních prvků HL v projekci krabicových grafů (boxplot).

Tento trend je více patrný v případě, kdy je sledováno tzv. variační rozpětí, které je definováno jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou daného souboru dat (viz. modré úsečky v krabicových grafech). Z hlediska obsahu vodíku a síry bylo toto hodnotící kritérium poněkud vyšší pro FK. V krabicových grafech si nelze nepovšimnout skutečnosti, že HL mají velmi blízké hodnoty mediánů připadajících uhlíku a vodíku. Naproti tomu, v případě ostatních elementů (vyjma organické síry) se jednotlivé frakce vyznačovaly signifikantně odlišnými hodnotami výše zmíněného statistického parametru. Na tomto místě se nabízí otázka, jak by vypadala distribuce biogenních prvků HL v případě, pokud bychom se na tyto biokoloidní sloučeniny dívali pouze makromolekulárním resp. polymerním pohledem. Jak již bylo uvedeno v subkapitole 2.1.2, tento koncept popisuje HL jako biomakromolekuly, jejichž struktura je převážně tvořena fenylypropanovými jednotkami pocházejícími z degradace ligninu. Dále si je vhodné připomenout, že makromolekulu HL mohou částečně spoluvytvářet i residua polysacharidů a bílkovin. Pokud bychom měli možnost tyto sloučeniny studovat pomocí prvkové analýzy, tak by se na základě výše popsaného konceptu dalo usuzovat, že se jejich elementární složení bude vyznačovat poměrně nižší distribuční variabilitou, než tomu bylo v případě analyzovaných HL viz. Obr. 9. Naproti tomu, projekce elementárního složení v krabicových grafech spíše dává tušit, že distribuce prvkového složení HL může nabývat rozmanitějších hodnot. V tomto kontextu můžeme spatřit otisk tzv. supramolekulárního modelu, pokud si uvědomíme, jakým způsobem je polydisperzita HL svázána s tímto strukturálním konceptem. Již z obecné definice supramolekulární struktury FK vyplývá, že tyto biokoloidní sloučeniny budou determinovány určitou škálou variability prvkového složení, aniž bychom blíže specifikovali jejich přírodní původ, tzn. přírodní matici, ze které jsou izolovány. Už jen předpoklad, že se jedná o asociáty malých hydrofilních molekul, je předurčuje k tomu, že jsou charakterizovány nižšími stupni disperzity elementárního složení. Naproti tomu, jsou HK dle supramolekulární teorie definovány jako kompilát převážně hydrofobních sloučenin (polymethylenových řetězců, mastných kyselin, steroidních látek, residuí ligninu, proteinů a polysacharidů), které jsou vzájemně stabilizovány slabými hydrofobními interakcemi, jako jsou van der Waalsovy síly a CH- $\pi$  interakce.



Na Obr. 10 jsou uvedeny krabicové grafy atomových poměrů H/C a O/C ilustrujících strukturní odlišnosti mezi jednotlivými frakcemi HL. Z vizuálního porovnání atomového poměru H/C vyplývá, že HL mají velmi podobnou škálu variability tohoto strukturního parametru, který je obecně pokládán za dobrý ukazatel stupně aromaticity či míry (de)hydrogenace.



Obrázek 10: Atomové poměry H/C a O/C huminových látek v projekci krabicových grafů.

V krabicovém grafu si můžeme povšimnout skutečnosti, že FK se vyznačují nižším stupněm aromaticity resp. vyšší mírou hydrogenace, avšak musíme mít na paměti, že výsledná hodnota je závislá i na přítomnosti ostatních sloučenin spoluvytvářejících supramolekulární asociace. Jak již bylo diskutováno dříve, kyslík je v HL přednostně spjat s přítomností různorodých funkčních skupin, jako jsou karboxylové, fenolické, alko- resp. aryloxylové, amidové, alkoholové, esterové atd. V této souvislosti lze předpokládat, že příslušná hodnota atomového poměru O/C vypovídá o relativním obsahu výše zmíněných funkčních skupin. Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že atomový poměr O/C obvykle bývá v dobré korelaci s hodnotami celkové kyselosti, a proto ho lze s výhodou využít k predikci této skutečnosti. Z uvedených výsledků lze jednoznačně odvodit, že distribuční variabilita kyslík obsahujících funkčních skupin se v případě FK nalézá v dosti úzkém rozmezí. Pokud uvedeme tento aspekt v širší souvislost, tak lze z něho vyvodit dvě zajímavé skutečnosti, z nichž první je potvrzením



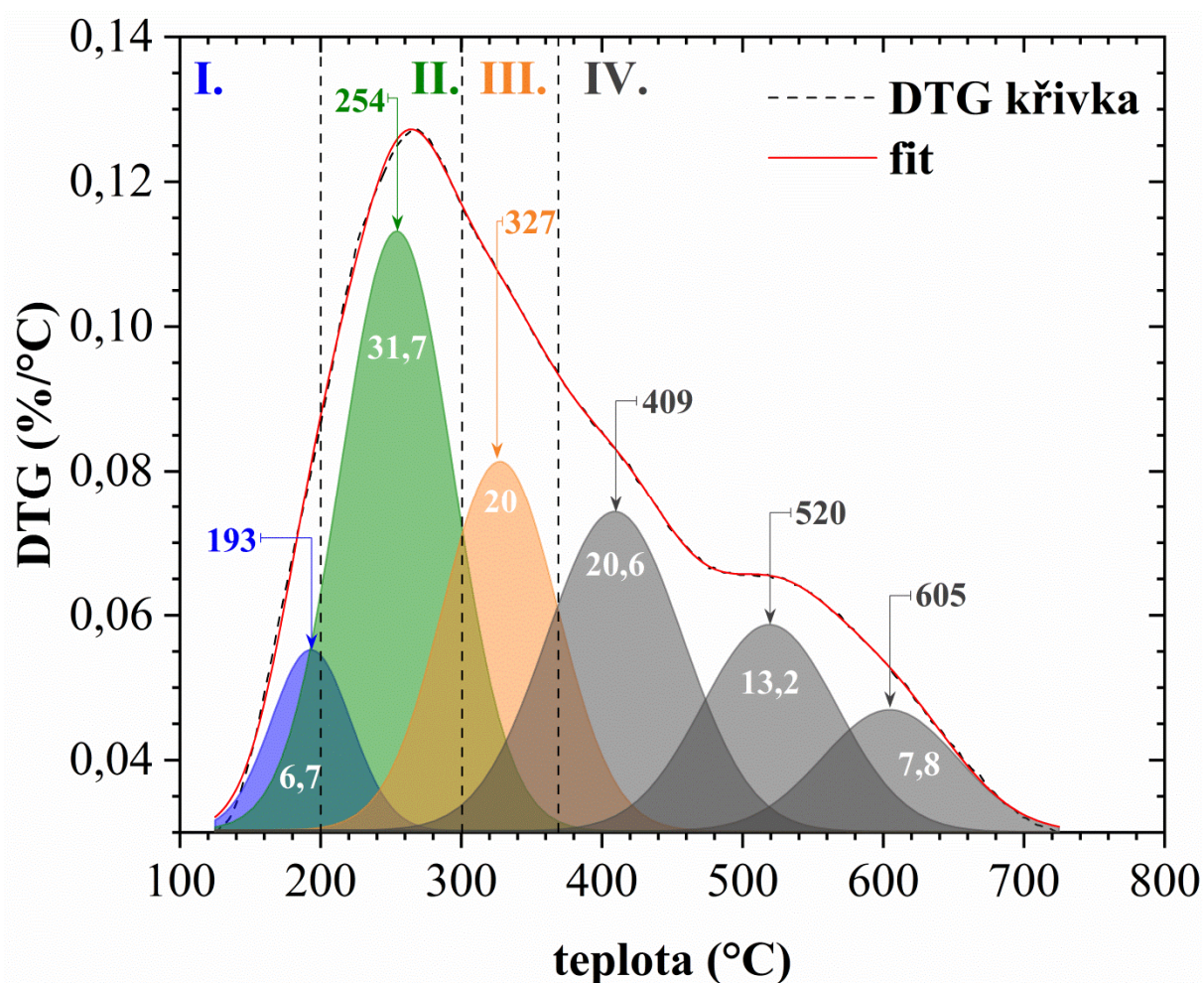
supramolekulární hypotézy a druhá přednostně vypovídá o jisté strukturní stabilitě izolovaných FK. Jinými slovy, v případě, kdybychom izolovali FK v různém stupni humifikace, tak by se dalo očekávat, že atomový poměr O/C bude nabývat podstatně širších hodnot. Diskrétní rozdělení atomového poměru O/C spíše poukazuje na fakt, že „izolované FK“ odpovídají OM, která již nepodléhá významným strukturním změnám v příslušném místě a čase humifikačního procesu, a tudíž je lze považovat za stabilní frakce HL. Jistá uniformita FK, jež je reprezentována tímto atomovým poměrem, obecně podporuje hypotézu, že se jedná o aglomerace malých hydrofilních molekul vycházejících ze supramolekulárního pojetí struktury HL.

### 5.1.2 Termogravimetrická analýza TGA a DTG

Jak již bylo diskutováno v subkapitole 4.1.1, termogravimetrická analýza TGA resp. DTG nám poskytuje nejen informace o hmotnostním podílu sorbované vlhkosti či popela, ale především je schopna reflektovat strukturní odlišnosti analyzovaných HL, které jsou v přímé souvislosti s jejich termální stabilitou. Pokud si uvědomíme, jakou robustností se tato technika vyznačuje, tak není překvapivé, že jsme schopni pomocí této metody predikovat některé fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou, přímým odrazem strukturní složitosti těchto biokoloidních sloučenin. Ukázalo se, že tato instrumentální technika hraje nezastupitelnou roli v rozmanitých oblastech studia HL a taktéž OM, kam z pravidla řadíme otázky týkající se jejich geneze, humifikace, struktury, stability, vazebných a komplexačních interakcí atd. Obvykle se nám nabízejí dvě možnosti, jakými lze realizovat termogravimetrické měření, a to zda je vzorek spalován v oxidativní atmosféře anebo v proudu inertního plynu, jako je dusík či argon. Je nutné si uvědomit, že v průběhu pyrolyzního procesu nedochází k oxidativním změnám analyzovaných HL, a tudíž jednotlivé poklesy v TGA křivkách resp. píky či méně výrazná ramena v DTG projekci odpovídají degradačním produktům příslušných komponent HL resp. OM. Konečným produktem tohoto procesu je karbonizovaná organická hmota. Mimo jiné lze z průběhu TGA resp. DTG křivek vyzorovat jistý vliv rychlosti ohřevu na pozici příslušných vrcholů či ramen, které ve svém důsledku odpovídají tzv. píku na píku. Zpravidla se zvyšující se rychlostí ohřevu dochází k posunu vrcholů anebo ramen na vyšší teploty pyrolýzy. Tento posun je obvykle způsoben nerovnoměrnou termální degradací jednotlivých molekul, které spoluvytvářejí složité struktury, a prostorové konformace HL. V této souvislosti je nutné říci, že aby nedocházelo k určité desinformaci vyplývající z výše zmíněného faktu, tak je zapotřebí jakoukoliv sadu vzorků striktně měřit při stejných rychlostech ohřevu resp. experimentálních podmínkách.

Až na některé výjimky, které jsou obecně dány povahou a složením vzorku OM, tak můžeme rozdělit TG/DTG křivky na čtyři oblasti, které jsou vytyčeny následujícími teplotními intervaly tzn. stupeň I (~25–200 °C), stupeň II (200–300 °C), stupeň III (300–375 °C) a stupeň IV (375–800 °C) [73–75]. Je zřejmé, že každý teplotní interval bude odpovídat odlišným strukturním jednotkám HL, které podléhají v příslušných intervalech pyrolyzního procesu degradaci. Hmotnostní úbytek v prvním stupni pyrolyzního procesu tzn. ~25–200 °C je zpravidla způsoben dehydratací vzorku HL, kdy nejprve odchází volná a následně adsorbovaná či krystalová voda. Rovněž přicházejí v úvahu i tzv. těkavé organické látky, které jsou postupně uvolňovány z pórovité struktury HL. Druhý stupeň pyrolyzního procesu je obecně spjat s tepelnou degradací

polysacharidů, ztrátou hydroxylových funkčních skupin alifatických sloučenin a v neposlední řadě i dekarboxylací organických kyselin. V teplotním intervalu III, který je determinován rozsahem 300–375 °C podléhá teplotní degradaci zejména C–C vazby alifatických struktur. Dále můžeme tento hmotnostní úbytek připsat tzv. krakování polyaromatických strukturních jednotek, které se vyznačují vyšší střední molekulovou hmotností  $\overline{M}_w$  v analyzovaných HL. Poslední hmotnostní úbytek je zpravidla vázán na probíhající polykondenzační reakce s jistým příspěvkem degradace a štěpení dlouhých uhlovodíkových řetězců či dusíkatých sloučenin. Přibližně od teploty 400–500 °C lze hmotnostní úbytek připsat počínajícímu rozpadu aromatických struktur, kdy degradace těchto strukturních jednotek je ukončena při dosažení teploty pyrolýzy okolo 700 °C.



Obrázek 11: Dekonvoluce DTG křivky vzorku půdní HK (*Elliott Soil* standardu IHSS) s příslušnými teplotními intervaly.

Pokud by našim záměrem bylo semi-kvantitativní stanovení jednotlivých hmotnostních úbytků determinovaných v příslušných teplotních intervalech lze s výhodou použít, avšak s jistou dávkou obezřetnosti metodu dekonvoluce DTG křivek.

Jako vhodný nástroj k sofistikovanějšímu popisu vznikajících produktů během pyrolýzy HL lze s výhodou využít tzv. tandemových metod, jako jsou TG-FTIR anebo Py-

FIMS. Jak mnohé studie naznačují, tak jednotlivé produkty pyrolýzy HL resp. OM jsou silně závislé na použité teplotě ohřevu.

Obecně vždy lze v TG-FTIR spektrech HL pozorovat absorpční pásy odpovídajících plynným produktům, které vznikají v průběhu pyrolyzního procesu, jejichž zastoupení se výrazně mění s teplotou ohřevu, a tudíž jsou přímými ukazateli poukazujícími na jednotlivé strukturní komponenty HL [73, 76–79]. Co se týče jednotlivých plynných produktů, které jsou infračervenou spektrometrií detekovány jedná se o molekuly  $H_2O$ ,  $CH_4$ ,  $CO$  a  $CO_2$ . Absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnočtů  $4000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  odpovídá uvolňování volné a absorbované tj. vázané a krystalické vody. Rovněž lze v TG-FTIR spektrech nalézt absorpční pásy při  $2500\text{--}2250\text{ cm}^{-1}$  a  $700\text{--}580\text{ cm}^{-1}$ , které jsou připisovány valenčním a deformačním vibracím  $C=O$  vazeb v molekulách  $CO_2$ . Vznik tohoto produktu v průběhu pyrolyzního procesu je přednostně svázán s mechanismy degradace odpovídajících štěpení karbonylových skupin v ligno-celulóзовých strukturách, jako rovněž i mechanismu dekarboxylace organických kyselin. Lehké plynné uhlovodíky, jako jsou především  $CH_4$  případně  $C_2H_6$  se vyznačují specifickou hodnotou absorpce v oblasti vlnočtů  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ . Tyto plynné produkty mají svůj původ v látkách, jako jsou dlouhé alifatické sloučeniny anebo aromáty substituované  $-OCH_3$  funkčními skupinami. Přítomnost absorpčního pásu odpovídajícího molekulám  $CO$  lze považovat za indikátor degradace polysacharidů a ligninových struktur. Vyjma výše uvedených molekul lze v TG-FTIR spektrech HL identifikovat absorpční pásy odpovídající aromátům, aldehydům a ketonům, a to zejména v oblasti vlnočtů  $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ .

## 5.2 Spektrometrické metody pro výzkum HL a DOM

### 5.2.1 UV/Vis spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) je doposud nejpoužívanější instrumentální technikou v oblasti studia HL a rozpuštěné organické hmoty (DOM). Výjimečnost této spektrometrické metody spočívá především v tom, že je nám schopna poskytnout mnoho zajímavých informací o studovaných HL, zatímco požadavky na její instrumentální náročnost jsou zpravidla minimální.

UV/Vis spektra HL resp. DOM mají obvykle kvazi-exponenciální průběh s výrazným maximem absorpance v ultrafialové oblasti UVC, jejichž vlnová délka je dána rozmezím  $200\text{--}280\text{ nm}$ . Co se týče přítomnosti lokálních absorpčních maxim, tak je nutné si uvědomit, že HL a DOM se obvykle těmito spektrálními charakteristikami nevyznačují. Avšak si v případě některých FK anebo DOM můžeme povšimnout méně výrazných ramének, které jsou obvykle lokalizovány právě v UVC oblasti elektromagnetického záření. Tato monotónnost činí UV/Vis spektra HL a DOM k přímému posouzení jejich kvality prakticky nepoužitelná. Naproti tomu, veškeré informace o těchto unikátních biokoloidních látkách jsou právě ukryty v jejich kvazi-exponenciálních průbězích UV/Vis spekter. Za účelem získání relevantních informací o povaze HL a DOM lze s výhodou použít celou řadu tzv. absorpčních koeficientů, které jsou definovány jako poměry absorpancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Obecně můžeme říci, že tyto



koeficienty jsou dobrými indikátory k odhadu střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$ , aromaticity, stupně humifikace, míry substituce aromatických jader kyslík obsahujícími funkčními skupinami atd.

Na prvním místě lze uvést absorpční koeficient, který je všeobecně znám jako tzv. *humifikační index* ( $E_4/E_6$  resp.  $E_{4/6}$ ) [80] či pedology zavedený barevný koeficient  $Q_{4/6}$  [81]. Tento absorpční index je definován jako poměr absorbance při 465 a 665 nm. Humifikační index je ve velmi dobré inverzní (negativní) korelaci se stanovenými hodnotami  $\overline{M}_w$ , a tudíž ho lze s výhodou použít k odhadu střední molekulové hmotnosti anebo molekulové velikosti HL a některých frakcí DOM. Mimo jiné byla nalezena signifikantní závislost mezi tímto absorpčním koeficientem a hmotnostním podílem kyslíku, který je především ve spojitosti s obsahem karboxylových funkčních skupin resp. celkovou kyselostí HL. Naproti tomu, výše zmíněné kvalitativní parametry jsou v pozitivní korelaci s absorpčním koeficientem  $E_4/E_6$ . Pokud uvedeme veškeré informace v širší souvislost, tak lze bezpochyby konstatovat, že vyšší hodnoty tohoto koeficientu jsou indikátorem nižší  $\overline{M}_w$ , avšak vyššího obsahu celkového kyslíku anebo karboxylových funkčních skupin. V tuto chvíli je nadmíru jasné, že *humifikační index* je schopen velmi dobře reflektovat výše zmíněné diference mezi jednotlivými frakcemi HL. Na druhou stranu je potřeba říci, že tento absorpční koeficient je velmi silně závislý na hodnotě pH roztoku, a tudíž je zapotřebí HL resp. DOM, jež se vyznačují rozdílnými hodnotami  $pK_A$  pufovat pomocí tlumivých roztoků. V případě, kdy je hodnota absorbance při 665 nm příliš nízká, tak se *humifikační index* stává do značné míry málo senzitivním. Tento problém lze s výhodou vyřešit použitím ekvivalentního koeficientu  $E_2/E_4$ , který je definován jako poměr absorbance při 265 a 465 nm [82]. Tento absorpční koeficient se stal jistou alternativou pro vzorky OM, které se vyznačují velmi nízkými hodnotami absorbance při  $\lambda > 500$  nm. Do této skupiny OM jsou řazeny některé FK a značná část rozpuštěné organické hmoty či frakcionované HL.

Neméně významný absorpční koeficient  $E_2/E_3$ , který je definován jako poměr absorbancí při 250 a 365 nm nám poskytuje informace o střední molekulové hmotnosti a stupni aromaticity HL a DOM [83]. Robustnost tohoto absorpčního koeficientu je především dána jeho všestrannou použitelností napříč rozmanitými přírodními maticemi a ekosystémy. Tento index vyniká velmi dobrou spolehlivostí i v případě, kdy je studována nikterak upravená DOM, jako jsou vzorky sladkovodních a mořských zdrojů měřených v in-situ. Jistá výjimečnost absorpčního koeficientu  $E_2/E_3$  vyplývá z obecně známého faktu, že v oblasti vlnových délek 240–280 nm dochází k  $\pi \rightarrow \pi^*$  elektronovému přechodu, který je příznačný pro organické sloučeniny, jako jsou deriváty mono- a polyaromatických kyselin s významnou substitucí aromatického jádra hydroxylovými anebo alkoxylovými funkčními skupinami, anilinu, polyenů aj. Tyto organické sloučeniny tvoří nejen supramolekulární asociace HL, ale jsou i hlavními komponenty DOM vodních zdrojů tzn. řek, jezer, podzemních vod, moří atd. Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že absorpční koeficient  $E_2/E_3$  není až tak závislý na povaze použitého rozpouštědla, která je především determinována hodnotou pH. K výše zmíněnému koeficientu lze zařadit absorpční index  $A_{280}/A_{350}$ , který byl prvotně použit k odhadu šířky absorpčního pásma odpovídajícího elektronovému přechodu  $\Delta ET$  [84]. Tento absorpční koeficient se vyznačuje velmi dobrou hodnotou korelace se strukturálními parametry, jako jsou  $\overline{M}_w$  a aromaticita. Někteří autoři uvádějí, že tento

absorpční koeficient je v případě odhadu střední molekulové hmotnosti a aromaticity HL senzitivnějším, než je tomu u indexu  $E_2/E_3$ .

Asi jeden z nejrozporupnějších absorpčních koeficientů je index  $A_{254}/A_{410}$ , který je definován jako poměr absorbancí při 254 a 410 nm. Jedna část vědecké společnosti považuje tento absorpční koeficient za dobrý ukazatel aromaticity a střední molekulové hmotnosti HL a DOM [85]. Na druhou stranu zaznívají i hlasy, že tento absorpční koeficient není schopen reflexe výše zmíněných kvalitativních parametrů. Kritici tohoto absorpčního koeficientu uvádějí, že doposud není experimentálně podložena uspokojivá korelace mezi tímto indexem a aromaticitou resp. hodnotou  $\overline{M}_w$  napříč studovanými HL a DOM. Tato názorová nestejnorodost je pravděpodobně způsobena již definicí resp. návrhem tohoto indexu, kde problematickým místem je právě použitá vlnová délka 410 nm. Jelikož se jedná o vlnovou délku ve viditelné části spektra, tak přihází v úvahu, že hodnota tohoto absorpčního koeficientu je silně závislá na fenomén tzv. fotobleachingu.

Na tomto místě můžeme uvést absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{Bz}$ , který je definován jako poměr absorbancí při 253 a 203 nm [86]. Hodnota absorpance při vlnové délce 253 nm odpovídá tzv. pásu přenosu náboje, jehož intenzita je silně závislá na přítomnosti polárních funkčních skupin, kterými jsou aromatická jádra substituována. Jedná se především o funkční skupiny, jako jsou hydroxylové, karbonylové resp. chinonové, karboxylové a v neposlední řadě i esterové. Pokud jsou benzenová jádra těmito funkčními skupinami substituována, tak výrazně stoupá hodnota molárního extinkčního koeficientu tohoto absorpčního pásu. Pro dokreslení celkové představy lze uvést, že hodnota  $\epsilon$  nesubstituovaného benzenového jádra se pohybuje v rozmezí 100–200 cm<sup>2</sup>·mol<sup>-1</sup>. Naproti tomu, v případě substituce aromatických jader polárními funkčními skupinami se tato hodnota zvýší až na hodnotu několika tisíc. Musíme mít na paměti, že substituce aromatických jader nepolárními resp. alifatickými funkčními skupinami nikterak neovlivňují intenzitu tohoto pásu přenosu náboje. Pokud uvedeme výše zmíněné skutečnosti v širší souvislost, tak to znamená, že v případě, kdy jsou aromatická jádra HL a DOM bohatě substituována polárními funkčními skupinami, lze bezpochyby očekávat i zvýšení vypočtených hodnot  $E_{ET}/E_{Bz}$ . Jinými slovy, tento absorpční koeficient je ve velmi dobré korelaci s mírou substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami. V neposlední řadě je na tomto místě nutné říci, že hodnota absorpance benzoidního pásu ( $E_{Bz}$ ) může být nepříznivě ovlivněna přítomností NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iontů, a proto byly definovány další absorpční koeficienty jako  $A_{220}/A_{253}$  a  $A_{230}/A_{253}$ , které jsou však ve velmi dobré korelaci s výše zmíněným parametrem  $E_{ET}/E_{Bz}$ .

Aromaticita a  $\overline{M}_w$  HL a DOM může být odhadnuta na základě tzv. specifických hodnot absorpance. Obecně se jedná o absorpance při vhodně zvolených vlnových délkách, které jsou však přepočítány na hodnoty obsahu celkového organického uhlíku TOC. Tyto specifické hodnoty absorpance jsou v odborné literatuře označovány jako SUVA<sub>254</sub> [87], SUVA<sub>280</sub> [88] a SUVA<sub>400</sub> [89], přičemž uvedené dolní indexy značí, při jakých vlnových délkách jsou odečteny příslušné hodnoty absorbancí. Specifická hodnota absorpance SUVA<sub>254</sub> je obecně ve velmi dobré pozitivní korelaci s aromaticitou resp. stupněm aromaticity HL a DOM. V případě odhadu střední molekulové hmotnosti HL tento parametr vyniká nebyvalou senzitivitou, a proto ho lze s výhodou použít k determinaci

této kvalitativní vlastnosti. Naproti tomu, specifická hodnota absorpce  $SUVA_{280}$  spíše vypovídá o střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$  nežli o aromaticitě. Jedním z možných důvodů může být právě vybraná vlnová délka, která ve své podstatě zohledňuje nejen čistě elektronové přechody aromatických jader, ale i substituentů o různé strukturní morfologii.

### 5.2.2 Infračervená spektrometrie a její techniky

Infračervená spektrometrie patří do skupiny tzv. nedestruktivních instrumentálních technik, přičemž analyzovaný vzorek při interakci s infračerveným zářením není nikterak poškozen, a přesto nám je schopen poskytnout kvalitativní, ale i kvantitativní informace o svém složení. Tato instrumentální technika je doposud širokou vědeckou společností považována za jednu z nejzákladnějších analytických metod kvalitativního hodnocení HL a DOM resp. OM. Na tomto místě je nutné říci, že s dynamickým rozvojem jednotlivých technik infračervené spektrometrie roste i vědecký zájem o využití této metody v rámci studia a charakterizace těchto biokoloidních látek. Jedná se především o FTIR techniky, které využívají optických jevů, jako je spekulární a difuzní reflexe, přičemž zde má svoji nezastupitelnou roli i nebývalý pokrok v oblasti softwarového zpracování měřících a vyhodnocovacích programů. V této souvislosti je dobré zmínit, že tak jako u fluorescenční spektrometrie jsme dnes schopni změřit časově-rozlišená infračervená spektra, která do nedávné doby nebyla možná jednoduše naměřit a experimentálně vyhodnotit.

V rámci studia HL a DOM je od tzv. klasických (transmisních) metod, kam zpravidla řadíme techniku lisování tablet a nujolu upouštěno, a to z několika důvodů, které budou podrobněji diskutovány níže. V případě nujolové techniky se zejména jedná o znemožnění interpretace FTIR spektra v oblastech specifické adsorpce alifatických uhlovodíků tzn.  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1470\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  a  $1390\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ , kde nastává významná adsorpce nosné matrice tzn. minerálního oleje Nujolu [90]. Jistou problematikou se vyznačuje i metoda lisování tablet, i když se jedná o explicitně odlišný nedostatek vycházející z kvalitativního ovlivnění struktury HL a DOM. Mnoho autorů poukazuje na fakt, že v průběhu lisování KBr tablet může docházet působením vysokých tlaků ( $\sim 80\text{ kN}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) k iontové výměně resp. de-protonaci kyselých funkčních skupin, jako jsou karboxylové a -OH fenolické. V případě HL se tento fenomén projeví zjevnými změnami v jejich FTIR spektrech, a to zejména snížením intenzity absorpčního pásu odpovídajícího valenční symetrické vibraci C=O vazeb a přítomností či zvýšením intenzity absorpčních pásů připisovaným valenčním a deformačním vibracím karboxylátového anionu  $\text{COO}^-$  [91].

Jako nejvhodnější technika infračervené spektrometrie se pro výzkum HL a DOM jeví metoda difuzní reflektance resp. reflexe DRIFT – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* [92]. Jak již bylo řečeno výše, v případě této instrumentální techniky nedochází k iontové výměně mezi substrátem a analyzovaným vzorkem, a proto nedochází ke zkreslení kvalitativní informace měřených vzorků. Na tomto místě je nutné říci, že difuzně reflexní spektra jsou vyjádřena v tzv. Kubelka-Munk jednotkách, které odpovídají jednotkám absorpce jako by byly vzorky měřeny pomocí transmisních technik [93]. Jedna z dalších neopomenutelných výhod je, že tato technika se v porovnání s ostatními metodami vyznačuje přítomností velmi intenzivních



absorpčních pásů při zachování velice dobrých hodnot spektrálního rozlišení. Při použití této techniky obvykle nedochází k negativnímu ovlivnění základní spektrální linie, a tudíž lze některé vzorky měřit tzv. diferenční metodou, kdy jako background je použita směs KBr a substrátu.

V případě měření roztoků HL a DOM, ať už máme, na mysli vodné či roztoky organických rozpouštědel, tak je instrumentálně výhodné tyto vzorky analyzovat pomocí jedné ze dvou metod spekulární reflexe tzn. za použití jedno či více odrazového ATR krystalu [94]. Tyto výše zmíněné techniky se především vyznačují velmi rychlou instrumentací, která je především dána možností přímého měření, kdy vzorek nemusí být nikterak upravován. Je nadevše jasné, že ATR metoda je nedocenitelná v případě, kdy potřebujeme analyzovat roztoky HL resp. DOM, aniž bychom museli volit tzv. diferenční měření, kdy jako background slouží spektrum čistého rozpouštědla. Pokud je zvolen výše zmíněný diferenční postup, tak se obvykle můžeme setkat s problémem, který přednostně vychází z nekvantitativního odečtení pozadí, jehož projevem jsou přítomné absorpční pásy v ATR spektru vzorku. Tento problém lze s výhodou vyřešit postupem, kdy po nanesení malého objemu vzorku (0,5–2  $\mu$ l) necháme rozpouštědlo odpařit a vzorek je tudíž deponován na ATR krystalu v podobě tenké a homogenní vrstvy. Pokud jsou dodrženy jisté instrumentální zásady, jako jsou shodné objemy a stejnorodé pokrytí ATR krystalu, tak obvykle jsme schopni získat velmi kvalitní kalibrační křivky, jejichž hodnoty koeficientu determinace  $R^2$  se blíží k jedné. Mimo jiné, o vhodnosti této metody ke kvantitativnímu stanovení daného analytu svědčí i residuální analýza, jejichž střední hodnota chybové složky je rovna nule a příslušné složky splňují podmínku tzv. homoskedasticity. Silně absorbující vzorky, jako jsou HK případně některé frakce OM by měly být měřeny na germaniovém ATR krystalu, a to zejména z důvodu, že malá penetrační hloubka evanescentní vlny zdaleka tak neovlivňuje relativní intenzitu absorpčních pásů v oblasti vyšších vlnočtů [95, 96]. Tento jev je více patrný v případě, kdy jsou výše zmíněné vzorky měřeny na diamantovém ATR krystalu. Tento fenomén lze s jistou experimentální opatrností řešit pomocí tzv. ATR korekce, avšak je v této souvislosti nutné říci, že kompenzovat tento jev můžeme pouze v případě, kdy je nám znám přesný index lomu vzorku.

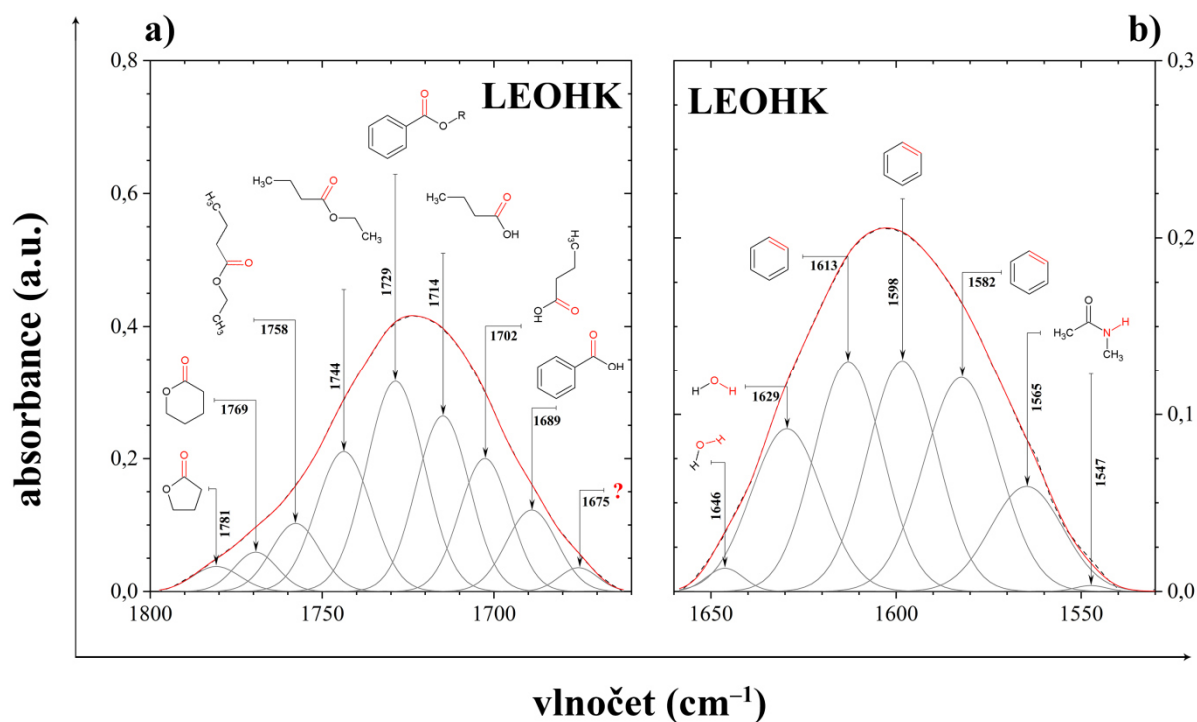
Je nutné si uvědomit, že z důvodu rozsáhlé strukturní složitosti těchto biokoloidních látek se jejich infračervená spektra vyznačují nebývale širokými absorpčními pásy, jejichž interpretace vyžaduje jistou experimentální zkušenost a určitou dávku obezřetnosti. Naprostá většina HL a DOM je charakterizována následujícími absorpčními pásy nehledě na jejich přírodní původ či zvolenou metodu měření [97–100].

Široký a poměrně intenzivní absorpční pás lokalizovaný v oblasti 3600–3100  $\text{cm}^{-1}$  je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci O–H vazeb v rozličných funkčních skupinách jako jsou karboxylové, –OH fenolické, amidové, alkoholové aj. Mimo jiné je zapotřebí zmínit i jistý příspěvek molekul  $\text{H}_2\text{O}$  sorbované vlhkosti. Prakticky vždy lze v infračervených spektrech HL a DOM nalézt absorpční pásy při 2970  $\text{cm}^{-1}$  a 2940  $\text{cm}^{-1}$ . Výše zmíněné absorpční pásy mají svůj původ v asymetrických vibracích C–H vazeb připadajících – $\text{CH}_3$  a – $\text{CH}_2$ – skupinám. Tyto alifatické funkční skupiny mohou být identifikovány i v oblasti tzv. fingerprintu, kde nastávají jejich deformační vibrace. Specifická absorpce těchto pásů nastává při 1465  $\pm$  5  $\text{cm}^{-1}$  a 1380  $\text{cm}^{-1}$ . Méně výrazný absorpční pás lokalizovaný při 3070  $\pm$  10  $\text{cm}^{-1}$  je zpravidla připisován valenční

symetrické vibraci C–H vazeb na aromátech. V důsledku bohaté substituce aromatického jádra HL a DOM funkčními skupinami, jako jsou –COOH, –OH fenolické, –OCH<sub>3</sub>, –O– atd. se tento pás obvykle vyznačuje nízkou relativní intenzitou. Naproti tomu, intenzivní absorpční pásy lokalizované při  $1610 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$  a  $1510 \text{ cm}^{-1}$  jsou obvykle připisovány valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromátech. Na tomto místě je nutné podotknout, že druhý v řadě zmíněný absorpční pás je považován za indikátor aromatických sloučenin odvozených z ligninu tzn. pás tzv. ligninových residuí. Až na některé výjimky jsou v infračervených spektrech HL nejintenzivnějšími absorpčními pásy ty, které můžeme bez jakéhokoliv zaváhání připsat valenčním symetrickým vibracím C=O vazeb v karboxylových skupinách. Specifická adsorpce těchto pásů nastává výhradně při  $1710 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ . Přítomnost karboxylových skupin je v infračervených spektrech HL a některých vzorků DOM doprovázena širokým absorpčním pásem lokalizovaným v oblasti  $2700\text{--}2400 \text{ cm}^{-1}$ . Tento absorpční pás je zpravidla připisován vyšším harmonickým přechodům tzv. *overtonům*, které jsou indukovány prostřednictvím kombinačních vibrací karboxylových skupin vytvářejících dimery R–C–OH $\cdots$ O=C–R. Zpravidla si v infračervených spektrech HL nelze nepovšimnout poměrně intenzivního a širokého absorpčního pásu, jehož specifická adsorpce nastává při  $1400 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ . Kvalitativní přiřazení tohoto pásu bývá poněkud problematické, a to především z důvodu jeho méně selektivní hodnoty vlnočtu, který se nachází na pomezí dvou forem karboxylových skupin. Obecně můžeme tento pás přiřadit rovinné deformační vibraci C–O–H a symetrické valenční vibraci C–O vazeb v –COOH resp. COO<sup>–</sup> skupinách. Tato hypotéza může být v dobré platnosti, pokud si uvědomíme, že určitá část populace karboxylových skupin se bude nacházet ve formě anionu, jelikož těmito reaktivními skupinami jsou vázány některé kationy, jako jsou Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> aj. O přítomnosti těchto anorganických příměsí v HL a DOM svědčí stanovené obsahy nespalitelného podílu tj. popela. Obdobně složitou interpretací se vyznačuje absorpční pás, který můžeme nalézt při  $1225 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ . Čistě z hypotetického hlediska může být tento pás připsán valenční symetrické vibraci C–O vazeb ve fenolech a karboxylových funkčních skupinách. Mimo jiné, přicházejí v úvahu i valenční asymetrické vibrace C–O–C vazeb v aryl-etherech. Naproti tomu, k absorpčnímu pásu lokalizovanému při  $1080 \text{ cm}^{-1}$  lze jednoznačně přiřadit specifický vibrační mód, který je v přímé souvislosti s valenční asymetrickou vibrací C–O–C vazeb v alkyl-etherech. Absorpční pás s proměnnou relativní intenzitou, který je obvykle lokalizován při  $1035 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční symetrické vibraci C–O vazeb v primárních alkoholech. Jinými slovy lze tento absorpční pás považovat za indikátor residuálních fragmentů polysacharidů.

Jak již bylo nastíněno výše, některé absorpční pásy mají povahu překrývajících se píků, které ve své podstatě odpovídají celé řadě vibračních módů připadajících rozličným funkčním skupinám resp. strukturním jednotkám. Tento kvalitativní problém lze s jistou dávkou obezřetnosti vyřešit pomocí dekonvolučních postupů, kam zpravidla řadíme Lorentzovu a Gaussovu profilovou funkci, případně jejich kombinaci [101–103]. Nicméně, v dnešní době je stále více používána tzv. Fourierova autodekonvoluce, avšak je nutné říci, že tato inverzní FT-funkce ve své podstatě postrádá informace týkající se kvantitativního zhodnocení nalezených pásů. Jinými slovy, tuto chemometrickou metodu nelze použít ke kvantitativnímu zhodnocení dekonvoluovaných absorpčních pásů, jak je tomu v případě výše zmíněných profilových funkcí.

Na Obr. 12 jsou uvedeny dekonvoluce absorpčních pásů vzorku hnědouhelné HK, které jsou obecně připisovány valenčním symetrickým vibracím C=O a C=C vazeb v karboxylových skupinách a aromatických strukturních jednotek. V případě dekonvoluce kondenzovaných systémů tzn. kapalných a pevných vzorků je nevyhnutelně nutné použít Gauss-Lorentzovu profilovou funkci. Jak z Obr. 12 vyplývá, mnoho zajímavých kvalitativních informací je zpravidla ztraceno v konvoluci jednotlivých vibračních módů, kterými se vyznačují poněkud široké absorpční pásy HL a DOM. Jak je vidět z Obr. 12a, tak pomocí dekonvoluce lze v původně širokém pásu s maximem specifické adsorpce při  $1710 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$  rozlišit celou řadu lokálních maxim, které přednostně odpovídají valenční symetrické vibraci C=O vazeb v rozličných funkčních skupinách, jako jsou laktonové, esterové, karboxylové aj. skupiny. Lokální maxima lokalizovaná při  $1758 \text{ cm}^{-1}$  a  $1744 \text{ cm}^{-1}$  lze jednoznačně připsat valenčním symetrickým vibracím C=O vazeb v satureovaných resp. alkyl-esterech. Naproti tomu je přítomnost aryl-esterů odhalena nejintenzivnějším signálem, jehož pozice je v dekonvoluovaném spektru při  $1729 \text{ cm}^{-1}$ . Pás lokalizovaný při  $1714 \text{ cm}^{-1}$  je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových skupinách alifatických organických kyselin. Méně intenzivní maximum s hodnotou specifické adsorpce při  $1689 \text{ cm}^{-1}$  lze bez jakéhokoliv zaváhání připsat  $\nu_s$  vibraci karbonylu v -COOH skupinách, kterými jsou substituovány Ar jednotky. V případě signálu vystředěného při  $1702 \text{ cm}^{-1}$  nejsme schopni jednoznačně určit, zda se jedná o karboxylové skupiny alifatických či aromatických kyselin. Z hlediska strukturního složení HL jsou velmi zajímavé pásy lokalizované při nejvyšších hodnotách vlnočtu, které mají svůj původ v látkách, jako jsou  $\delta$ - a  $\gamma$ -laktony.



Obrázek 12: Dekonvoluce absorpčních pásů vzorku standardu hnědouhelné HK (*Leonardite IHSS*).

Signály přítomné v dekonvoluovaném spektru viz. Obr. 12b lze rozdělit do tří skupin tzn. aromatických strukturních jednotek, sekundárních amidů a sorbovaných molekul  $\text{H}_2\text{O}$ . Pásky, které jsou lokalizovány v oblasti  $1650\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$  lze výslovně identifikovat jako signály připadající valenčním a deformačním vibracím O–H vazeb v molekulách  $\text{H}_2\text{O}$ . Aromatickým strukturním jednotkám náleží triplet pásů při  $1613\text{ cm}^{-1}$ ,  $1598\text{ cm}^{-1}$  a  $1582\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídají valenční symetrické resp. dýchací vibraci C=C vazeb v těchto výše zmíněných strukturách. Naproti tomu dublet píků, jejichž pozice jsou vystředěny při  $1565\text{ cm}^{-1}$  a  $1547\text{ cm}^{-1}$  lze bez jakéhokoliv zaváhání připsat deformační rovinné vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech. Tyto strukturní jednotky jsou v přímé souvislosti s přítomností bílkovinných residuí v analyzovaných vzorcích OM.

Jako u ostatních instrumentálních technik lze při analýze těchto biokoloidních sloučenin využít tzv. specifických strukturních koeficientů, které jsou obecně definovány jako poměry intenzit či integrovaných ploch dvou unikátních absorpčních pásů. Tato semikvantitativní metoda nám umožňuje rychlé zhodnocení strukturních odlišností, které jsou především determinovány obsahem rozličných funkčních skupin resp. strukturních jednotek, které mohou být připsány jednotlivým stavebním kamenům spoluvytvářejících supramolekuly HL potažmo DOM.

O míře substituce aromatických strukturních jednotek karboxylovými či fenolickými funkčními skupinami vypovídají dva specifické strukturní koeficienty  $I_{\text{Ar}}/I_{\text{COOH}}$  a  $I_{\text{Ar}}/I_{\text{ArOH}}$ . V prvním případě se jedná o poměr intenzit absorpčních pásů při  $1620\text{ cm}^{-1}$  a  $1710\text{ cm}^{-1}$ , které čistě odpovídají valenčním vibracím C=C a C=O vazeb v aromatických strukturních jednotkách a karboxylových funkčních skupinách. Naproti tomu je ve druhém případě totožná hodnota čitatele podělena intenzitou absorpčních pásů při  $1220\text{ cm}^{-1}$ , který je spjat s valenčními vibracemi C–O vazeb koexistence aromatického uhlíku s kyslíkem hydroxylové skupiny. Na základě těchto strukturních parametrů můžeme odhadovat aromaticitu resp. alifaticitu studovaných HL. Za tímto účelem byl definován specifický koeficient  $I_{\text{Ar}}/I_{-\text{CH}_2-(\text{s})}$  anebo  $I_{\text{Ar}}/I_{-\text{CH}_2-(\text{as})}$ , který zohledňuje buď symetrickou anebo asymetrickou vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. Na tomto místě je nutné zmínit i další specifický strukturní koeficient, který je v literatuře běžně označován jako  $I_{\text{O}}/I_{\text{R}}$ , na jehož základě můžeme velmi dobře predikovat reaktivitu HL, která je především vázána na obsah karboxylových a –OH fenolických skupin. Tento koeficient je definován jako poměr intenzit všech absorpčních pásů odpovídajících kyslíkatým funkčním skupinám a pásů, které jsou čistě považovány za indikátory hydrofobicity HL. Za nositele hydrofobicity HL a DOM jsou obecně považovány alifatické a aromatické strukturní jednotky. Rozvětvení alifatických strukturních jednotek může být predikováno na základě specifického strukturního koeficientu  $I_{-\text{CH}_3}/(I_{-\text{CH}_3} + I_{-\text{CH}_2-})$ , který je definován jako poměr intenzity absorpčního pásu methylových funkčních skupin a veškerých alifatických jednotek.

### 5.2.3 Steady-state fluorescenční spektrometrie

Jak již bylo uvedeno v subkapitole 4.2.1, roztoky HL resp. OM jsou schopny významně absorbovat elektromagnetické záření, a to především v krátkovlnné UVC oblasti. Nicméně pravděpodobnost elektronových přechodů nelineárně klesá se snižující se energií dopadajících fotonů, a tudíž mají výsledná UV/Vis spektra typický

kvaziexponenciální průběh. V tuto chvíli se nacházíme jen nepatrný krok od pozorování fluorescence těchto unikátních biokoloidních sloučenin. Aby byla splněna podmínka fluorescence, tak musí excitovaný elektron pozbýt část své energie prostřednictvím nezářivého přechodu nasnadě označovaným jako vibrační relaxace. Při vibrační relaxaci je část přebytečné energie disipována ve formě tepla, v důsledku čehož může ze základního excitovaného stavu  $S_1$  dojít k zářivému přechodu elektronu na některou ze základních hladin stavu  $S_0$  tj. princip fluorescence resp. emise elektromagnetického záření.

Fluorescenční spektrometrii v ustáleném stavu můžeme považovat za vysoce selektivní instrumentální techniku, jelikož pozorovaná fluorescence je indukována pouze takovými organickými sloučeninami, které se vyznačují konjugovaným systémem dvojných vazeb. V případě HL a DOM jsou tyto konjugované systémy spjaty s přítomností aromatických a heterocyklických sloučenin, zatímco nelze opomenout i takové organické sloučeniny, které se vyznačují poměrně dlouhými řetězci s výše zmíněnou konjugací. V první řadě nám fluorescenční spektrometrie poskytuje informace o chemické povaze HL a DOM, které jsou determinovány polohou a intenzitou fluorescenčních domén. Tyto fluorescenční maxima jsou obecně velmi dobrými markery vypovídajícími o původu HL a DOM, a proto jsou rovněž využívány jako potencionální „otisky prstů“, na jejichž základě mohou být tyto biokoloidní sloučeniny klasifikovány a tříděny do příslušných skupin. Mimo jiné je na tomto místě nutné zmínit, že poloha a intenzita fluorescenčních maxim nese v sobě informace i o míře substituce daných fluoroforů elektron-donorními či elektron-akceptorními skupinami. Jako u ostatních instrumentálních technik, tak i v tomto případě jsme schopni predikce některé z dalších vlastností, kterými se tyto biokoloidní sloučeniny vyznačují. Jedná se především o aromaticitu, heterogenitu, střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_w$  a dynamické vlastnosti související s jejich intermolekulárními a intramolekulárními interakcemi.

Celková luminiscenční spektrometrie<sup>40</sup> (TLS), která je v dnešní době spíše známa jako excitačně-emisní matice (EEM) je mnohými autory považována za jednu z nejkompexnějších metod studia HL a DOM, a to především proto, že tato fluorescenční technika vyniká nebyvalou senzitivitou stanovení jednotlivých sloučenin ve fluorescenční směsi. V důsledku supramolekulárního pohledu je nadevše jasné, že jednotlivé stavební kameny spoluvytvářející tyto obdivuhodné asociace budou mít nezanedbatelný vliv na fluorescenční chování, ale i tak můžeme popsat některá obecná pravidla, která jsou povšechně v platnosti. Pokud jsou aromatické strukturní jednotky bohatě substituovány elektron-donorními funkčními skupinami tzn.  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$  atd. lze u těchto fluorescenčních domén pozorovat významné zvýšení intenzity fluorescence. Naproti tomu, pokud převládá substituce aromatického jádra elektron-akceptorními funkčními skupinami tzn.  $-COOH$ ,  $-COH$  atd. je pozorovaný efekt opačný [104, 105]. V této souvislosti je nutné říci, že určitá variabilita v substituci aromatického jádra má nejen vliv na intenzitu fluorescence, ale také významně ovlivňuje pozici příslušných domén v EEM spektrech. Obecně můžeme konstatovat, že substituenty

---

<sup>40</sup> EEM spektra vznikají spojením excitačních a emisních spekter do dvojrozměrného (*konturová mapa*) anebo trojrozměrného (*3D EEM mapa*) obrazu, kde na jedné ose je vynesena excitační vlnová délka, na druhé ose je vynesena vlnová délka emise a na svislé ose je vynesena intenzita fluorescence  $I_F$  (CPS).



obsahující karbonyl, hydroxyl, alkoxylyl či aminoskupiny mají tendenci posouvat fluorescenční maximum do oblasti vyšších vlnových délek, to znamená, že dochází k tzv. red-shift (*červený posun*). Na druhé straně, je posun fluorescenčního maxima ke kratším vlnovým délkám převážně spjat s poklesem počtu aromatických kruhů anebo snížením konjugovaného systému dvojných vazeb ve struktuře dlouhých lineárních řetězců. Jinými slovy, tzv. blue-shift resp. *modrý posun* fluorescenčního maxima je vždy doprovázen významným snížením počtu  $\pi$  elektronů v daném fluoroforu. Aby byla naše představa o fluorescenci HL a DOM v úplnosti, tak je třeba zmínit, že fluorescenční domény, které jsou lokalizovány v oblasti vysokých vlnových délek excitace i emise se obvykle vyznačují systémem lineárně kondenzovaných aromatických struktur anebo systémy vysokého stupně konjugace nenasycených vazeb. V obou těchto případech se příslušné domény vykazují poměrně nízkými hodnotami fluorescenční intenzity. Nicméně, jak z výše uvedeného faktu vyplývá, tak intenzita fluorescence může být použita k predikci molekulární velikosti daného fluoroforu [106].

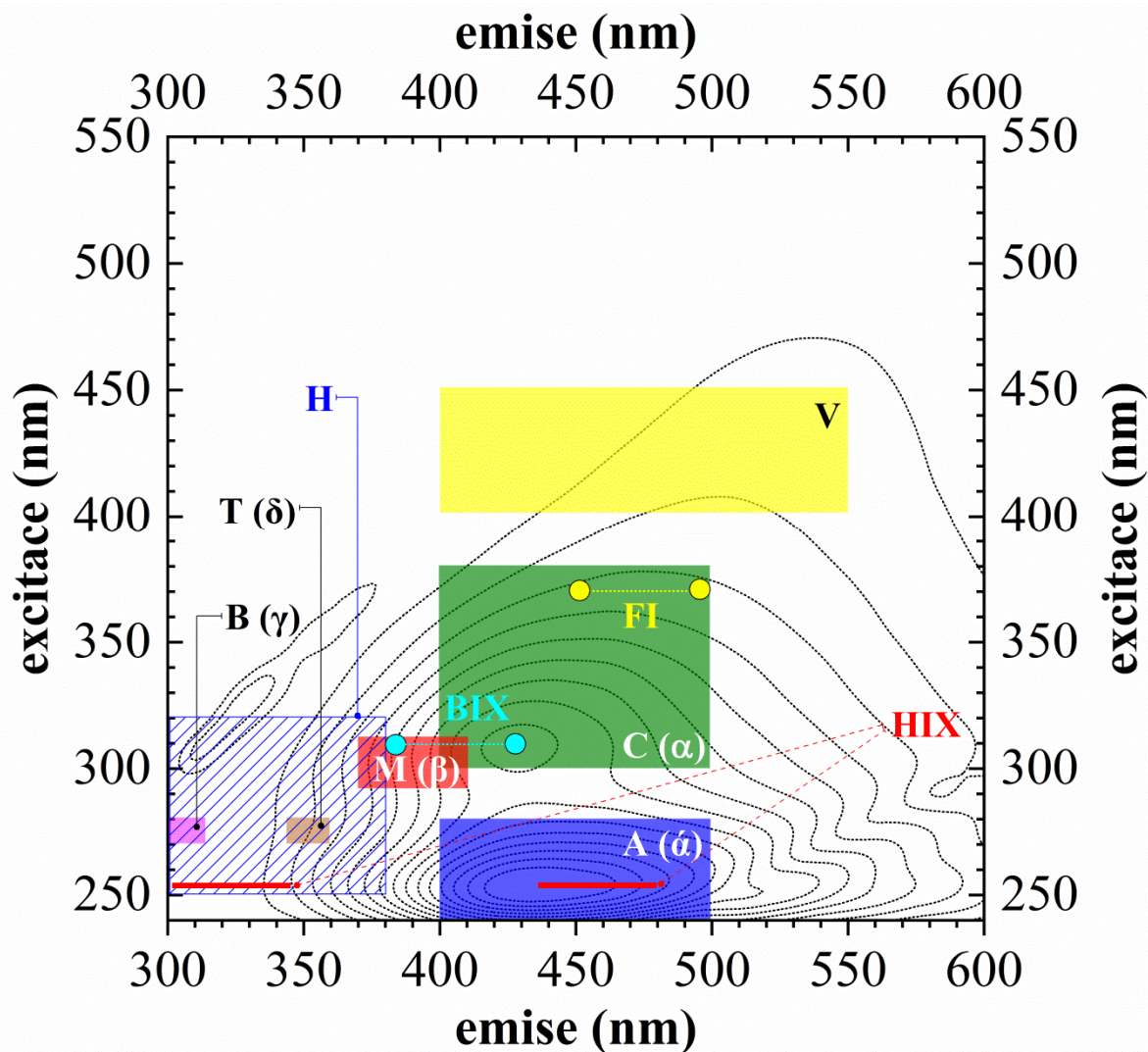
#### *Rozdělení HL a DOM dle fluorescenčních domén přítomných v EEM*

Jak již bylo řečeno výše, celková fluorescenční spektra resp. excitačně-emisní matice HL a DOM mají povahu tzv. fingerprintu, a proto je lze s výhodou využít ke klasifikaci těchto unikátních biokoloidních sloučenin do jednotlivých tříd či skupin. Jinými slovy, každý vzorek HL a DOM se vyznačuje v EEM spektrech specifickým počtem fluorescenčních domén, zatímco jejich přesná pozice a intenzita fluorescence ( $I_F$ ) jsou obecně nositelkami typických vlastností, kterými se tyto organické sloučeniny vyznačují. Jedná se především o jejich aromaticitu, střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_w$ , míru kondenzace a substituce aromatických strukturních jednotek elektron-donorními či elektron-akceptorními funkčními skupinami a v neposlední řadě i efekty spojené s intramolekulárními stavy přenosu náboje v literatuře označované jako charge-transfer states.

Fluorescenční domény resp. fluorofory jsou tradičně rozděleny do dvou základních skupin, a to na huminové (fulvic/humic-like) a ne-huminové (tyrosin/tryptofan-like) [107–117]. Až na některé výjimky, jako jsou buď HK izolované z hnědouhelných přírodních matric anebo vzorky DOM, jež se nacházejí v prvních fázích humifikačního procesu, se zpravidla tyto biokoloidní sloučeniny vyznačují dvěma fluorescenčními doménami, které jsou v odborných pramenech označovány symboly A a C, případně  $\alpha$  a  $\beta$ . Fluorescenční doména A resp.  $\alpha$  je v excitačně-emisním spektru (EEM) lokalizována v oblasti vlnových délek 240–280/400–500 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ), na druhé straně, fluorofor C resp.  $\beta$  se zpravidla nachází v oblasti vyšších vlnových délek excitace i emise tzn. při 300–360/400–500 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Mimo jiné se v odborné literatuře můžeme setkat s označením výše zmíněných fluoroforů jako UVC a UVA, jež je v přímé souvislosti s použitou vlnovou délkou excitace resp. budícího záření. Fluorescenční domény C resp.  $\beta$ , které jsou v odborných publikacích označovány jako humic-like fluorofory lze jednoznačně připsat aromatickým sloučeninám, které mají svůj původ v látkách, jako jsou polyhydroxybenzoové kyseliny, deriváty kyseliny skořicové a kumarinu. Mimo jiné přicházejí v úvahu i sloučeniny, jež jsou odvozeny od polyaromatických fytohormonů, kam zpravidla řadíme kumasteny, z nichž nejvýznamnějšími představiteli jsou deriváty kumasterolu. Obecně jsou tyto organické sloučeniny produkovány během dekompozice rostlinných těl. Na tomto místě je nutné říci, že do této skupiny jsou rovněž řazeny



takové organické sloučeniny, které jsou v přímé souvislosti s látkami, jako jsou deriváty různě substituovaných fenolických jednotek pocházejících z ligninu, Schiffovy báze či deriváty xanthonu anebo chinolinu. Naproti tomu, fluorescenční domény A resp.  $\alpha$  (fulvic-like) jsou převážně spjaty s mono- anebo di-aromatickými kyselinami s variabilní mírou substituce Ar jednotek hydroxylovými skupinami. Kromě toho, mohou být do této kategorie řazeny i deriváty chinonů, jako jsou benzochinony a naftochinony. Poslední typickou fluorescenční doménou, kterou se vyznačují HL je fluorofor, který je v odborných pramenech označován jako marine humic-like. Jak název tohoto fluorescenčního maxima napovídá, tak tato doména je typickým fluoroforem HL a DOM izolovaných z pobřežních sedimentů a mořských vod. Nicméně toto fluorescenční maximum se nachází i ve vzorcích terestriálních HL a v této souvislosti je obvykle považováno za prekursor fluorescenční domény C resp.  $\alpha$ . V tuto chvíli je patrné, že pojmenování této fluorescenční domény je spjato s okamžikem, kdy a v jakém vzorku OM byla prvotně nalezena. Pozice tohoto fluoroforu M resp.  $\beta$  je determinována oblastí vlnových délek 290–310/370–410 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ).



Obrázek 13: EEM konturová mapa vzorku standardu FK (*Elliott Soil IHSS*) s vyznačenými fluorescenčními doménami (fluorofory) a fluorescenčními koeficienty; převzato upraveno [114].

Na tomto místě je nutné podotknout, že v případě terestriálních HK, a to zejména těch, které byly izolovány z kaustobiolitických přírodních matric se v jejich EEM spektrech můžeme setkat s fluorescenčním maximem, které je lokalizováno v oblasti velmi vysokých vlnových délek excitace a emise, nejčastěji však při 450–470/500–520 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) [72, 111, 113]. Tato fluorescenční doména V má pravděpodobně svůj původ v látkách jako je fytochlorin. Tyto sloučeniny jsou degradačními produkty chlorofylu, které se svojí strukturou podobají žlučovému barvivu bilirubinu, a to především v důsledku toho, že obě tyto sloučeniny jsou tvořeny centrálními porfyrinovými kruhy.

Jak již bylo zmíněno výše, v EEM spektrech HL a DOM můžeme nalézt i fluorescenční domény tzv. ne-huminového typu, které jsou obvykle považovány za indikátory biologické aktivity mikroorganismů půdní a vodní flóry. Jedná se především o 2,3-benzopyrrol tj. indol, který je prekurzorem mnoha organických sloučenin, jako je tryptofan či různé alkaloidy a biomolekuly. Tyto organické sloučeniny můžeme obecně označit jako indol-obsahující látky. Fluorofor, který se nachází v oblasti nejnižších vlnových délek emise je označován jako tyrosin-like. Tato fluorescenční doména B resp.  $\gamma$  je v excitačně-emisních spektrech lokalizována v oblasti vlnových délek 270–280/300–315 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Naproti tomu, fluorescenční doména, které je všeobecně známa jako tryptofan-like (T resp.  $\delta$ ) se nachází v oblasti vyšších vlnových délek emise tzn. 270–280/345–360 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Výše zmíněné fluorescenční domény jsou produkovány na základě aktivity mikrobiální biomasy, a to zejména v podobě exsudátů, které se nacházejí v jejich blízkosti [114–117].

Steady-state fluorescenční spektra lze s výhodou použít k výpočtu tzv. fluorescenčních koeficientů, které jsou definovány jako poměry intenzit fluorescence ( $I_F$ ), anebo jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise. Fluorescenční koeficienty nám poskytují nejen informace o kvalitativních vlastnostech HL resp. DOM, kam zpravidla řadíme aromaticitu, střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_w$ , aj., ale také vypovídají o určitých biologických mechanismech, které jsou neoddělitelnou součástí jejich geneze v rozličných přírodních ekosystémech. V této souvislosti máme především na mysli mikrobiální aktivitu, dostupnost organického uhlíku, který může být buď autochtonního anebo alochtonního původu, vliv slunečního záření atd.

Historicky, jeden z prvních navržených koeficientů je tzv. fluorescenční index (FI), který je definován jako poměr intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 450 a 500 nm, zatímco vlnová délka budícího záření je 370 nm [109]. Vypočtené hodnoty tohoto fluorescenčního koeficientu jsou především závislé na přítomnosti a intenzitě fluorescenčních domén C ( $\alpha$ ) a M ( $\beta$ ). Na tomto místě je nutné podotknout, že v úvahu přicházejí i doposud neidentifikované fluorofory, které se vyznačují poměrně velkými Stokesovými posunu (> 80 nm), přičemž jejich emise nastává v modrozelené oblasti Vis spektra. Výše zmíněný index velmi dobře reflektuje rozdíly mezi terestriálními a mikrobiálně derivatizovanými HL a DOM. Hranice k určení specifického původu HL a DOM je v tomto případě dána rozmezím hodnot: FI (terestriální OM) < 1,4–1,9 > FI (mikrobiální OM). Mimo jiné, stupeň aromaticity HL a DOM je ve velmi dobré inverzní korelaci s tímto fluorescenčním koeficientem, a proto ho lze s výhodou použít k odhadu aromaticity či  $\overline{M}_w$ . Také lze vysledovat, že hodnota fluorescenčního indexu FI se zvyšuje s klesajícím atomovým poměrem C/N.

Za komplementární fluorescenční koeficient k navrženému parametru FI můžeme považovat tzv. biologický/autochtonní index BIX, který je definován jako poměr intenzit fluorescence při kratších vlnových délkách emise a excitace. Jak z ilustrativního EEM spektra vyplývá (viz. Obr. 13), tak tento fluorescenční koeficient lépe zohledňuje příspěvek fluorescenční domény M ( $\beta$ ), jež je spjata s autochtonní resp. mikrobiální produkcí OM v přírodních ekosystémech [118]. Výše zmíněný koeficient je definován jako poměr intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 380 a 430 nm, přičemž vlnová délka excitace je 310 nm. Biologický/autochtonní index BIX je ve své podstatě formulován tak, aby co nejcitlivěji odpovídal na kvantitativní změny v relativním zastoupení obou fluorescenčních domén, které jsou připisovány DOM terestriálního a mikrobiálního původu. Fluorescenční doména M ( $\beta$ ), jež je lokalizována v oblasti kratších vlnových délek emise se výhradně přičítá autochtonním DOM, které jsou výsledkem mikrobiální činnosti rozličných společenstev, nejčastěji však oligokarbofilních bakterií. Fluorofor C ( $\alpha$ ) resp. UVA fluorescenční doména je výhradně připisována alochtonním OM anebo diageneticky pozměněným doménám marine humic-like. Vypočtené hodnoty BIX, které se nacházejí v rozmezí 0,8–1,0 odpovídají nově resp. „čerstvě“ syntetizovaným DOM biologického či mikrobiálního původu. Naproti tomu, vzorky, které se vyznačují hodnotami BIX < 0,6 jsou považovány za OM převážně alochtonního původu.

Snaha o predikci stupně humifikace vedla odbornou společnost zabývající se fluorescenční spektrometrií HL a DOM k návrhu tzv. humifikačního indexu HIX, který je definován, jako poměr dvou integrálních ploch pod emisním spektrem tzn.  $A_4/A_1$  [119]. Za tímto účelem byly použity dvě oblasti označované jako  $A_1$  a  $A_4$ , které jsou vypočteny jako plošné integrály v rozmezí vlnových délek emise 300–345 nm ( $A_1$ ) a 435–480 nm ( $A_4$ ). Vlnová délka budícího záření (254 nm) byla zvolena tak, aby byly zohledněny nejen fluorescenční domény A ( $\alpha$ ), ale také i fluorofory ne-huminového charakteru, jako jsou tyrosin- a tryptofan-like. Na tomto místě je nutné říci, že stupeň humifikace reprezentovaný vypočtenými hodnotami koeficientu HIX je obecně indikátorem „věku“ (*material's age*) a jeho odolnosti vůči kvalitativním změnám v probíhajícím procesu humifikace. Např. obecně se předpokládá, že vysoce humifikované organické sloučeniny, které jsou typickými představiteli HL a DOM terestriálních ekosystémů jsou poměrně dost perzistentní vůči degradaci a předpokládá se, že v takových to přírodních prostředních přetrvávají v nepozměněné podobě déle než ty s nízkým stupněm humifikace. Hodnota humifikačního indexu HIX je všeobecně velmi nízká (HIX < 5) pro vzorky HL a DOM pocházejících z rostlinné biomasy a hnoje hospodářských zvířat, zatímco se zvyšuje v průběhu jejich rozkladu a humifikace či sorpce na minerální podíl půdy. Naproti tomu, HL a DOM pocházející z terestriálních přírodních matric, jako jsou kaustobiolity a půdy se vyznačují očividně vyššími hodnotami tohoto parametru, avšak nejčastěji jsou determinovány rozmezím 10–30. Mimo jiné, nelze ani opomenout, že tento fluorescenční index je v silné pozitivní korelaci s aromaticitou resp. stupněm aromaticity. Nicméně bylo i dokázáno, že tento index je poměrně v dobré inverzní korelaci s obsahem polysacharidů, a proto ho lze s jistou opatrností použít k predikci těchto biopolymerních residuů v analyzovaných vzorcích HL a DOM.



Posledním fluorescenčním parametrem, který je definován jako plošný integrál přes celé emisní fluorescenční spektrum je tzv. Milori index, který je v odborných publikacích označován jako  $A_{440}$  [120]. Tento fluorescenční index je formulován jako totální integrál pod emisním spektrem v rozmezí vlnových délek 460–650 nm, které prakticky pokrývá celé viditelné spektrum Vis. Vlnová délka excitačního záření byla pro tento kvalitativní parametr zvolena na 440 nm, jež ve své podstatě odpovídá přechodu mezi fialovým a modrým světlem. Fluorescenční index  $A_{440}$  vyniká výbornými hodnotami koeficientu determinace s výše zmíněným parametrem HIX, a tudíž ho lze s výhodou použít k odhadu stupně aromaticity a humifikace HL a DOM.

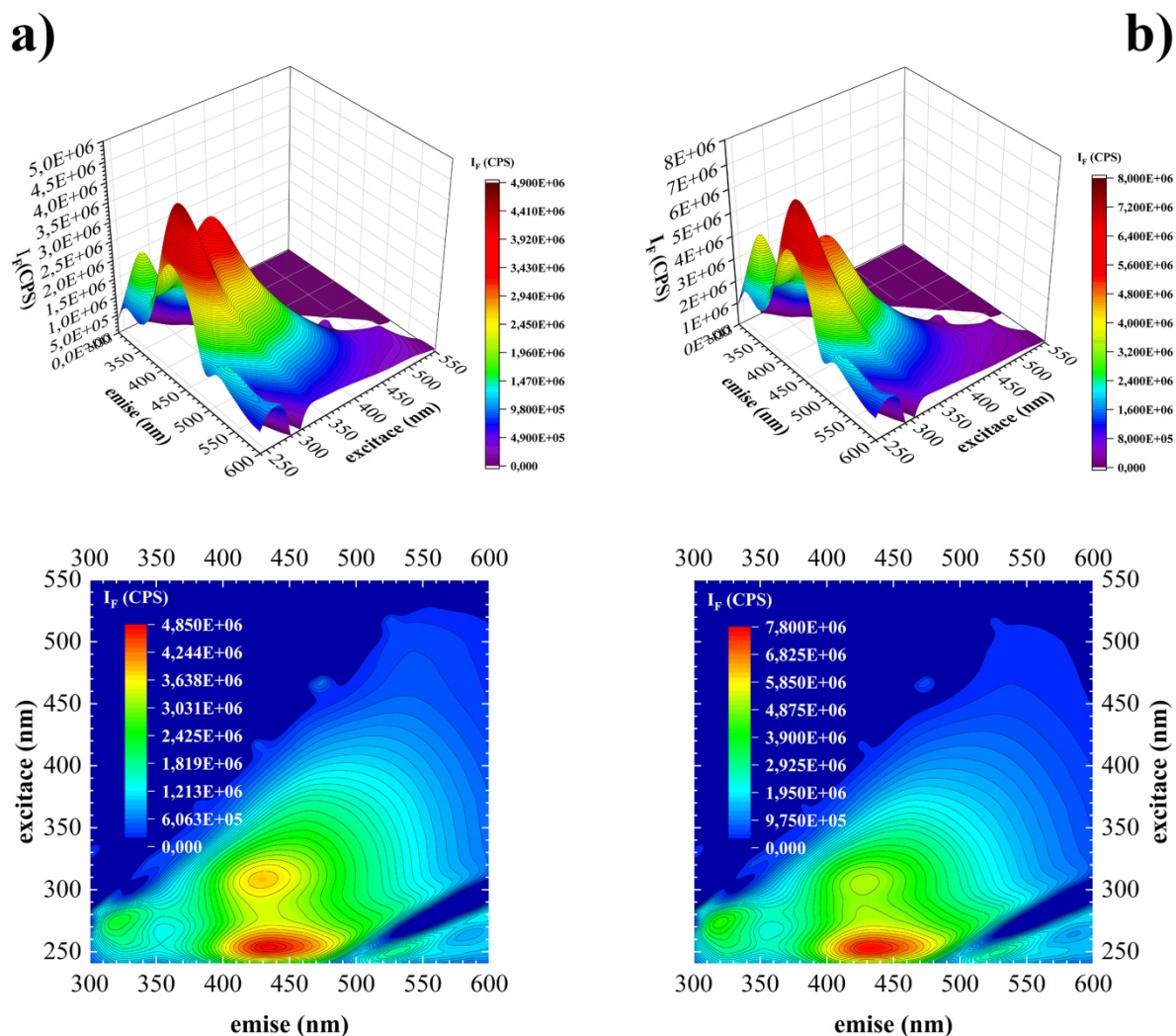
#### *Vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu HL a DOM*

Jak již bylo zmíněno v úvodní části této subkapitoly, vodné anebo organické roztoky HL a DOM se vyznačují velmi silnou absorpcí v tzv. krátkovlnné oblasti UVC, od které postupně klesá s charakteristickým kvaziexponenciálním průběhem. Výše zmíněný prudký pokles absorbance je zpravidla ukončen v oblasti zeleného světla, která je limitována rozsahem vlnových délek 500–565 nm. Od této hranice můžeme průběh Vis spektra považovat za lineární s poměrně nízkou hodnotou směrnice  $k_x$ .

Obecně můžeme říci, že zdánlivá intenzita fluorescence  $I_F$  závisí přednostně na optické hustotě vzorku a na použité geometrii mezi excitačním a emisním zářením, kdy nejběžnějším uspořádáním mezi těmito paprsky je pravý úhel a k emisi záření, tak dochází v centrální části kyvety. Je důležité si uvědomit, že intenzita fluorescence je úměrná koncentraci analyzovaného vzorku pouze v omezené míře rozsahu optických hustot. V případě pravoúhlého uspořádání tak dochází k tzv. vnitřnímu filtračnímu efektu resp. efektu vnitřnímu filtru. Vnitřní filtrační efekt můžeme rozdělit na dva zároveň působící fenomény, z nichž první je dán snížením intenzity budícího záření v centrální části kyvety, a naproti tomu druhý je spjat se snížením intenzity fluorescence re-absorpcí emitovaného záření. Je tedy zřejmé, že relativní vliv každého tohoto efektu závisí na optických hustotách analyzovaného vzorku při konkrétních vlnových délkách excitace a emise. Uvádí se, že naměřená intenzita fluorescence je přímo úměrná optické hustotě, jejíž velikost při konkrétních vlnových délkách excitačního a emisního záření nepřesáhne hodnotu 0,05. V opačném případě je nevyhnutelně nutné tyto vnitřní filtrační efekty prvního a druhého druhu korigovat pomocí nějakého vhodného matematického aparátu. Asi nejjednodušším korekčním modelem je matematický vztah navržený Lakowiczem [121]. Empiricky můžeme definovat následující korekční vztah následující rovnicí:

$$I_F(\text{corr.}) = I_F(\text{obs.}) \times 10^{\left(\frac{OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}}{2}\right)} \quad (3)$$

kde  $I_F(\text{corr.})$  je korigovaná intenzita fluorescence,  $I_F(\text{obs.})$  je naměřená intenzita fluorescence,  $OD_{\text{ex}}$  a  $OD_{\text{em}}$  jsou optické hustoty při příslušných vlnových délkách excitace a emise.



sledovaný parametr	nekorigovaný IFE <sup>1</sup>		korigovaný IFE <sup>1</sup>	
	( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ )	$I_F$ (CPS) $\times 10^6$	( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ )	$I_F$ (CPS) $\times 10^6$
fluorofor A ( $\acute{\alpha}$ )	255/425	4,86	250/435	7,68
fluorofor C ( $\alpha$ )	310/435	3,85	300/430	5,21
fluorofor B ( $\gamma$ )	315/275	2,54	320/275	4,51
<b>B (<math>\gamma</math>)/A (<math>\acute{\alpha}</math>)</b>		0,52		0,59
<b>C (<math>\alpha</math>)/A (<math>\acute{\alpha}</math>)</b>		0,79		0,67
<b>FI</b>		1,05		1,06
<b>BIX</b>		0,44		0,46
<b>HIX</b>		2,66		2,11
<b>Milori index</b>		8,40 $\times 10^7$		8,83 $\times 10^7$

<sup>1</sup>vnitřní filtrační efekt (inner filter effect)

Obrázek 14: Porovnání nekorigovaného a korigovaného EEM spektra vzorku půdní FK.

Na tomto místě si dovolím ilustrovat (viz. Obr. 14), jakých závažných pochybení bychom se dopustili v případě opomíjení tohoto efektu v případě studia HL a DOM pomocí fluorescenční spektrometrie. Je zřejmé, že v případě nekorigovaných EEM spekter bychom se dopustili již závažného pochybení z hlediska interpretace a lokalizace fluorescenčních domén, které vypovídají nejen o původu vzorku, ale jsou především



nositelkami dalších zajímavých informací, jako je míra substituce aromatických struktur elektron-donorními či elektron-akceptorními funkčními skupinami, heterogenita, aromaticita, střední molekulová hmotnost  $\overline{M}_w$ , dynamické vlastnosti související s jejich intermolekulárními a intramolekulárními interakcemi atd.

V případě výše zmíněných fluorescenčních koeficientů by se především jednalo o potlačení příspěvku tzv. ne-huminových fluoroforů, jejichž specifická fluorescence nastává v oblastech velmi krátkých vlnových délek excitace a emise, kde je pozorovaný vnitřní filtrační efekt nejmarkantnější. Jinými slovy by docházelo k nadhodnocení stupně aromaticity, střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_w$  a v neposlední řadě i příspěvku alochtonních konstituentů, které se spolupodílejí na celkové fluorescenci HL a DOM.

#### 5.2.4 $^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie

Nevídaný rozmach využití  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie v oblasti studia HL resp. DOM byl iniciován počátkem 80. let minulého století, kdy se do popředí dostávají instrumentální techniky s Fourierovou transformací (FT) [122]. V dnešní době je  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie považována za jistý standard v oblasti kvalitativního, ale i do jisté míry kvantitativního zhodnocení těchto unikátních biokoloidních látek. V případě  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie se nám nabízejí dvě cesty, jakými lze tyto přírodní sloučeniny analyzovat, a obvykle vycházejí ze skupenského stavu použitého vzorku. Je nadmíru jasné, že použití solid-state anebo liquid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie má své přednosti, ale i nevýhody, které jsou převážně determinovány povahou vzorku a do jisté míry i naší představou, co od naměřených spekter očekáváme za relevantní informace. Použití  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie v tzv. pevném stavu (solid-state) je preferováno v případě, kdy povaha analyzovaného vzorku nám neumožňuje jeho kvantitativní převedení do roztoku. Omezená rozpustnost HL je obvykle způsobena vyšším obsahem anorganických příměsí, který lze definovat jako nespalitelný podíl, jenž je ve struktuře HL adsorbován převážně reaktivními funkčními skupinami, kam zpravidla řadíme  $-\text{COOH}$  a fenolické  $-\text{OH}$  skupiny. Mimo jiné je tato metoda spíše použitelná pro rychlou a rutinní analýzu, jelikož naměřená  $^{13}\text{C}$  NMR data mají obvykle povahu pásového spektra bez zjevných lokálních maxim, které bychom mohli přiřadit příslušným typům uhlíku. Avšak jednou z hlavních výhod této techniky je minimalizace případných kvalitativních změn, ke kterým by mohlo docházet v průběhu rozpouštění vzorku. V této souvislosti máme především na mysli hydrolýzu či do jisté míry pravděpodobnou oxidaci, v případě, kdy je rozpuštěný vzorek HL před vlastním měřením skladován po delší dobu. Rovněž ani nelze vyloučit případnou mikrobiální degradaci anaerobními bakteriemi, jako jsou např. *Clostridium sporogenes*. Tyto gram-positivní bakterie se běžně vyskytují v terestriálních přírodních matricích, a tudíž mohou být sorbovány HL a DOM, které jsou dobrými zdroji organického uhlíku pro jejich metabolismus. Naproti tomu, liquid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie je podstatně náročnější na přístrojový čas, nicméně co se týče senzitivity a spektrálního rozlišení, tak tato instrumentální technika mnohonásobně převyšuje NMR spektrometrii v pevném stavu. Na tomto místě je nutné říci, že právě liquid-state (LS)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrii lze s výhodou využít k velmi podrobným kvalitativním analýzám, a to především z důvodu hyper-jemného rozlišení signálů, které mohou být následně připsány jednotlivým typům atomu uhlíku  $^{13}\text{C}$ .

Obvykle můžeme rozdělit  $^{13}\text{C}$  NMR spektra na čtyři základní oblasti, ve kterých nastává specifická absorpce jednotlivých stavebních jednotek HL a DOM, jako jsou alifatické řetězce, fragmenty polypeptidů, polysacharidů a v neposlední řadě i aromatických sloučenin převážně odvozených z ligninu. Specifická absorpce výše zmíněných konstituentů nastává v následujících oblastech chemických posunů: (i) oblast alifatických uhlíků (0–45 ppm); (ii) oblast O-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–106 ppm); (iii) oblast veškerých aromatických atomů uhlíku (106–165 ppm) a (iv) oblast karbonylových atomů uhlíku (165–210/220 ppm) [123]. Na tomto místě je nutné říci, že oblasti chemických posunů, které jsou připisovány veškerým aromatickým a karbonylovým uhlíkům, lze s jistotou dávkou experimentální obezřetnosti blíže specifikovat. Oblast chemického posunu aromatických uhlíků můžeme rozdělit na specifickou absorpci převážně alkoxy-substituovaných aromátů (106–145 ppm) a fenolických atomů uhlíku (145–165 ppm). Obdobným způsobem lze blíže specifikovat oblast karbonylových atomů uhlíků, a to tak, že v oblasti chemických posunů při 165–190 ppm nastává absorpce karboxylových funkčních skupin, zatímco oblast při 190–210/220 ppm je výhradně spjata s absorpcí karbonylu [9].

Velmi často lze v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech HL a DOM pozorovat specifické signály při 27, 31 a 40 ppm, které odpovídají absorpci methylenových funkčních skupin ( $-\text{CH}_2-$ ) [124, 125]. Bohužel, v případě těchto funkčních skupin nejsme schopni rozeznat, zda příslušné signály odpovídají čistě alifatickým strukturním jednotkám anebo aromatickým sloučeninám, které jsou těmito skupinami substituovány. Naproti tomu, signál lokalizovaný při 20 ppm je bez výjimky vždy připisován specifické absorpci methylových funkčních skupin ( $-\text{CH}_3$ ).

Pokud budeme blíže diferencovat oblast připadající O-alkylovým a peptidovým atomům uhlíku můžeme v ní najít zóny, které lze výlučně připsat buď residuálním složkám polysacharidů, jako je celulóza či hemi-celulóza, anebo polypeptidům, jež se mohou nacházet v různém stupni dekompozice. Jedná se především o oblast 60–90 ppm, ve které se nacházejí signály připadající  $-\text{OCH}_3$  substituovaným sacharidům v hemi-celulóze [126]. V této souvislosti přicházejí v úvahu i C-2, C-3 a C-5 atomy celulózy, případně  $-\text{CH}_2-$  skupiny vázané na aromatických jednotkách ligninu. Rovněž nelze ani opomenout příspěvek alifatických alkoholů, jejichž specifická absorpce nastává při hodnotách chemického posunu 62 a 80 ppm. Aminokyseliny resp. residua polypeptidů přispívají v této oblasti specifickými signály při 60, 61, 72 a 73 ppm.

Asi nejintenzivnější a co se týče do počtu signálů nejbohatší oblastí, je zóna odpovídající specifické absorpci aromatických a fenolických atomů uhlíku. V této spektrální oblasti lze až na některé výjimky nalézt poměrně intenzivní signály při hodnotách chemických posunů 115, 130 a 145–150 ppm. Signál lokalizovaný při 130 ppm odpovídá specifické absorpci kvarterních C-1 a aromatických CH uhlíků, pokud se nacházejí v ortho anebo para poloze vůči O-substituovaným aromatickým uhlíkům v 4-hydroxycinnamylové jednotce. Pokud jsou ve struktuře HL a DOM přítomny  $\beta$ -O-4 sinapylalkoholové a koniferylalkoholové resp. vanilylové jednotky, tak v jejich  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech lze pozorovat výrazné signály při 145 a 148 ppm. Až s jistým dogmatickým aspektem je v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech HL a některých vzorků DOM přítomen variabilně intenzivní signál při 150 ppm, který je výlučně připisován specifické absorpci O-substituovaným aromatickým uhlíkům, jež ve své podstatě odpovídají fenolickým C-

atomům. Pokud jsou analyzovány HL resp. DOM výlučně pocházející z dekompozice dřevní hmoty listnatých stromů, tak v jejich NMR spektrech nalézáme signál při 105 ppm, který lze připsat C-2 a C-6 atomům pocházejících z sinapylových jednotek ligninu [127]. V tuto chvíli je nadmíru jasné, že tyto signály lze s jistou výhodou použít jako markery OM, jež v průběhu geneze těchto biokoloidních látek převládala.

Jak již bylo v této práci několikrát zmíněno, tak za mimořádnou reaktivitu HL resp. DOM jsou primárně zodpovědné karboxylové funkční skupiny, které se mohou ve strukturách těchto biokoloidních látek nacházet jako alifatické či aromatické karboxylové kyseliny. Tyto funkční skupiny se v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech vyskytují v podobě intenzivně variabilních signálů, a to v celé příslušné oblasti tzn. 165–190 ppm. Nicméně, lze vyzkoušet, že maximum absorpce nastává v oblasti chemických posunů 170–175 ppm [128]. Na tomto místě je nutné podotknout, že určitá část karboxylových funkčních skupin je vázána na přítomnost uronové kyseliny pocházející z hemi-celulózy anebo aminokyselin.

V oblasti chemických posunů 190–210/220 se nacházejí méně intenzivní signály karbonylu, jež je součástí rozličných funkčních skupin a strukturálních jednotek. V této souvislosti přicházejí v úvahu např. estery, ketony, chinony atd.

Ke studiu kvalitativních vlastností HL a DOM lze s výhodou použít tzv. strukturální parametry, které jsou obvykle definovány jako poměry příslušných integrálních oblastí při vhodně zvolených rozmezech chemických posunů. Bezesporu, jednou z hlavních výhod této instrumentální techniky je její vysoká selektivita, kdy jsme schopni jednoznačně přiřadit jednotlivé funkční skupiny anebo stavební jednotky k příslušným absorpčním signálům. Jinými slovy, v případě  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie nepozorujeme některé negativní vlivy, které by následně ztěžovaly interpretaci naměřených spekter, jako jsou např. široké a překrývající se absorpční signály, méně výrazná ramena atd.

V současnosti je asi nejpoužívanějším strukturálním parametrem odrážejícím kvalitativní vlastnosti HL a DOM tzv. aromaticita resp. stupeň aromaticity. Obecně můžeme tento strukturální parametr definovat jako poměr aromatických uhlíků, jejichž specifická absorpce nastává v oblasti chemického posunu při 106–165 ppm ke všem atomům uhlíku, které jsou přítomny v celém rozsahu  $^{13}\text{C}$  NMR spektra tzn. 0–210/220 ppm. Avšak je na tomto místě nutné zmínit, že v definici tohoto strukturálního parametru panuje celá řada modifikací a variant. Například, někteří autoři [129–132] definují aromaticitu ( $f_a$ ) jako podíl součtu aromatických a fenolických atomů uhlíku ke všem atomům, vyjma karboxylových a karbonylových funkčních skupin. Nepřítomnost karboxylových a karbonylových atomů uhlíku ve vzorci je odůvodněna tím, že v tomto případě nejsme schopni přesně rozhodnout, zda absorpční signály pocházejí z aromatických anebo alifatických struktur. Do značné míry jsou další modifikace tohoto kvalitativního parametru způsobeny nejednotností v rozsahu integračních mezí, kterými jsou determinovány příslušné typy atomů uhlíku.

Obecně jsou HL resp. HK považovány za velmi reaktivní biokoloidní sloučeniny, které hrají nezastupitelnou úlohu v rozličných přírodních ekosystémech. V této souvislosti byl definován tzv. index biologické aktivity BiA, jenž lze vyjádřit jako poměr obsahu biologicky účinných atomů uhlíku (tzn. aromatických a –COOH) k atomům biologicky inaktivním (tzn. alifatickým a O-alkylovým). Z hlediska studia konformačních změn

v roztoku HL a DOM byl navržen tzv. index hydrofobnosti resp. hydrofilnosti ( $H_{fi}/H_{fo}$ ). V tomto kontextu je očividné, že alifatické (0–45 ppm) a aromatické (106–165 ppm) atomy uhlíku tvoří tzv. hydrofobní část supramolekulární struktury HL, zatímco O-/N-alkylové (45–106 ppm) spolu s karboxylovými a karbonylovými atomy (165–230) spoluvytvářejí tzv. hydrofilní část, jež má snahu se orientovat vně vodného roztoku. Výše zmíněný strukturní parametr se obecně vyjadřuje v procentech a ve své podstatě odráží převažující hydrofobnost či hydrofilnost analyzovaných HL.

### 5.2.5 Analýza hlavních komponent (PCA) vs. shluková analýza (CA)

V některých situacích studia HL a DOM se můžeme ocitnout před jistým dilematem, jak co nejpřesněji analyzovat a diskutovat poměrně rozsáhlé soubory dat, které jsou generovány buď rozsáhlým počtem analyzovaných vzorků anebo použitím celé řady instrumentálních technik. Jinými slovy, použitím kvalitativních instrumentálních technik je v zásadě spojeno se získáním tzv. multidimenzionálních dat, v důsledku čehož je využití jednorozměrné statistiky z velké části omezeno. V této souvislosti přicházejí v úvahu pouze testy statistických hypotéz, jež se týkají predikce významnosti mezi dvěma skupinami vzorků. Za tímto účelem lze využít tzv. (ne)-parametrické testy, jako jsou analýza rozptylu (t-test) nebo testy pocházející z normálního rozdělení (H-test resp. jednofaktorová neparametrická ANOVA) [133].

Jak již bylo zmíněno výše, pro tak rozsáhlé datové soubory, které jsou nositeli komplexních informací týkajících se původu, heterogenity, stupně humifikace resp. aromaticity, obsahu jednotlivých strukturních komponent, typických funkčních skupin atd. jsou především využitelné tzv. multidimenzionální statistické postupy. Jejich aplikační potenciál vyplývá z úlohy systematizace dat, nalezení případných trendů či vyšších struktur, a v neposlední řadě příčinných souvislostí. Jak je patrné z názvu této subkapitoly, tak výše zmíněné statistické postupy lze rozdělit na dvě skupiny, a to na tzv. nekontrolované, kam zpravidla řadíme analýzu hlavních komponent a metody shlukové analýzy. Naproti tomu, do skupiny tzv. kontrolovaných resp. „supervised procedures“ řadíme především takové statistické postupy, které berou v potaz jak X matici (naměřená data), tak Y matici tzv. prediktorů, jež jsou v podstatě předem známé informace.

První skupinu multidimenzionálních statistických postupů lze co nejjednodušeji popsat, tak že, jednou z hlavních úloh je tzv. redukce dimenzí dat anebo snaha o nalezení jistých podobností při zachování předem definované vzdálenosti v multidimenzionálním prostoru. V této souvislosti je typickým statistickým aparátem, který redukuje dimenze dat tzv. analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA). V podstatě se jedná o transformaci původních resp. experimentálních dat do nové dvojrozměrné anebo trojrozměrné soustavy s významně malým počtem proměnných. Tyto proměnné jsou v podstatě právě výše zmíněnými hlavními komponenty PC1, PC2 atd. V této souvislosti musíme mít na paměti, že hlavní komponenty jsou dále nositeli rozsáhlého množství původní variability, avšak bez vzájemné korelace, a proto poskytují nezávislé informace o analyzovaném souboru dat. Grafickou projekcí pro analýzu PCA jsou tzv. rozptylové diagramy komponentních skóre, které zobrazují průmět analyzovaných vzorků do roviny zvolených hlavních komponent. Dále bývají tyto diagramy doplněny o informace tzv. komponentních zátěží, jež jsou nositelkami vztahů původních



proměnných k novým hlavním komponentům. Avšak obvykle se setkáváme s grafickým znázorněním obou statistických kritérií v jednom diagramu (viz. Obr. 15a), který je všeobecně znám jako bi-plot. Jako vhodný příklad využití analýzy hlavních komponent je na Obr. 15a uveden bi-plot diagram, který ilustruje strukturní diference mezi HL pocházejícími z rozličných přírodních matric a ekosystémů. K vizualizaci bi-plotu byly použity experimentální data de-konvoluce FTIR absorpčních pásů při  $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$  a  $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ , které nesou mnoho zajímavých informací, jenž jsou v nativních FTIR spektrech ztraceny v podobě širokých a překrývajících se absorpčních pásů. Jak vyplývá z uvedeného Obr. 15a, tak počáteční počet proměnných byl PC analýzou snížen na dvě hlavní komponenty, jejichž hodnoty byly větší jak jedna. Výše zmíněné komponenty tvořily přibližně 60 % variability původního souboru dat, přičemž 32,8 % připadá na první složku (PC1), zatímco druhá komponenta (PC2) se vyznačuje zbylými 26,7 %. Nejvyšší pozitivní zatížení na sledovaném parametru PC1 bylo zjištěno v případě obsahu karboxylových funkčních skupin, jimiž jsou substituovány aromatické jednotky analyzovaných HL. Naproti tomu si nelze nepovšimnout skutečnosti, že v případě alifatických karboxylových kyselin byl pozorovaný trend opačný. Jinými slovy, tyto funkční skupiny se v příslušném diagramu vyznačovaly nejvyšší hodnotou negativního zatížení PC1. V levých kvadrantech jsou projektovány parametry, které jsou v přímé souvislosti s obsahem  $\delta$ -laktonů tj. cyklických esterů (ne)-nasycených karboxylových kyselin, alifatických kyselin a bílkovinných či peptidových residuí. Pravostranné kvadranty převážně odpovídají obsahu aromatických konstitučních jednotek a veškerým esterům, jako jsou alkyl- a aryl-estery. Obecně můžeme říci, že hlavní složka PC1 nám poskytuje jasnou separaci mezi HL autochtonního či alochtonního původu, avšak v případě některých vzorků je očividně jasné, že v průběhu jejich geneze se uplatňovaly oba dva mechanismy, a to s variabilní mírou jednotlivých příspěvků z nich vyplývajících. Je nadmíru jasné, že autochtonní HL se vyznačují především méně typickými stavebními jednotkami, jako jsou bílkovinné či peptidické residuální sloučeniny, cyklické estery tj. základní bloky tzv. polyketidů a strukturně jednoduchými alifatickými kyselinami. Na druhé straně, alochtonní HL jsou tvořeny typickými stavebními kameny, jež jsou odvozeny od biopolymerních sloučenin, jako je např. lignin, celulóza, detrity atd. Druhá hlavní složka (PC2) poskytuje další separaci HL, a to zejména podle kvantitativního zastoupení aryl-esterů,  $\delta$ -laktonů a bílkovinných residuí přítomných v jejich strukturách. Z uvedeného diagramu je vidět, že některé HL např. FK pocházející z *leonarditu* se promítají téměř na nulovou hodnotu PC2. Naproti tomu se některé vzorky HK významně oddělí od ostatních, a to díky podstatně vyššímu obsahu residuálních polypeptidů (A55HK) anebo specifickou methylací reaktivních funkčních skupin  $-\text{COOH}$  a fenolických  $-\text{OH}$  (mLEOHK).

Jak již bylo zmíněno výše, dalším vhodným postupem analýzy multidimenzionálních dat je statistická metoda, jež je všeobecně známa jako tzv. shluková analýza (Cluster Analysis, CA). Jednoduše řečeno, touto statistickou metodou jsou vyhledávány podobnosti mezi jednotlivými subjekty anebo proměnnými na základě jejich definované vzdálenosti v multidimenzionálním prostoru, který si pro zjednodušení můžeme představit jako PCA diagram se zakreslenými analyzovanými objekty resp. vzorky. Obecně na podobu a zakreslení jednotlivých klastrů v PCA diagramu anebo jejich vizualizaci v podobě tzv. dendrogramů mají především zásadní vliv dva parametry, a to metrika vzdálenosti a metoda shlukování. Parametr označovaný jako metrika





nabízí otázka, zda by nebylo možné tyto multidimenzionální statistické metody využít jako vhodný aparát např. k predikci původu půdních kondicionérů na bázi lignohumátů.

## 6 INTERMEZZO II

**A** si bychom nenašli odborný článek, ve kterém by autoři zabývající se studiem HL nepoužili k základní charakterizaci těchto biokoloidních sloučenin jednu z metod termální analýzy, kam zpravidla řadíme instrumentální techniky, jako jsou termogravimetrie (TG), diferenční termická analýza (DTA), diferenčně kompenzační kalorimetrie (DSC) a v neposlední řadě i elementární analýza (EA – CHNS/O). I když by se na první pohled mohlo zdát, že tyto techniky nám poskytují pouze základní informace o analyzovaných vzorcích, tak by to v konečném důsledku nebyla pravda. Například, pokud jsou námi výsledky elementárního složení resp. atomových poměrů H/C a O/C projektovány do tzv. *van Krevelenova diagramu*, tak jsme schopni následné predikce, z některých dalších kvalitativních vlastností HL, jako je hydrogenace/dehydrogenace, oxidace/redukce, methylace/demethylace, kondenzace atd. Je třeba si uvědomit, že ve van Krevelenově projekci se stávají výsledky elementární analýzy více srozumitelnými, a také jsme si schopni lépe povšimnout z některých méně zjevných diferencí, jako by tomu bylo v případě prosté sumarizace ve formě tabulek. O velmi dobré senzitivě van Krevelenova diagramu svědčí i fakt, že v případě použití multikomponentální analýzy (PCA) zahrnující nejen výsledky EA, ale i ostatních instrumentálních technik jsou jednotlivé pozice analyzovaných vzorků v obou případech dosti podobné, ba zcela totožné<sup>35</sup>. Ve většině odborných publikací zabývajících se studiem HL a DOM se stále setkáváme s tím, že elementární složení těchto biokoloidních sloučenin je uvedeno v hmotnostních procentech (hm. %). V této souvislosti si dovoluji připomenout, že v případě, kdy je elementární složení uvedeno v tradičních hm. %, tak se dopouštíme očividného „numerického“ znevýhodnění vodíku v důsledku jeho nejnižší relativní atomové hmotnosti. Jinými slovy, i když je tento prvek zastoupen v majoritním počtu, tak z důvodu jeho nízké atomové hmotnosti nabývá obvykle srovnatelných hodnot hm. % s biogenními prvky, které jsou co do počtu ve struktuře HL zastoupeny nejméně. V tomto případě máme zejména na mysli dusík anebo síru, jež jsou specifickými prvky odkazující se na stavební jednotky, jako jsou fragmenty polypeptidů, organo-síranů (primárně R–O–SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sirných aminokyselin rostlinného anebo mikrobiálního původu atd.

Termogravimetrická analýza (TG/DTG) nám poskytuje nejen informace o sorbované vlhkosti a obsahu nespalitelného podílu tj. popela, na základě kterých může být snadno dopočítán obsah kyslíku v těchto biokoloidních sloučeninách, ale co je důležitější, tak jsme schopni bližšího porozumění, které vyplývá z jejich unikátní struktury, stability a v neposlední řadě i schopnosti interagovat s rozličnými anorganickými či organickými xenobiotiky. Mimo jiné, se tato instrumentální technika stala nepostradatelnou v oblastech studia dekompozice organické hmoty, a také i geneze HL. Jako vhodný příklad lze na tomto místě uvést vznik HL v průběhu *vermikompostování* koňského hnoje<sup>30</sup>. V první řadě je nutné říci, že kompostování za použití kalifornských žížal (*Eisenia andrei*) vede ke vzniku HK, které se svým termálním chováním blíží půdním HL resp. HK. Tento fakt lze spatřit v průběhu DTG křivky, kdy HK izolované z přírodních kompostů se vyznačují pouze dvěma vrcholy lokalizovanými v teplotním rozsahu 200–

600 °C. Informace, které jsme schopni vyčíst z průběhu DTG křivek lze pro jednoduchost rozdělit do dvou kategorií, a to: (i) klasifikace a stabilita přítomných frakcí HK; (ii) sledování kvalitativních změn (geneze resp. „stárí“ HK × stabilita). Na základě tvaru a průběhu můžeme DTG křivky HK rozdělit na tři základní oblasti, které jsou determinovány následujícími teplotními intervaly: stupeň I (200–300 °C); stupeň II (300–390 °C) a stupeň III (400–500 °C). Již po pěti týdnech vermikompostování dochází k eliminaci vrcholů, které se nacházely v prvním a třetím teplotním intervalu. První teplotní interval je pravděpodobně spjat s organickými sloučeninami, jako jsou polysacharidy a polypeptidy. Nicméně, v tomto teplotním rozsahu dochází i ke ztrátě hydroxylových funkčních skupin alifatických sloučenin, a také k dekarboxylaci organických kyselin. Teplotní interval, který je zde označen jako stupeň III, je výhradně spojen s přítomností aromatických biopolymerů, kdy v tomto případě máme především na mysli doposud nedegradovaný lignin. Jelikož tato biomakromolekulární sloučenina bývá často považována za dosti perzistentní, tak je zajímavým zjištěním, že k její dekompozici dochází, tak v krátkém čase tzn. do pěti týdnů od začátku vermikompostování. Rychlá dekompozice ligninu je pravděpodobně způsobena silnou aktivitou kalifornských žížal, jejichž hmotnostní koncentrace byla v této vrstvě kompostu nejvyšší tj.  $157 \pm 21 \text{ g Eisenia andrei / kg}_{\text{kompostu}}$ . Druhý teplotní interval, který je vymezen rozsahem 300–390 °C je pravděpodobně spjat s teplotní degradací C–C vazeb alifatických struktur anebo polysacharidů, jako je celulóza, hemicelulóza, atd. Nicméně si nelze nepovšimnout, že teplotní stabilita tohoto vrcholu se v průběhu vermikompostování zvyšovala. Toto zjištění nabývá na pravdě, pokud si vypočteme vzdálenost tohoto teplotního posunu, který v tomto konkrétním případě činil  $\sim 30$  °C. Přímoú spojitost mezi zvýšením stability HK a časem vermikompostování lze nalézt v genezi nových organických sloučenin, které jsou označovány jako fluorescenční domény C ( $\alpha$ ) – humic-like. Z kvalitativního hlediska se jedná o polyaromatické sloučeniny, jejichž základní skelet je tvořen třemi a více aromatickými kruhy s různou variabilitou v substituci jejich jader funkčními skupinami, jako jsou C=O, –OH, –OR, R–CO–NH<sub>2</sub> anebo R<sub>1</sub>–CO–NH–R<sub>2</sub>.

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) zaujímá v oblasti studia HL a DOM jednu z předních příček, která je především dána její experimentální nenáročností, rychlostí atp. Ke kvalitativnímu zhodnocení těchto biokoloidních sloučenin byly navrženy tzv. absorpční koeficienty, které jsou až na některé výjimky definovány jako podíly či rozdíly absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Tyto absorpční indexy resp. hodnoty specifických absorbancí můžeme rozdělit do následujících skupin, a to: (i) ty, které se výhradně opírají o zákonitosti kvantové fyziky resp. chemie; (ii) a ty, jejichž vypovídající hodnota byla determinována na základě korelací s jinými instrumentálními technikami, jako je vysokotlaká velikostně vylučovací chromatografie (HPSEC); osmometrie, viskozimetrie, techniky <sup>13</sup>C NMR spektrometrie apod. Pod zorným úhlem jisté exaktnosti se druhá skupina těchto koeficientů může jevit poněkud fyzikálně-chemicky mystickou. Naproti tomu, u absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí  $E_{ET}/E_{Bz}$ ,  $E_2/E_3$ ,  $SUVA_{254}$  a  $SUVA_{280}$  je mechanismus elektronových přechodů velmi dobře znám, a tudíž se tyto UV indexy mohou odkazovat na takové kvalitativní vlastnosti, kterými je daná absorpce přímo indukována.

Naše dosavadní studie naznačují<sup>29, 30, 34, 35, 41</sup>, že absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{Bz}$  je schopen velmi dobře ilustrovat míru substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami, ať už máme na mysli HL nejrůznějšího původu (kaustobiolity, půdy, komposty atp.), organické extrakty, vodné výluhy DOC aj. Na tomto místě je však nutné zmínit, že hodnota absorpčního koeficientu  $E_{ET}/E_{Bz}$  může být nepříznivě ovlivněna přítomností  $NO_3^-$  iontů v roztoku, a proto doporučujeme použití ekvivalentního indexu, který je definován jako poměr absorbance při  $A_{220}$  ( $E_{Bz}$ ) a  $A_{253}$  ( $E_{ET}$ ). Při vyšší vlnové délce benzoidního pásu je absorpce dusičnanového anionu eliminována co v největší možné míře.

Asi nejvíce používaným kvalitativním kritériem je tzv. *aromaticita*, která je často vypočtena z  $^{13}C$  NMR spekter. Jelikož nukleární magnetická resonance izotopu uhlíku  $^{13}C$  patří mezi citlivé, avšak velmi drahé instrumentální techniky, tak byla iniciována snaha o nalezení strukturního parametru, který by byl výhradně indikátorem aromaticity HL a DOM, a zároveň aby jeho získání nebylo limitováno cenovou náročností experimentálního přístupu. V této souvislosti byly navrženy tzv. *specifické hodnoty absorbancí* (SUVA). Tyto specifické koeficienty jsou definovány jako hodnoty absorbancí při vlnových délkách, které výhradně odpovídají elektronovým přechodům dvojných vazeb tzn.  $\pi \rightarrow \pi^*$  konjugovaných systémů. Abychom získali specifické indexy SUVA, tak je zapotřebí naměřené hodnoty absorbance korigovat, a to na koncentraci rozpuštěného organického uhlíku DOC v analyzovaném vzorku. Korekční vztah pro výpočet SUVA je definován rovnicí:

$$SUVA_{\lambda} \left( \frac{\text{dm}^3}{\text{mg} \times \text{m}} \right) = \frac{UV_{\lambda} (\text{cm}^{-1})}{DOC \left( \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} \right)} \times 100 \left( \frac{\text{cm}}{\text{m}} \right) \quad (4)$$

kde,  $UV_{\lambda}$  je absorbance při vlnové délce  $\lambda$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) a DOC je koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ( $\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$ ).

Specifická hodnota absorbance  $SUVA_{254}$  byla použita k odhadu aromaticity vodnou extrahovatelných organických frakcí z jihomoravského lignitu (JML)<sup>34</sup>. Jak hodnoty tohoto koeficientu dokládají, tak již v počátku loužení organické hmoty lignitu dochází k extrakci aromatických sloučenin, které byly identifikovány jako fulvic-like. Prvotní organická frakce se vyznačovala o něco nižší aromaticitou v porovnání s ostatními výluhy, které byly odebírány v následujících týdenních intervalech. Naproti tomu, hodnoty specifické absorbance  $SUVA_{254}$  se u následujících organických frakcí měnily jen velmi málo, a proto můžeme konstatovat, že v dlouhodobém časovém horizontu jsou z jihomoravského lignitu extrahovány kvalitativně podobné aromatické sloučeniny. Mimo jiné je nutné zmínit, že tyto specifické hodnoty absorbance jsou srovnatelné ba dokonce totožné s koeficienty, které jsou typické pro FK.

Rovněž se tento koeficient ukázal jako nepostradatelný „pomocník“ při kvalitativní analýze organických frakcí (TCM1–MET6), které byly získány metodou sekvenční frakcionace HK, a to na základě rozdílné polaritativy použitých organických rozpouštědel<sup>35</sup>. Jelikož se jednalo o originální metodu, která doposud nebyla k frakcionaci HL použita, tak se do poslední chvíle nevědělo, jaké extrakční výtěžky můžeme očekávat. Prvotní idea této studie byla následující, všechny organické frakce tzn. TCM1–MET6 podrobit

<sup>41</sup> Doskočil, L.; Burdíková-Szewieczková, J.; Enev, V.; Kalina, L.; Wasserbauer, J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*, **2018**, *213*, 123–132.

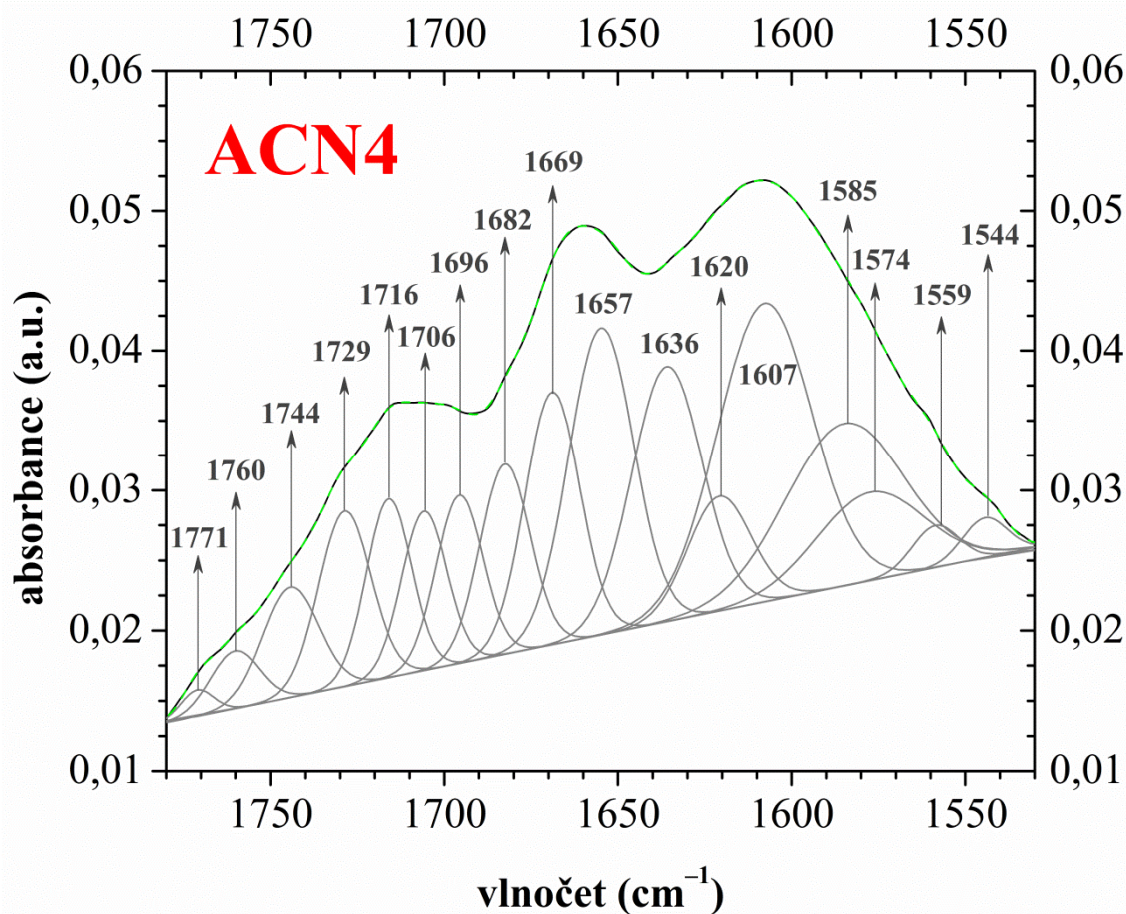


sofistikované kvalitativní analýze pomocí liquid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie. Tato instrumentální technika měla sloužit nejen k identifikaci jednotlivých absorpčních pásů při charakteristických hodnotách chemických posunů (ppm), ale také k signifikantní determinaci aromaticity ( $f_a$ ). V případě organických frakcí EAC a ACN se nám nedostávalo potřebného množství k provedení  $^{13}\text{C}$  NMR analýzy, a proto byla k odhadu aromaticity celého souboru vzorků použita UV/Vis spektrometrie resp. její hodnota specifické absorbance  $\text{SUVA}_{254}$ . Ukázalo se, že tento strukturní parametr je vhodný nejen v případě kvalitativního zhodnocení HK, ale také může hrát významnou roli v odhadu aromaticity organických frakcí těchto biokoloidních sloučenin. Abychom získali ucelenou představu o kvalitativní robustnosti tohoto strukturního parametru, lze jako vhodný příklad uvést situaci, kdy byl tento koeficient využit k determinaci aromaticity organických frakcí získaných sekvenční frakcionací rašeliništní HK. Frakce extrahované acetonem a silně polárními organickými rozpouštědly, jako je *n*-propanol a methanol, se vykazovaly blízkými hodnotami  $\text{SUVA}_{254}$ , které odpovídaly původní HK. Jinými slovy, výše zmíněné organické sloučeniny tzn. původní (mateřská) HK a organické frakce ACE3, PRO5 a v neposlední řadě i MET6 se vyznačovaly obdobnou aromaticitou a střední molekulovou hmotností  $\overline{M}_w$ . Naproti tomu, organická frakce extrahovaná acetonitrilem (ACN4) byla charakterizována znatelně nižší hodnotou specifické absorpce  $\text{SUVA}_{254}$  v porovnání s více či méně polárními frakcemi tzn. ACE3 a PRO5. Z logiky věci vyplývá, že acetonitril je specifické rozpouštědlo, které je schopno extrahovat z HK takové organické sloučeniny, které se svými kvalitativními vlastnostmi vymykají od ostatních, jak jsme to viděli v případě použití silně nepolárních rozpouštědel. Infračervená spektrometrie resp. *metoda dekonvoluce absorpčních pásů* přispěla ke kvalitativní identifikaci výše zmíněné organické frakce ACN4. Jelikož tato frakce se vykazovala nejen nízkou aromaticitou, ale i nejvyšší hodnotou atomového poměru N/C, která byla podpořena přítomností absorpčních pásů odpovídajících sekundárním amidům, je tedy logickým vyústěním připsat tuto frakci tzv. *protein-like* strukturním jednotkám HK.

V tuto chvíli se v krátkosti dotkneme problematiky, která je přednostně spjata se ztrátou kvalitativních informací v důsledku širokých a překrývajících se absorpčních pásů, jež mohou být pozorovány v infračervených spektrech HL a DOM. Tento problém lze s jistou dávkou experimentální opatrnosti vyřešit pomocí tzv. Fourierovy autodekonvoluce (FSD) anebo Gauss-Lorentzovy spojité funkce. Přednost první metody vyplývá z její uživatelské nenáročnosti, kdy pro separaci jednotlivých absorpčních pásů nám postačí znát pološířku dekonvoluované oblasti (FWHH), případně vstupní data mohou být doplněna o odhad počtu překrývajících se pásů. Nicméně je zapotřebí říci, že separované absorpční pásy resp. jejich plochy pod křivkou v žádném případě neodpovídají relativnímu zastoupení jednotlivých funkčních skupin anebo strukturních jednotek v analyzovaném vzorku, a tudíž ji nelze použít ke kvantitativní analýze. Naproti tomu, Gaussova a Lorentzova (Cauchyho) profilová funkce v sobě ukrývá i kvantitativní informace o analyzovaných vzorcích, které jsou v tomto případě reprezentovány procentuálním vyjádřením jednotlivých ploch pod křivkami separovaných pásů. V infračervených spektrech HL resp. DOM můžeme nalézt celou řadu oblastí, ve kterých dochází k silnému překryvu jednotlivých absorpčních pásů, a tudíž mají podobu velmi širokých pásů s více či méně výraznými raménky. Jedná se především o absorpční pásy, jejichž specifická absorpce je dána vlnočty  $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1230\text{ cm}^{-1}$ ,

a  $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ . V důsledku velmi silného překryvu je v těchto absorpčních pásech ztraceno mnoho užitečných informací vypovídajících o jejich struktuře.

Tato problematika může být velmi pěkně ilustrována na příkladu infračerveného spektra organické frakce, jež byla extrahována z rašeliništní HK pomocí acetonitrilu (viz. Obrázek I-2). Ve spektrální oblasti ( $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ) původního infračerveného spektra byly lokalizovány tři absorpční pásy, které jevíly známky silně se překrývajících absorpčních pásů. Na základě jejich pozice v FTIR spektru byly tyto absorpční pásy identifikovány, a to následujícím způsobem: (i) méně výrazný absorpční pás lokalizovaný při  $1710\text{ cm}^{-1}$  je výhradně připisován valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách; (ii) ostrý a intenzivní absorpční pás při  $1660\text{ cm}^{-1}$  může být připsán buď valenční symetrické vibraci C=O vazeb v sekundárních amidech anebo stejným vibračním módům pocházejících z chinonů; (iii) široký pás lokalizovaný při  $1610\text{ cm}^{-1}$  nelze přičítat jiným strukturám nežli aromátům. Jelikož organická frakce ACN4 se vyznačovala takovými indiciemi, které napovídaly, že jejími základními stavebními jednotkami by mohly být sloučeniny podobné proteinům resp. bílkovinným residuům, tak tuto hypotézu bylo nutné potvrdit nevyvratitelnými důkazy. Za tímto účelem byla použita spojitá Gauss-Lorentzova profilová funkce, jež primárně vedla k separaci překrývajících se absorpčních pásů.



Obrázek I-2: Dekonvoluce absorpčních pásů vzorku organické frakce ACN4 extrahované z rašeliništní HK.

Touto metodou byly separovány nejen absorpční pásy, které lze připsat  $\delta$ -laktonům, alky- a aryl-esterům či karboxylovým kyselinám, aromátům a sorbované vlhkosti, ale co je důležitější, tak v tomto dekonvoluovaném spektru byly identifikovány pásy při  $1682\text{ cm}^{-1}$ ,  $1669\text{ cm}^{-1}$ ,  $1657\text{ cm}^{-1}$ ,  $1574\text{ cm}^{-1}$ ,  $1559\text{ cm}^{-1}$  a  $1544\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídají valenční symetrické vibraci C=O a deformační vibraci N-H a C-N vazeb v sekundárních amidech tzn. -NH-CO-. Jinými slovy, bez jakýchkoliv pochybností se na základě dekonvoluce FTIR spektra potvrdilo, že organická frakce ACN4 je tvořena mimo jiné i bílkovinnými residui.

V závěrečné části tohoto intermezza by bylo vhodné ještě zmínit problematiku týkající se fluorescenční spektrometrie HL a DOM. Fluorescenční spektrometrie a její metody poskytují mnoho cenných informací o kvalitativních vlastnostech HL resp. DOM. Využití této selektivní techniky je především dáno tím, že tyto biokoloidní sloučeniny jsou tvořeny konjugovanými systémy dvojných vazeb, které jsou přednostně vázány na přítomnost jakkoliv substituovaných aromatických struktur. V tuto chvíli je nadmíru jasné, že těmito strukturálními vlastnostmi jsou předurčeny k tomu, aby mohla u nich po absorpci světla proběhnout zářivá de-excitace resp. *fluorescence*. V tomto případě je pojem *fluorescence* méně přesným až zavádějícím, jelikož je tento termín přednostně spjat s takovými systémy, které nejsou schopny emitovat záření, avšak pro jejich fyzikálně-chemické studium je k nim přidána sloučenina tzv. *fluorescenční sonda*, jež je sama o sobě schopna záření emitovat. V případě HL a DOM bychom měli spíše mluvit o schopnosti jejich *autofluorescence*. Fluorofory resp. fluorescenční domény mohou být rozděleny do dvou základních skupin, a to na (i) *fulvic- a humic-like*, které jsou přednostně spjaty se stavebními jednotkami spoluvytvářejících rodinu HL. Nicméně je zapotřebí zmínit i případy, jako je DOC přírodních vod, jejichž fluorescenční domény jsou terminologicky v přímé souvislosti s těmi, které eminentně odpovídají izolovaným HK a FK, avšak spektrální znaky DOC je mohou pouze připomínat; (ii) naproti tomu, *protein-like* anebo terminologicky komplikovanější dedikce *soluble microbial by-product-like* primárně odkazují na ty fluorescenční domény, jež jsou produkty mikrobiální činnosti v přírodních ekosystémech. Jak již bylo uvedeno výše (tzn. subkapitola 4.2.3), tak tyto ostře ohraničené pozice fluorescenčních domén umožňují selektivní, avšak citlivé rozlišení jednotlivých příspěvků, které spoluvytvářejí tyto obdivuhodné organické sloučeniny, ať už máme na mysli HL, DOM anebo DOC. V nekomplikované řeči bychom mohli konstatovat, že přítomnost fluorescenčních domén a jejich specifická pozice v EEM spektrech je odrazem nejen původu, ale i různé fáze *humifikace* či *diageneze*.

V případě HK izolovaných z lignitů různé geologické proveniencie lze fluorescenční EEM spektra použít jako vhodný nástroj k získání jejich spektrálních charakteristik, které jak se ukázalo, mají povahu otisku prstu (*fingerprintu*). Přestože HK byly izolovány z lignitů pocházejících z různých evropských pánví, tak se jejich EEM spektra vyznačovala pouze jednou fluorescenční doménou, která byla na základě své pozice klasifikována, jako fluorofor A ( $\alpha$ ) - *fulvic-like*. Tato fluorescenční doména byla lokalizována v oblasti vlnových délek excitace a emise při 255–265/460–510 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Jak již bylo zmíněno výše, tak pomocí rozdílů v přesné lokalizaci fluorescenčního maxima a odpovídající intenzitě fluorescence lze objasnit některé kvalitativní vlastnosti, jimiž se dané strukturální jednotky HK vyznačují. V tomto



konkrétním případě si nelze nepovšimnout, že při téměř shodných vlnových délkách excitace se některé maxima fluoroforu A ( $\alpha$ ) významně posunují do oblasti vyšších vlnových délek emise (*red-shift*), avšak jejich intenzita fluorescence zůstává víceméně nezměněna. Fluorescenční domény s maximy při kratších vlnových délkách emise pravděpodobně souvisejí s relativně jednoduchými aromatickými sloučeninami, které můžeme blíže definovat, jako nízkomolekulární sloučeniny s jedním až třemi aromatickými kruhy. Z tohoto kontextu vyplývá, že právě tyto nízkomolekulární sloučeniny mohou být louženy vodou, a obohacovat tak půdní ekosystém, jak je uvedeno v odborné studii zabývající se vodou extrahovatelných DOM z jihomoravského lignitu<sup>34</sup>. Naproti tomu tzv. *red-shift* je odrazem přítomnosti kondenzovaných aromatických systémů bohatě substituovaných funkčními skupinami přitahujícími elektrony tj. C=O, –OH, –OR apod. Nicméně je zapotřebí dodat, že fluorescence v této oblasti může být spjata i s takovými organickými sloučeninami, které se svojí morfologií podobají steroidním sloučeninám tzn. kondenzovaného steroidního jádra substituovaného alifatickými či lipidickými sloučeninami<sup>36</sup>.

Asi největší výhodou této metody spočívá v lokalizaci a následné identifikaci nejen fluorescenčních domén odpovídajících HL resp. „humifikované“ OM, ale také těch, jejichž přítomnost v EEM spektrech odkazuje, zda se na genezi HL významně nepodílela rozličná mikrobiální společenstva. Ne-huminové fluorofory, jako jsou B ( $\gamma$ ) *tyrosin-like* a T ( $\delta$ ) *tryptofan-like* jsou typickými fluorescenčními doménami autochtonních DOM. Ukázalo se, že fluorescenční domény *tryptofan-like* mohou být použity jako indikátory zralosti vermikompostu, kdy po šesti měsících vermikompostování koňského hnoje nebyly v EEM spektrech HK výše zmíněné ne-huminové domény identifikovány<sup>30</sup>. Nicméně, v průběhu zrání vermikompostu byly formovány takové fluorofory, jež jsou pokládány za ukazatele stabilních frakcí HL. V této souvislosti máme především na mysli fluorescenční domény C ( $\alpha$ ) *humic-like*, které byly lokalizovány v oblasti vlnových délek excitace a emise při 330–335/440 nm a 385–390/435–440 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ).

Steady-state fluorescenční spektrometrie byla použita k identifikaci dominantních fluoroforů, kterými se vyznačovaly jednotlivé organické frakce (TCM1–MET6), jež byly získány pomocí sekvenční frakcionace rašeliništní HK za použití rozdílné polarizace organických rozpouštědel<sup>35</sup>. Výjimečnost spojení sekvenční frakcionace a fluorescenční spektrometrie spočívá především v tom, že jsme schopni identifikovat jednotlivé stavební jednotky, které spoluvytvářejí supramolekulární asociace HK. Toto tvrzení nabývá paradigmatického rozměru, pokud si uvědomíme, že původní (mateřská) HK byla charakterizována pouze jednou fluorescenční doménou A ( $\alpha$ ) *fulvic-like*, přičemž ostatní fluorofory nebyly v EEM spektru patrné, anebo se jevily, jako méně výrazná ramena. V této souvislosti si dovoluji v krátkosti zmínit ty fluorescenční domény, které do značné míry dopomohly k podrobné strukturní charakterizaci této rašeliništní HK. Organické frakce extrahované chloroformem (TCM1), ethyl-acetátem (EAC2) a acetonitrilem (ACN4) se vyznačovaly přítomností fluorescenčních domén ne-huminového charakteru, které jsou považovány za přímé indikátory mikrobiální aktivity v průběhu geneze HL. Jedná se o fluorofory B ( $\gamma$ ) *tyrosin-like*, jejichž specifické pozice v EEM spektrech byly determinovány v oblasti vlnových délek excitace a emise 270/305–315 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Nicméně, toto nejsou jediné fluorescenční domény, které by poukazovaly na významnou mikrobiální činnost v průběhu geneze rašeliništní HK. Tato

hypotéza byla podpořena i přítomností fluorescenčního maxima, které je dle dosavadní nomenklatury označováno, jako doména „H“ soluble microbial by-product-like. Avšak je zapotřebí říci, že doposud nebyl navržen žádný strukturní model tohoto fluoroforu, jehož specifická pozice v EEM spektrech nastává v oblasti nejkratších vlnových délek excitace. Na druhou stranu, lze podle doposud platných pravidel tento fluorescenční signál blíže specifikovat, a to tak, že za jeho fluorescenci jsou zodpovědné jednoduché aromatické struktury (bez kondenzace) s bohatou substitucí elektron-darujícími funkčními skupinami, jako jsou alkylové resp. alkoxylové substituenty. V posledních dvou frakcích extrahovaných (PRO5 a MET6) nejpolárnějšími organickými rozpouštědly byly lokalizovány fluorescenční domény „V“, a to v oblasti vlnových délek excitace a emise 435–445/525–530 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Obecně platí, že fluorescenční maxima s emisní vlnovou délkou  $> 470$  nm pravděpodobně odpovídají přechodu elektronového náboje z jedné oblasti molekulárního druhu na jinou, anebo z jednoho molekulárního druhu na druhý, nežli z nezávislé fluorescenční domény. Jinými slovy, fluorescenční domény „V“ s největší pravděpodobností odpovídají takovým strukturním jednotkám HK, které si můžeme představit jako vysokomolekulární frakce s poměrně významnou mírou kondenzace jejich aromatických jednotek. Nicméně nelze ani vyloučit příspěvky vyplývající z jejich bohaté substituce elektron-odebírajícími funkčními skupinami. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry získanými pomocí UV/Vis (viz. SUVA<sub>254</sub> a  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ ), FTIR a liquid-state <sup>13</sup>C NMR spektrometrie. Někteřími autory je tato fluorescenční doména připisována degradovaným rostlinným pigmentům, jako je *fytochlorin*.



## 7 EPILOG

**T**ak jak se zdokonalují instrumentální techniky, tak i v oblasti studia HL a DOM byl v posledních 20. letech zaznamenán nebývalý pokrok, který je přednostně spjat s dnes již podrobným kvalitativním popisem jejich strukturních jednotek. Na druhou stranu je vidět, že čím více víme o jejich chemické struktuře, tím stále eminentněji se dostávají do popředí doposud ne zcela objasněné otázky, týkající se především jejich geneze. Co se týká struktury HL a DOM, tak asi jeden z nejvýznamnějších poznatků byl fakt, že mezi nejvíce perzistentní strukturní jednotky nepatří aromatické sloučeniny, jak jsme se dříve domnívali, ale ty, které jsou tvořeny alifatickými biopolymery. Tento nový pohled a následné odborné publikace potvrzující *alifatičnost* HL prokázaly, že role ligninu, jakož to jedna z majoritních komponent vstupujících do dekompozičního procesu geneze HL byla poněkud nadhodnocena. Touto skutečností byly otevřeny pomyslné dveře, za kterými se nacházelo rozcestí s mnoha cestami, avšak vedoucími k jednomu a stejnému cíli. Každá z těchto cest byla následována jinými vědními obory, jako je chemie, pedologie, mikrobiologie, biologie, botanika, zoologie, evoluční biologie, klimatologie atd. V této souvislosti se zdá až neuvěřitelné, že takové dílčí zjištění, jakou je rezistentnost alifatických struktur vůči degradaci přispěla k multidisciplinárnímu pohledu na problematiku HL, potažmo humusu. Pohled půdních mikrobiologů vnesl do této problematiky mnoho zajímavých skutečností, z nichž asi nejvýznamnější je tzv. *polyketidová teorie* vzniku HL. Abychom si mohli představit komplexnost, jakou v sobě ukrývá problematika HL, SOM, DOM atd., tak se ji pokusme přiblížit v odrazu polyketidové teorie. Nicméně, na tomto místě chci říci, že následující odstavce nejsou preferencí té či oné teorie, ale především si kladou za cíl poukázat na širokost tohoto tématu.

Abychom lépe porozuměli syntéze a dekompozici půdních polyketidů v koexistenci s živou a neživou přírodou (půdní mikroorganismy × rostliny × minerální povrchy) je zapotřebí ověřit zda naše hypotézy jsou v obecné platnosti s rychlostními zákony termodynamiky. V této souvislosti by se mohlo jednat o studium modelových enzymatických reakcí, které vedou k transformaci malých organických molekul na tzv. polyketidy, jež se mohou stát centrálními strukturními jednotkami HL a SOM. Je pravděpodobné, že tyto modelové reakce by mohly přispět k identifikaci doposud neznámých polyketidů či jejich metabolitů rozkladu. Zároveň by bylo vhodné pokusit se o implementaci molekulárního přístupu z hlediska úlohy nukleových kyselin, které mohou hrát důležitou roli při biosyntéze polyketidových sloučenin. Využití biosyntetických molekulárních technik a vhodné kvalitativní analýzy by mohlo dozajista přispět k objasnění některých aspektů spojených s procesem *humifikace* a *geneze* HL, a to v důsledku podrobného studia sekundárních polyketidů, které můžeme považovat za typické představitele centrálních stavebních jednotek ve strukturách HL, SOM, DOM apod. Jak již bylo několikrát zmíněno, tak bez multidisciplinárního přístupu zahrnujícího pohled chemika, půdního mikrobiologa, biologa atd. bychom nebyli schopni přesně objasnit, jaké důležité role hrají tyto sloučeniny (PK) v půdních ekosystémech.

Moderní instrumentální techniky, fyzikální chemie, zvláště pak termodynamika, molekulární biologie, nanotechnologie, simulační modelování, mikroskopie atd. nám

dozajista umožní lépe a specifickyji identifikovat tyto organické sloučeniny, jež jsou produkovány na základě pozoruhodné komunikace mezi půdními mikroorganismy a cévnatými rostlinami. Tento pokrok nese v sobě skrytý potenciál stát se odrazovým můstkem k lepšímu pochopení struktury HL. Na tomto místě je nutné říci, že celkovou představu o transformaci polyketidů by bylo možné získat prostřednictvím studia kinetiky mikrobiální a enzymatické metamorfózy izotopově značených substrátů *in vivo*. Tyto interdisciplinární aspekty mohou vést k ozřejnění některých doposud nevyjasněných otázek týkajících se: (i) humifikace malých organických molekul; (ii) ekologického významu bio-syntetizovaných a vylučovaných polyketidů živými organismy (půdní biota × rostliny); (iii) formace centrálních strukturních jednotek HL a SOM; (iv) chemické rozmanitosti PK a jejich dynamiky v půdě; (v) kvantitativní a strukturní analýza HL a SOM.

Na tomto místě je nutné mít na paměti, že polyketidy (PK) jsou rozsáhlou skupinou organických sloučenin, která čítá zhruba  $1 \cdot 10^5$  chemických individuí. Tyto organické sloučeniny jsou produkovány na základě symbiotické kooperace resp. chemické komunikace mezi rostlinami a mikroorganismy. Jelikož se jedná výhradně o „malé“ signální molekuly, tak se jejich střední molekulová hmotnost  $\overline{M}_w$  pohybuje poměrně v úzkém rozmezí, a to výlučně v rozsahu  $300\text{--}2500 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1}$ . Asi polovina doposud známých PK je produkována půdními mikroorganismy. Tyto bioaktivní sloučeniny jsou explicitně tvořeny komplexními moduly PK syntázy, a tudíž je lze v ekosystému půda × rostlina vyjádřit, jako bioaktivní sloučeniny s přímou vazbou na ostatní organismy, které tyto sloučeniny neprodukují. Čistě hypoteticky, pokud bychom provedli potencionální permutace pomocí čtyř doposud známých modulů *polyketidových syntáz* (PKS), tak by to znamenalo, že jsme schopni teoreticky získat více jak  $1 \cdot 10^5$  organických sloučenin, a to z jednoduchých půdních prekurzorů, jako jsou oxokyseliny. Obecně můžeme tyto vzniklé polyketidy klasifikovat jako *alkylaromatické*, *polyaromatické* či *polyfenolické* organické sloučeniny.

Již v tuto chvíli je zřejmé, že mechanismus tvorby a vylučování půdních PK představuje odrazový můstek k syntéze huminových látek či půdní organické hmoty, který je v dobré shodě s publikovanými teoriemi jejich geneze. Především díky své bioaktivitě, silné a rychlé adsorpci na minerální podíl půdy a v neposlední řadě i vysoké hodnotě energie, jež je skryta v podobě jejich chemických vazeb, tak lze tyto sloučeniny považovat za „pasivní“ uhlíkové fondy, jež mohou významně přispívat k výstavbě centrálních stavebních jednotek HL a SOM. Tyto centrální jednotky mohou dále interagovat s ostatními stavebními jednotkami, jako jsou sacharidy, bílkoviny, lipidy, dusíkaté heterocyklické sloučeniny apod. za vzniku HL. Na této teorii přednostně oceňuji to, že jejím hlavním aspektem nejsou dohady, zda jsou HL biopolymery či supramolekulární asociace.

Po mnoho desetiletí probíhal výzkum HL v zcela separovaných oborech, přičemž jednotlivé vědecké týmy nebyly schopni mezi sebou navázat významnější spolupráci. V této souvislosti by bylo velmi dobré, pokud by se podařilo odstartovat užší spolupráci napříč rozmanitými vědními obory, jako je chemie, mikrobiologie, biologie apod. Tento multidisciplinární přístup by dozajista přispěl k posílení lidského poznání v této oblasti výzkumu.

## 8 REFERENCE

- [1] Stockmann, U.; Adams, M.A.; Crawford, J.W.; Field, D.J.; Henakaarchchi, N.; Jenkins, M.; Minasny, B.; McBratney, A.B.; de Remy de Courcelles, V.; Singh, K.; Wheeler, I.; Abbott, L.; Angers, D.A.; Baldock, J.; Bird, M.; Brookes, P.C.; Chenu, C.; Jastrow J.D.; Zimmermann, M. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2013**, *164*, 80–99. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.001>.
- [2] Fong, S.S.; Seng, L.; Chong, W.N.; Asing, J.; Nor, M.F.M.; Pauzan, A.S.M. Characterization of the coal derived humic acids from Mukah, Sarawak as soil conditioner. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 582–587. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000300023>.
- [3] Thurman, E.M. *Organic Geochemistry of Natural Waters*, 1<sup>st</sup> ed.; Springer, Dordrecht, 1985, pp. 497.
- [4] Galip, N.; Polat, U.; Biricik, H. Effects of supplemental humic acid on ruminal fermentation and blood variables in rams. *Ital. J. Anim. Sci.* **2010**, *9*, 390–393. <https://doi.org/10.4081/ijas.2010.e74>.
- [5] Ozturk, E.; Ocak, N.; Turan, A.; Erener, G.; Altop, A.; Cankaya, S. Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 59–65. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4541>.
- [6] Tan, K.H. *Humic Matter in Soil and the Environment, Principles and Controversies*, 2<sup>nd</sup> ed.; CRC Press, 2014, pp. 495.
- [7] Stevenson, F.J. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions*, 1<sup>st</sup> ed.; John Wiley: New York, NY, USA, 1994, pp. 512.
- [8] Grimalt, J.O.; Hermosin, B.; Yruela, I.; Saiz-Jimenez, C. Lipids of soil humic acids. II. Residual components after humatomelanic acid extraction. *Sci. Total Environ.* **1989**, *81–82*, 421–428. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90150-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90150-2).
- [9] Novák, F.; Šestauberová, M.; Hrabal, R. Structural features of lignohumic acids. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1093*, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.03.054>.
- [10] Lamar, R.T.; Olk, D.C.; Mayhew, L.; Bloom, P.R. A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. *J. AOAC Int.* **2014**, *97*, 721–730. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-393>.
- [11] Kleber, M.; Johnson, M.G. Chapter 3 - Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter: Implications for Interactions in the Environment. *Adv. Agron.* **2010**, *106*, 77–142. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)06003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)06003-7).
- [12] Hölemann, J.A.; Henrich, R. Allochthonous versus autochthonous organic matter in Cenozoic sediments of the Norwegian Sea: Evidence for the onset of glaciations in the northern hemisphere. *Mar. Geol.* **1994**, *121*, 87–103. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0025-3227(94)90159-7).
- [13] Bilby, R.E.; Bisson, P.A. Allochthonous versus Autochthonous Organic Matter Contributions to the Trophic Support of Fish Populations in Clear-Cut and Old-Growth Forested Streams. *Can. J. Fish. Aquat.* **1992**, *49*, 540–551. <https://doi.org/10.1139/f92-064>.
- [14] Wilkinson, G.M.; Pace, M.L.; Cole, J.J. Terrestrial dominance of organic matter in north temperate lakes. *Global Biogeochem. Cycles* **2013**, *27*, 43–51. <https://doi.org/10.1029/2012GB004453>.
- [15] Schnitzer, M. Chapter 1 Humic Substances: Chemistry and Reactions. *Developments in Soil Science* **1978**, *8*, 1–64. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70016-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70016-3).

- [16] Schnitzer, M. A Lifetime Perspective on the Chemistry of Soil Organic Matter. *Adv. Agron.* **1999**, *68*, 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60842-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60842-1).
- [17] Gieseking, J.E. Soil Components, Volume 1, Organic Components, 1<sup>st</sup> ed.; Springer-Verlag, New York, Inc. 1975, pp. 535.
- [18] Aiken, G.R.; McKnight, D.M.; Wershaw, R.L.; MacCarthy, P. Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation, and Characterization, 1<sup>st</sup> ed.; John Wiley & Sons. USA, 1985, pp. 692.
- [19] Waksman, S.A. Humus. Origin, chemical composition and importance in nature, 1<sup>st</sup> ed.; The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1936, pp. 494.
- [20] Haider, K.; Martin, J.P. Synthesis and Transformation of Phenolic Compounds by *Epicoccum nigrum* in Relation to Humic Acid Formation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1967**, *31*, 766–772. <https://doi.org/10.2136/sssaj1967.03615995003100060019x>.
- [21] Wu, J.; Zhao, Y.; Zhao, W.; Yang, T.; Zhang, X.; Xie, X.; Cui, H.; Wei, Z. Effect of precursors combined with bacteria communities on the formation of humic substances during different materials composting. *Bioresour. Technol.* **2017**, *226*, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.031>.
- [22] Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* **2001**, *166*, 810–832.
- [23] Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* **2002**, *75*, 1–134. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7).
- [24] Wershaw, R.L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.* **1999**, *164*, 803–813. <https://doi.org/10.1097/00010694-199911000-00004>.
- [25] Sutton, R.; Sposito, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9009–9015. <https://doi.org/10.1021/es050778q>.
- [26] von Wandruszka, R. The micellar model of humic acid: evidence from pyrene fluorescence measurements. *Soil Sci.* **1998**, *163*, 921–930. <https://doi.org/10.1097/00010694-199812000-00002>.
- [27] Schnitzer, M.; Monreal, C.M. Quo Vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification. *Adv. Agron.* **2011**, *113*, 145–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386473-4.00003-8>.
- [28] Roessner, C.A.; Scott, A.I. Genetically engineered synthesis of natural products: From alkaloids to corrins. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 467–490. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.467>.
- [29] Demain, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>.
- [30] Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>.
- [31] Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
- [32] Strohl, W. Biotechnology of Antibiotics, 2<sup>nd</sup> ed.; CRC Press, 1997, pp. 860.
- [33] Blaak, H.; Schrempf, H. Binding and substrate specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolitically processed form. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *229*, 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20447.x>.

- [34] Monreal, C.M.; Sultan, Y.; Schnitzer, M. Soil organic matter in nano-scale structures of a cultivated Black Chernozem. *Geoderma*, **2010**, *159*, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.07-017>.
- [35] Canellas, L.P.; Olivares, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2014**, *1*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.
- [36] Burdon, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Sci.* **2001**, *166*, 752–769. <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00004>.
- [37] Schaeffer, A.; Nannipieri, P.; Kästner, M.; Schmidt, B.; Botterweck, J. From humic substances to soil organic matter–microbial contributions. In honour of Konrad Haider and James P. Martin for their outstanding research contribution to soil science. *J. Soils Sediments*, **2015**, *15*, 1865–1881. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1177-4>.
- [38] Allison, F.E. Chapter 9: The Interaction of Organic Matter with Clays. *Developments in soil science*, **1973**, *3*, 162–177. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70567-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70567-1).
- [39] Graham, E.B.; Knelman, J.E.; Schindlbacher, A.; Siciliano, S.; Breulmann, M.; Yannarell, A.; Beman, J.M.; Abell, G.; Philippot, L.; Prosser, J.; Foulquier, A.; Yuste, J.C.; Glanville, H.C.; Jones, D.L.; Angel, R.; Salminen, J.; Newton, R.J.; Burgmann, H.; Ingram, L.J.; Hamer, U.; Siljanen, H.M.; Peltoniemi, K.; Potthast, K.; Baneras, L.; Hartmann, M.; Banerjee, S.; Yu, R.Q.; Nogaro, G.; Richter, A.; Koranda, M.; Castle, S.C.; Goberna, M.; Song, B.; Chatterjee, A.; Nunes, O.C.; Lopes, A.R.; Cao, Y.; Kaisermann, A.; Hallin, S.; Strickland, M.S.; Garcia-Pausas, J.; Barba, J.; Kang, H.; Isobe, K.; Papaspyrou, S.; Pastorelli, R.; Lagomarsino, A.; Lindstrom, E.S.; Basiliko, N.; Nemergut, D.R. Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00214>.
- [40] Wilpiszkeski, R.L.; Aufrecht, J.A.; Retterer, S.T.; Sullivan, M.B.; Graham, D.E.; Pierce, E.M.; Zabolocki, E.D.; Palumbo, A.V.; Elias, D.A. Soil Aggregate Microbial Communities: Towards Understanding Microbiome Interactions at Biologically Relevant Scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-19>.
- [41] De Gryze, S.; Six, J.; Merckx, R. Quantifying water-stable soil aggregate turnover and its implication for soil organic matter dynamics in a model study. *Eur. J. Soil. Sci.* **2006**, *57*, 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00760.x>.
- [42] Christensen, B.T. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *Eur. J. Soil. Sci.* **2001**, *52*, 345–353. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x>.
- [43] Monrozier, L.J.; Ladd, J.N.; Fitzpatrick, R.W.; Foster, R.C.; Raupach, M. Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* **1991**, *50*, 37–62. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(91\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0016-7061(91)90025-0).
- [44] Young, I.M.; Crawford, J.W. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, **2004**, *304*, 1634–1637. <https://doi.org/10.1126/science.1097394>.
- [45] Crawford, J.W.; Deacon, L.; Grinev, D.; Harris, J.A.; Ritz, K.; Singh, B.K.; Young, I. Microbial diversity affects self-organization of the soil-microbe system with consequences for function. *J. R. Soc. Interface*, **2012**, *9*, 1302–1310. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0679>.
- [46] Cortes-Tolalpa, L.; Salles, J.F.; van Elsas, J.D. Bacterial synergism in lignocellulose biomass degradation - complementary roles of degraders as influenced by complexity of the carbon source. *Front. Microbiol.*, **2017**, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01628>.



- [47] Paerl, H.W.; Pinckney, J.L. A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* **1996**, *31*, 225–247.
- [48] Raynaud, X.; Nunan, N. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS One*, **2014**, *9*, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>.
- [49] Watt, M.; Silk, W.K.; Passioura, J.B. Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere. *Ann. Bot.* **2006**, *97*, 839–855. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl028>.
- [50] Kremen, A.; Bear, J.; Shavit, U.; Shaviv, A. Model demonstrating the potential for coupled nitrification denitrification in soil aggregates. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4180–4188. <https://doi.org/10.1021/es048304z>.
- [51] Smith, A.P.; Bond-Lamberty, B.; Benscoter, B.W.; Tfaily, M.M.; Hinkle, C.R.; Liu, C.; Bailey, V.L. Shifts in pore connectivity from precipitation versus groundwater rewetting increases soil carbon loss after drought. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01320-x>.
- [52] Rillig, M.C.; Muller, L.A.; Lehmann, A. Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. *ISME J.* **2017**, *11*, 1943–1948. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.56>.
- [53] Sparks, D.L.; Page, A.L.; Helmke, P.A.; Loeppert, R.H.; Soltanpour, P.N.; Tabatabai, M.A.; Johnston, C.T.; Summer, M.E. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 1<sup>st</sup> ed.; Soil Science Society of America, Inc., American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA, pp. 1424.
- [54] De Nobili, M.; Bragato, G.; Alcaniz, J.M.; Puigbo, A.; Comellas, L. Characterization of electrophoretic fractions of humic substances with different electrofocusing behavior. *Soil Sci.* **1990**, *150*, 763–770. <https://doi.org/10.1097/00010694-199011000-00002>.
- [55] Thurman, E.M.; Malcolm, R.L. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **1981**, *15*, 463–466. <https://doi.org/10.1021/es00086a012>.
- [56] Watanabe, A.; Kuwatsuka, S. Fractionation of soil fulvic acids using polyvinyl-pyrrolidone and their ionization difference spectra. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1991**, *37*, 611–617. <https://doi.org/10.1080/00380768.1991.10416929>.
- [57] Ortiz de Sera, M.; Schnitzer, M. Extraction of humic acid by alkalis and chelating resin. *Can. J. Soil Sci.*, **1972**, *52*, 365–374. <https://doi.org/10.4141/cjss72-049>.
- [58] Grossman, R.B.; Lynn, W.C. Gel-Like Films that May Form at the Air-Water Interfaces in Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1967**, *31*, 259–262. <https://doi.org/10.2136/sssaj1967.03615995003100020032x>.
- [59] Fedotov, G.N.; Shoba, S.A.; Pozdnyakov, A.I.; Puzanova, A.E. Structural transition in the humic matrix of soil gels and its effect on the soil properties. *Eurasian Soil Sci.* **2014**, *47*, 873–883. <https://doi.org/10.1134/S1064229314090038>.
- [60] Fedotov, G.N.; Shoba, S.A. Structural transition in the humic matrix of soil gels and the electrical resistivity of soils. *Eurasian Soil Sci.* **2015**, *48*, 1222–1228. <https://doi.org/10.1134/S106422931511006X>.
- [61] Fedotov, G.N.; Dobrovolskii, G.V.; Shoba, S.A. Water resistance of soils and structural transition in the humus matrix of soil gels. *Dokl. Biol. Sci.* **2013**, *450*, 162–164. <https://doi.org/10.1134/s0012496613030149>.
- [62] Fedotov, G.N.; Zhukov, D.V.; Pakhomov, E.I.; Pozdnyakov, A.I. Organomineral gels in soils: experimental facts and hypotheses. *Eurasian Soil Sci.* **2004**, *37*, 599–603.

- [63] Fedotov, G.N.; Dobrovol'skii, G.V.; Putlyaev, V.I.; Garshev, A.V.; Ivanov, V.K.; Pakhomov, E.I. Gel structures in soils. *Eurasian Soil Sci.* **2006**, *39*, 738–747. <https://doi.org/10.1134/S1064229306070076>.
- [64] Nebbioso, A.; Piccolo, A. Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 1187–1199. <https://doi.org/10.1021/bm101488e>.
- [65] Nebbioso, A.; Piccolo, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *720*, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.027>.
- [66] Nebbioso, A.; Piccolo, A.; Lamshöft, M.; Spiteller, M. Molecular characterization of an end-residue of humeomics applied to a soil humic acid. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 23658–23665. <https://doi.org/10.1039/C4RA01619J>.
- [67] Nebbioso, A.; Vinci, G.; Drosos, M.; Spaccini, R.; Piccolo, A. Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humins) by humeomics. *Biol. Fertil. Soils*, **2015**, *51*, 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0991-y>.
- [68] Ma, X.; Green, S.A. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract. *Chemosphere*, **2008**, *72*, 1425–1434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.029>.
- [69] Khairy, A.H. Contribution to the quantification of humic acids by thin layer chromatography. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 1990, *153*, 133–140. <https://doi.org/10.1002/jpln.19901530302>.
- [70] Doskočil, L.; Enev, V.; Pekař, M.; Wasserbauer, J. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. *Org. Geochem.* **2016**, *95*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.02.008>.
- [71] Curtis, M.A.; Witt, A.F.; Schram, S.B.; Rogers, L.B. Humic acid fractionation, using a nearly linear pH gradient. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1195–1199. <https://doi.org/10.1021/ac00231a014>.
- [72] Enev, V.; Sedláček, P.; Kubíková, L.; Sovová, Š.; Doskočil, L.; Klučáková, M.; Pekař, M. Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids. *Agronomy*, **2021**, *11*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030587>.
- [73] Li, T.; Song, F.; Zhang, J.; Liu, S.; Xing, B.; Bai, Y. Pyrolysis characteristics of soil humic substances using TG-FTIR-MS combined with kinetic models. *Sci. Total Environ.* **2020**, *698*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134237>.
- [74] Liang, F.; Wang, R.; Xiang, H.; Yang, X.; Zhang, T.; Hu, W.; Mi, B.; Liu, Z. Investigating pyrolysis characteristics of moso bamboo through TG-FTIR and Py-GC/MS. *Bioresour. Technol.* **2018**, *256*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.140>.
- [75] Boguta, P.; Sokołowska, Z.; Skic, K. Use of thermal analysis coupled with differential scanning calorimetry, quadrupole mass spectrometry and infrared spectroscopy (TG-DSC-QMS-FTIR) to monitor chemical properties and thermal stability of fulvic and humic acids. *PLoS One*, **2017**, *12*, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189653>.
- [76] Özsın, G.; Pütün, A.E. Kinetics and evolved gas analysis for pyrolysis of food processing wastes using TGA/MS/FT-IR. *Waste Manag.* **2017**, *64*, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.020>.
- [77] Ma, Z.; Chen, D.; Jie, G.; Bao, B.; Zhang, Q. Determination of pyrolysis characteristics and kinetics of palm kernel shell using TGA-FTIR and model-free integral methods. *Energy Convers. Manag.* **2015**, *89*, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.09.074>.

- [78] Baigorri, R.; Fuentes, M.; González-Vila, F.J.; García-Mina, J.M. Singular Structural Features on Humic Fractions in Solution: Statistical Analysis of Diverse Analytical Techniques Spectra. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2010**, *74*, 74–86. <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0212>.
- [79] Frimmel, F.H.; Abbt-Braun, G.; Heumann, K.G.; Hock, B.; Lüdemann, H-D.; Spiteller, M. *Refractory Organic Substances in the Environment*, 1<sup>st</sup> ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2002, pp. 579. <https://doi.org/10.1002/9783527611195>.
- [80] Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. Information Provided on Humic Substances by E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> Ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, *41*, 352–358. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x>.
- [81] Boguta, P.; Sokołowska, Z. Zinc binding to fulvic acids: Assessing the impact of pH, metal concentrations and chemical properties of fulvic acids on the mechanism and stability of formed soluble complexes. *Molecules*, **2020**, *25*, 1–24. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules25061297>.
- [82] Hanc, A.; Enev, V.; Hrebeckova, T.; Kluckova, M.; Pekar, M. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *Waste Manag.* **2019**, *99*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.08.032>.
- [83] Peuravuori, J.; Pihlaja, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *337*, 133–149. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00412-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00412-6).
- [84] Hur, J.; Williams, M.A.; Schlautman, M.A. Evaluating spectroscopic and chromatographic techniques to resolve dissolved organic matter via end member mixing analysis. *Chemosphere*, **2006**, *63*, 387–402. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.069>.
- [85] Andersen, D.O.; Alberts, J.J.; Takács, M. Nature of natural organic matter (NOM) in acidified and limed surface waters. *Water Res.* **2000**, *34*, 266–278. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00133-5).
- [86] Korshin, G.V.; Li, C-W.; Benjamin, M.M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Res.* **1997**, *31*, 1787–1795. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00006-7).
- [87] Chin, Y-P.; Aiken, G.; O'Loughlin, E. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 1853–1858. <https://doi.org/10.1021/es00060a015>
- [88] Wang, L.; Wu, R.; Zhang, R.; Li, W.; Liao, H. Characterization of dissolved organic matter fractions from Lake Hongfeng, Southwestern China Plateau. *J. Environ. Sci.* **2009**, *21*, 581–588. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62311-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62311-6).
- [89] Uyguner, C.S.; Hellriegel, C.; Otto, W.; Larive, C.K. Characterization of humic substances: implications for trihalomethane formation. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1579–1586. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2451-7>.
- [90] Morra, M.J.; Marshall, D.B.; Lee, C.M. FT-IR analysis of aldrich humic acid in water using cylindrical internal reflectance. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1989**, *20*, 851–867. <https://doi.org/10.1080/00103628909368121>.
- [91] Davis, W.M.; Erickson, C.L.; Johnston, C.T.; Delfino, J.J.; Porter, J.E. Quantitative fourier transform infrared spectroscopic investigation humic substance functional group composition. *Chemosphere*, **1999**, *38*, 2913–2928. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00486-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00486-X).

- [92] Tremblay, L.; Gagné, J-P. Fast Quantification of Humic Substances and Organic Matter by Direct Analysis of Sediments Using DRIFT Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2985–2993. <https://doi.org/10.1021/ac011043g>.
- [93] Aoyama, M.; Sugiyama, Y.; Ikeya, K.; Maie, N. Spectrophotometric and Mass Spectrometric Properties of Lake Biwa Fulvic Acids, a Japanese Humic Substances Society Standard Sample. *Humic Sub. Res.* **2019**, *15*, 21–31.
- [94] Tanaka, T.; Nagao, S.; Ogawa, H. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy of Functional Groups of Humic Acid Dissolving in Aqueous Solution. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 1081–1084. <https://doi.org/10.14891/analscisp.17icas.0.i1081.0>.
- [95] Guan, Y-F.; Qian, C.; Chen, W.; Huang, B-C.; Wang, Y-J.; Yu, H-Q. Interaction between humic acid and protein in membrane fouling process: A spectroscopic insight. *Water Res.* **2018**, *145*, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.019>.
- [96] Jayalath, S.; Wu, H.; Larsen, S.C.; Grassian, V.H. Surface Adsorption of Suwannee River Humic Acid on TiO<sub>2</sub> Nanoparticles: A Study of pH and Particle Size. *Langmuir*, **2018**, *34*, 3136–3145. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00300>.
- [97] Stuart, B. Infrared Spectrometry: Fundamentals and applications, 1<sup>st</sup> ed.; John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., USA, 2004, pp. 244. <https://doi.org/10.1021/10.1002/0470011149>.
- [98] Felbeck, G.T. (Jr.). Structural Chemistry of Soil Humic Substances. *Adv. Agron.* **1965**, *17*, 327–368. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60417-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60417-4).
- [99] Ghabbour, E.A.; Davies, G. Humic Substances: Structures, Models and Functions. 1<sup>st</sup> ed.; Northeastern University, Boston, MA, USA, 2001, pp. 402. <https://doi.org/10.1039/9781847551085>.
- [100] Niemeyer, J.; Chen, Y.; Bollag, J-M. Characterization of Humic Acids, Composts, and Peat by Diffuse Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1992**, *56*, 135–140. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010021x>.
- [101] Giachin, G.; Nepravishita, R.; Mandaliti, W.; Melino, S.; Margon, A.; Scaini, D.; Mazzei, P.; Piccolo, A.; Legname, G.; Paci, M.; Leita, L. The mechanisms of humic substances self-assembly with biological molecules: The case study of the prion protein. *Plos One*, **2017**, *12*, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188308>.
- [102] Novák, F.; Machovič, V.; Hrabalová, H.; Novotná, M. Kvantitativní FTIR spektrometrie huminových látek. *Chemické listy*, **2017**, *111*, 363–373.
- [103] Li, T.; Song, F.; Zhang, J.; Liu, S.; Feng, W.; Zuo, L.; Pu, J.; Xing, B.; Giesy, J.P.; Bai, Y. Investigation of eluted characteristics of fulvic acids using differential spectroscopy combined with Gaussian deconvolution and spectral indices. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 11000–11011. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07699-3>.
- [104] Peuravuori, J.; Koivikko, R.; Pihlaja, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water Res.* **2002**, *36*, 4552–4562. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00172-0).
- [105] Świetlik, J.; Sikorska, E. Application of fluorescence spectroscopy in the studies of natural organic matter fractions reactivity with chlorine dioxide and ozone. *Water Res.* **2004**, *38*, 3791–3799. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.010>.

- [106] Coble, P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* **1996**, *51*, 325–346. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00062-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00062-3).
- [107] Gao, J.F.; Dou, S.; Wang, Z.G. Structural Analysis of Humic Acid in Soil at Different Corn Straw Returning Modes through Fluorescence Spectroscopy and Infrared Spectroscopy. *Int. J. Anal. Chem.* **2019**, *2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/1086324>.
- [108] Wu, Q-Y.; Zhou, T-H.; Du, Y.; Ye, B.; Wang, W-L.; Hu, H-Y. Characterizing the molecular weight distribution of dissolved organic matter by measuring the contents of electron-donating moieties, UV absorbance, and fluorescence intensity. *Environ. Int.* **2020**, *137*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105570>.
- [109] McKnight, D.M.; Boyer, E.W.; Westerhoff, P.K.; Doran, P.T.; Kulbe, T.; Andersen D.T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 38–48. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.1.0038>.
- [110] Zhang, T.; Lu, J.; Ma, J.; Qiang, Z. Fluorescence spectroscopic characterization of DOM fractions isolated from a filtered river water after ozonation and catalytic ozonation. *Chemosphere*, **2008**, *71*, 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.030>.
- [111] 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. *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2003.11.007>.
- [112] Sierra, M.M.D.; Giovanela, M.; Parlanti, E.; Soriano-Sierra, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*, **2005**, *58*, 715–733. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.038>.
- [113] Budavari, S. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 1<sup>st</sup> ed.; Whitehouse Station, NJ: Merck, 1996, pp. 2708.
- [114] Birdwell, J.E.; Engel, A.S. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.* **2010**, *41*, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.11.002>.
- [115] Burdige, D.J.; Kline, S.W.; Chen, W. Fluorescent dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Mar. Chem.* **2004**, *89*, 289–311. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.015>.
- [116] Coble, P.G.; Lead, J.; Baker, A.; Reynolds, D.M.; Spencer, R.G.M. Aquatic Organic Matter Fluorescence, 1<sup>st</sup> ed.; Cambridge University Press, UK, pp. 418.
- [117] Wolfe, A.P.; Kaushal, S.S.; Fulton, J.R.; McKnight, D.M. Spectrofluorescence of Sediment Humic Substances and Historical Changes of Lacustrine Organic Matter Provenance in Response to Atmospheric Nutrient Enrichment. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3217–3223. <https://doi.org/10.1021/es011215r>.
- [118] Huguet, A.; Vacher, L.; Relexans, S.; Saubusse, S.; Froidefond, J.M.; Parlanti, E. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* **2009**, *40*, 706–719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>.
- [119] Zsolnay, A.; Baigar, E.; Jimenez, M.; Steinweg, B.; Saccomandi, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*, **1999**, *38*, 45–50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0).



- [120] Milori, D.M.B.P.; Martin-Neto, L.; Bayer, C.; Mielniczuk, J.; Bagnato, V.S. Humification Degree of Soil Humic Acids Determined by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Sci.* **2002**, *167*, 739–749. <https://doi.org/10.1097/00010694-200211000-00004>.
- [121] Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3<sup>rd</sup> ed.; Springer: Baltimore, MD, USA, 2006; p. 954.
- [122] Gonzalez-Vila, F.J.; Lentz, H. FT-C13 nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *72*, 1063–1070. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(76\)80240-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(76)80240-9).
- [123] Hayes, M.H.B.; MacCarthy, P.; Malcom, R.L.; Swift, R.G. Humic Substances II: In Search of Structure, 1<sup>st</sup> ed.; Wiley, Chichester, UK, pp. 764.
- [124] Schnitzer, M.; Preston, C.M. Supercritical Gas Extraction of a Soil with Solvents of Increasing Polarities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1987**, *51*, 639–646. <https://doi.org/10.2136/sssaj1987.03615995005-100030016x>.
- [125] Hänninen, K.I. Aliphatic structures in peat fulvic acids. *Sci. Total Environ.* **1987**, *62*, 193–200. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90501-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90501-8).
- [126] Lodygin, E.D.; Beznosikov, V.A. <sup>13</sup>C NMR and ESR study of structural and functional group characteristics of macromolecular compounds of soils. *Environmental Problems of Chemistry and Technology*, **2006**, *79*, 1478–1484. <https://doi.org/10.1134/S1070427206090163>.
- [127] Hatcher, P.G. Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.* **1987**, *11*, 31–39. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(87\)90049-0](https://doi.org/10.1016/0146-6380(87)90049-0).
- [128] Deshmukh, A.P.; Pacheco, C.; Hay, M.B.; Myneni, S.C.B. Structural environments of carboxyl groups in natural organic molecules from terrestrial systems. Part 2: 2D NMR spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2007**, *71*, 3533–3544. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.03.039>.
- [129] Hatcher, P.G.; Schnitzer, M.; Dennis, L.W.; Maciel, G.E. Aromaticity of humic substances in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1981**, *45*, 1089–1094. <https://doi.org/10.2136/sssaj1981.03615995004500060016x>.
- [130] Schnitzer, M. Soil organic matter: The next 75 years. *Soil Sci.* **1991**, *151*, 41–48. <https://doi.org/10.1097/00010694-199101000-00008>.
- [131] Piccolo, A.; Conte, P.; Cozzolino, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.* **2001**, *50*, 687–694. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00276.x>.
- [132] Huang, P.M.; Senesi, N.; Buffle, J. Structure and Surface Reactions of Soil Particles, 1<sup>st</sup> ed.; Wiley, Chichester, UK, 1998, pp. 506.
- [133] Naik, G.R. Advances in Principal Component Analysis, 1<sup>st</sup> ed.; Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 2018, pp. 252. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6704-4>.

## 9 PŘÍLOHY – RUKOPISY DOPLNĚNÉ O KOMENTÁŘE

V této části habilitační práce jsou jednotlivé přílohy odborných publikací doplněny o jejich komentáře. Nicméně je zapotřebí říci, že právě zde je to pravé místo, kde se autor může konkrétněji a déle věnovat jednotlivým experimentálním výsledkům, které jsou předmětem jednotlivých publikací. Tato část habilitační práce má rovněž nezastupitelnou úlohu právě v tom, že se lze bez jakéhokoliv omezení věnovat doposud nevyřčeným myšlenkám a názorům vycházejícím z experimentální činnosti autora. Dále lze čtenáře upozornit na mnoho zajímavých výsledků, motivaci a z ní vycházející design experimentálního přístupu, který hraje zvláště v oblasti huminové chemie jednu z klíčových rolí. Pevně věřím, že tato habilitační práce doplněná o jednotlivé komentáře bude jistým dokladem o přínosu autora v dané problematice, který vychází z konkrétní aplikace oboru fyzikální chemie, bez které by byl rozvoj v dané vědní disciplíně takřka nemožný.

# Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite

Leoš Doskočil, Laurent Grasset, **Vojtěch Enev**, Lukáš Kalina, Miloslav Pekař

*Environmental Earth Sciences*, **2015**, 73, 3873–3885.

Impact factor (2020): 2,784

JCR Category: Environmental Sciences-Scie – Q2

# Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite

Leoš Doskočil · Laurent Grasset · Vojtěch Enev ·  
Lukáš Kalina · Miloslav Pekař

Received: 13 November 2013 / Accepted: 2 September 2014 / Published online: 13 September 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Lignite can be applied directly in natural form on agricultural fields as a soil conditioner. However, there is little information on leaching of risky compounds by its interaction with water. South Moravian lignite was therefore extracted with water at 25 °C and 2.3 % of water-soluble fractions were obtained from lignite corresponding to 0.3 % of total organic carbon. All ten fractions form aromatic and aliphatic structures with oxygen-containing functional groups such as carboxyl groups, alcohols, ethers, esters, can be characterized as fulvic-like and humic-like substances. According to the XPS spectra, the fractions contain two nitrogen forms, one of which is ascribed to pyrroles and the second is related to protonated amines or quaternary nitrogen. Analysis at molecular level showed that the fractions contain compounds such as benzene carboxylic acids and their derivatives, small aliphatic diacids, fatty acids and polyols. Most of the identified molecules reflect clearly the presence of microbial remains in the lignite structure since microbial activity during coalification is well known. The differences between the

individual fractions are negligible, especially after 21 days of extraction. From environmental point of view, it seems that the identified compounds do not represent a toxic risk.

**Keywords** Lignite · Water-soluble fractions · Fulvic acid · Humic acid · Organic matter

## Introduction

Lignite is a low-rank coal which is formed from original phytomass by peatification, followed by coalification, and is considered as intermediate form between peat and bituminous coal. Lignite is mainly used for energy production but its disadvantages are low caloric value and high water content. In this regard, non-energy or non-fuel applications can represent more interesting use of this valuable raw material [e.g., a production of small acids by chemical treatments (Doskočil et al. 2014)].

Probably the most attractive way is the use of lignite as sources for humic acids in agriculture (Kučerík et al. 2003) or for the production of organic, organomineral fertilizers (generally coal-based fertilizers) and soil conditioners (Chassapis et al. 2009; Song and Schobert 1996; Pehlivan and Arslan 2007). The simplest and cheapest way is the direct application of natural lignite after milling to suitable particle sizes by spreading or ploughing. For example, a product from South Moravian lignite called Terra Clean acts as an effective soil conditioner and it is exported to some Arab countries (Honěk et al. 2009). One drawback of these applications can be related to the release of inorganic and organic components into the soil, surface and underground water as a consequence of the interaction of lignite with water (Chassapis et al. 2009). The available literature pays sufficient attention to inorganic materials (especially

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12665-014-3671-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Doskočil (✉) · V. Enev · M. Pekař  
Institute of Physical and Applied Chemistry, Brno University  
of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic  
e-mail: xcdoskocil@fch.vutbr.cz

L. Doskočil · V. Enev · L. Kalina · M. Pekař  
Materials Research Centre, Faculty of Chemistry,  
Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno,  
Czech Republic

L. Grasset  
Université de Poitiers, CNRS, UMR 6514, 40 Avenue du  
Recteur Pineau, 86022 Poitiers, France

toxic elements such as lead, arsenic, copper, cadmium, etc.) leached out from coals due to their potential environmental pollution problem for ecosystems (Petrotou et al. 2012; Wongyai et al. 2013), whereas organic components are of rather marginal interest.

Besides agriculture, lignite has also a potential application as a low-cost and effective sorbent (mainly heavy metals) for the treatment of wastewater (Doskočil and Pekař 2012). On the other hand, studies do not deal with water quality after sorption treatment of wastewater, although the contact of lignite with water always results in the release of organic matter and water yellowing. It has been proven that coals themselves are not mutagenic, but water-soluble organic matter from lignite produced an appreciable mutagenicity when the treatment was performed by chlorine sterilization (Nakajima et al. 2008). Some works have reported (McElmurry and Voice 2004; Maharaj et al. 2014; Orem et al. 1999; Finkelman et al. 2002) that groundwater can leach organic matter from Pliocene lignite and they can be hazardous to human health (e.g., urinary tract cancer, tubulointerstitial nephropathies). Long-term exposure to low concentrations of organic compounds leached from Pliocene lignite is probably one of factors in the etiology of the disease so-called Balkan endemic nephropathy (Maharaj et al. 2014).

The importance of water-extractable organic matter from lignite does not involve only the above-mentioned areas, but there are many other cases in which coal is exposed to water, e.g., coal washing processes, storage piles exposed to rain and/or water spray, transport in coal-water slurry, and disposal of coal (Nakajima et al. 2005).

Extraction studies of coal were previously performed using hot, sub- and supercritical water, but experimental conditions cannot reflect a situation occurring in nature (Vieth et al. 2008; Nakajima et al. 2005; Kashimura et al. 2004; Cheng et al. 2004).

In other previous studies, organic compounds such as phenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, and humic substances have been detected in coal washing wastewater (Berrueta et al. 1991), coal slurry transport wastewater (Reid et al. 1988) and simulated coal slurry pipelines (Godwin and Manahan 1979). But very few works deal with the water extraction of organic matter from coals at environmental temperatures and when lignite is exposed to contact with water in a batch method (Berrueta et al. 1991; Peuravuori et al. 2006).

Peuravuori et al. (2006) leached lignite with pure water and classified water-soluble organic compounds into six structural categories: (1) aliphatic acids, alcohol and ester derivatives with long carbon chains; 2) aromatic carboxylic acid and phenol derivatives; (3) aromatic condensed

PAH-type derivatives; (4) lignin signal compounds; (5) carbohydrate signal compounds (furans); and (6) N-containing compounds (aromatic amines and nitrogen heterocycles). Unfortunately, they did not detect specific compounds at the molecular level. On the other hand, compounds analyzed by Fabiańska et al. (2013) do not agree with the classification proposed by Peuravuori et al. (2006). Water-washing of Polish lignite resulted in decreased bitumen yield from the original matter due to the removal of short-chain *n*-alkanes ( $n\text{-C}_{12}\text{-}n\text{-C}_{19}$ ), the removal of some more polar compounds such as quinoline derivatives, and lower concentrations of naphthalene and alkylnaphthalenes (sometimes with naphthalene absent in the extracts) in bitumen (Fabiańska et al. 2013). Study of Maharaj et al. (2014) showed that aqueous leaching of Pliocene lignite from the countries of the former Yugoslavia yielded aliphatic compounds, phthalate esters, phenols, benzenes, heterocycles, polycyclic aromatic hydrocarbon and lignin degradation compounds that depended on the experimental conditions.

In order to predict the potential impact of interactions between coal and water that might occur in soil systems during the agricultural application of lignite, or in the waste water during sorption treatment, it is necessary to have more information on the composition of nature lignite water-soluble fractions. In this study, South Moravian lignite was subjected to water sequential extraction at 25 °C, and water-soluble fractions were characterized using a set of analytical techniques, i.e., spectrometric methods, thermochemolysis and GC–MS analysis. The combination of various techniques assures better characterization of water-soluble fractions.

## Experimental

### Material

The sample of lignite used in this study was obtained from the locality Mikulčice, Czech Republic, the mine Mír belonging to the Dubňany seam in the South Moravian Lignite Coalfield that forms northern part of the Vienna basin. This was a representative sample of standard product from this mine; its detailed characteristic, including geochemical and petrographic description, has been published elsewhere (Kučerík et al. 2003; Havelcová et al. 2012; Jelínek et al. 2011). The lignite was used after drying at 105 °C for 24 h and then let to equilibrate with ambient laboratory atmosphere at about 25 °C which resulted in the final equilibrium moisture content of about 7 % by weight. Then lignite milled was sieved to the size fraction less than 0.2 mm.



## Extractions of lignite with water

Ten grams of ground lignite and 150 ml of ultrapure water were put into a 200-ml glass flask. Nitrogen was bubbled through a lignite suspension and the content of the flask was closed under a nitrogen atmosphere. The extraction was carried out by means of a rotary shaker at temperature 25 °C for 7 days.

Every 7 days, the extract was separated from lignite by centrifugation for 10 min at 4,000 rpm and at 25 °C. After centrifugation the supernatant was filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter (MS<sup>®</sup>MCE). The filtrate was freeze-dried, the solid product was kept in the dark before it was analyzed as described below (see also Fig. S1 in Online Resource).

To the solid residue of coal, 150 ml of ultrapure water was again added and the extraction continued. The exchange of water was carried out nine times and all extractions were performed in quadruplicate. Letters marked the individual fractions in alphabetical order and subscripts indicated the number of days of extraction (that is the first fraction as fraction A<sub>7</sub>, the second fraction as fraction B<sub>14</sub>... and the last fraction as fraction J<sub>70</sub>). Extraction procedure is illustrated in detail in Fig. S2 in Online Resource.

Total organic carbon (TOC) was determined by accredited testing laboratory Povodí Moravy using a Shimadzu TOC 5000A analyzer according to Czech technical standard SOP 300-ČSN 75 7515.

## UV–Vis spectrometry

UV–Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/VIS spectrophotometer in the range of 200–700 nm. Freeze-dried fractions were dissolved and measured in a 10-mm quartz cuvette against ultrapure water as blank.

## FTIR spectrometry

The FTIR spectra were recorded on pellets prepared by pressing a mixture of 1.5 mg of the individual fractions and 400 mg of dried spectrometry grade KBr using a Nicolet iS50. Spectra were recorded in the range 4,000–400  $\text{cm}^{-1}$  with a 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution and 256 scans were performed on each sample.

## XPS analysis

The samples of fractions were ground in an agate mortar and molded into a disc with a diameter of 10 mm. XPS spectra were measured with a Kratos AXIS Ultra DLD spectrometer using a monochromatic Al K $\alpha$  source operating at 150 W (10 mA, 15 kV). High-resolution spectra

were obtained using an analysis area of  $\sim 300 \times 700 \mu\text{m}$  and 20 eV pass energy with the step size 0.1 eV. The analyzer chamber pressure was less than  $2 \times 10^{-7}$  Pa. The Kratos charge neutralizer system was used for all analyses. The spectra were corrected using the adventitious hydrocarbon peak at 284.6 eV.

## Fluorescence spectrometry

For fluorescence measurements, solutions of 10 mg L<sup>-1</sup> of organic carbon were prepared from freeze-dried fractions in phosphate buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). All spectra were performed on a fluorescence spectrophotometer Fluorolog, with a scan speed of 600 nm min<sup>-1</sup>, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. The following spectroscopical indexes were obtained:

Zsolnay index: Emission spectra were collected between 350 and 650 nm, with an excitation wavelength of 240 nm, using the method proposed by Zsolnay et al. (1999).

Milori index: Emission spectra were recorded over a range of 460–650 nm using an excitation wavelength of 440 nm, and the total area under these spectra was also calculated (Milori et al. 2002).

Emission spectra were obtained over a range of 380–550 nm using an excitation wavelength of 360 nm and excitation spectra were collected over a range of 300–500 nm applying an emission wavelength of 520 nm.

The excitation–emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range 300–600 nm, and the excitation wavelength increment was set at 5 nm.

The primary and secondary inner filter effects were corrected. The fluorescence intensity (IF) values (in CPS/MicroAmplitude) of samples were corrected using method of Lakowicz (2006).

## Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis

The thermochemolysis procedure was based on the off-line procedure developed by Grasset and Ambès (1998). The individual freeze-dried fractions from lignite were mixed together. The resulting sample (about 350 mg) was placed in a ceramic boat and thoroughly soaked with 2 ml of a 50 % w/w solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH; Acros Organics, New Jersey, USA) in methanol. After 1 h of impregnation, the sample was transferred to a 60  $\times$  3 cm i.d. Pyrex tube and heated at 400 °C (30 min isothermal). Thermochemolysis products were swept using N<sub>2</sub> (flow rate at 100 ml min<sup>-1</sup>) to a trap containing dichloromethane in the ice-water bath. When pyrolysis was completed, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator.

## Derivatization of chloroform extract from freeze-dried fractions

The individual freeze-dried fractions were collected together, dissolved and the aqueous sample solution was several times extracted with chloroform. The extracts were combined, dried over  $\text{MgSO}_4$  and silylated with a mixture of BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) and TMCS (trimethylchlorosilane) at 60 °C for 15 min.

## Gas chromatography–mass spectrometry

The products of thermochemolysis and the chloroform extract were analyzed by capillary GC using a Hewlett–Packard 6890 GC (split injector, 250 °C; Flame Ionization Detector (FID), 300 °C) with a fused silica capillary column (SGE BPX 5, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and helium as a carrier gas. The GC was temperature programmed from 60 to 300 °C at 5 °C  $\text{min}^{-1}$  isothermal for 20 min final time. The GC–MS analyses were performed on a Trace GC Thermo Finnigan coupled to a Thermo Finnigan Automass (with the same GC conditions). The MS was operated in the electron impact mode with a 70 eV ion source energy and the ion separation was operated in a quadrupolar filter. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards) and literature data. Quantification was done with *n*-nonadecane as an internal standard.

## Results and discussion

### Yields

The water extract obtained from the South Moravian lignite was yellow in color. After the freeze-drying process the first fraction A<sub>7</sub> was white in color unlike the others which were light brown. The difference in color may be explained by a higher content of salts in the first fraction. Yields of extracts gradually decreased as can be seen in Table 1. Fraction J<sub>70</sub> contained an insignificant amount of solids and therefore further extractions were not performed. Thus, about 2.7 % of material from lignite can be released into water. Organic part of the water-soluble fraction represented about 0.3 % of TOC from the original lignite. Peuravuori et al. (2006) reported that the total amount of water-soluble organic compounds from lignite accounted for about 0.38 %. Lower values of TOC in fractions A<sub>7</sub> and B<sub>14</sub> indicate a higher salt content and there was no big change of TOC from fraction C<sub>21</sub> to fraction J<sub>70</sub>. Inorganic and organic species whose presence was registered by FTIR analysis, were responsible for the conductivity of

water-extractable fractions. Table 1 clearly shows that the conductivity greatly decreased from fraction A<sub>7</sub> to fraction B<sub>14</sub>, subsequently slightly decreased, reaching about 15  $\mu\text{S}/\text{cm}$  from fraction G<sub>49</sub>. Extracts were weakly acid and the fraction A<sub>7</sub> was the most acidic. The results indicate that initially fractions rich in salts were released followed by a predominance of fractions containing organic compounds which were gradually released from the complex coal structure.

### UV–Vis spectroscopy

UV–Vis absorbance spectra of water extract from lignite were featureless and characterized by the absence of recognizable maxima and/or minima with a decreasing absorbance with increasing acquisition wavelength (not shown). This spectral behavior is typical for fulvic acid and humic acid (Baes and Bloom 1990; Li et al. 2009).

Fractions absorbed light significantly at wavelengths between 200 and 400 nm. It indicates the vast majority of the chromophores including aromatic groups with various degrees and types of substitution such as monosubstituted and polysubstituted phenols and different aromatics acids (Korshin et al. 1997). The lower  $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$  ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to at 203 nm) indicates aromatic rings substituted predominantly with aliphatic functional groups or a scarce substitution in the aromatic rings, whereas higher  $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$  ratio is associated with the presence of aromatic rings substituted with carbonyl, carboxyl and (especially) ester carboxylic groups (Korshin et al. 1997; Fuentes et al. 2006). Table 2 shows an increase in  $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$  ratios ranging from 0.55 in fraction A<sub>7</sub> to 0.61 in fractions from E<sub>35</sub> to J<sub>70</sub>. These results show that the aromatic structures in fractions (especially up to fraction E<sub>35</sub>) have a higher degree of substitution with oxygen-containing functional groups with ascending order of fractions, although the differences of values are minimal from the fraction C<sub>21</sub>. The degree of substitution in aromatic rings does not alter from the fraction E<sub>35</sub> because consecutive values of  $E_{\text{ET}/\text{Bz}}$  ratios were identical.

The quotient  $E_{250/365}$  (the ratio of absorbance at 250 nm to at 365 nm) is used as an indicator of aromaticity and molecular size (Peuravuori and Pihlaja 1997). In general, if the ratio  $E_{250/365}$  increases the aromaticity and molecular size decrease. The results listed in Table 2 indicate that basically the aromaticity and molecular size increase slightly for individual fractions in ascending order, although the increase can be considered as negligible starting from the fraction C<sub>21</sub>.

SUVA<sub>254</sub> (specific UV absorbance) is defined as the UV absorbance of a water-soluble sample at 254 nm normalized for TOC concentration (Weishaar et al. 2003). It is a useful parameter for estimating the dissolved aromatic

**Table 1** Chemical characteristics of water-extractable fractions from lignite

Extract	Fractions									
	A <sub>7</sub>	B <sub>14</sub>	C <sub>21</sub>	D <sub>28</sub>	E <sub>35</sub>	F <sub>42</sub>	G <sub>49</sub>	H <sub>56</sub>	I <sub>63</sub>	J <sub>70</sub>
Yields (mg)	193.7	21.1	20.4	7.2	10.1	8.1	3.3	2.7	2.9	1.1
pH	5.16	5.67	5.79	5.63	5.63	5.96	5.54	5.79	5.44	5.39
Conductivity (μS/cm)	1143.0	137.4	59.1	27.8	31.3	26.8	14.5	14.6	15.0	14.9
TOC (g/kg)	41	170	346	363	347	380	316	345	323	–

**Table 2** Spectroscopic data of water-extractable fractions from lignite

Fraction	UV–Vis parameter			Fluorescence parameter	
	E <sub>ET</sub> /E <sub>Bz</sub>	E <sub>250/220</sub>	SUVA <sub>254</sub>	Milori (10 <sup>8</sup> )	Zsolnay
A <sub>7</sub>	0.55	4.62	0.32	0.61	0.19
B <sub>14</sub>	0.56	5.78	0.43	1.31	0.19
C <sub>21</sub>	0.59	4.49	0.45	2.41	0.22
D <sub>28</sub>	0.59	4.14	0.43	3.16	0.25
E <sub>35</sub>	0.61	3.99	0.54	4.13	0.35
F <sub>42</sub>	0.61	4.07	0.35	3.26	0.28
G <sub>49</sub>	0.61	3.47	0.45	3.49	0.38
H <sub>56</sub>	0.61	3.57	0.37	4.13	0.34
I <sub>63</sub>	0.61	3.49	0.39	3.51	0.35
J <sub>70</sub>	0.61	3.68	0.40	–	–

carbon content in aquatic systems (Weishaar et al. 2003). The lowest value of SUVA<sub>254</sub> was observed in the fraction A<sub>7</sub>. Other fractions displayed more or less higher values of SUVA<sub>254</sub> with minimal variation.

Porous structure of South Moravian lignite (Pekář 2009) is known to consist mainly of macropores (95 %). It therefore seems that initially molecules freely entrapped in pores or weakly attached to the outer surface were released. Subsequently, molecules adsorbed on the pore or outer surface could be released due to swelling and opening of the lignite structure. It should be noted that the size of molecules and aromatic substituents with oxygen-containing functional groups did not change significantly among fractions (from the fraction C<sub>21</sub> to the fraction J<sub>70</sub>).

Absorbance above 550 nm in the UV–Vis spectra was minimal or equal to zero. Hence, we can suppose that fractions did not comprise extended conjugation in aliphatic or polyaromatic structures as well as to the absence of metal complexes and/or inter-, or intramolecular donor–acceptor complexes (Fuentes et al. 2006).

**FTIR**

The FTIR spectra of the fractions show mainly the existence of oxygen-containing functional groups, though the appearance of gypsum and kaolinite made the

interpretation of the FTIR spectra difficult. The differences between FTIR spectra of the individual fractions were insignificant. Gypsum was revealed by the bands at 3,543, 671 and 603 cm<sup>-1</sup> (Painter et al. 1978) and it was the most pronounced in the fraction A<sub>7</sub>. Kaolinite was related to bands at 3,696, 3,620, 534 and 470 cm<sup>-1</sup> (Iordanidis et al. 2012). The interference of gypsum gradually declined in accordance with results of conductivity and TOC (see Table 1).

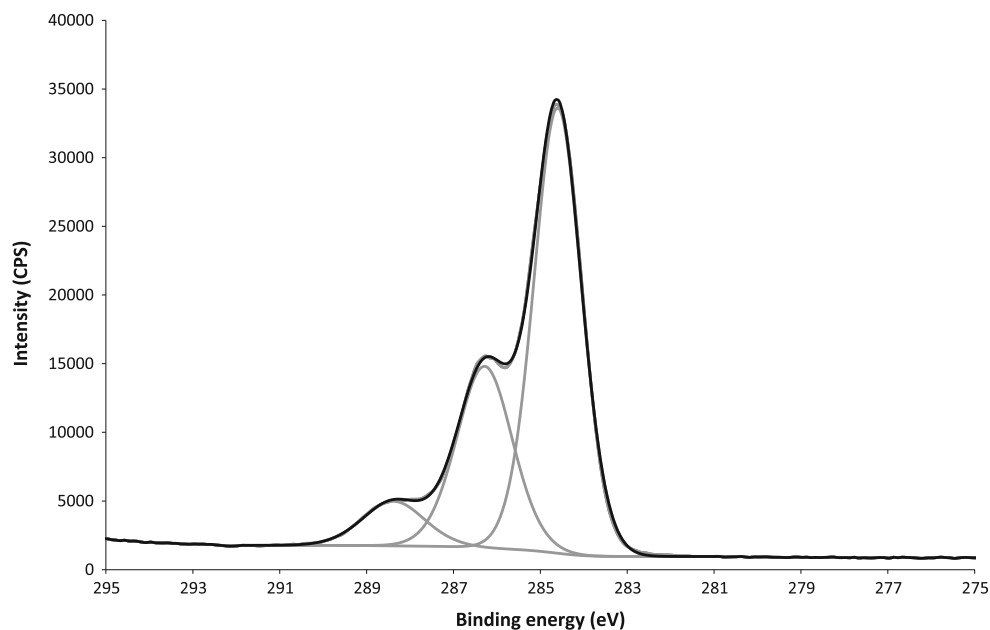
Interpretation of the absorption bands was done as described in the literature (Milata and Segla 2007). The presence of aliphatic chains was revealed by the bands at 2,925 and 2,852 cm<sup>-1</sup> which were attributed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups. The deformation vibrations of methylene and methyl groups occurred in the spectrum at 1,451 and 1,369 cm<sup>-1</sup>. The band at around 3,400 cm<sup>-1</sup> was attributed to OH groups. The appearance of C=C aromatic stretching at 1,510 cm<sup>-1</sup> (and probably at 1,611 cm<sup>-1</sup>) pointed out aromatic molecules. The bands at 1,265 and 1,220 cm<sup>-1</sup> were related to C–O and O–H vibrations from phenols, carboxyl groups and aryl ethers. Carboxylic groups were responsible to the band at 1,710 cm<sup>-1</sup>. The band at 1,120 cm<sup>-1</sup> was ascribed to the C–O stretching of secondary alcohols, ethers and inorganic matter; and the band at 1,033 cm<sup>-1</sup> was attributed to C–O stretching of primary alcohols and Si–O bonds. These results are consistent with that from UV–Vis spectra.

**XPS analysis**

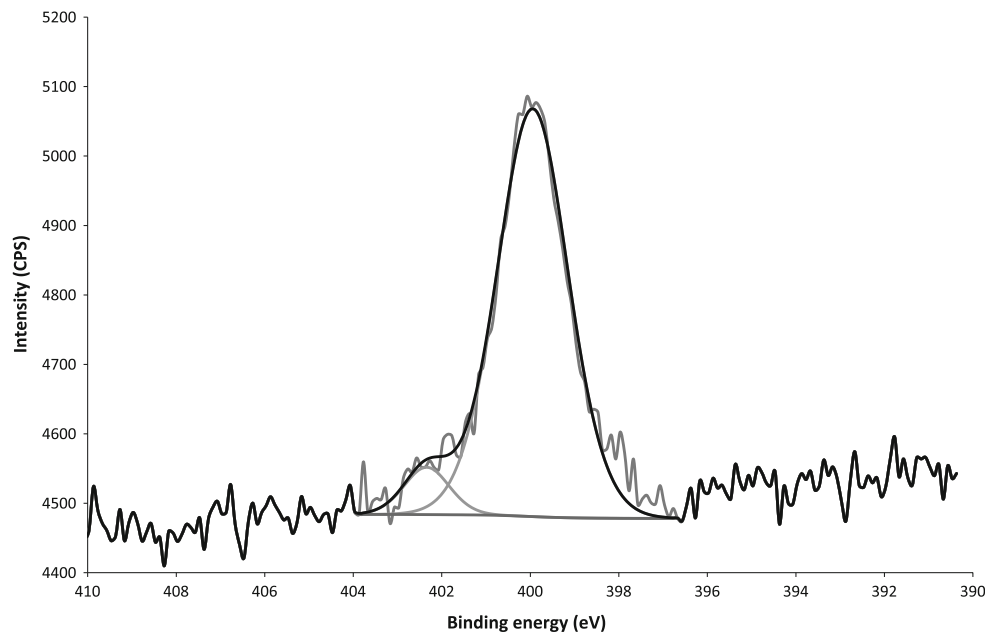
The XPS analysis was used to obtain qualitative information about the chemical states of carbon, nitrogen and sulphur in the lignite fractions.

Figure 1 shows example of XPS carbon C 1 s spectra of the fraction F<sub>42</sub>. For all fractions, the results indicate that three different structural groups occurred at 284.6, 286.3, and 288.4 eV. The 284.6 eV peak represents contributions from both aromatic and aliphatic carbon (C–C, C=C, C–H). The 286.3 eV peak represents carbon bound to oxygen by a single bond (e.g., C–O, C–OH, etc.), but it can also include carbon bound to nitrogen or sulphur (C–N, C–S). The

**Fig. 1** Example XPS carbon (C 1 s) spectrum for the fraction F<sub>42</sub>



**Fig. 2** Example XPS nitrogen (N 1 s) spectrum for the fraction F<sub>42</sub>

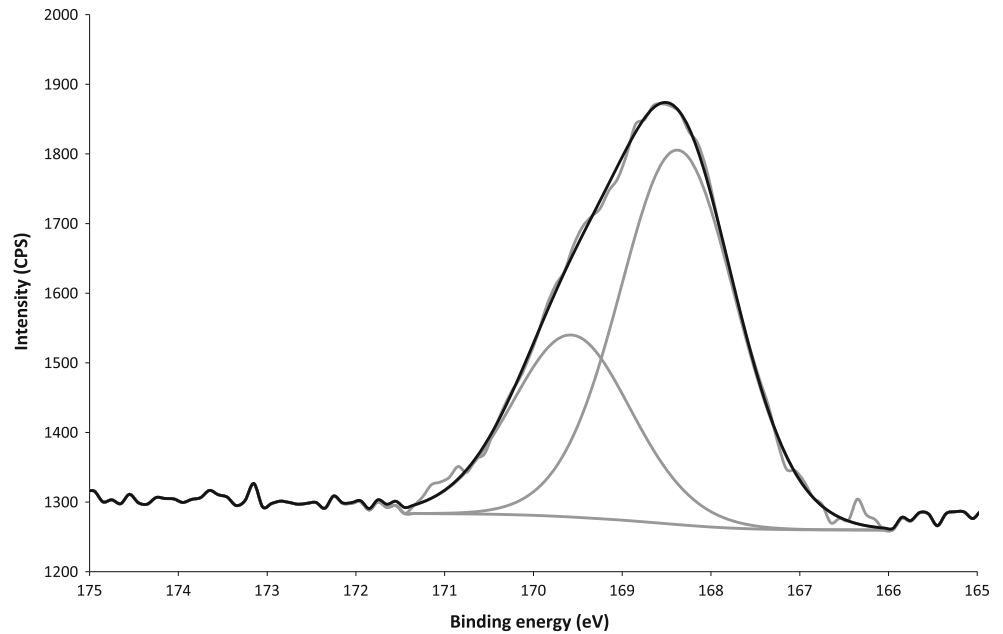


288.4 eV peak corresponds mainly to carbon bound to oxygen by three bonds such as carboxyl and ester functional group (O=C–O).

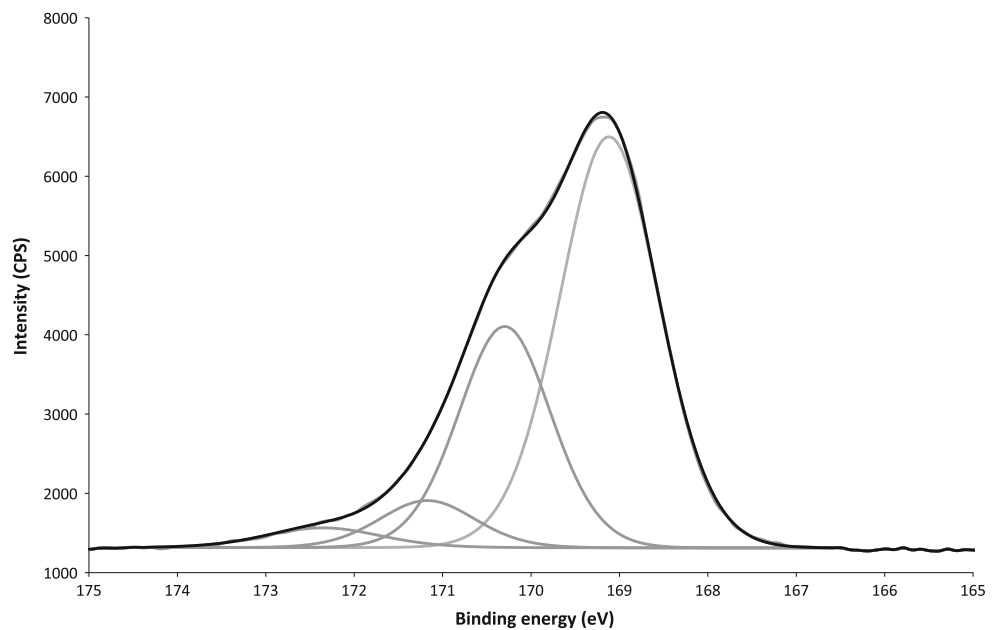
For the nitrogen N 1 s signal, two peaks were applied to curve fitting as shown in Fig. 2. The 400.0 eV peak can be assigned to pyrroles, pyridones, amides, secondary and tertiary amines and imides. Although these species cannot be unequivocally distinguished with each other due to very close binding energies (Kelemen et al. 1999, 2006; Zhu et al. 1997), based on several published statements

(Cagniant et al. 1998; Gorbaty et al. 1990; Kelemen et al. 1994) the peak at 400.0 eV was considered predominantly as pyrrolic. The 402.3 eV peak can be related to protonated amines, quaternary N and oxidized nitrogen (N–O) (Templier et al. 2012; Straka et al. 2000). Quaternary nitrogen arises from the interaction (protonation) of pyridinic nitrogen and adjacent phenolic groups (Kelemen et al. 1994). We are inclined rather to the opinion that the 402.1 eV peak is involved in protonated amines, or quaternary nitrogen. Amino containing functional groups were

**Fig. 3** Example XPS sulphur (S 2p) spectrum for the fraction C<sub>21</sub>



**Fig. 4** XPS sulphur (S 2p) spectrum of the fraction A<sub>7</sub>



also observed in the work of Finkelman et al. (2002) in the aqueous leachate from lignite. The same results were observed in all fractions.

Typical sulphur XPS spectrum is shown in Fig. 3 and contains peak at 169.1 eV (S 2p<sub>3/2</sub>) belonging to sulfate group and can be attributed to gypsum which was also detected by means of FTIR. In the case of fraction A<sub>7</sub>, sulphur was determined in two chemical states (Fig. 4). The second peak obtained at 171.2 eV cannot be unambiguously ascribed to given binding energy.

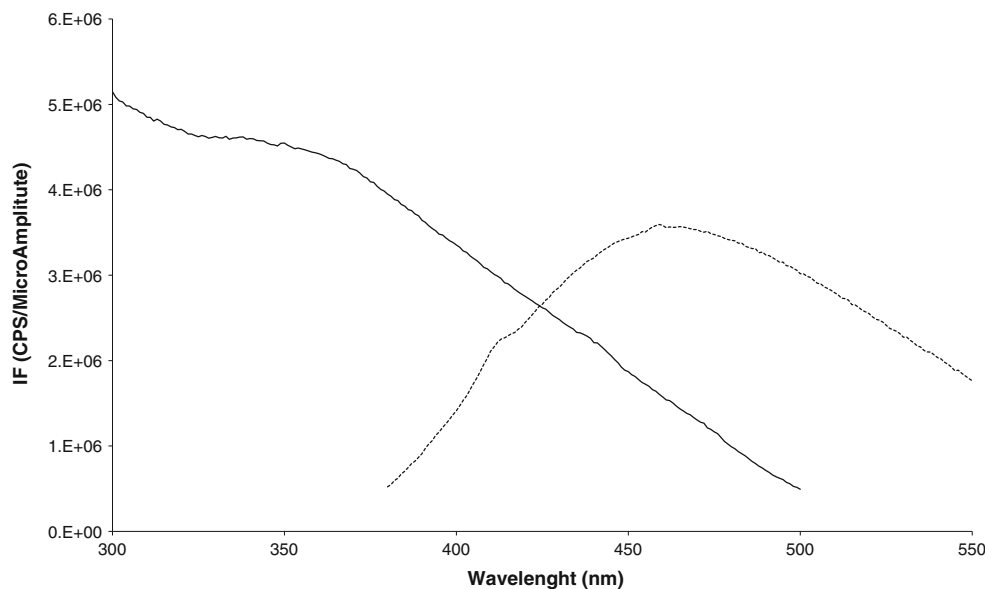
#### Fluorescence spectroscopy

Emission spectra (Fig. 5) are characterized by a broad band with the maximum centered at a wavelength (equal to 459 nm) that was identical for all fractions. The shoulder at 410–415 nm in the spectra is due to the Raman band of water. The values of the maximum are in the range typical for fulvic acids (Senesi et al. 1991; Plaza et al. 2003).

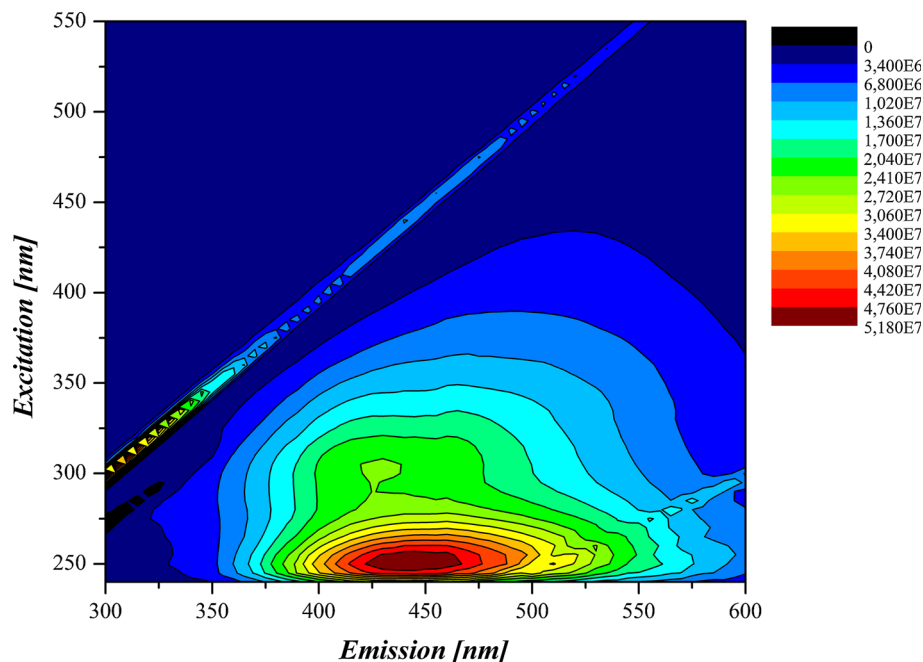
Excitation spectra of all fractions (Fig. 5) are less clearly resolved than emission spectra, and are



**Fig. 5** Fluorescence emission (dashed line) and excitation (solid line) spectrum of the fraction E<sub>35</sub>



**Fig. 6** Example of EEM spectrum of the fraction C<sub>21</sub>



characterized with unclear maximum values. Excitation spectra are closely paralleling the absorbance spectra, see above.

The fluorescence EEM spectrum of water-extractable fractions is presented in Fig. 6. The spectra of all fractions were characterized by the persistence of two fluorescent centers situated at distinctive positions which are marked as peak A and peak C. Both fluorescence peaks (A and C), centered at the excitation/emission wavelength pair of about 250/440 nm and about 300/425 nm, respectively, were detected in all the fractions. According to previous

studies (Chen et al. 2003; Rodríguez et al. 2014), peak A and C are located in fluorescent regions attributed to humic-like substances with the former assigned to fulvic and fulvic-like structures, while the latter is attributed to humic-like materials. Fluorescence intensity (IF) in the individual fractions shows higher values for fulvic-like structures than in the case of humic-like structures. Higher intensity associated with fulvic-like materials may be indicative of simpler structures with less condensed aromatic rings or conjugation in aliphatic chains (Senesi et al. 1991; Fuentes et al. 2006). The position of peak C in the

region of excitation wavelengths suggests that carboxylic groups predominate over phenolic groups (Rodríguez et al. 2014).

To determine the degree of aromaticity in the individual fractions by means of fluorescence spectroscopy, Milori and Zsolnay indexes were utilized. The smallest degree of aromaticity was determined for the fraction A<sub>7</sub>, B<sub>14</sub> (eventually in the fraction C<sub>21</sub>), see Table 2. In other fractions, differences in the values of indices were relatively small.

We consider that aromaticity of individual fractions compared with one another, both for the Milori index and the Zsolnay index, were not significantly varied. With respect to the results of SUVA<sub>254</sub> and E<sub>250/365</sub>, we can conclude that the aromaticity increased slightly for fractions in ascending order, although the increase can be considered to be negligible from the fraction C<sub>21</sub>. This may be explained by concluding that the first fractions (up to the fraction C<sub>21</sub>) formed smaller molecules with aliphatic structures, and low aromaticity moieties, which were dissolved in preference.

Fulvic acids can form the soluble chelates/complex with nutrients which can then move by diffusion and mass flow to plant roots (Tan 2003). On the other hand, fulvic acids (generally water-soluble organic fractions) in free form and/or in form of complexes with nutrients might be washed up into bottom layers of soil or might pollute the groundwater. Thus, loss of nutrients from topsoils and groundwater contaminations cannot be utterly excluded if lignite is applied as the fertilizer or the soil conditioners.

#### Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis

The products of thermochemolysis were characterized by the predominance of aromatic compounds (77 % of the total identified molecules), i.e., benzene carboxylic acids and their derivatives (appearing as methyl esters), especially methoxybenzoic acids, and further to a lesser extent, methoxybenzenes. A smaller contribution (23 % of the total identified molecules) corresponded to aliphatic compounds, consisting of short-chain diacids, fatty acids and polyols. The identified compounds are listed in Table 3.

The most abundant compounds were the methyl esters of 3,4-dimethoxy-, 3,4,5-trimethoxy- and 4-methoxybenzoic acids. They may be considered as the end products from oxidation of side chains during microbial degradation of lignin, and as pristine components of the humic structure (Lehtonen et al. 2000). However, it must be stated that the origin of many benzene carboxylic acid methyl esters can also be partly explained on the basis of secondary reactions induced by TMAH as it has been reported (Tanczos et al. 1999). The methoxybenzenes, which were detected in lower amounts, have an uncertain origin. Molecules of

**Table 3** List of assigned compounds and their abundance in the mixture of fractions after thermochemolysis

Identified compounds	Abundance (nmol/g sample)
Succinic acid, dimethyl ester	7.8
Methyl succinic acid, dimethyl ester	3.7
Glutaric acid, dimethyl ester	4.8
1,2-Dimethoxybenzene	2.2
Adipic acid, dimethyl ester	2.0
1,2,6-Trimethoxyhexane	8.7
1,2,3-Trimethoxybenzene	2.3
3-Methoxybenzoic acid, methyl ester	7.7
1,2,4-Trimethoxybenzene	3.0
4-Methoxybenzoic acid, methyl ester	16.0
Trimethyl propan-1,2,3-tricarboxylate	8.3
3-Methoxy-4-methylbenzoic acid, methyl ester	2.6
4-Methoxybenzeneacetic acid, methyl ester	2.1
Dulcitol, hexamethyl ether	8.5
3-Hydroxymandelic acid, dimethyl ether, methyl ester	5.4
3,5-Dimethoxybenzoic acid, methyl ester	2.5
Veratric acid, methyl ester	82.9
3,4-Dimethoxybenzeneacetic acid, methyl ester	5.0
3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester	16.1
Tetradecanoic acid, methyl ester	1.4
3,4-Dihydroxymandelic acid, dimethyl ether, methyl ester	13.9
Hexadecanoic acid, methyl ester	2.6

1,2-dimethoxybenzene and 1,2,3-trimethoxybenzene are not obligatory specific only to lignin but they can also be derived from other biopolymers such as carbohydrates (including 1,2,4-trimethoxybenzene) and tannins (Frazier et al. 2003).

The aliphatic diacids released after thermochemolysis consisted of succinic acid, glutaric acid, methylsuccinic acid and adipic acid. Tricarboxylic acid (propan-1,2,3-tricarboxylic acid) was also detected. The occurrence of such acids was previously reported by other authors utilizing various methods as alkaline hydrolysis, oxidation processes or thermochemolysis of humic substances (Doskočil et al. 2014; Hänninen and Niemelä 1992; Estournel-Pelardy et al. 2013). They are considered as cross-linkages between aromatic structures of humic substances (Doskočil et al. 2014). It is known that methyl succinic acid can arise from cleavage of an aromatic ring (Joll et al. 2003). The regular aliphatic diacids, particularly succinic, glutaric and adipic acids, could be more probably considered as products of biological degradations. These acids are very common among natural compounds as they are direct (succinic acid) or secondary products of the intermediate metabolism (citric acid cycle or glyoxylate cycle) of animal, vegetable

and microbial cells (Templier et al. 2005). Glutaric and adipic acids are produced during methanogenic fermentation of aromatic substrates that form phenol or benzoate as an intermediate (Nanny and Ratasuk 2002).

Fatty acids, as methyl ester, were observed in minor portion among thermochemolysis products and they consist of *n*-C<sub>14</sub> and *n*-C<sub>16</sub>. These short-chain *n*-fatty acids (< C<sub>20</sub>) are ubiquitous in living kingdom (Zelles 1999) and they were probably released by scission of ester moieties in humic substances. Two polyols, dulcitol and 1,2,6-tri-hydroxyhexane (appearing as methyl ether), were found among products and carbohydrates reduced during the diagenesis can be considered as the precursors of these polyols (Vlčková et al. 2009).

#### Analysis of chloroform extract from freeze-dried fractions

Table 4 shows the results of GC–MS analysis of the chloroform extract from freeze-dried fractions. The data revealed the presence of aromatic compounds (72 % of the total identified molecules), including benzoic acids and 3-vanilpropanol, and aliphatic compounds (28 % of the total identified molecules), including fatty acids and glycerol.

The benzoic acids may represent free products resulting from microbial degradation of lignin which were adsorbed on lignite and/or trapped in the lignite structure. The same acids (excluding benzoic acid) were detected in thermochemolysis products as methyl esters. In this regard, benzoic acids can occur in free form and bound via ester/ether linkages to bigger molecules. The aromatic compounds can

be divided into the three types of lignin monomers units: guaiacyl (isovanillic acid, 3-vanilpropanol), *p*-hydroxyphenyl (4-hydroxybenzoic acid) and syringyl lignin (syringic acid). The quantitative and qualitative predominance of guaiacyl units indicates the presence of gymnosperm lignin. Benzoic acid may be derived from various sources because it is a common intermediate in the anaerobic degradation of aromatic compounds (Nanny and Ratasuk 2002). 3-vanilpropanol represents microbially degraded guaiacyl lignin with the preserved side chain greater than a 2-carbon unit. The major aliphatic products comprised of fatty acids, ranging from *n*-C<sub>9</sub> to *n*-C<sub>18</sub>, of which *n*-C<sub>9</sub>, *n*-C<sub>16</sub> and *n*-C<sub>18</sub> were the most prominent. From the fatty acids, *n*-C<sub>14</sub> and *n*-C<sub>16</sub> were observed during thermochemolysis as mentioned above. Thus, besides the fatty acids bound via ester to the low-molecular-weight humic substances, free fatty acids were also detected in the fractions, which were released from lignite during the extraction with water, even though fatty acids are hydrophobic molecules and are not readily soluble in water. These results are in accordance with the observations of Fabiańska and Kurkiewicz (2013), who recorded that water-washing of lignite results in the removal of several groups of compounds (such as aliphatic hydrocarbons, naphthalene, alkylnaphthalenes, slightly polarity compounds and others) or a change in their distribution. Only one unsaturated fatty acid, palmitoleic acid, was found. Glycerol was detected in extract as well which may be related to products of biological degradations.

It seems that the identified compounds do not represent an environmental or a health risk with respect to acute toxicity (Peuravuori et al. 2006) when lignite would be applied as the soil conditioner. However, long time exposure and/or accumulation could potentially lead to risks like kidney damage, the development of urothelial carcinomas (Maharaj et al. 2014; Orem et al. 1999).

Unlike the results of the XPS analysis, no nitrogen-containing compounds were observed in the thermochemolysate and the chloroform extract. This fact may be explained by the absence of free nitrogen-containing compounds in fractions from lignite, or conversely by the presence nitrogen-containing compounds in the form of large molecules that do not undergo a scission of bonds under conditions used during the thermochemolysis.

The compounds identified from the thermochemolysis and the chloroform extract qualitatively indicate that they can be related to the constituents of humic substances (Reid et al. 1988; Lehtonen et al. 2000, 2004; Estournel-Pelardy et al. 2013) in accordance with the results of the fluorescence EEM spectra. Several of these identified molecules may act as metal-binding ligands. For example, succinic acid type structures bound within the molecules may participate in multidentate coordination with metals. In this

**Table 4** List of assigned compounds and their abundance in the chloroform extract from the GC–MS analysis

Compounds	Abundance (nmol)
Benzoic acid	10.1
Glycerol	2.4
Nonanoic acid	8.4
Decanoic acid	4.9
4-Hydroxybenzoic acid	16.4
Dodecanoic acid	4.5
3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid (isovanillic acid)	37.1
3-Vanilpropanol	4.4
Tetradecanoic acid	5.2
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (syringic acid)	3.8
Palmitelaidic acid	3.4
Palmitic acid	7.8
Stearic acid	7.6

regard, water-soluble organic fractions can serve as complexing agents of nutrients for plants or the fractions can cause the depletion of nutrients.

## Conclusions

South Moravian lignite contains about 2.7 % water-extractable fractions and in those fractions about 0.3 % of original TOC is released. First, inorganic salts such as gypsum, kaolinite (especially the fraction A<sub>7</sub>) and smaller molecules containing probably aliphatic moieties and structures with low aromaticity, are particularly dissolved (the fractions A<sub>7</sub>, B<sub>14</sub>). Then, slightly larger molecules are predominantly released (from the fractions C<sub>21</sub> to the fraction J<sub>70</sub>) whose aromaticity, molecular size and degree of substitution of aromatic rings with oxygen-containing functional groups are identical in principle. Thus after 14 days of extractions the fractions may be collectively characterized the parameters such as TOC (316–380 g/kg), pH (5.39–5.96), E<sub>ET/Bz</sub> (0.59–0.61), E<sub>250/220</sub> (3.47–4.49), SUVA<sub>254</sub> (0.37–0.54), Milori index (2.41–4.13·10<sup>8</sup>) and Zsolnay index (0.22–0.38). Moreover, it should be noted that overall variances among the fractions are minimal. All fractions are characterized by the presence of fulvic acids and low-molecular weight humic-like acids. Likewise, all fractions include nitrogen-containing compounds. Analysis at molecular level showed that the fractions contain compounds such as benzene carboxylic acids and their derivatives, short-chain aliphatic diacids, fatty acids and polyols. Most of the identified molecules reflect clearly the presence of microbial remains in the lignite structure since microbial activity during coalification is well known. In the water-extractable fractions, the fatty acids are found to be both free and bound via ester to the low-molecular weight humic substances.

Water-extractable fractions form compounds which may act as complexing agents and sources of nutrients for plants. On the other hand, the fractions might also take away nutrients from topsoils into bottom layers of soil or might pollute the groundwater. It seems that the identified compounds do not represent an acute toxic risk from an environmental viewpoint. However, nitrogen-containing compounds can raise concerns and further study is needed to focus on this. Applications of lignite as a soil conditioner will also call for a study on the penetration of compounds leached from lignite into plants and food.

**Acknowledgments** This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

## References

- Baes AU, Bloom PR (1990) Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: influence of solvent and pH. *Soil Sci Soc Am J* 54:1248–1254
- Berrueta LA, Fernández LA, Vicente F (1991) Fluorescence study of the solubilization of benzo[a]pyrene: application to its detection in coal washing waters. *Anal Chim Acta* 243:115–119
- Cagniant D, Gruber R, Boudou JP, Bilem C, Bimer J, Salbut PD (1998) Structural characterization of nitrogen-enriched coals. *Energy Fuel* 12:672–681
- Chassapis K, Roulia M, Tsirigoti D (2009) Chemistry of metal–humic complexes contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral fertilization. *Int J Coal Geol* 78:288–295
- Chen J, LeBoeuf EJ, Dai S, Gu B (2003) Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50:639–647
- Cheng L, Zhang R, Bi J (2004) Pyrolysis of a low-rank coal in sub- and supercritical water. *Fuel Process Technol* 85:921–932
- Doskočil L, Pekař M (2012) Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Process Technol* 101:29–34
- Doskočil L, Grasset L, Válková D, Pekař M (2014) Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel* 134:406–413
- Estournel-Pelardy C, El-Mufleh Al Husseini A, Doskočil L, Grasset L (2013) A two-step thermochemolysis for soil organic matter analysis. Application to lipid-free organic fraction and humic substances from an ombrotrophic peatland. *J Anal Appl Pyrol* 104:103–110
- Fabiańska MJ, Kurkiewicz S (2013) Biomarkers, aromatic hydrocarbons and polar compounds in the Neogenelignites and gangue sediments of the Konin and Turoszów Brown Coal Basins (Poland). *Int J Coal Geol* 107:24–44
- Finkelman RB, Orem W, Castranova V, Tatu CA, Belkin HE, Zheng B, Lerch HE, Maharaj SV, Bates AL (2002) Health impacts of coal and coal use: possible solutions. *Int J Coal Geol* 50:425–443
- Frazier SW, Nowack KO, Goins KM, Cannon FS, Kaplan LA, Hatcher PG (2003) Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis GC-MS. *J Anal Appl Pyrol* 70:99–128
- Fuentes M, González-Gaitano G, García-Mina JM (2006) The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org Geochem* 37:1949–1959
- Godwin J, Manahan SE (1979) Interchange of metals and organic matter between water and subbituminous coal or lignite under simulated coal slurry pipeline conditions. *Environ Sci Technol* 13:1100–1104
- Gorbaty ML, George GN, Kelemen SR (1990) Chemistry of organically bound sulphur forms during the mild oxidation of coal. *Fuel* 69:1065–1067
- Grasset L, Amblès A (1998) Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J Anal Appl Pyrol* 47:1–12
- Hänninen K, Niemelä K (1992) Alkaline degradation of peat humic acids. Part II. Identification of hydrophilic products. *Acta Chem Scand* 46:459–463
- Havelcová M, Sýkorová I, Trejtnarová H, Šulc A (2012) Identification of organic matter in lignite samples from basins in the Czech Republic: geochemical and petrographic properties in relation to lithotype. *Fuel* 99:129–142
- Honěk J, Staněk F, Hoňková K, Jelínek J (2009) Coal seams in the South Moravia Lignite Coalfield. *Acta Montan Slovaca* 14:43–54 (in Czech)

- Iordanidis A, Schwarzbauer J, Georgakopoulos A, van Lagen B (2012) Organic geochemistry of amynteo lignite deposit, northern Greece: a multi-analytical approach. *Geochem Int* 50:159–178
- Jelínek J, Staněk F, Vizi L, Honěk J (2011) Evolution of lignite seams within the South Moravian Lignite Coalfield based on certain qualitative data. *Int J Coal Geol* 87:237–252
- Joll CA, Huynh T, Heitz A (2003) Off-line tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis of model compound aliphatic and aromatic carboxylic acids: decarboxylation of some ortho- and/or para-substituted aromatic carboxylic acids. *J Anal Appl Pyrol* 70:151–167
- Kashimura N, Hayashi J, Chiba T (2004) Degradation of a Victorian brown coal in sub-critical water. *Fuel* 83:353–358
- Kelemen SR, Gorbaty ML, Kwiatek PJ (1994) Quantification of nitrogen forms in argonne premium. *Energy Fuel* 8:896–906
- Kelemen SR, Freund H, Gorbaty ML, Kwiatek PJ (1999) Thermal chemistry of nitrogen in kerogen and low-rank coal. *Energy Fuel* 13:529–538
- Kelemen SR, Afeworki M, Gorbaty ML, Kwiatek PJ, Sansone M, Walters CC, Cohen AD (2006) Thermal transformations of nitrogen and sulfur forms in peat related to coalification. *Energy Fuel* 20:635–652
- Korshin GV, Li C, Benjamin MM (1997) Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Res* 31:1787–1795
- Kučerík J, Pekař M, Klučáková M (2003) South-Moravian Lignite—potential source of humic substances. *Pet Coal* 45:58–62
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Baltimore
- Lehtonen T, Peuravuori J, Pihlaja K (2000) Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 424:91–103
- Lehtonen T, Peuravuori J, Pihlaja K (2004) Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium atmospheres. *Anal Chim Acta* 511:349–356
- Li A, Hu J, Li W, Zhang W, Wang X (2009) Polarity based fractionation of fulvic acids. *Chemosphere* 77:1419–1426
- Maharaj SVM, Orem WH, Tatu CA, Lerch HE III, Szilagyi DN (2014) Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ Geochem Health* 36:1–17
- McElmurry SP, Voice TC (2004) Screening methodology for coal-derived organic contaminants in water. *Intern J Environ Anal Chem* 84:277–287
- Milata V, Segla P (2007) Vybrané kapitoly molekulovej spektroskopie. Slovenská technická univerzita, Bratislava
- Milori DMBP, Martin-Neto L, Bayer C (2002) Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci* 167:739–749
- Nakajima T, Kanda T, Fukuda T, Takanashi H, Ohki A (2005) Characterization of eluent by hot water extraction of coals in terms of total organic carbon and environmental impacts. *Fuel* 84:783–789
- Nakajima T, Hasegawa H, Nakamata S, Takanashi H, Ohki A (2008) Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: effect of chlorination. *Fuel* 87:3132–3136
- Nanny MA, Ratasuk N (2002) Characterization and comparison of hydrophobic neutral and hydrophobic acid dissolved organic carbon isolated from three municipal landfill leachates. *Water Res* 36:1572–1584
- Orem WH, Feder GL, Finkelman RB (1999) A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignite by groundwater: preliminary investigation. *Int J Coal Geol* 40:237–252
- Painter PC, Coleman MM, Jenkins RG, Whang PW, Walker PL (1978) Fourier transform infrared study of mineral matter in coal. A novel method for quantitative mineralogical analysis. *Fuel* 57:337–344
- Pehlivan E, Arslan G (2007) Removal of metal ions using lignite in aqueous solution—Low cost biosorbents. *Fuel Process Technol* 88:99–106
- Pekař (2009) Fluoride anion binding by natural lignite (South Moravian Deposit of Vienna Basin). *Water Air Soil Poll* 197:303–312
- Petrotou A, Skordas K, Papastergios G, Filippidis A (2012) Factors affecting the distribution of potentially toxic elements in surface soils around an industrialized area of northwestern Greece. *Environ Earth Sci* 65:823–833
- Peuravuori J, Pihlaja K (1997) Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal Chim Acta* 337:133–149
- Peuravuori J, Žbáňková P, Pihlaja K (2006) Aspect of structural features in lignite humic acids. *Fuel Process Technol* 87:829–839
- Plaza C, Senesi N, Polo A, Brunetti G, García-Gil JC, D’Orazio V (2003) Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil Tillage* 74:179–190
- Reid MC, Davis JW, Minear RA, Sayler GS (1988) Fulvic acid constituents of coal slurry transport wastewater. *Water Res* 22:127–131
- Rodríguez JF, Schlenger P, García-Valverde M (2014) A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Sci Total Environ* 476–477:718–730
- Senesi N, Miano TM, Provenzano MR, Brunetti G (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci* 152:259–271
- Song Ch, Schobert HH (1996) Non-fuel uses of coals and synthesis of chemicals and materials. *Fuel* 75:724–736
- Straka P, Marinov S, Tyuliev G (2000) X-ray photoelectron spectroscopy of nitrogen and sulfur functionalities in organic substance of coal. *Acta Montana, B* 10:36–44
- Tan KH (2003) Humic matter in soil and the environment. Dekker, New York
- Tanczos I, Rendl K, Schmidt H (1999) The behavior of aldehydes—produced as primary pyrolysis products—in the thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *J Anal Appl Pyrol* 49:319–327
- Templier J, Derenne S, Croué JP, Largeau C (2005) Comparative study of two fractions of riverine dissolved organic matter using various analytical pyrolytic methods and a  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR approach. *Org Geochem* 36:1418–1442
- Templier J, Miserque F, Barré N, Mercier F, Croué JP, Derenne S (2012) Is nitrogen functionality responsible for contrasted responses of riverine dissolved organic matter in pyrolysis? *J Anal Appl Pyrol* 97:62–72
- Vieth A, Mangelsdorf K, Sykes R, Horsfield B (2008) Water extraction of coals – potential for estimating low molecular weight organic acids as carbon feedstock for the deep terrestrial biosphere. *Geochem* 39:985–991
- Vlčková Z, Grasset L, Antošová B, Pekař M, Kučerík J (2009) Lignite pre-treatment and its effect on bio-stimulative properties of respective lignite humic acids. *Soil Biol Biochem* 41:1894–1901
- Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ Sci Technol* 37:4702–4708



- Wongyai K, Garivait S, Donald O (2013) A geochemistry study of arsenic speciation in overburden from Mae Moh Lignite Mine, Lampang, Thailand. *Environ Earth Sci* 70:2047–2053
- Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fert Soils* 29:111–129
- Zhu Q, Money SL, Russell AE, Thomas KM (1997) Determination of the fate of nitrogen functionality in carbonaceous materials during pyrolysis and combustion using X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Langmuir* 13:2149–2157
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38:45–50

Na tomto místě bych rád podotknul, že jednotlivé myšlenky vycházející z publikační činnosti autora jsou synergickou součástí celé této habilitační práce, přičemž konkrétněji je lze bezesporu spatřit v kapitolách jednotlivých intermezz. Pevně věřím, že právě teď je ta vhodná chvíle, kdy se budu moci věnovat jednotlivým komentářům uveřejněných vědeckých prací, a to z pohledu mého přínosu v dané problematice, odbornosti a v neposlední řadě i pedagogické činnosti, jelikož značná část publikovaných článků odstartovala mnoho zajímavých témat, ať už řešených či budoucích vysokoškolských prací vedených na Ústavu fyzikální a spotřební chemie.

Na druhou stranu se pokusím v jednotlivých komentářích vyzdvihnout ty experimentální výsledky a z nich vyplývající závěry, které jsou z mého pohledu přínosem a obohacením mnohých vědeckých skupin zabývajících se touto problematikou.

Jak již bylo diskutováno dříve (viz kapitola 4, str. 37), použití lignitu (oxyhumolitu) jako paliva v sobě nese značné ekonomické a environmentální problémy, které lze spatřit v jeho nízké výhřevnosti, jež je obvykle doprovázena enormními emisemi skleníkových plynů a polévatého prachu. Naproti tomu, pro vysoký obsah HK a vodou extrahovatelných frakcí OM se jeví jako vhodnější jeho neenergetické využití v podobě tzv. půdních kondicionérů, které tvoří samostatnou skupinu tzv. půdních pomocných látek (PPL).

Touto problematikou se zabývá odborný článek: „Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite“; kde jsem spoluautorem.

Organická hmota hnědého uhlí, zvláště pak jeho nejmladšího představitele lignitu je převážně tvořena vysokomolekulárními HK, avšak z environmentálního hlediska se zdají být důležitějšími právě ty frakce OM, které jsou vyluhovatelné vodou. Obecně se jedná o nízkomolekulární FK, případně o strukturně jednodušší aromatické sloučeniny s jistou mírou variability v substituci jejich aromatických jednotek karboxylovými, hydroxylovými, alkoxylovými či esterovými funkčními skupinami. Experimentální výsledky postupného loužení jihomoravského lignitu naznačují, že tento kaustobiolit obsahuje přibližně 3 hm. % vodou extrahovatelných sloučenin, přičemž jednotlivé frakce obsahovaly 4–40 hm. % celkového organického uhlíku (TOC). Z hlediska fluorescenční spektrometrie se jednotlivé frakce vyznačovaly velmi podobnými motivy ve svých excitačně-emisních spektrech (EEM). Tyto fluorescenční domény lze podle jejich polohy jednoznačně klasifikovat jako *fulvic-* a *humic-like*, z nichž druhý jmenovaný měl v EEM spektrech podobu méně výrazného maxima či raménka. Na molekulární úrovni lze fluorescenční doménu A ( $\alpha$ ) – *fulvic-like* přiřadit následující konstituční jednotky: (i) kyselina salicylová (2-hydroxybenzoová kyselina); (ii) kyselina gentisová (2,5-dihydroxybenzoová kyselina); (iii) kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina). Nicméně je nutné poznamenat, že výše zmíněné strukturní jednotky se obvykle nacházejí ve formě hydrolyzovatelných taninů vázaných na sacharidové části původní OM. Fluorescenční doména C ( $\alpha$ ) – *humic-like* je v případě vodou extrahovatelných frakcí OM výlučně spojována s produkty degradace ligninu, které jsou charakterizovány významnými strukturními modifikacemi v postranních řetězcích fenylypropanových jednotek.

Jak se ukázalo, tak instrumentální metoda *thermochemolýzy* hraje nezastupitelnou roli při identifikaci jednotlivých organických sloučenin, které byly přítomny v lyofilizátech vodných výluhů jihomoravského lignitu. Mimo jiné byla získaná data doplněna o výsledky GC-MS chloroformových extraktů získaných z příslušných lyofilizátů. Tyto výsledky byly již podrobně diskutovány v kapitole 4 této habilitační práce. Nicméně se pokusím o krátké shrnutí těchto experimentálních výsledků. Tyto analýzy na molekulární úrovni jasně dokládají, že vodou extrahovatelná OM jihomoravského lignitu je převážně tvořena strukturně jednoduchými aromatickými kyselinami a jejich deriváty, alifatickými di-kyselinami s krátkými řetězci, mastnými kyselinami a v neposlední řadě i polyoly. Nicméně je zapotřebí říci, že žádná analyzovaná sloučenina nepředstavuje potencionální environmentální či toxické riziko, a to v případě aplikace lignitu, jako vhodného půdního kondicionéru.

Použití lignitu jako vhodného půdního kondicionéru jsme se zabývali v rámci řešeného projektu TH02030073 „Revitalizace zemědělské půdy v oblastech ČR ohrožených suchem“, financovaného Technologickou agenturou ČR v rámci programu Epsilon. Jak vyplývá z předešlého komentáře, tak hlavní rolí lignitu je především zvýšit obsah půdní OM, která by sekundárně vedla k „nastartování“ její přirozené tvorby v půdním prostředí. Podpora humifikačního procesu v půdách postižených suchem je především dána schopností lignitu zlepšovat mnohé fyzikální, chemické a v neposlední řadě i biologické vlastnosti půdy. Z fyzikálně-chemického pohledu se jedná o tvorbu tzv. půdních agregátů, jejichž primární vlastností je významně podpořit vznik drobtovité a porézní struktury půdy, jež je schopna lépe a efektivněji zadržovat vodu v podobě přirozených dešťových srážek. To je zejména způsobeno tím, že lignit resp. další zástupci těchto kaustobiolitů (oxyhumolit, leonardit atd.) obsahují nemalá množství hydrofilních funkčních skupin, které se významně podílejí na vzniku vodíkových vazeb mezi substrátem a vodou volné, pevně vázané či semikrystalické povahy. Tyto interakce se mohou dále uplatňovat mezi půdními částicemi organominerálního komplexu a aplikovanou PPL. Avšak z dlouhodobého hlediska hraje lignit nezastupitelnou úlohu v tom, že v průběhu jeho loužení ve vodném prostředí jsou uvolňovány takové organické sloučeniny, které jsou považovány za signální molekuly půdní bioty a představitelů vyšších rostlin. Tímto je nastartována složitá kaskáda biochemických reakcí, kterou lze umístit do pomyslného středu společenstva živých organismů a neživé části půdního ekosystému.

# The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins

Leoš Doskočil, **Vojtěch Enev**, Miloslav Pekař, Jaromír Wasserbauer

*Organic Geochemistry*, **2016**, 95, 34–40.

Impact factor (2020): 3,607

JCR Category: Geochemistry & Geophysics-Scie – Q2



# The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins



Leoš Doskočil\*, Vojtěch Enev, Miloslav Pekař, Jaromír Wasserbauer

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno 612 00, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 24 July 2015

Received in revised form 13 January 2016

Accepted 18 February 2016

Available online 26 February 2016

### Keywords:

Lipid

Lignite

Humic substances

Excitation–emission matrix

Fluorophore

## ABSTRACT

Lipids were extracted from seven different lignite samples and subsequently characterized using spectrometric methods. Excitation–emission matrix (EEM) or total luminescence spectrometry was here used for the first time to study lipids extracted from lignites more extensively. Spectrometric characterization showed that lipids differ from each other depending on the origin of the lignite in which they occur. EEM spectra can be used as fingerprints not only for distinguishing between lipids but also lignites. Lipids contain fluorophores, which participate in the total fluorescence of lignites; some of these also participate in the fluorescence of humic substances. The typical maxima (260–275/370–440 nm) of EEM lipid spectra lie within the A' region, which can be ascribed to aromatic ring systems and steroids. Lipids from South Moravian lignite also contain maxima in the H (255/305 nm) and V (430/475 nm) regions, in contrast to other samples. The first could be related to single aromatic systems and substituents such as carboxyl and carbonyl and the latter is probably the result of intramolecular charge-transfer states.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Lignites are low-rank coals which are formed from original phytomass by peatification followed by coalification and are considered as intermediate forms between peat and bituminous coal. According to one model, coal may be considered a three-dimensional cross-linked macromolecular structure in which relatively lower molecular weight compounds are trapped. These small molecules have been defined as the mobile component in coals and are extractable using organic solvents (Iino, 2000). Another model assumes that coal consists only of coal molecules forming huge associates through non-covalent interactions. An extraction yield of more than 50% can be achieved by using a suitable solvent mixture including an additive for some bituminous coals. General consensus suggests that the structure of lignite is better described by the first of these models (often called a two-phase model) (Iino, 2000). In non-energy applications, lignites have been studied mainly as raw materials for the sorption of toxic elements (Doskočil and Pekař, 2012), for the production of small compounds (Doskočil et al., 2014), and for agricultural purposes (Chassapis et al., 2009; Doskočil et al., 2015).

\* Corresponding author. Tel.: +420 541 149 330; fax: +420 541 149 398.  
E-mail address: [doskocil@fch.vutbr.cz](mailto:doskocil@fch.vutbr.cz) (L. Doskočil).

A considerable part of lignite is formed by humic substances (traditionally divided into humic acid, fulvic acid, and humin), of which humic acids predominate (Doskočil and Pekař, 2012). Humic substances are naturally occurring biomolecules ubiquitous, not only in sediments (peat, coal, Leonardite) but also in water and soil, and are the subject of intense research.

In contrast to humic substances, lipids represent only a minor component of coals. They can be defined as organic substances that are effectively insoluble in water but extractable with non-polar solvents such as chloroform, hexane, benzene, and toluene. Clearly, this broad definition encompasses a wide variety of compound classes (such as fatty acids and their derivatives, waxes, terpenes, steroids etc.). It should be noted that geochemists sometimes use the term bitumen as a synonym for lipid (Lesueur, 2009). Lipids or bitumens are commonly extracted from coals by a variety of different methods including Soxhlet extraction (Papanicolaou et al., 2000), accelerated solvent extraction (Životić et al., 2008), and extraction in an ultrasonic bath (Fabiánska, 2004), using a solvent or solvent mixtures such as dichloromethane, chloroform, isohexane/acetone, and dichloromethane/ethanol. Most coals commonly have lipid contents ranging from 2 to 10 wt.% of the coal (Papanicolaou et al., 2000; Stefanova et al., 2011; Havelcová et al., 2012; Fabiánska and Kurkiewicz, 2013). The extracts comprise a complex mixture of nonpolar compounds with potential contributions from compounds produced by living organisms as



well as the degradation products of those compounds. The characterization of these extracts on the molecular level by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry largely reveals the presence of *n*-alkanes, fatty acids, sesquiterpenoids, diterpenoids, non-hopanoid triterpenoids, hopanoids, and steroids (Stefanova et al., 2002, 2011; Fabiańska, 2004; Životić et al., 2008; Havelcová et al., 2012; Stojanović and Životić, 2013).

Ultraviolet–visible (UV–Vis) and Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry are the most frequently used tools in spectroscopic characterization and can be very useful in the study of organic matter (Fuentes et al., 2006). A similarly reliable technique is fluorescence spectrometry, which provides important information on the structural nature of organic substances (e.g. functional groups, polycondensation, aromaticity) based on variances in the positions, shifts and intensities of fluorescence peaks. In addition, it is a simple, rapid, sensitive and non-destructive method requiring only a small volume of sample at a low concentration. In the literature, several fluorescence techniques have been applied to the study of coal extracts – from conventional emission spectrometry (emission scan fluorescence) to more recent and comprehensive methods such as synchronous fluorescence spectrometry and total luminescence spectrometry (or excitation–emission matrix, EEM) (von der Dick and Kalkreuth, 1986; Mille et al., 1988; Kashimura et al., 2004). Of these fluorescence techniques, synchronous fluorescence spectrometry is probably the most widely used in the study of extracts of raw coals and modified coals (preheating, oxidation, demineralization etc.), coal liquefaction, and tar (von der Dick and Kalkreuth, 1986; Mille et al., 1988; Kister and Pieri, 1996; Kashimura et al., 2004). This technique has been successfully applied in the determination of polyaromatic hydrocarbon families or certain polyaromatic hydrocarbons (Kister and Pieri, 1996; Matuszewska and Czaja, 1996).

In their study of extracts, Mille et al. (1988) reported that it is possible to clearly elucidate the differences among coals of different ranks using fluorescence spectrometry. However, it is not clear whether fluorescence spectrometry can also be used to fingerprint extracts (such as lipids) from various lignites, due to the paucity of available experimental data. The utilization of total luminescence spectrometry for the analysis of coal extracts is of marginal interest (von der Dick and Kalkreuth, 1986), in spite of the fact that EEM provides a global and complete view of fluorescence spectra from substances in the form of three-dimensional contour plots of fluorescence intensity as a function of excitation and emission wavelengths (Rodríguez et al., 2014).

The goal of this work was to extract and characterize lipids from different lignites by means of rapid and relatively simple spectroscopic methods. In the present work, excitation–emission matrix (EEM) spectrometry was used for the first time to extensively study lipids extracted from lignites and to show that this approach is a valuable source of new knowledge relating not only to lipids but also to lignites and their major components (i.e. humic acids).

## 2. Materials and methods

Seven lignite samples from different coal basins were selected for the extraction of lipids. The selected basins were Chucurovo and Maritza East (Bulgaria), Krepoljin and Kostolac (Serbia), Konin (Poland), and the South Moravian Coalfield (the northern part of the Vienna basin in the Czech Republic). Two lignites from the Kazimierz (sample K1) and Lubstów (sample L2) mines belonging to the Konin basin were also subject to extraction; the sample codes (K1 and L2) correspond to the designation used in Fabiańska and Kurkiewicz (2013). Detailed characteristics of all the lignites, including their geochemical and petrographic descriptions, have been published elsewhere (Stefanova et al., 1995, 2002, 2005; Havelcová et al., 2012; Fabiańska and Kurkiewicz, 2013; Stojanović and Životić, 2013; Doskočil et al., 2015).

The lignite samples were finely milled (to a grain size of under 0.2 mm) and ca. 40 g were then placed in a cellulose thimble and Soxhlet extracted for 36 h using trichloromethane as a solvent. The lipid fractions isolated from the lignites were collected and concentrated by a rotary evaporator and the resulting dark brown extracts were dried in a desiccator with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Elemental compositions of the extracted lipid fractions were determined using a CHNS-O EA 3000 Elemental Analyzer. The % oxygen content was calculated by difference and the data obtained were corrected for moisture and ash content.

UV–Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/Vis spectrophotometer by recording the absorption spectra between 200 nm and 900 nm. Samples were measured in a 10 mm quartz cuvette and were blanked against chloroform.

FTIR spectra from lipids were obtained in Attenuated Total Reflection (ATR) mode using a Nicolet iS50 spectrometer. Samples were dissolved in chloroform at a concentration of ca. 120 mg/l. All spectra were recorded over the range 4000–400 cm<sup>-1</sup> at 4 cm<sup>-1</sup> resolutions and were the averages of 128 scans. The spectrum for air on a clean dry ATR diamond crystal was used as the background for the infrared measurements. Thermo Scientific Omnic spectroscopy software was used to obtain the spectra and Advanced ATR algorithm corrections were applied to band intensity distortion, peak shifts, and non-polarization effects.

For fluorescence measurements, lipids were dissolved in chloroform at a concentration of 75 mg/l. All spectra were performed on a Fluorolog fluorescence spectrophotometer with a scan speed of 600 nm/min, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. The excitation–emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range 250–600 nm, with the emission and excitation increment set at 5 nm. The sample cell with lipid solution was kept at a temperature of 20 °C during each measurement. Primary and secondary inner filter effects were corrected. The fluorescence intensity values of samples (in counts per second, CPS) were corrected using the method devised by Lakowicz (2006).

**Table 1**

Lipid yields, results of elemental analysis, and calculated ratios.

Origin of lipid	Lipid yield (wt.%)	Elemental analysis (at.%)				Atomic ratios		FTIR intensity ratios	
		H	C	O <sup>diff</sup>	N	H/C	O/C	I <sub>CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub></sub> <sup>a</sup>	I <sub>Ar</sub> /I <sub>Al</sub> <sup>b</sup>
SML <sup>c</sup>	2.1	58.4	37.0	4.6	0.00	1.58	0.12	2.11	0.12
Chucurovo	9.0	54.0	39.3	6.8	0.00	1.37	0.17	1.47	0.55
Maritza East	7.8	56.7	35.1	8.1	0.04	1.62	0.23	2.52	0.10
Kostolac	1.0	62.1	33.7	4.1	0.03	1.84	0.12	3.06	0.09
Krepoljin	3.4	54.7	37.6	7.8	0.00	1.46	0.21	1.60	0.20
K1	2.3	62.9	33.1	4.0	0.01	1.90	0.12	5.19	0.05
L2	3.8	61.1	35.2	3.7	0.01	1.74	0.11	3.83	0.06

<sup>a</sup> FTIR ratio calculated as ratio of intensity at 2918 cm<sup>-1</sup> to intensity at 2955 cm<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> FTIR ratio calculated as ratio of intensity at 1510 cm<sup>-1</sup> to intensity at 2918 cm<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Yields and elemental analysis

The lipid extraction yields and elemental analyses obtained from Soxhlet extraction with chloroform are shown in Table 1. These data represent mean values from two replicates.

The content of free lipids in lignites ranged from 1% to 9% depending on the type of the lignite. The highest extraction yields (9.0% and 7.8%) were obtained for lipids isolated from the Chucurovo and Maritza East lignites from Bulgaria. In contrast, the lowest yields (1.0% and 2.1%) were observed for lipids extracted from the Kostolac and South Moravian lignites. These lipid contents are in the same ranges as previously reported for coals (Papanicolaou et al., 2000; Stefanova et al., 2011; Havelcová et al., 2012; Stojanović and Životić, 2013). Fabiańska and Kurkiewicz (2013) reported that there is no clear relationship between lignite lithotype/maceral composition and extraction yield, nor between a particular brown coal mine and lignite extraction yield. It should be noted that the procedure we used only extracts free lipids.

Elemental compositions and H/C and O/C atomic ratios of lipids isolated from the lignites (Table 1) show that the lipids studied in this work are mainly composed of hydrogen (about 59 at.%), carbon (about 36 at.%), and a subordinate amount of oxygen (about 6 at.%). Nitrogen is either absent or represents a minor component of lipids. Apparently nitrogen compounds are either poorly extracted by chloroform or form the integral part of lignite structure. The H/C ratios attest to the prevailing aliphatic character of the lipids. Lipid isolated from the K1 lignite exhibited the strongest aliphatic character, while the greatest degree of aromaticity was observed for lipids extracted from the Chucurovo lignite. O/C ratios represent the amounts of oxygen-containing functional groups in the lipids (Table 1) and indicate that these moieties are generally low in the lipids from our sample set. The highest O/C ratio was found for lipid isolated from the Maritza East lignite.

#### 3.2. UV–Vis spectrometry

The UV–Vis absorbance spectra of chloroform extracts from the lignites are shown in Fig. 1. The spectra (except those for lipids extracted from the K1 and L2 lignites) are featureless and characterized by the absence of maxima and/or minima; absorbance decreases with increasing acquisition wavelength. These spectra contain only broadly recognizable shoulders. In the spectrum of

lipid from the South Moravian lignite, a pronounced shoulder is visible in the range from 325 nm to 365 nm, which is centered at around 330 nm and 350 nm. The shoulder at around 330 nm is also present in the spectra of lipids from the K1, L2 and Maritza East lignites. Lipids from the K1 and L2 lignites have two prominent absorption maxima, the first located at 265 nm and the second at 275 nm. These maxima can be related to two or more different chromophores occurring in these lipids. First-order derivatives of the absorption spectra revealed that other lipids also absorb at 275 nm. However, in those cases, the absorption appears as a shoulder due to the effects of other chromophores. Thus, the identical absorption values for shoulders and peaks indicate that lipids contain structural units of similar chemical origin. Absorbance above 500 nm in UV–Vis spectra is minimal or equal to zero and hence, we can assume that the extracts do not comprise extended conjugations in aliphatic or polyaromatic structures (Fuentes et al., 2006).

#### 3.3. FTIR spectrometry

The ATR-FTIR spectra of lipid samples are shown in Fig. 2. Although the samples were extracted from lignites from different basins with variable depositional settings, strong similarities among the ATR-FTIR spectra of lipids were observed. Interpretation of the absorption bands was performed as described in the literature (Milata and Segľa, 2007). The spectra are mainly characterized by bands of aliphatic groups. Very pronounced bands at 2918  $\text{cm}^{-1}$  and 2849  $\text{cm}^{-1}$  were ascribed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups. Bands of asymmetric (2955  $\text{cm}^{-1}$ ) and symmetric (2868  $\text{cm}^{-1}$ ) stretching in methyl groups were only observed for lipids extracted from the Chucurovo and Kostolac lignites; occurring as shoulders in the rest of the samples. The presence of long carbon chains with four atoms, or more than four atoms (e.g. fatty acids), was revealed by the band at 720  $\text{cm}^{-1}$ , which is absent in lipids from the Chucurovo lignite. These results suggest that methyl groups predominate over methylene groups in lipids from the Chucurovo lignite, which tends to comprise a greater number of shorter carbon chains. This is supported by the  $I_{\text{CH}_2/\text{CH}_3}$  ratio (the ratio of the intensity at 2918  $\text{cm}^{-1}$  to the intensity at 2955  $\text{cm}^{-1}$ ), which was used to estimate the length and degree of branching of aliphatic chains. The intensity ratio (Table 1) shows that longer and less branched aliphatic chains are found in lipids from the K1 lignite compared with the other samples. Deformation vibrations of methylene and methyl groups are also present in spectra from all the samples at 1463  $\text{cm}^{-1}$  and 1377  $\text{cm}^{-1}$ .

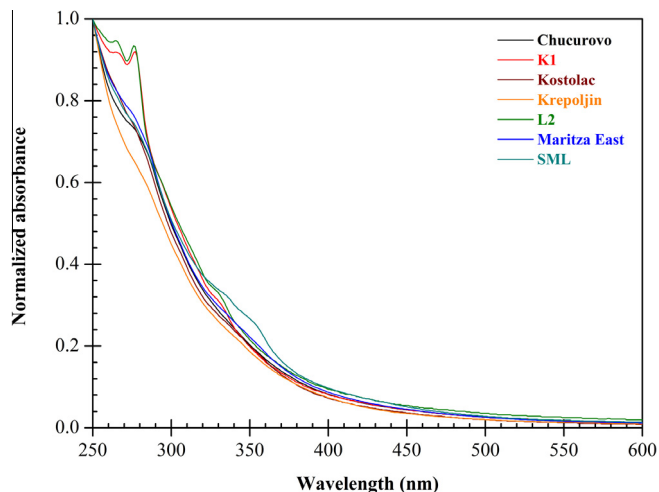


Fig. 1. UV–Vis spectra of lipids extracted from various lignite samples. The spectra are only displayed in the 250–600 nm range.

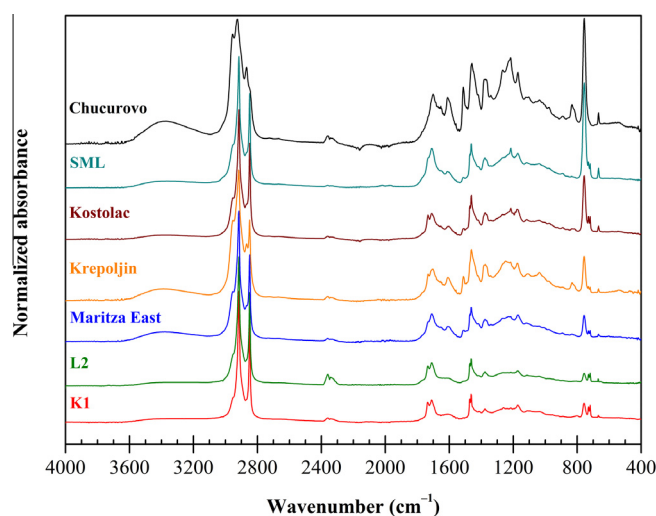


Fig. 2. FTIR spectra of lipids extracted from various lignite samples.

The bands at  $1610\text{ cm}^{-1}$  and  $1510\text{ cm}^{-1}$  were assigned to C=C aromatic ring stretch groups with the most intense bands observed in lipids from the Chucurovo lignite. Three out-of-plane C–H deformation bands were found in the  $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  region and these were assigned to aromatic structures with isolated aromatic hydrogens ( $891\text{ cm}^{-1}$ ), two adjacent hydrogens per ring ( $833\text{ cm}^{-1}$ ) and four adjacent hydrogens ( $756\text{ cm}^{-1}$ ). The first two of these bands are missing in the spectra of lipids from the K1 and L2 lignites. Of all the spectra, the highest intensity for the band at  $756\text{ cm}^{-1}$  was found in lipids isolated from the Chucurovo and South Moravian lignites, reflecting the occurrence of di-substituted aromatic rings. The degree of aromaticity was determined using the  $I_{A_1}/I_{A_2}$  ratio (the ratio of the intensity at  $1510\text{ cm}^{-1}$  to the intensity at  $2918\text{ cm}^{-1}$ ). Aromaticity is highest for lipids extracted from the Chucurovo lignite and the lowest for lipid extracted from the K1 lignite. These results are in good agreement with the elemental analysis (and H/C ratios) listed in Table 1.

All the lipids in our samples set have low oxygen contents, which is reflected by the lower intensities of the bands of OH groups (occurring at around  $3363\text{ cm}^{-1}$ ) in the spectra. The presence of esters was confirmed by the band at  $1736\text{ cm}^{-1}$  in all spectra (except the spectrum for lipid from the Chucurovo lignite). The bands observed at  $1710\text{ cm}^{-1}$  were assigned to carboxylic groups and the shoulder at around  $1653\text{ cm}^{-1}$  to conjugated carbonyl groups. Several bands are situated in the range  $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ , which can be attributed to other oxygen-containing functional groups. In this zone, the two most intense bands at  $1172\text{ cm}^{-1}$  and  $1220\text{ cm}^{-1}$  are related to the C–O stretching of phenols and ethers, the C–O stretching and O–H bending of carboxylic acids, phenoxy structures, and ethers. The band at  $1267\text{ cm}^{-1}$  is attributed to C–O stretching in aryl ethers. The appearance of bands at  $1116\text{ cm}^{-1}$  and  $1038\text{ cm}^{-1}$  indicate the presence of alcohols (secondary and primary) and aliphatic ethers.

### 3.4. Fluorescence spectrometry

The fluorescence spectra or EEM contour maps of the lipids (see Fig. 3) were not corrected for Rayleigh scattering peaks, appearing in the form of diagonal bands. First order and second order Rayleigh scattering peaks occur at the same wavelength as the excitation light and twice this wavelength, respectively.

The first notable observation from the EEM spectra is that lipids contain fluorophores which ultimately participate in the fluorescence of lignites. Individual EEM spectra are characterized by peaks of maximum intensity which differ in their number and position, and correspond to specific fluorophores or fluorophore families. The values of the fluorescence intensities and excitation–emission wavelength pairs of the main peaks in the EEM spectra from our sample set are presented in Table 2. The maxima are mainly located at excitation wavelengths in the ultraviolet region (around 260 nm). In the visible region (at an excitation wavelength 430 nm) only one maximum was observed out of our whole sample set (the South Moravian lignite). Several fluorescence peaks have been reported previously in the literature, such as peak A at 240–260/400–460 nm (excitation/emission wavelength pair), peak C at 320–360/420–460 nm, peak M at 290–310/370–410 nm, peak B at 270–280/300–315 nm, and peak T at 270–280/345–360 nm (Birdwell and Engel, 2010).

From the domains described (Fig. 3) the fluorescence of lipids lies predominantly in the region of peak A, which is characteristic of humic substances (Rodríguez et al., 2014; Enev et al., 2014). Because lipids have, in most cases, lower emission wavelengths compared to humic substances (440 nm and less), we chose the designation A' for all maxima located in the ultraviolet region (except for the maximum at 255/305 nm). A certain degree of similarity between the positions of the peak A and peak A' regions in

the EEM spectra suggests that some lipids can contribute their fluorophores to the total fluorescence of humic substances in the ultraviolet region of peak A. Unfortunately, no attention has been paid so far to spectrometric characterization of lipids extracted from humic acids, despite the fact that lipids have recently been the subject of relatively intensive study (Kohl and Rice, 1999; Chilom et al., 2009). The maximum at 255/305 nm for lipids from the South Moravian lignite represents essentially an isolated fluorophore (or fluorophores) in the ultraviolet region; therefore, we denote the maximum of this fluorescent domain as peak H.

Likewise, the maximum observed in the visible region in lipids from the South Moravian lignite has is not seen in the other EEM lipid spectra. Coble (1996) introduced the terminology peak C for EEM spectra of humic substances if their maximum is situated in the visible region at excitation wavelengths in the range of 300–400 nm. However, there are maxima having excitation wavelengths higher than 400 nm (including those for lipids as well as humic acids isolated from lignites) (Enev et al., 2014; Tamamura et al., 2015). It is evident that the origin of these peaks is different to that of peak C (Enev et al., 2014) and we therefore propose the designation V for this region ( $\lambda_{\text{ex}} \geq 400\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 470\text{ nm}$ ), based on excitation in the violet region of the visible spectrum. The comparison of EEM spectra of lipids from the South Moravian lignite and humic acids isolated from the same lignite (Enev et al., 2014) suggests that lipids may also participate in the fluorescence of humic acids in the region with excitation wavelengths higher than 400 nm. On the other hand, the presence of maxima with an emission wavelength greater than 470 nm is in agreement with previous studies that suggest such maxima originate from intramolecular charge-transfer states, rather than from independent fluorophores in lipids and humic substances (Del Vecchio and Blough, 2004; Boyle et al., 2009). This suggestion is also supported by the results of our UV–Vis spectrometry.

A more detailed scrutiny of the EEM spectra and their fluorescence maxima reveals that they differ from each other in contour plots and the values of their excitation/emission wavelength pairs. Hence, EEM spectra can be used to potentially fingerprint and rapidly distinguish between lipids of different origins and to characterize lignites as well. So far, this approach has only been used to distinguish coal extracts of different rank (Mille et al., 1988).

Subtle variations in EEM spectra were observed mainly in the case of lipids from the Chucurovo, Maritza East, and Krepoljin lignites. These lipids are characterized by significant spectral overlapping and peak broadening due to their multicomponent nature. By contrast, these characteristics are not observed in the lipids extracted from the K1 and L2 lignites. This separation is also supported by the results of the UV–Vis spectrometry. We therefore propose that lipids from the K1 and L2 lignites are formed by a very small number of individual fluorophores.

For most of the lipids in our sample set, typical maxima lie within the A' region and are thus restricted to wavelengths in the range 260–275/370–440 nm, suggesting they all have similar structures and components. Some maxima for the different lipids occur at the same excitation/emission positions (primarily 260/440 nm), implying that fluorophores in these lipids are either the same or from the same fluorophore family.

Using the differences in wavelength and fluorescence intensity, various structural units in the lipids can be elucidated. At nearly the same excitation wavelength, the peaks in region A' shift toward a longer emission wavelength while the fluorescence intensity decreases. The shorter emission wavelengths (in this work, 350–400 nm) and higher fluorescence intensities measured in the EEM spectra can be associated with low aromatic content, low molecular weight components, and electron-donating groups such as hydroxyls and alkoxylys. In contrast, the longer emission wavelengths (in this work, 400–450 nm) and lower intensities measured

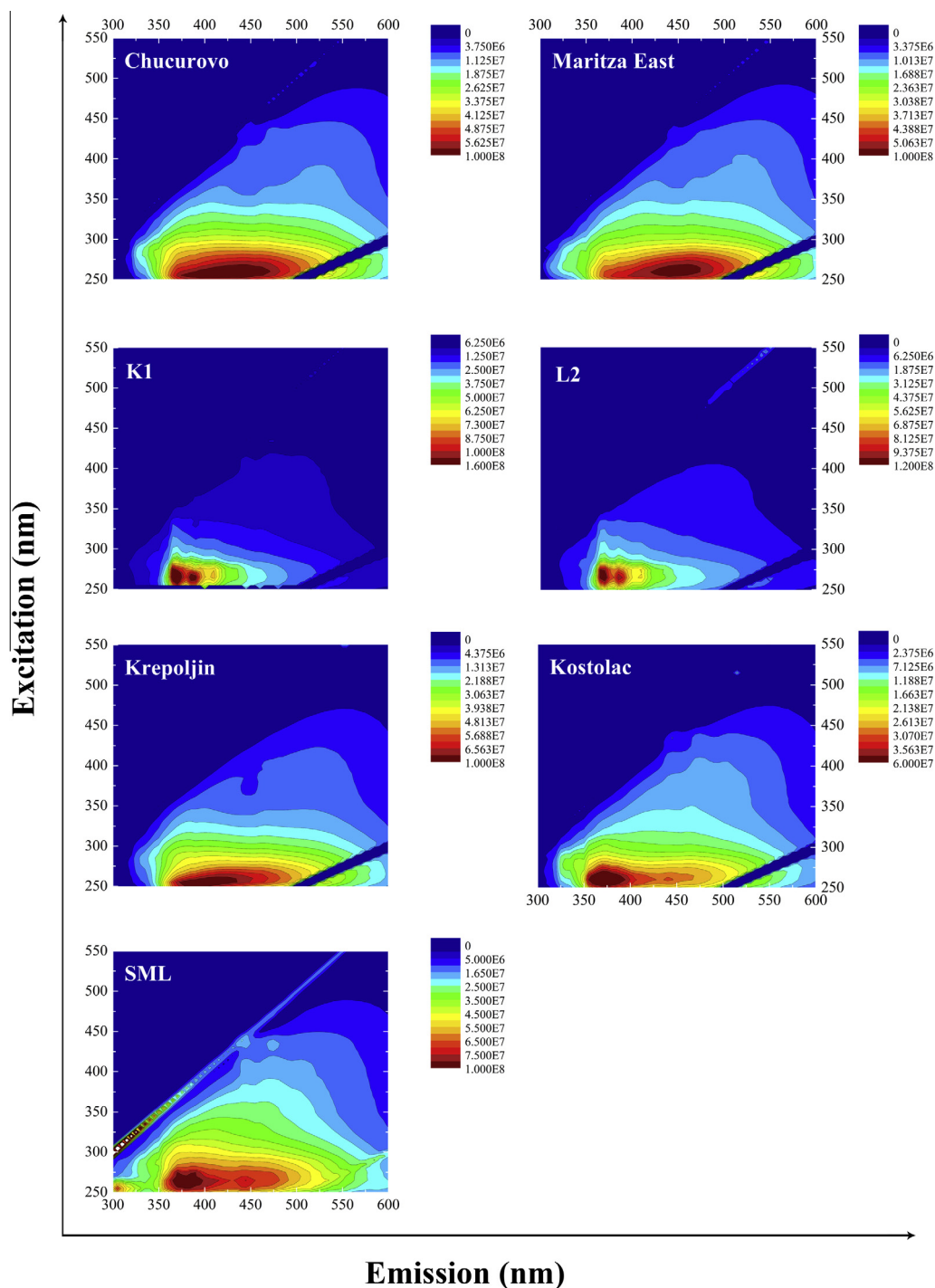


Fig. 3. EEM spectra of lipids extracted from various lignite samples.

for the fluorescence peaks of lipids can indicate the presence of condensed aromatic rings and electron-withdrawing groups such as carboxyl and carbonyl groups. It is well established that polycyclic aromatic hydrocarbons fluoresce at wavelengths ranging from 310 to >400 nm when subjected to excitation at 245–280 nm (Bugden et al., 2008). According to previous studies, aromatic ring systems may be interpreted such that lower emission wavelengths between 350 and 400 nm (centered at approximately 380 nm) could be associated with three-ring aromatic structures, whereas higher emission wavelengths between 400 and 450 nm (centered at approximately 440 nm) could be associated with four-ring aromatic structures (Kister and Pieri, 1996; Kashimura

et al., 2004; Bugden et al., 2008; Wang et al., 2012). The GC–MS analysis of some lipids has revealed that they may comprise compounds with different numbers of aromatic rings (one to five), such as aromatic sesquiterpenoids (e.g. cuparane, cadalene), aromatic diterpenoids (e.g. simonellite, retene), and other aromatic hydrocarbons (naphthalene, phenanthrene, dibenzofurans, pyrene, fluoranthene, chrysene, perylene) (Životić et al., 2008; Stefanova et al., 2011; Havelcová et al., 2012; Fabiańska and Kurkiewicz, 2013; Stojanović and Životić, 2013).

Peak H (255/305 nm), occurring only in lipids from the South Moravian lignite, exhibited the lowest emission wavelength of all the EEM spectra and a lower fluorescence intensity than the peaks



**Table 2**

Positions of excitation–emission wavelength pairs for fluorescence peaks and values of fluorescence intensities for lipids isolated from different lignites.

Origin of lipid	Fluorescence peak region					
	H		A'		V	
	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>b</sup>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>b</sup>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>b</sup>
SML <sup>c</sup>	255/305	0.692	260/380 260/440	0.850 0.741	430/475	0.175
Chucurovo			260/420 <sup>a</sup> 260/440	0.652 0.659		
Maritza East			260/440	0.573		
Kostolac			260/370 260/440	0.479 0.311		
Krepoljin			260/410	0.724		
K1			265/370 265/385 265/410	1.408 1.152 0.761		
L2			265/370 265/385 265/410 275/410	1.116 1.004 0.634 0.630		

<sup>a</sup> The maximum is overlaid with the neighboring maximum 260/440 nm.<sup>b</sup>  $I_F \times 10^8$  CPS (counts per second) of fluorescence peaks.<sup>c</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.

in region A' of this lipid. We conclude that the maximum position is probably related to single aromatic systems and substituents such as carboxyl and carbonyl groups.

Peak V had the lowest fluorescence intensity of all maxima observed in the EEM spectrum of lipid from the South Moravian lignite and the highest emission wavelength compared with other lipids. As mentioned earlier, the origin of peak V is ascribed to intramolecular charge-transfer states, rather than by independent fluorophores. Some authors (e.g. [Peuravuori et al., 2002](#)) have suggested that fluorescence at long wavelengths with low intensity could be related to the presence of linearly condensed aromatic rings.

Earlier works attribute maxima only to aromatic ring systems; however, on the basis of published literature, various model organic compounds may also be proposed as possible fluorophores responsible for the fluorescence of lipids. Equilenin, 5 $\alpha$ -pregnan-3-ol-2-one, mescaline, cannabinol, and 5 $\alpha$ -androstan-3-one with maxima centered at 250/370 nm, 268/406 nm, 273/315, 356 nm, 280/318, and 288/413 nm, respectively, could represent classes of fluorophores linked to region A' ([Wolfbeis, 1985](#); [Ichinose et al., 1991](#); [Ma and Green, 2008](#)). They comprise a structure comprising both substituted aromatic compounds and steroids. The compounds listed above are simply intended to demonstrate the diversity of mixtures which could contribute to lipid fluorescence. Certainly, other fluorophores may have EEM spectra in these spectral regions. In addition, lipid fluorescence is complex because the sum of fluorescences of individual components in a mixture is not necessarily equivalent to the fluorescence of the whole. Specifically, overlapping excitation/emission peaks of various components can result in energy transfer, charge migration, structural reorganization, or some combination of these, which can quench the fluorescence of the donor and produce fluorescence in the acceptor ([Ma and Green, 2008](#)).

#### 4. Conclusions

In this study, different yields of lipids ranging from 1% to 9% were extracted from lignites of different origin. The lipids have a predominantly aliphatic character, highest for lipids isolated from

the K1 lignite and least for the Chucurovo lignite. The oxygen content of lipids is overall low and includes oxygen functional groups such as carboxyls, hydroxyls (including phenols), esters, ethers, and conjugated carbonyls. Lipid from the Chucurovo lignite comprises a greater number of shorter carbon chains compared with the other samples. Lipids contain fluorophores, which participate in the total fluorescence of lignites. The EEM spectra show that fluorophores occur predominantly in region A' (the ultraviolet region of the excitation wavelength) and typical maxima are in the range 260–275/370–440 nm. An exception is the South Moravian lignite, which uniquely also contains maxima in the H (255/305 nm) and V (430/475 nm) regions. Some maxima are at the same, or very similar excitation/emission positions, which implies that the fluorophores are of the same form, or from very similar fluorophore families. The EEM spectra of lipids can be used as fingerprints to distinguish between lipids extracted from different lignites and between lignites themselves. Lipids from the K1 and L2 lignites are probably formed by a very small number of individual fluorophores, while other lipids are mainly characterized by the mutual effects of other fluorophores. It seems that region A' is chiefly rich in aromatic ring systems with three to four rings. In contrast, region H is mainly formed by simple molecules, while region V can be related either to linearly condensed aromatic rings or, more probably, to intramolecular charge-transfer states. Compared to model compounds, region A' can be ascribed not only to aromatic systems but also to steroids. The results suggest that lipids participate in the fluorescence of humic substances in region A and probably also to some degree in region V.

Spectrometric characterization is a useful and relatively quick way of obtaining new knowledge, especially the application of the EEM method.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. M. Stefanova, Prof. D. Životić, and Prof. M. Fabiańska for supplying the lignite samples. This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and



Sports). We also thank James A. Rice, Erdem Idiz and an anonymous reviewer for suggesting improvements to the original manuscript.

*Associate Editor*—James A. Rice

## References

- Birdwell, J.E., Engel, A.S., 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* 41, 270–280.
- Boyle, E.S., Guerriero, N., Thiallet, A., Vecchio, R.D., Blough, N.V., 2009. Optical properties of humic substances and CDOM: Relation to structure. *Environmental Science* 43, 2262–2268.
- Bugden, J.B.C., Yeung, C.W., Kepkay, P.E., Lee, K., Blough, N.V., 2008. Application of ultraviolet fluorometry and excitation–emission matrix spectroscopy (EEMS) to fingerprint oil and chemically dispersed oil in seawater: Relation to structure. *Marine Pollution Bulletin* 56, 677–685.
- Chassapis, K., Roulia, M., Tsigirigi, D., 2009. Chemistry of metal–humic complexes contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral fertilization. *International Journal of Coal Geology* 78, 288–295.
- Chilom, G., Bruns, A.S., Rice, J.A., 2009. Aggregation of humic acid in solution: contributions of different fractions. *Organic Geochemistry* 40, 455–460.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation–emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325–346.
- Del Vecchio, R., Blough, N.V., 2004. On the origin of the optical properties of humic substances. *Environmental Science* 38, 3885–3891.
- Doskočil, L., Pekař, M., 2012. Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Processing Technology* 101, 29–34.
- Doskočil, L., Grasset, L., Válková, D., Pekař, M., 2014. Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel* 134, 406–413.
- Doskočil, L., Grasset, L., Enev, V., Kalina, L., Pekař, M., 2015. Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite. *Environmental Earth Sciences* 73, 3873–3885.
- Enev, V., Pospíšilová, L., Klučáková, M., Liptaj, T., Doskočil, L., 2014. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil and Water Research* 9, 9–17.
- Fabiańska, M.J., Kurkiewicz, S., 2013. Biomarkers, aromatic hydrocarbons and polar compounds in the Neogene lignites and gangue sediments of the Konin and Turoszów Brown Coal Basins (Poland). *International Journal of Coal Geology* 107, 24–44.
- Fabiańska, J.M., 2004. GC–MS investigation of distribution of fatty acids in selected Polish brown coals. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 72, 241–244.
- Fuentes, M., González-Gaitano, G., García-Mina, J.M., 2006. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry* 37, 1949–1959.
- Havelcová, M., Sýkorová, I., Trejtnarová, H., Šulc, A., 2012. Identification of organic matter in lignite samples from basins in the Czech Republic: geochemical and petrographic properties in relation to lithotype. *Fuel* 99, 129–142.
- Ichinose, N., Schreiber, J., Schnepel, F.M., Adachi, K., 1991. *Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry: Trends and Techniques Including HPLC Applications*. John Wiley and Sons, New York.
- Iino, M., 2000. Network structure of coals and association behavior of coal-derived materials. *Fuel Processing Technology* 62, 89–101.
- Kashimura, N., Hayashi, J-ichiro, Li, C.-Z., Sathe, C., Chiba, T., 2004. Evidence of polycondensed aromatic rings in a Victorian brown coal. *Fuel* 83, 97–107.
- Kister, J., Pieri, N., 1996. Effects of preheating and oxidation on two bituminous coals assessed by synchronous UV fluorescence and FTIR spectroscopy. *Energy & Fuels* 10, 9458–9957.
- Kohl, S.D., Rice, J.A., 1999. Contribution of lipids to the nonlinear sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soil organic matter. *Organic Geochemistry* 30, 929–936.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Baltimore.
- Lesueur, D., 2009. The colloidal structure of bitumen: consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 42–82.
- Ma, X., Green, S.A., 2008. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract: structural characterization of humic substances. *Chemosphere* 72, 1425–1434.
- Matuszewska, A., Czaja, M., 1996. Aromatic compounds in molecular phase of Baltic amber—synchronous luminescence analysis. *Talanta* 56, 1049–1059.
- Milata, V., Segfa, P., 2007. Vybrané kapitoly molekulevej spektroskopie. Slovenska technicka univerzita, Bratislava.
- Mille, G., Guiliano, M., Kister, J., 1988. Analysis and evolution of coals: UV fluorescence spectroscopy study (deminerallized coals-oxidized coals). *Organic Geochemistry* 13, 947–952.
- Papanicolaou, C., Dehmer, J., Fowler, M., 2000. Petrological and organic geochemical characteristics of coal samples from Florina, Lava, Moschopotamos and Kalavryta coal fields, Greece. *International Journal of Coal Geology* 44, 267–292.
- Peuravuori, J., Koivikko, R., Pihlaja, K., 2002. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water Research* 36, 4552–4562.
- Rodríguez, F.J., Schlenger, P., García-Valverde, M., 2014. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Science of the Total Environment* 476–477, 718–730.
- Stefanova, M., Magnier, C., Velinova, D., 1995. Biomarker assemblage of some Miocene-aged Bulgarian lignite lithotypes. *Organic Geochemistry* 23, 1067–1084.
- Stefanova, M., Oros, D.R., Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2002. Polar aromatic biomarkers in the Miocene Maritza-East lignite, Bulgaria. *Organic Geochemistry* 33, 1079–1091.
- Stefanova, M., Markova, K., Marinov, S., Simoneit, B.R.T., 2005. Molecular indicators for coal-forming vegetation of the Miocene Chukurovo lignite, Bulgaria. *Fuel* 84, 1830–1838.
- Stefanova, M., Ivanov, D.A., Utescher, T., 2011. Geochemical appraisal of palaeovegetation and climate oscillation in the Late Miocene of Western Bulgaria. *Organic Geochemistry* 42, 1363–1374.
- Stojanović, K., Životić, D., 2013. Comparative study of Serbian Miocene coals – Insights from biomarker composition. *International Journal of Coal Geology* 107, 3–23.
- Tamamura, S., Ueno, A., Aramaki, N., Matsumoto, H., Uchida, K., Igarashi, T., Kaneko, K., 2015. Effects of oxidative weathering on the composition of organic matter in coal and sedimentary rock. *Organic Geochemistry* 81, 8–19.
- Von Der Dick, H., Kalkreuth, W., 1986. Synchronous excitation and three-dimensional fluorescence spectroscopy applied to organic geochemistry. *Organic Geochemistry* 10, 633–639.
- Wang, Z., Wei, C., Shui, H., Ren, S., Pan, C., Wang, Z., Li, H., Lei, Z., 2012. Synchronous fluorimetric characterization of heavy intermediates of coal direct liquefaction. *Fuel* 98, 67–72.
- Wolfbeis, O.S., 1985. The fluorescence of organic natural products. In: Schulman, S. G. (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy, Part 1*. John Wiley, New York, pp. 160–370.
- Životić, D., Wehner, H., Cvetković, O., Jovančević, B., Gržetić, I., Scheeder, G., Vidal, A., Šajnović, A., Ercegovac, M., Simić, V., 2008. Petrological, organic geochemical and geochemical characteristics of coal from the Soko mine, Serbia. *International Journal of Coal Geology* 73, 285–306.

V případě strukturního modelu hnědého uhlí bylo dosaženo všeobecného konsenzu, který pohlíží na tyto kaustobiolity jako na trojrozměrně zesíťované makromolekulární struktury, v jejichž objemu mohou být zachyceny organické sloučeniny s nižší molekulovou hmotností. Tyto malé organické sloučeniny jsou považovány za mobilní frakce organické hmoty těchto kaustobiolitů, přičemž je lze velmi lehce extrahovat pomocí různých organických rozpouštědel případně jejich směsí. Na druhou stranu se předpokládá, že tato mobilní fáze OM je do jisté míry ve struktuře hnědého uhlí stabilizována pomocí slabých vazebných interakcí, o čemž vypovídají rozdílné extrakční výtěžky při použití rozdílných extrakčních činidel. Jak již bylo diskutováno dříve, HL zauímají podstatnou část extrahovatelné OM hnědého uhlí, nicméně bychom neměli opomenout i ty frakce, které jsou omezeně rozpustné ve vodě a silně polárních organických rozpouštědel. V této souvislosti máme především na mysli organické sloučeniny, které jsou extrahovatelné nepolárními rozpouštědly, jako je chloroform, hexan, benzen, toluen atd. Tato skupina nepolárních organických sloučenin je tvořena zejména mastnými kyselinami a jejich deriváty, vosky, terpeny, steroidními sloučeninami apod. Souhrnně můžeme tyto sloučeniny označit jako *bitumeny*.

Tato problematika byla předmětem komplexní studie odborné publikace: „The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins“.

Pro samotnou extrakci lipidických složek OM bylo vybráno sedm zástupců hnědého uhlí, které se lišily zeměpisným původem uhelných pánví. Blíže se jednalo o vzorky lignitu pocházejících z oblastí střední a jihovýchodní Evropy. Přesné lokace uhelných pánví jsou zmíněny v kapitole 4 této habilitační práce (viz. str. 39). Jednotlivé lipidické frakce byly extrahovány pomocí Soxhletovy aparatury za použití chloroformu jakož to vhodného organického rozpouštědla. Jak je doloženo mnohými instrumentálními technikami použitými v této studii, tak extrahované bitumeny měly převážně alifatický charakter s minoritními příspěvky aromatických sloučenin substituovanými kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxyly, hydroxyly včetně fenolických –OH skupin, estery, ethery, případně i konjugované karbonyly. Strukturní parametr reprezentovaný poměrem intenzit absorpčních pásů odpovídajících asymetrickým valenčním vibracím C–H vazeb v methylových a methylenových funkčních skupinách (viz. ATR-FTIR spektra) se ukázal jako velmi senzitivní kritérium k posouzení rozvětvenosti resp. linearitě lipidických řetězců. Nicméně dalším hodnotným výsledkem bylo zjištění, že silně nepolární frakce OM se podílejí nejen na celkové fluorescenci lignitu, ale především na luminiscenci HL, jak je doloženo přítomností fluorescenčních domén A ( $\alpha$ ) – *fulvic-like*, jejichž specifické polohy fluorescenčního maxima jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 260–275/370–440 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ).

Dále tato studie přispěla k objevu doposud nepublikovaného fluorescenčního maxima, které bylo námi označeno jako doména H, a tudíž můžeme hovořit o rozšíření doposud známých fluorescenčních maxim spoluvytvářejících rodinu HL a DOM. Tato fluorescenční doména byla lokalizována v oblasti velmi nízkých vlnových délek excitace a emise (255/305 nm), a tudíž lze v obecném přiblížení konstatovat, že toto fluorescenční maximum je spojeno se strukturně jednoduchými aromatickými sloučeninami. Toto tvrzení je ve velmi dobré shodě, pokud si uvědomíme, že právě fluorofory lokalizované v oblasti vlnových délek 400–450/400–550 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) jsou

převážně spojovány s morfologicky složitými fluorescenčními systémy odpovídajícími lineárně kondenzovaným aromatickým kruhům, jako jsou deriváty porfyrinových cyklů. Avšak na přesnou lokalizaci tohoto fluorescenčního maxima mají do značné míry vliv i intramolekulární stavy přenosu náboje v rámci tak složitého luminiscenčního systému. V rámci fluorescenčního chování lipidických sloučenin izolovaných z lignitu lze fluorescenčním doménám A ( $\lambda$ ) přisoudit původ, který odpovídá nejen aromatickým kruhovým systémům, ale i organickým sloučeninám jako jsou: equilenin (250/370 nm), allopregnanolon (268/406 nm), meskalin (273/315 nm), kanabinol (280/318 nm) a androstan (288/413 nm). Obecně můžeme říci, že spektrometrické techniky, zvláště pak fluorescenční spektrometrie EEM jsou užitečnými nástroji charakterizace lipidických sloučenin extrahovaných z přírodní organické hmoty, přičemž jsme schopni získat nové poznatky ohledně tak složitého systému jako je lignit.

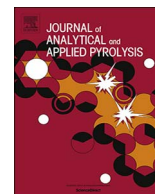
# The characterization of South Moravian lignite in its natural and treated forms using thermal degradation methods

Leoš Doskočil, **Vojtěch Enev**, Laurent Grasset, Jaromír Wasserbauer

*Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2017**, 128, 83–91.

Impact factor (2020): 5,541

JCR Category: Chemistry, Analytical-Scie – Q1



## The characterization of South Moravian lignite in its natural and treated forms using thermal degradation methods

Leoš Doskočil<sup>a,\*</sup>, Vojtěch Enev<sup>a</sup>, Laurent Grasset<sup>b</sup>, Jaromír Wasserbauer<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno, 612 00, Czech Republic

<sup>b</sup> Université de Poitiers, IC2MP, UMR 7285, 4 rue Michel Brunet, 86073 Poitiers, France



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lignite pyrolysis  
Thermochemolysis  
Thermal analysis  
FTIR analysis  
TG-FTIR

### ABSTRACT

Thermal degradation experiments were performed on South Moravian lignite in its natural and treated forms primarily to investigate the changes taking place during pyrolysis, and, secondarily, to determine the structural characteristics of lignite using thermal degradation methods. The lignite was treated by extraction with chloroform, demineralization, and the remineralization or sorption of calcium ions on the demineralized lignite. The analysis of pyrolysis products was performed in solid and gaseous states using FTIR analysis and the thermogravimetric technique coupled with FTIR (TG-FTIR). Experiments were complemented by thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). South Moravian lignite was characterized by the bimodal distribution of saturated fatty acids, with two maxima at  $n\text{-C}_{16}$  and at  $n\text{-C}_{28}$ , and the dominance of guaiacyl units indicating a gymnosperm origin. FTIR analysis of the examined sample set showed that lignite contains different functional groups with various thermal stabilities degrading to the evolution of gases such as  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$ . Precursors of the gaseous products generated and an analysis of functional groups in the samples are discussed in the paper. The results show that treatments of lignite may be reflected in their thermal behaviors during pyrolysis.

### 1. Introduction

Lignite is a low-rank coal which is formed from original phytomass by peatification followed by coalification and is considered as an intermediate form between peat and bituminous coal. Lignite is mainly used for energy and fuel production, even though it has low calorific value and high water content. Alternative applications of low rank coals are subject to intensive research and may include, for example, use as a sorbent of heavy metals and dyes [1,2]; uses in agriculture as a source of humic acids [3], as organic and organomineral fertilizers (generally coal-based fertilizers), and as soil conditioners [3]; and material for the production of low molecular weight acids by chemical treatments [4].

The improvement and development of these applications are closely linked with an understanding of coal structure. Chemical information on coaly organic matter can be obtained either by non-destructive methods, or destructive methods, while coal can be studied in its original form, or modified through various process such as demineralization, extraction etc. Destructive methods are based on the fragmentation of macromolecular organic matter by chemical and/or pyrolytic degradation and subsequent analyses of the low molecular weight products. Secondary reactions (rearrangement, cracking,

hydrogenation, and polymerization) in a heterogeneous mixture cannot be excluded, and it is logical that conclusions regarding the original structure of coal in the macromolecular phase have to be drawn with caution. In contrast, the main advantage of non-destructive methods lies in the fact that the sample can be analyzed without drastic pretreatment. The sample can be examined as a whole and secondary reactions can be avoided. Non-destructive methods include, for example, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray near edge absorption spectroscopy (XANES), and scanning electron microscopy (SEM) coupled to energy-dispersive X-ray analysis (EDX). Most of these methods, however, are relatively insensitive and reveal low resolution. Although these techniques can give good results concerning total chemical composition, specific compounds are difficult to identify [5].

The present study is focused on lignite from the South Moravian Lignite Coalfield located in the northern part of the Vienna basin. The Vienna basin extends into the Czech Republic from the northern tip of Austria. A part of the basin is located on the territory of Slovakia. Some of the abovementioned analytical approaches have been used to characterize the macromolecular organic matter of South Moravian lignite.

\* Corresponding author.

E-mail address: [doskocil@fch.vut.cz](mailto:doskocil@fch.vut.cz) (L. Doskočil).



**Table 1**

Ultimate and proximate analyses of natural lignite (NL), extracted lignite (EL), demineralized lignite (DL), and remineralized lignite (RL).

Sample	Moisture (wt.%)	Ash (wt.%)	Elemental composition (at.%)					Atomic ratios		
			C	H	N	S	O <sup>diff.</sup>	H/C	O/C	N/C
NL	15.0	11.3	33.8 ± 0.2	40.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	24.9 ± 0.3	1.20 ± 0.01	0.74 ± 0.01	0.02 ± 0.00
EL	21.7	11.4	32.0 ± 0.3	38.1 ± 0.6	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	29.0 ± 0.5	1.19 ± 0.03	0.91 ± 0.02	0.02 ± 0.00
RL	9.2	11.9	35.6 ± 0.0	41.5 ± 0.2	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	22.0 ± 0.3	1.17 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.02 ± 0.00
DL	6.5	1.4	39.6 ± 0.5	41.6 ± 0.9	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	17.9 ± 1.3	1.05 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.02 ± 0.00

However, the studies focused mainly on the spectrometric characterization of structural features in South Moravian lignite using <sup>13</sup>C NMR and FTIR spectrometers [6]. Doskočil et al. [4] applied hydrogen peroxide oxidation to lignite in order to obtain structural information and to find interesting new applications for this coal. Havelcová et al. [7] analyzed soluble organic compounds in a suite of coals including that from the South Moravian Coalfield using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). With regard to potential applications, water-extractable fractions from South Moravian lignite were characterized by spectrometric methods and further analyzed at the molecular level [8]. However, no thermochemical methods have so far been used or reported in the literature with respect to this low-rank coal or any other coals from the Vienna basin.

Thermogravimetric analysis (TGA) is a widely used method providing information on the mass loss and pyrolysis rate through the thermogravimetric curve and the differential thermogravimetric curve, respectively. A gas analyzer connected to TGA provides information on the volatiles evolved during the process and information on the pyrolysis behavior. Thermogravimetry coupled with Fourier transform infrared spectroscopy (TG-FTIR) is one of the most common methods enabling the study of functional-group decomposition [9]. Gaseous products such as CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, COS, SO<sub>2</sub> are the most commonly detected gases during coal pyrolysis using TG-FTIR [10]. MacPhee et al. [10] reported that TG-FTIR can also be reliably used for determination of the organic oxygen content in coals. Thermochemolysis is an analytical pyrolysis, which allows the analysis of both free and bound carboxylic and alcoholic moieties [11]. The result of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) is the formation of less polar and methylated low molecular weight units which are amenable to gas chromatography analysis [12]. Even though thermochemolysis with the reagent TMAH is well known and used for the molecular analysis of natural organic matter such as soils and sediments, this procedure has, so far, been applied to whole coals to a lesser extent [13–15].

The aim of this work was primarily to investigate the changes taking place during pyrolysis and, secondarily, to determine the structural characteristics of lignite using thermal degradation methods such as thermogravimetric analysis (TGA), a thermogravimetric technique coupled with FTIR (TG-FTIR), and thermochemolysis with TMAH. These methods were applied to South Moravian lignite from the Vienna basin before and after treatments including extraction with chloroform, demineralization, and the remineralization or sorption of calcium ions on the demineralized lignite. Although the pyrolysis of lignite has been widely studied, in most cases pyrolysis products are analyzed in either a solid or a gaseous state. In our work, we performed an analysis of residues together with the evolved gases, thereby allowing a complementary and comprehensive view of pyrolysis.

## 2. Materials and methods

The sample of lignite used in this study was obtained from the Mír mine in the locality of Mikulčice, Czech Republic; the mine belongs to the Dubňany seam in the South Moravian Lignite Coalfield, which forms the northern part of the Vienna basin. This was a representative sample of the standard product of this mine; its detailed characteristics,

including its geochemical and petrographic description, have been published elsewhere [7,8,16]. Before use, the lignite was dried at 105 °C for 24 h and left to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C, which resulted in a final equilibrium moisture content. Then, the milled lignite was sieved to the size fraction of less than 0.2 mm.

The lignite sample was extracted with chloroform for 36 h in a Soxhlet apparatus. The extracted lignite was dried and then allowed to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C.

Demineralization of the lignite sample was done by treatment with hydrochloric and hydrofluoric acids under conditions described in the literature [17]. Briefly, hydrofluoric acid was added to the lignite and the suspension was maintained at 55 °C for 45 min. After filtration, the procedure was repeated with HCl instead of HF. Demineralized lignite was washed with hot water, dried, and then left to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C.

The preparation of remineralized lignite was performed according to Murakami et al. [18]. Briefly, demineralized lignite was immersed in a calcium acetate solution with a pH of 8.3. This value of pH was based on reports that protons of all carboxyl groups were exchanged with calcium ions at this pH [19,20]. Remineralized lignite was washed with ultrapure water, dried, and then allowed to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C.

Elemental compositions of the samples were determined using a CHNS-O EA 3000 Elemental Analyzer. The oxygen content was calculated by difference and the data obtained were corrected for moisture and ash content. The results are presented in Table 1.

Thermal degradation of the prepared samples was performed using a Q5000IR TG analyzer (TA Instruments) with ± 1 °C temperature accuracy and ± 0.1% mass accuracy. Twenty mg of examined sample was introduced into a platinum cup. The sample was heated at a heating rate of 20 °C min<sup>-1</sup> to different temperatures in the range 300–800 °C under a flow of nitrogen (20 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>). The solid residue obtained after degradation at different temperatures was analyzed using an FTIR spectrometer.

FTIR spectra were recorded on pellets prepared by pressing a mixture of 1.5 mg of sample and 400 mg of dried spectrometry grade KBr using a Nicolet iS50. Spectra were recorded in the range 4000–400 cm<sup>-1</sup> with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and 256 scans were performed on each sample.

For the analysis of evolved gases, 20 mg of lignite sample was introduced into a platinum cup. The crucible was inserted into a Q600TG-DTA analyzer (TA Instruments) connected with the measuring cell (TGA/FT-IR Interface, Thermo Scientific) of a Nicolet iS10 FTIR spectrometer (Thermo Scientific) by means of a heated capillary (200 °C). The sample was heated at a heating rate of 20 °C min<sup>-1</sup> under a flow of argon (100 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) to 900 °C. A set of 651 infrared spectra was collected in the wavenumber region from 600 to 4000 cm<sup>-1</sup>.

Thermochemolysis was based on the off-line procedure developed by Grasset and Amblès [21]. Sample (350 mg) was placed in a ceramic boat and thoroughly soaked with 2 ml of a 50% w/w solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH; Acros Organics, New Jersey, USA) in methanol. After 1 h of impregnation, the sample was transferred into a Pyrex tube and heated at 400 °C (30 min isothermal). Thermochemolysis products were swept using N<sub>2</sub> to a trap containing

dichloromethane in an ice-water bath. When pyrolysis was completed, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator.

The products of thermochemolysis were analyzed by capillary gas chromatography (GC) using a Hewlett–Packard 6890 GC (split injector, 250 °C; Flame Ionization Detector (FID), 300 °C) with a fused silica capillary column (SGE BPX 5, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and helium as a carrier gas. The GC was temperature programmed from 60 to 300 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> isothermal for 20 min final time. Gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) analyses were performed on a Trace GC Thermo Finnigan coupled to a Thermo Finnigan Automass (with the same GC conditions). The MS was operated in electron impact mode with a 70 eV ion source energy, and ion separation was operated in a quadripolar filter. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards), and literature data. Quantification was performed with *n*-nonadecane as an internal standard.

### 3. Results and discussions

#### 3.1. Thermochemolysis with TMAH

After thermochemolysis of the lignite samples, more than 50 principal compounds were identified (Table 2). The results show that there are no significant qualitative differences among samples. However, the method of lignite treatment can have an impact on the yields of individual compounds. The lowest yields of aliphatic compounds (5.5%) were produced from extracted lignite, while untreated lignite produced twofold yields (11.2%). This difference is related to the extraction of lignite with chloroform, which preferentially extracts hydrophobic (aliphatic) molecules, as was reported in a previous work [22]. In contrast, the highest yields of aliphatic molecules (27.0%) were obtained in the case of demineralized lignite. The increased release of aliphatic molecules is probably related to the structural disruption of lignite resulting from the use of mineral acids during the demineralization process, which caused the cleavage of weaker bonds such as esters and metal bridges connecting functional groups. The decrease in the yield of remineralized lignite (24.1%) compared to demineralized lignite can probably be related to the hindered release of aliphatic molecules due to the formation of calcium bridges between functional groups (mainly carboxylic groups) during the sorption process. The exact roles of cations remain unclear, but it is believed that the introduction of ion-exchangeable cations, particularly calcium, increases the matrix densities of the coal [23]. Sathe et al. [23] predicted that cations originally associated with a carboxyl group may be gradually bonded to the coal matrix, leading to the phenomenon that coals with cationic components are less susceptible to thermal cracking. By comparing the total amount of identified compounds from thermochemolysis products, we obtained the following sequence: demineralized lignite (433 mg g<sup>-1</sup>) > remineralized lignite (404 mg g<sup>-1</sup>) > lignite (382 mg g<sup>-1</sup>) > extracted lignite (292 mg g<sup>-1</sup>). Thus, the treatment of lignite with mineral acids results in the highest yields of organic material identified with thermochemolysis.

The identified aliphatic compounds were mainly linear saturated fatty acids (C<sub>12</sub>–C<sub>34</sub>) with a strong even/odd carbon number pre-dominance. The bimodal distribution had two maxima, one at *n*-C<sub>28</sub> and, to a lesser extent, one at *n*-C<sub>16</sub> (see Fig. 1). In the case of extracted lignite, the second maximum within the short chain range (C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub>) was shifted to more at *n*-C<sub>18</sub>. The distinctly different shape of the bimodal distribution for extracted lignite in comparison to the other samples resulted from the loss of lipids from the original lignite during extraction. Saturated fatty acids with a carbon chain length ≥ C<sub>20</sub> are commonly related to a higher plant origin [24], whereas fatty acids having a carbon chain length < C<sub>20</sub> have both a higher plant and a microbial origin [25]. A branched fatty acid (*br*-C<sub>16</sub>) was also detected.

**Table 2**

Compounds identified in products of the thermochemolysis of natural lignite (NL), extracted lignite (EL), demineralized lignite (DL), and remineralized lignite (RL). The abbreviations L, P, L(G), and L(S) represent the possible origins of the identified compounds, which can be attributed to lignin, proteins, guaiacyl lignin units, and syringyl lignin units, respectively.

Compound	Abundance (nmol g <sup>-1</sup> )				Probable source
	NL	EL	DL	RL	
phenol	4.6	8.2	0.0	0.0	L + P
m-cresol	14.4	8.4	0.0	3.7	L + P
2-methoxyphenol	7.1	6.8	2.6	2.3	L + P, L(G)
1,2-dimethoxybenzene	3.9	4.4	3.3	2.3	L(G), L(S)
3,4-dimethylphenol	3.6	3.0	0.0	1.0	L(G)
2,3-dimethylphenol	2.8	0.4	0.0	0.7	L + P (?)
p-vinylanisole	1.8	1.7	0.0	1.2	L(G) (?)
2-methoxy-3-methylphenol	2.7	2.6	0.0	0.0	L + P (?)
2-methoxy-5-methylphenol	2.5	1.6	0.0	1.0	L + P (?)
2-methoxy-4-methylphenol	10.5	5.8	5.9	4.1	L + P, L(G)
3,4-dimethoxytoluene	19.7	14.4	18.3	17.9	L, L(G)
4-methoxybenzaldehyde	0.0	0.0	3.4	3.9	L(G)
4-ethyl-2-methoxyphenol	0.0	0.0	2.2	1.8	L(G)
4-ethyl-1,2-dimethoxybenzene	5.0	2.6	3.8	3.2	–
3,4-dimethoxyphenol	2.2	1.4	0.0	1.3	L + P
4-methylacetophenone	2.8	1.9	3.1	2.8	L(S)
4-ethenyl-1,2-dimethoxybenzene	8.6	5.0	8.5	7.6	L(G)
1,2,4-trimethoxybenzene	3.8	3.3	3.7	4.3	–
3-methoxybenzoic acid, methyl ester	4.9	4.4	6.4	4.8	–
2,4,6-trimethoxytoluene	3.4	2.4	10.6	6.8	L
1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)benzene	15.4	9.2	10.6	9.6	–
2,4,6-trimethoxybenzoic acid	3.3	4.3	4.9	4.0	–
3,4-dimethoxybenzaldehyde	37.9	27.7	24.7	23.6	L, L(G)
1,2-dimethoxy-4-(methoxymethyl)benzene	0.0	3.3	6.3	1.2	–
<i>n</i> -C <sub>12</sub>	0.0	0.0	0.0	1.9	Lipids
2,4-dimethoxyacetophenone	22.1	19.4	27.3	24.3	–
3,4-dimethoxyphenylacetone	6.8	5.8	6.3	4.6	L(G)
3,4-dimethoxybenzoic acid, methyl ester	41.5	48.0	59.2	46.2	L(G)
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	3.6	3.3	3.6	2.9	L(S)
1,2-dimethoxy-4-(3-methoxypropyl)benzene	37.8	30.5	34.4	46.0	–
1,2-dimethoxy-4-(2-methoxyethenyl)benzene	10.8	7.9	9.5	12.2	–
3,4-dimethoxypropiophenone	7.1	6.3	7.8	7.9	–
trimethoxy-5-(2-propenyl)benzene	4.1	2.8	3.1	3.5	–
methyl 4-methoxycinnamate	4.1	3.4	7.9	5.1	–
3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester	8.5	8.8	16.5	9.9	L(S)
<i>n</i> -C <sub>14</sub>	0.7	0.5	1.9	1.8	Lipids
<i>n</i> -C <sub>15</sub>	0.2	0.2	0.2	0.2	Lipids
1,2-dimethoxy-4-(1,2,3-trimethoxypropyl)benzene	15.6	9.8	8.8	17.8	–
1,2,3-trimethoxyacetophenone	5.9	4.6	5.7	7.9	–
1,2,3-trimethoxy-4-(3,3-dimethoxy-1-propenyl)benzene	8.8	4.1	4.6	7.1	–
<i>br</i> -C <sub>16</sub>	0.0	3.7	3.0	2.9	Lipids
<i>n</i> -C <sub>16</sub>	2.0	1.5	6.4	6.4	Lipids
<i>n</i> -C <sub>17</sub>	0.2	0.2	0.2	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>18</sub>	1.2	1.5	3.2	2.8	Lipids
methyl 16-methoxyhexadecanoate	5.6	2.5	11.0	11.5	Lipids
<i>n</i> -C <sub>20</sub>	0.2	0.3	1.5	1.1	Lipids
<i>n</i> -C <sub>21</sub>	0.1	0.1	0.1	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>22</sub>	2.9	0.7	4.8	3.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>23</sub>	0.3	0.2	0.3	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>24</sub>	3.6	1.1	8.8	7.6	Lipids
<i>n</i> -C <sub>25</sub>	0.2	0.2	0.2	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>26</sub>	7.1	1.5	20.7	16.6	Lipids
<i>n</i> -C <sub>27</sub>	0.3	0.2	0.3	0.3	Lipids
<i>n</i> -C <sub>28</sub>	9.6	2.2	30.0	24.1	Lipids
<i>n</i> -C <sub>29</sub>	0.4	0.2	0.4	0.4	Lipids
<i>n</i> -C <sub>30</sub>	8.2	1.3	22.2	16.7	Lipids

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Compound	Abundance (nmol g <sup>-1</sup> )				Probable source
	NL	EL	DL	RL	
<i>n</i> -C <sub>31</sub>	0.2	0.1	0.3	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>32</sub>	0.5	0.1	4.7	0.5	Lipids
<i>n</i> -C <sub>33</sub>	0.0	0.0	0.0	0.2	Lipids
<i>n</i> -C <sub>34</sub>	0.2	0.1	0.2	0.2	Lipids

*n*-C<sub>12</sub>–*n*-C<sub>34</sub> correspond to fatty acids.

Branched fatty acids are known to have a microbial origin [26]. A methoxyderivate of saturated fatty acids (16-methoxyhexadecanoic acid) was also found. This kind of molecule is well known as a major constituent of biological polyesters such as cutin and suberin [27,28].

The majority of aromatic compounds can be generally assigned to one of three types of lignin monomer units: guaiacyl (G), *p*-hydroxyphenyl (P), and syringyl (S). The major methylated lignin derivatives such as 3,4-dimethoxybenzaldehyde, 3,4-dimethoxybenzoic acid methyl ester, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde, and 3,4,5-trimethoxybenzoic acid methyl ester reflect the presence of a relatively preserved lignin monomers. The quantitative and qualitative predominance of guaiacyl-derived units suggests a gymnosperm dominated palaeoplant community [29]. However, some of the identified molecules can be derived not only from lignin but also from thermochemolysis products of proteins [11,30–32].

### 3.2. Thermal degradation and FTIR analysis

The examined samples of lignite were characterized by FTIR spectrometry at different temperatures and the results are presented in Fig. 2.

The broad band centred at about 3410 cm<sup>-1</sup> corresponds to the stretching vibration of O–H groups which are connected with an intermolecular hydrogen-bond. In the spectra of all samples, the band gradually narrows with increasing temperature and its intensity decreases.

The presence of aliphatic groups is revealed by the bands at 2922 cm<sup>-1</sup> and 2851 cm<sup>-1</sup>, which are attributed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups. Aliphatic structures are not observed in the spectra at 520 °C for any lignite samples, but in the case of remineralized and untreated lignite they are already absent at 500 °C. The deformation vibrations of methylene and methyl groups occur in the spectra at 1451 cm<sup>-1</sup> and 1380 cm<sup>-1</sup>. The remineralized lignite manifests these vibrations only as shoulders due to overlapping with carboxylates. The deformation vibrations are generally observed at lower temperatures (420 °C for demineralized lignite and 400 °C for other samples) than the stretching vibrations.

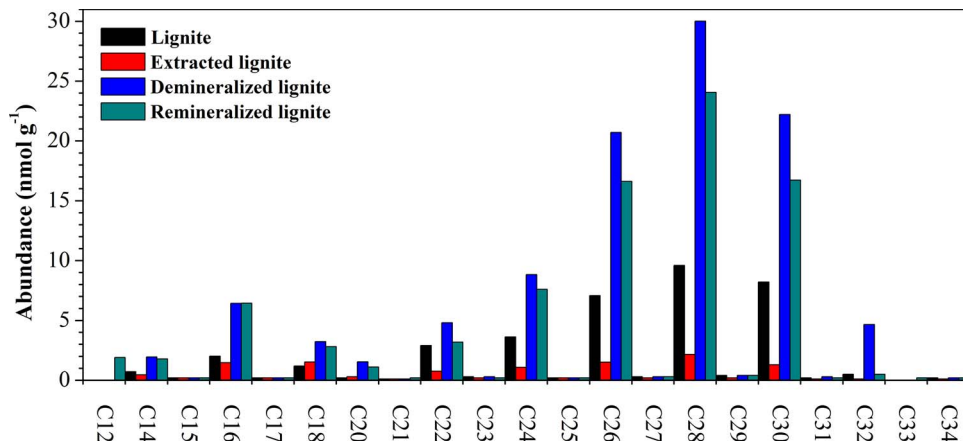


Fig. 1. The distribution of linear saturated fatty acids (C<sub>12</sub>–C<sub>34</sub>) in the examined samples.

The appearance of C=C aromatic stretching at 1510 cm<sup>-1</sup> and at 1619 cm<sup>-1</sup> indicated the presence of aromatic molecules. Peuravuori et al. [6] consider the band at 1510 cm<sup>-1</sup> to be an indicator of lignin. Aromatic components with a band at 1510 cm<sup>-1</sup> are not present in the spectra of lignite or other samples at 440 °C or 420 °C, respectively. In addition, the band at 1619 cm<sup>-1</sup> can also be related to carbonyl groups and carboxylates [33,34]. With increasing temperature, this band shifts to lower wavenumbers – up to a value of 1596 cm<sup>-1</sup> at 380 °C. A further decrease in intensity and in wavenumber continues with increasing temperature.

The band at 1415 cm<sup>-1</sup> is ascribed to carboxylates predominating mainly in the spectrum of remineralized lignite. The weak band at 1415 cm<sup>-1</sup> in demineralized lignite is given by the interaction between carboxyl groups of the sample and the KBr matrix rather than by the insufficient progress of demineralization. The carboxylates are not observed at a temperature of about 650 °C in the FTIR spectra.

In the spectrum of demineralized lignite, the characteristic band at 1708 cm<sup>-1</sup> decreases its intensity with increasing temperature and shifts to a lower wavenumber value (1691 cm<sup>-1</sup>) at a temperature of 420 °C. This is probably associated with the degradation of less thermally stable carboxylic acids (e.g. aliphatic) and the preservation of thermally stable conjugated carboxylic acids (aromatic) which degrade at 600 °C.

The interpretation of bands in the region 1000–1300 cm<sup>-1</sup> is made difficult by the overlapping of various organic functional groups with the mineral matter. The prominent band at 1033 cm<sup>-1</sup> is visible in the spectra of lignite before and after extraction, but its intensity decreases considerably through demineralization with the mixture of HF and HCl. This behavior is indicative of the prevailing mineral origin of the band. The presence of the band in demineralized lignite can be explained by the incomplete removal of inorganic minerals (e.g. silicate) during the treatment of lignite with the acid mixture and/or it arises from the stretching C–O vibration of primary alcohols. The intensive band at 1112 cm<sup>-1</sup> occurs in lignite but is wholly absent after the treatment with mineral acids. With respect to organic functional groups, the band may theoretically be ascribed to ethers, esters, and secondary alcohols, of which, however, only esters can undergo hydrolysis. In addition to esters, mineral matter can also be taken into account even though the band is not identifiable at 550 °C. This is most probably caused by the overlap of the given band with the neighboring band at 1152 cm<sup>-1</sup>, whose intensity is again reduced at 800 °C with the simultaneous clear appearance of the band at 1112 cm<sup>-1</sup>. The band at 1268 cm<sup>-1</sup> can be related to aromatic ethers. Some authors [34] reported that it corresponds to the C–O vibration of carboxyl groups and/or phenols. Our observation is inconsistent with the claim by Gezici et al. [34] because remineralized lignite should not include this band with the same intensity as it appears in the spectra of other samples due to the formation of carboxylate. Pyrolysis shows that the band at 1268 cm<sup>-1</sup> disappears

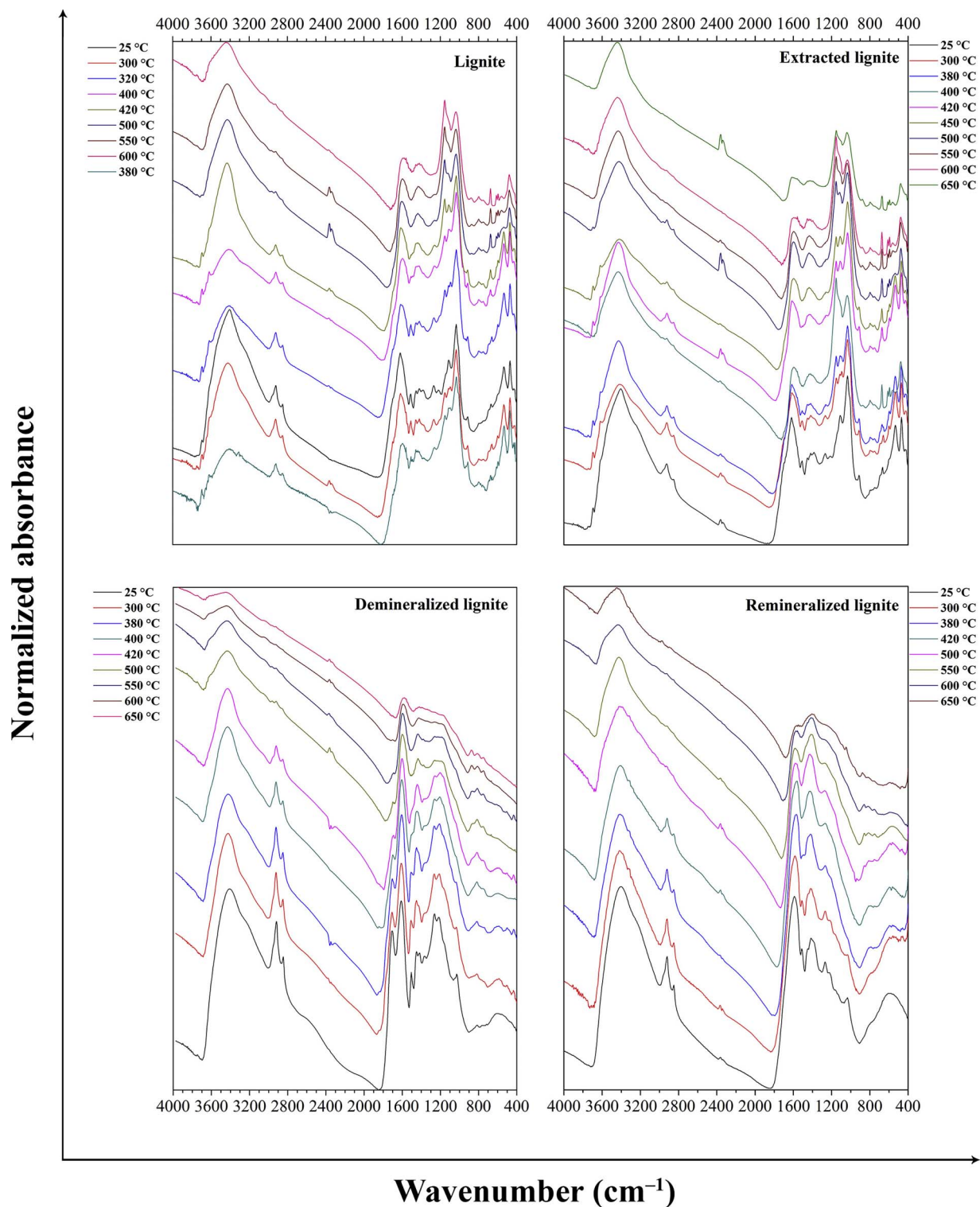


Fig. 2. FTIR spectra at different temperatures for the examined samples. The spectra at 700 °C and 800 °C are not displayed due to the poor appearance of the vibrational bands.

in the spectrum at 600 °C, which is the decomposition temperature of ethers. Moreover, maximum  $\text{CH}_4$  formation is observed at 600 °C and this gas is considered to be the precursor of ethers. In the light of the literature and our results, we suppose that the band at  $1268\text{ cm}^{-1}$  can more likely be attributed to aromatic ethers and/or phenols. The band at  $1219\text{ cm}^{-1}$  is related to the stretching vibration of C–O and to the deformation vibration of O–H in carboxylic groups and ethers (inclusive of phenoxy structures). In remineralized lignite, the vibration occurs as a shoulder corresponding only to ethers because carboxylic

groups form carboxylate. The absence of the vibration in the spectrum of remineralized lignite at 380 °C indicates that the shoulder originates exclusively from alkyl aryl ethers (aryl ethers decay at higher temperature). As a result, the band at  $1219\text{ cm}^{-1}$  is not observed in any sample spectrum at 380 °C and, together with the band at  $1258\text{ cm}^{-1}$ , forms a region without a clearly defined center at higher temperature.

The spectra of lignite before and after extraction contain, in the range  $1000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ , bands at 914, 668, 534, 471,  $431\text{ cm}^{-1}$  and shoulders at 796, 746, 696 and  $602\text{ cm}^{-1}$ , all of which are removed by



demineralization (except for  $431\text{ cm}^{-1}$  appearing at  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). According to our results and published literature, the observed bands and shoulders can be attributed to an inorganic part (except perhaps  $431\text{ cm}^{-1}$ ) [35,36]. The band at  $914\text{ cm}^{-1}$  can be related to the deformation vibrations of OH groups in kaolinite. The bands at  $534$  and  $471\text{ cm}^{-1}$  most probably correspond to deformation vibrations of Si–O–Al (kaolinite, eventually montmorillonite) and Si–O–Si (kaolinite, amorphous  $\text{SiO}_2$ ), respectively. Georgakopoulos et al. [33] associate the vibration at  $669\text{ cm}^{-1}$  with aromatic out-of-plane C–H deformations. The present work shows that the intensity of the shoulder does not change after the extraction of lignite with chloroform and that the shoulder is absent in the spectrum in consequence of demineralization. If we do not take into account  $\text{CO}_2$  from the air, then the shoulder at  $669\text{ cm}^{-1}$  together with the shoulder at  $602\text{ cm}^{-1}$  could be associated rather with gypsum, which is present in South Moravian lignite [8]. The shoulder at  $796\text{ cm}^{-1}$  could be ascribed to amorphous silica [35,36]. In the spectra at  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , two bands at  $3692$  and  $3617\text{ cm}^{-1}$  appeared corresponding to stretching vibrations of OH groups in kaolinite and montmorillonite. The dehydration of these minerals took place in the temperature range  $480\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as suggested by the disappearance of the bands at  $3692$ ,  $3617$  and  $914\text{ cm}^{-1}$ .

In the spectra of the demineralized and remineralized lignite at about  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , three closely neighboring bands at  $864$ ,  $814$  and  $752\text{ cm}^{-1}$  were observed, of which the third was seen as a shoulder in the spectra at  $420\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In addition, demineralized and remineralized lignite contained the band at  $814\text{ cm}^{-1}$  before pyrolysis degradation. These three bands are caused by out-of-plane C–H deformation and assigned to aromatic structures with isolated aromatic hydrogens ( $864\text{ cm}^{-1}$ ), two adjacent hydrogens per ring ( $814\text{ cm}^{-1}$ ), and four adjacent hydrogens per ring ( $752\text{ cm}^{-1}$ ) [37].

### 3.3. Thermogravimetric analysis

The curves of weight loss (TGA) and their derivatives (DTA) for the used samples are shown in Fig. 3. Three peaks may be distinguished in the DTA curves of the untreated, extracted, and remineralized lignite, whereas demineralized lignite is characterized by two peaks. The first peak occurs approximately in the range  $40\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}$  for each sample and is obviously connected with the gradual evaporation of moisture from the surface and pores of the lignite. In all cases, the mass loss connected with the evaporation did not exceed 10%. The second broad peak occurs approximately in the range  $200\text{--}650\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with a well-defined maximum at  $380\text{ }^{\circ}\text{C}$  for natural and extracted lignite, and at  $385\text{ }^{\circ}\text{C}$  for remineralized lignite. In the case of the natural and the extracted lignite, the observed shoulder at  $430\text{ }^{\circ}\text{C}$  suggests a complex degradation

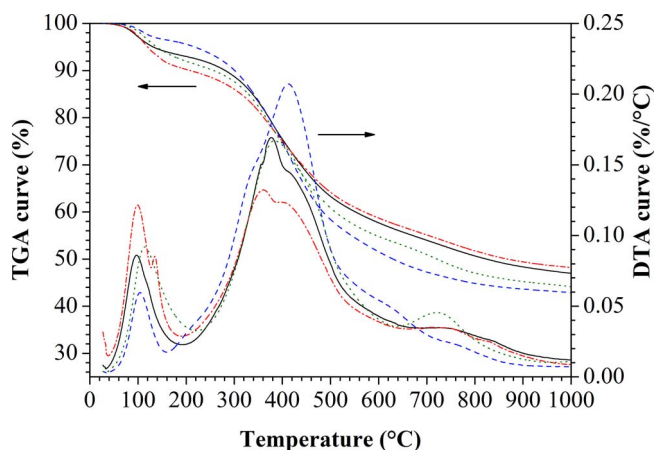


Fig. 3. Thermogravimetric analyses results for lignite (black solid), extracted lignite (red dash), demineralized lignite (blue dot), remineralized lignite (green dash dot). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

process under the given conditions. The abovementioned maxima reflect the prevailing degradation of carboxyl groups, which is accompanied by  $\text{CO}_2$  production; see below. In addition, other structural groups are subject to degradation, these comprising mainly esters, ethers, alcohols. Pyrolysis in this temperature range results in the greatest mass loss (about 49%). The second broad peak for demineralized lignite is more complicated and appears in the range  $165\text{--}900\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The shift of the peak maximum to a higher temperature ( $420\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) is registered in the curve of demineralized lignite, in contrast to other samples. In addition, three shoulders are observed in the ranges  $320\text{--}350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $560\text{--}680\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and  $705\text{--}850\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with maxima at  $330\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $635\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $780\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. The first shoulder is probably related mainly to the evolution of water, while the second shoulder is consistent with the region of maximum CO formation and with the region of the second maximum of methane formation appearing up to a temperature of about  $560\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Further details are provided below. The second peak for demineralized lignite represents 56% of mass loss during pyrolysis. The third peak falls approximately in the range  $650\text{--}900\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with a maximum at about  $755\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pyrolysis in this temperature range represents a smaller mass loss (about 11%) compared to the secondary peak for the samples. This region of the degradation process is especially connected with CO generation and, to a lesser degree, with  $\text{CO}_2$  production. It is worth noting that the sorption of calcium ions on demineralized lignite resulted in the occurrence of the third peak in the DTA curve, as in the case of lignite before treatment with mineral acids.

### 3.4. Evolved gas analysis

For the evolution curve of  $\text{H}_2\text{O}$  (see Fig. 4(a)), the low-temperature peak (below  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) is obviously connected with the gradual evaporation of moisture from the surface and pores of the samples and is centred at about  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $\text{H}_2\text{O}$  evolution above  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  is attributed to the decomposition of various oxygen-containing groups, mainly OH groups, leading to the formation of pyrolysis water over a broad temperature range. The high-temperature regions of the  $\text{H}_2\text{O}$  evolution curves are especially close to those of methane generation (about  $465\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), indicating that the formation of  $\text{CH}_4$  is accompanied by water generated during lignite pyrolysis. In the same temperature region, a similar, though less marked trend, is also observed for CO generation. In addition to the degradation of organic material, the dehydration of clay minerals occurs in the temperature range of about  $480\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as was shown above by the FTIR method.

The shape of the CO evolution profiles differs depending on the treatment of the samples. Simple peak (demineralized lignite), dual peaks (untreated and remineralized lignite), and triple peaks (extracted lignite) are clearly visible in Fig. 4(b). The broad peak of demineralized lignite ranges approximately from  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  and its maximum occurs at about  $645\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The sorption of calcium ions on the demineralized lignite results in the appearance of the CO evolution profile with dual peaks, as in the case of raw lignite before any treatment. The maxima of both peaks have very similar temperature positions:  $460\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$  for native lignite, and  $480\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $740\text{ }^{\circ}\text{C}$  for remineralized lignite. It appears that metal ions (such as calcium ions) contained in the lignite could act as triggers of degradation reactions of different precursors at various temperatures leading to CO formation. Interestingly, the extraction of lignite caused the splitting of the low-temperature peak of CO into distinct dual peaks centred at  $380\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $480\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The comparison of other gas curves of extracted lignite with the CO curve shows that the first of the dual peaks corresponds well to the highest pyrolysis peak of  $\text{CO}_2$  and also partly to water, while the latter is basically consistent with the maximum of  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4$ . This observation implies that degradation occurs comprehensively. The results also clearly show that the treatment of lignite (demineralization, remineralization and extraction) has an influence on CO generation during pyrolysis. The high-temperature peak for CO is above



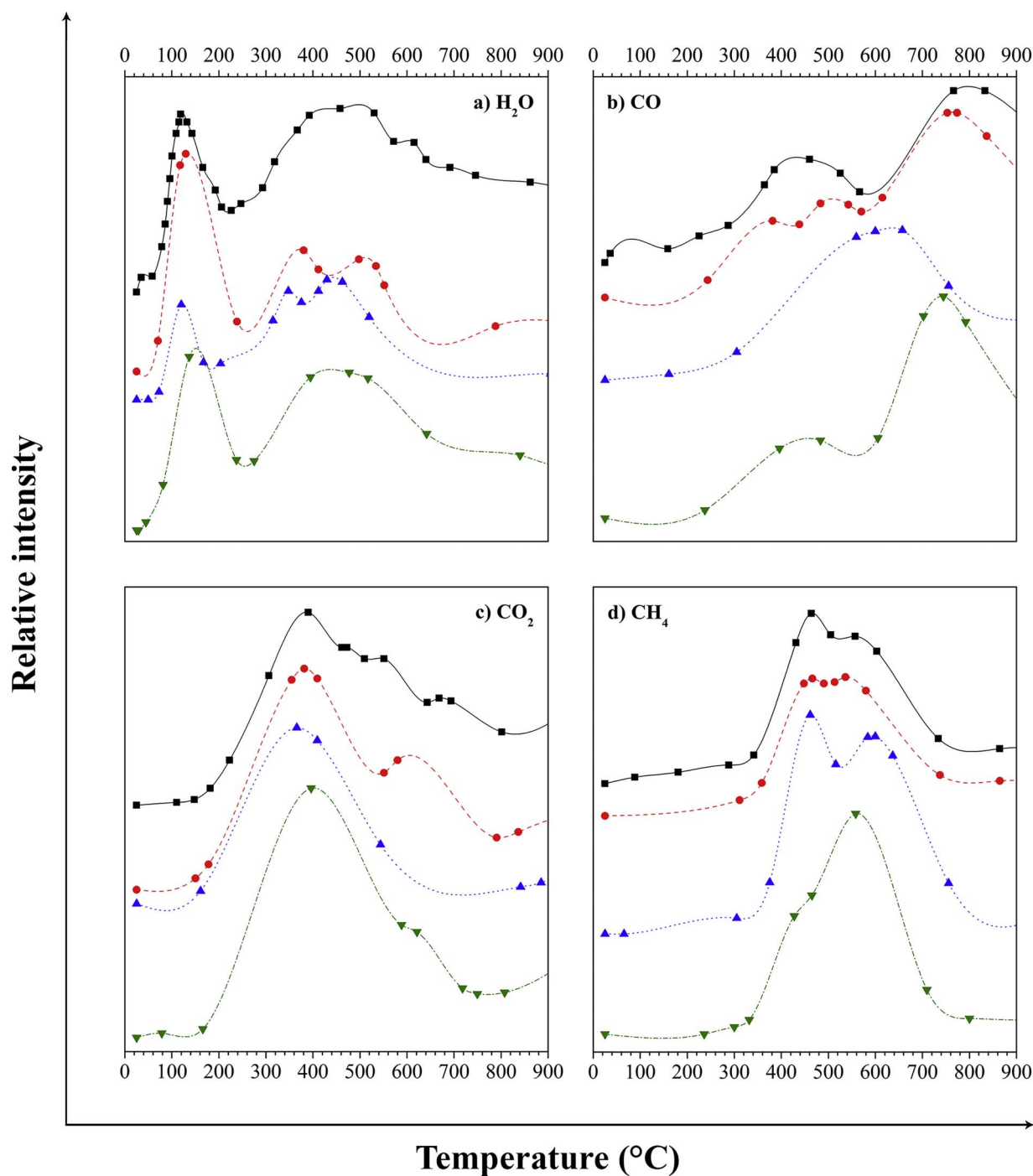


Fig. 4. Evolution curves of H<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub>, and CH<sub>4</sub> during pyrolysis of lignite (black solid), extracted lignite (red dash), demineralized lignite (blue dot), remineralized lignite (green dash dot). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

approximately 600 °C and has maxima at 800 °C, 765 °C, and 740 °C for untreated, extracted, and remineralized lignite, respectively. The precursors that could produce CO can be related to alkyl aryl ethers at 400 °C, methylene bridges and aryl aryl ethers at about 550 °C, and high condensed structures at 700 °C [38]. FTIR analysis shows that alkyl aryl ethers (the band at 1219 cm<sup>-1</sup>) are degraded at about 380 °C, and aryl aryl ethers (the band at 1268 cm<sup>-1</sup>) and aliphatic groups are degraded at about 550 °C. Thus, our conclusions are in good agreement with those reported in the literature [38].

Fig. 4(c) presents the CO<sub>2</sub> evolution profiles during pyrolysis. It shows that the temperature evolution range was wide (between 200 and 800 °C) for all samples. The maximum occurs at about 380 °C and is

consistent with the temperature maximum of the second peak in the DTA curve, as was mentioned above. This fact suggests that the rate of mass loss of organic matter (see the DTA curve) is associated primarily with the generation of CO<sub>2</sub>. All the samples, except demineralized lignite, revealed shoulders in the CO<sub>2</sub> profile at higher temperatures above 380 °C. In the case of lignite, three shoulders can be resolved, with maxima at 420, 550, and 670 °C. The first and last can mainly be linked to CO formation (the maximum at 460 °C and at 800 °C in the CO curve) while the second can be related to CH<sub>4</sub> generation (the maximum at about 550 °C). The sorption of calcium ions on demineralized lignite leads again to the appearance of a shoulder in the CO<sub>2</sub> evolution profile, although the maximum of the shoulder is at a lower temperature (about

620 °C) than in the case of lignite (about 670 °C). Differences in the temperature maxima of shoulders can be explained by the various sample treatments. FTIR analysis suggests that the main source of CO<sub>2</sub> in this temperature region could be carboxylates degrading at about 650 °C. Another possible source could be highly conjugated carbonyl groups, whose degradation could be influenced by the presence of metal ions. On the other hand, Wang et al. [39] explain the shoulder at 650 °C by the existence of a certain amount of ethers, quinones, and stable oxygen-bearing heterocyclic compounds in the sample. CO<sub>2</sub> evolution peaks below 380 °C can mainly be related to the decomposition of carboxylic groups and esters [40]. FTIR analysis showed that alkyl aryl ethers can also be ascribed to CO<sub>2</sub> precursors because they are degraded at 380 °C. At higher temperatures, CO<sub>2</sub> can be derived from thermally more stable ether structures (mainly aryl aryl ethers), carboxylates, quinones, and oxygen-bearing heterocycles [41].

No significant amount of CH<sub>4</sub> is generated until the temperature is greater than 350 °C, with the first maximum production at 465 °C and a smaller peak at about 560 °C, as illustrated in Fig. 4(d). Dual peaks in the curves indicate formation from different precursor structures within samples. Distinct dual methane peaks occur mostly in demineralized lignite, while remineralized lignite is rather characterized by a shoulder (centred at 450 °C) at a higher temperature. Sorption probably results in the predominant degradation of precursors relating to the high-temperature peak; consequently, in the CH<sub>4</sub> evolution profile of remineralized lignite, the low temperature generation of methane appears only as a shoulder centred at 450 °C. The early CH<sub>4</sub> peak and the shoulder in the samples can mainly be related to the degradation of ethers, as is also indicated by the co-existence of water and CO peaks in the evolution curves and by FTIR analysis. The methane peak in this relatively low temperature region is characteristic of low rank coals and has been associated with the degradation of lignin contained in these materials. This is supported by the observation that the band at 1510 cm<sup>-1</sup>, known as an indicator of lignin [6], disappears from the FTIR spectra at about 440 °C. The second evolution peak of methane can be ascribed to a series of reactions related to the breakup and recombination of the macromolecular structure of coal [42].

### 3.5. Implications for the molecular character of South Moravian lignite

The structure of coal is the subject of long-term intensive research due among other things to a better understanding of the reactions during combustion, liquefaction, and gasification. Mathews and Chaffee [43] provided a comprehensive overview of coal molecular models. They state that over 134 coal models have been published in the literature, while less attention has been paid to the construction of molecular representations of lignite compared to high-rank coals. The reason is not only the wide use of high-rank coals such as bituminous coal, but also the complex and complicated structure of lignite with its smaller aromatic clusters, rich substitutional groups, and many cross-links [9].

Our results show that the structure of South Moravian lignite is predominantly composed of single aromatic rings linked and cross-linked by methylene and ethylene chains [4].

It seems that a significant portion of the lignite structure is also formed by (1,2-diphenylethyl)benzene units [4]. Oxygen occurs in a variety of forms including carboxylic acids, ketones, phenols, alcohols, ethers, and esters, each with different thermal stabilities. The thermal stability may also be different for the same functional groups depending on their surroundings, and this fact should be taken into account when designing lignite models. For example, conjugated carboxylic acids are much more thermally stable than carboxylic acids connected with aliphatic carbons. The relatively well-preserved lignin monomers with a predominance of guaiacyl-derived units are an integral part of the South Moravian lignite structure. Extraction with chloroform and thermochemolysis show that saturated fatty acids are present in lignite through weak interactions and through covalent bonds formed by esters

and ethers. Hence, aliphatic long chains with an even number of carbon atoms (especially C<sub>16</sub> and C<sub>28</sub>) should be incorporated into the lignite model, while odd-numbered chains should represent a minority share.

In the light of our results, the models published by Tromp and Mouljijn [44] and Huttinger and Michenfelder [45] seem appropriate for describing South Moravian lignite. These two models also take into account mono- and multi-valent cations, whose significance for the structural integrity of lignite was observed in our thermal degradation experiments (e.g. carboxylates degraded at a much higher temperature than carboxylic acids).

## 4. Conclusions

The distribution of linear saturated fatty acids in South Moravian lignite has a bimodal character with two maxima at *n*-C<sub>28</sub> and at *n*-C<sub>16</sub>, of which the first represents the main maximum. The identified unbranched saturated fatty acids indicate both a high plant origin ( $\geq$  C<sub>20</sub>) and microbiological origin (< C<sub>20</sub>). The dominance of guaiacyl units indicates a gymnosperm origin for the studied lignite.

FTIR analysis allowed the investigation of changes in functional groups in our lignite sample set during pyrolysis. Alkyl aryl ethers, lignin, and some carboxylic groups were identified as the least thermally stable. The results suggest that lignite contains carboxyl groups of different thermal stability, of which conjugated carboxyl groups degrading at 600 °C appear to be the most thermally stable. Carboxylates degraded up to about 650 °C.

The evolutions of gaseous compounds (i.e. H<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>) during pyrolysis were associated with the presence of different functional groups with various thermal stabilities in the lignite samples. First, physically bound water was released and subsequently a complex thermal reaction in the temperature range of about 200–650 °C took place, which was responsible for the major loss of organic matter.

CO<sub>2</sub> evolution profiles contained a single peak with a distinct maximum at about 380 °C, which coincided with the temperature maximum of the second peak in the DTA curve.

Dual peaks in the CH<sub>4</sub> evolution profiles indicate the degradation of different precursor structures within lignite samples.

CO evolution profiles are formed by a different number of peaks depending on the treatment of lignite. The pyrolysis of remineralized and raw lignite suggests that metal ions (such as calcium ions) contained in the lignite could act as triggers of reactions leading to CO production from different precursors at various temperatures.

H<sub>2</sub>O evolution profiles are formed by dual peaks. Low temperature peaks are related to the evaporation of water from the surface and pores, whereas high temperature peaks are attributed primarily to the condensation of hydroxyl groups. In addition, the dehydration of clay minerals occurs in the temperature range 480–500 °C.

The results show that FTIR analyses of the evolved gases and residues produced through the pyrolysis of lignite in its natural and treated states were complementary and provided a comprehensive view of the progress of degradation.

## Acknowledgments

This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports). We thank anonymous reviewers for suggesting improvements to the original manuscript.

## References

- [1] L. Doskočil, M. Pekař, Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite, *Fuel Process. Technol.* 101 (2012) 29–34.
- [2] A. Hassani, F. Vafaei, S. Karaca, A.R. Khataee, Adsorption of a cationic dye from aqueous solution using Turkish lignite: kinetic, isotherm, thermodynamic studies

- and neural network modeling, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 2615–2624.
- [3] K. Chassapis, M. Roulia, D. Tsirigoti, Chemistry of metal-humic complexes contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral fertilization, *Int. J. Coal Geol.* 78 (2009) 288–295.
- [4] L. Doskočil, L. Grasset, D. Válková, M. Pekař, Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite, *Fuel* 134 (2014) 406–413.
- [5] I. Kögel-Knabner, Analytical approaches for characterizing soil organic matter, *Org. Geochem.* 31 (2000) 609–625.
- [6] J. Peuravuori, P. Žbáňková, K. Pihlaja, Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 829–839.
- [7] M. Havelcová, I. Sýkorová, H. Trejtnarová, A. Šulc, Identification of organic matter in lignite samples from basins in the Czech Republic: geochemical and petrographic properties in relation to lithotype, *Fuel* 99 (2012) 129–142.
- [8] L. Doskočil, L. Grasset, V. Enev, L. Kalina, M. Pekař, Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite: consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification, *Environ. Earth Sci.* 73 (2015) 3873–3885.
- [9] Q. He, K. Wan, A. Hoadley, H. Yeasmin, Z. Miao, TG-GC-MS study of volatile products from Shengli lignite pyrolysis, *Fuel* 156 (2015) 121–128.
- [10] J.A. MacPhee, J.-P. Charland, L. Giroux, Application of TG-FTIR to the determination of organic oxygen and its speciation in the Argonne premium coal samples, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 335–341.
- [11] C. Estournel-Pelardy, A. El-Muffleh Al Hussein, L. Doskočil, L. Grasset, A two-step thermochemistry for soil organic matter analysis. Application to lipid-free organic fraction and humic substances from an ombrotrophic peatland, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 104 (2013) 103–110.
- [12] F. Shadkani, R. Helleur, Recent applications in analytical thermochemistry, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 89 (2010) 2–16.
- [13] P.G. Kralert, R. Alexander, R.I. Kagi, An investigation of polar constituents in kerogen and coal using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with in situ methylation, *Org. Geochem.* 23 (1995) 627–639.
- [14] D. Fabbri, I. Vassura, C.E. Snape, Simple off-line flash pyrolysis procedure with in situ silylation for the analysis of hydroxybenzenes in humic acids and coals, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 235–242.
- [15] S. Dutta, S. Bhattacharya, M. Mallick, A.C. Shukla, U. Mann, Preserved lignin structures in early eocene Surat lignites, Cambay Basin Western India, *J. Geol. Soc. India* 79 (2012) 345–352.
- [16] J. Jelínek, F. Staněk, L. Vizi, J. Honěk, Evolution of lignite seams within the South Moravian Lignite Coalfield based on certain qualitative data, *Int. J. Coal Geol.* 87 (2011) 237–252.
- [17] M. Bishop, D.L. Ward, The direct determination of mineral matter in coal, *Fuel* 37 (1958) 191–196.
- [18] K. Murakami, T. Yamada, K. Kaga, K. Fuda, T. Matsunaga, Cation exchange properties of heat-treated Australian brown coal: influences of pre-exchanged calcium ions, *Colloid Surfaces A* 193 (2001) 153–159.
- [19] H.N.S. Schafer, Determination of the total acidity of low-rank coals, *Fuel* 49 (1970) 271–280.
- [20] H.N.S. Schafer, Carboxyl groups and ion exchange in low-rank coals, *Fuel* 49 (1970) 197–213.
- [21] L. Grasset, A. Amblès, Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemistry technique, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47 (1998) 1–12.
- [22] L. Doskočil, V. Enev, M. Pekař, J. Wasserbauer, The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins, *Org. Geochem.* 95 (2016) 34–40.
- [23] C. Sathe, Y. Pang, C.-Z. Li, Effects of heating rate and ion-exchangeable cations on the pyrolysis yields from a Victorian brown coal, *Energ. Fuel* 13 (1999) 748–755.
- [24] P.A. Meyers, R.A. Bourbonniere, N. Takeuchi, Hydrocarbons and fatty acids in two cores of Lake Huron sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta* 44 (1980) 1215–1221.
- [25] R.J. Parkes, J. Taylor, The relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments, *Estuar. Coast Shelf Sci.* 16 (1983) 173–174.
- [26] L. Zelles, Fatty acid patterns of phospholipids and lipopoly-saccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review, *Biol. Fert. Soils* 29 (1999) 111–129.
- [27] P.E. Kolattukudy, Biopolymer membranes of plants: cutin and suberin, *Science* 208 (1980) 990–1000.
- [28] I.D. Bull, P.Fvan Bergen, C.J. Nott, P.R. Poulton, R.P. Evershed, Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments—V. The fate of lipids in different long-term experiments, *Org. Geochem.* 31 (2000) 389–408.
- [29] J.I. Hedges, D.C. Mann, The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products, *Geochim. Cosmochim. Acta* 43 (1979) 1803–1807.
- [30] S.W. Frazier, K.O. Nowack, K.M. Goins, F.S. Cannon, L.A. Kaplan, P.G. Hatcher, Characterization of organic matter from natural waters using tetramethylammonium hydroxide thermochemistry GC-MS, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 70 (2003) 99–128.
- [31] J. Templier, S. Derenne, J.-P. Croué, C. Largeau, Comparative study of two fractions of riverine dissolved organic matter using various analytical pyrolytic methods and a 13C CP/MAS NMR approach, *Org. Geochem.* 36 (2005) 1418–1442.
- [32] S. Amir, M. Hafidi, L. Lemee, J.-R. Bailly, G. Merlina, M. Kaemmerer, et al., Structural characterization of fulvic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemistry-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 77 (2006) 149–158.
- [33] A. Georgakopoulos, A. Iordanidis, V. Kapina, Study of low rank greek coals using FTIR spectroscopy, *Energy Source* 25 (2003) 995–1005.
- [34] O. Gezici, I. Demir, A. Demircan, N. Ünlü, M. Karaarslan, Subtractive-FTIR spectroscopy to characterize organic matter in lignite samples from different depths, *Spectrochim. Acta Part A* 96 (2012) 63–69.
- [35] P. Painter, M. Coleman, R. Jenkins, P. Whang, P. Walker Jr., Fourier Transform Infrared study of mineral matter in coal. A novel method for quantitative mineralogical analysis, *Fuel* 57 (1978) 337–344.
- [36] J. Madejová, FTIR techniques in clay mineral studies, *Vib. Spectrosc.* 31 (2003) 1–10.
- [37] J.V. Ibarra, R. Moliner, Coal characterization using pyrolysis-FTIR, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 20 (1991) 171–184.
- [38] W. Hodek, J. Kirschstein, K.-H. van Heek, Reactions of oxygen containing structures in coal pyrolysis, *Fuel* 70 (1991) 424–428.
- [39] Z. Wang, H. Shui, C. Pan, L. Li, S. Ren, Z. Lei, et al., Structural characterization of the thermal extracts of lignite, *Fuel Process. Technol.* 120 (2014) 8–15.
- [40] L. Giroux, J.-P. Charland, J.A. MacPhee, Application of thermogravimetric Fourier transform infrared spectroscopy (TG-FTIR) to the analysis of oxygen functional groups in coal, *Energy Fuel* 20 (2006) 1988–1996.
- [41] A. Arenillas, F. Rubiera, J.J. Pis, Simultaneous thermogravimetric-mass spectrometric study on the pyrolysis behaviour of different rank coals, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 50 (1999) 31–46.
- [42] M. Obeng, L.M. Stock, Distribution of pendant alkyl groups in the argonne premium coals, *Energy* 10 (1996) 988–995.
- [43] J.P. Mathews, A.L. Chaffee, The molecular representations of coal – a review, *Fuel* 96 (2012) 1–14.
- [44] P.J.J. Tromp, J. Moulijn, Slow and rapid pyrolysis of coal, in: Y. Yuda (Ed.), *New Trends in Coal Science*, Vol. NATO ASI Series, Series C, Mathematical and Physical Sciences, 244 Kluwer Academic Publishers, Boston, 1987, pp. 305–338.
- [45] K.J. Huttinger, A.W. Michenfelder, Molecular structure of brown coal, *Fuel* 66 (1987) 1164–1165.

Na tomto místě bychom si mohli položit řečnickou otázku: Proč je hnědé uhlí resp. lignit stále předmětem neutuchajícího zájmu mnohých vědeckých skupin, i když se touto problematikou zabýváme od doby, kdy byla „pramáti“ chemie diferenciována na své specifické obory. Hnací síla tohoto zájmu může být spatřena právě ve snaze hledání nových neenergetických aplikací těchto kaustobiolitů. Na druhou stranu je jasné, že bez hlubšího pochopení struktury a složení, a to i na molekulární úrovni by jejich další aplikační rozvoj nebyl možný.

Při studiu organické hmoty kaustobiolitů či jejich specifických frakcí, jako jsou huminové látky a lehce hydrolyzovatelné organické sloučeniny se nám obecně nabízejí dvě cesty, kterými lze tyto sloučeniny charakterizovat. Konkrétněji se jedná o instrumentální techniky, při kterých je vzorek OM podroben destruktivní fragmentaci, anebo je analyzován v neporušené podobě. Pohledem zkušeného fyzikálního chemika je očividné, že každá z těchto cest v sobě skrývá svá pozitiva, ale i negativa. V případě použití destruktivních metod, kam zpravidla řadíme chemické či pyrolytické instrumentální techniky (termická analýza, termochemolýza atd.) lze jejich benefit spatřit právě v tom, že jsme schopni jednoznačně určit nízkomolekulární fragmenty, které jsou produkty degradačního procesu. Na druhou stranu musíme mít na paměti, že v průběhu dekompozice OM může docházet k sekundárním reakcím, jako je přeskupení, praskání kovalentních vazeb, hydrogenace a v neposlední řadě i polymerace, a tudíž interpretace získaných experimentálních výsledků může být někdy svízelná. Naproti tomu, nedestruktivní instrumentální techniky (NMR, FTIR, XPS, XRD, UV/Vis, XANES atd.) výše zmíněné nežádoucí sekundární reakce eliminují, avšak na druhé straně lze také hovořit o jejich nižší molekulární specifitě. Jinými slovy, tyto instrumentální techniky nám poskytují informace o celkovém chemickém složení a dominantních strukturních motivech analyzované sloučeniny, přičemž specifické sloučeniny jsou obvykle obtížně identifikovatelné.

Komplexnímu studiu a charakterizaci organické hmoty jihomoravského lignitu (JML) jsme se zabývali v odborné publikaci: „The characterization of South Moravian lignite in its natural and treated forms using thermal degradation methods“.

Hlavní myšlenkou této práce bylo prozkoumat degradační mechanismy probíhající v průběhu pyrolýzy OM lignitu a na základě identifikovaných produktů se pokusit o celkové zhodnocení jednotlivých stavebních jednotek, které by podaly jasné informace o původní organické hmotě tohoto kaustobiolitu. Jelikož, základní průměrné složení hnědé uhlí nezahrnuje nejen spalitelný podíl (huminit, liptinit, HL, lehce hydrolyzovatelné či vodou extrahovatelné organické sloučeniny), ale i významnou část anorganických sloučenin (popelovin), tak bylo nutné nativní vzorek dále upravovat. Za tímto účelem byl vzorek JML podroben extrakci chloroformem (snížení lipidických frakcí OM), demineralizací (snížení obsahu anorganických příměsí) a v neposlední řadě i remineralizací (sorpce  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na zpřístupněná reakční místa). Výše zmíněné procedury nám poskytly lepší interpretovatelnost získaných experimentálních dat. Na tomto místě bych se rád zastavil, aby bylo možné podat konkrétnější důkazy o vhodnosti této strategie.

Demineralizace JML byla realizována pomocí směsného roztoku HCl a HF, v důsledku, čehož došlo k významnému snížení obsahu anorganických sloučenin až na polovinu původní hodnoty. Tato purifikační procedura přispěla k jednoznačné interpretaci

absorpčních pásů v oblasti tzv. *fingerprintu* (otisku prstu), kde nastává absorpce nejen funkčních skupin a stavebních jednotek organických sloučenin, ale i výše zmíněných anorganických látek, jako je kaolinit, montmorillonit, amorfní a krystalický SiO<sub>2</sub>, kalcit atd.

Lépe řečeno, v důsledku jednotlivých modifikací vzorku JML se nám podařilo jednoznačně identifikovat absorpční pásy, zda pocházejí z anorganických příměsí anebo jsou otiskem přítomnosti organických sloučenin, jako jsou aromáty, alkoholy atd. Mimo jiné byla i ulehčena interpretace vzniklých produktů CH<sub>4</sub>, CO, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O při termogravimetrické analýze spojené s FTIR detekcí (TG/FTIR). V tomto kontextu můžeme říci, že v případě studia nejen nativních kaustobiolitů, ale i HL s vysokým obsahem popela je vhodné před jejich samotnou pyrolyzní analýzou zařadit tuto modifikační proceduru stávající se z extrakce volných organických sloučenin lipidické povahy, demineralizace případně opětovné remineralizace.

Termochemolýza organické hmoty JML derivatizované pomocí tetramethylamonium hydroxidu poukázala na bimodální charakter distribuce lineárních nasycených mastných kyselin (C<sub>12</sub>–C<sub>34</sub>), přičemž nejvyšší obsah byl detekován v případě kyseliny palmitové (*n*-C<sub>16</sub>) a montanové (*n*-C<sub>28</sub>). Soubor identifikovaných mastných kyselin s celkovým počtem uhlíku ≥ 20 poukazuje na převážně rostlinný původ OM lignitu. Naproti tomu, mastné kyseliny s nižšími počty atomů uhlíku tzn. < C<sub>20</sub> jsou výlučně považovány za indikátory mikrobiální činnosti. Naprostá dominance coniferylových resp. guaiacylových jednotek poukazuje na skutečnost, že organická hmota JML pochází především z dřevní hmoty nahosemenných rostlin (*Gymnospermea*).

Infračervená spektrometrie (FTIR) umožnila hlubší studium dekompozičních změn organické hmoty JML v průběhu pyrolyzního procesu. Na základě identifikace příslušných absorpčních pásů a následného vizuálního porovnání v průběhu pyrolyzního procesu (tzn. při teplotě degradace 25 °C, 300 °C, 380 °C, 400 °C, 420 °C, 450 °C, 500 °C, 550 °C, 600 °C a 650 °C) bylo zjištěno, že nejméně stabilními strukturními jednotkami jsou alkyl- a aryl-ethery s jistým příspěvkem karboxylových funkčních skupin. V této studii se nám podařilo zjistit, že organická hmota JML obsahuje více či méně stabilní –COOH funkční skupiny, z nichž teplotně nejstabilnějšími jsou konjugované, jejichž teplota stability byla stanovena na ~ 600 °C. Nicméně je zapotřebí říci, že tyto funkční skupiny, pokud se nacházejí v interakci s anorganickými ionty např. ve formě chelátů, tak je jejich teplota degradace významně posunuta k vyšším hodnotám tj. až 650 °C.

Obecně můžeme říci, že teplotně závislý vznik plyných produktů (tj. H<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) během pyrolýzy OM je ve skutečnosti odrazem přítomnosti rozličných funkčních skupin a strukturních jednotek o různé tepelné stabilitě. Jak výsledky TGA/FTIR analýzy dokládají, tak tepelná degradace lignitu je nejdříve spojena se ztrátou fyzikálně vázané vody (povrchová, porézní atd.), na kterou navazuje celková dekompozice OM viz. teplotní rozsah 200–650 °C. Dvojitý pík, jež je přítomen v profilu vývoje obsahu CH<sub>4</sub> je s největší pravděpodobností spjat s degradací rozličně substituovaných jednotek lignitu, z nichž nejvýznamnějšími jsou stavební jednotky ligninu, případně aromatické frakce HK.



Pyrolyzní profily molekuly CO jsou reprezentovány variabilním počtem maxim, které jsou silně závislé na použité proceduře úpravy JML. Experimentální výsledky pyrolýzy nativního a remineralizovaného lignitu naznačují, že anorganické ionty obsažené v tomto kaustobiolitu by mohly působit jako iniciátory dekompozičních reakcí, které vedou ke vzniku plynných produktů CO. Mimo jiné si nelze nepovšimnout, že teploty degradace odpovídající vzniku CO pokrývají poměrně širokou oblast, a tudíž se můžeme domnívat, že emise tohoto produktu je výlučně spojena s dekompozicí rozličných prekurzorů a stavebních jednotek organické hmoty JML.

Napříč všemi vzorky JML jsou profily vývoje molekul H<sub>2</sub>O reprezentovány duální charakteristikou. V oblasti nízkých teplot pyrolýzy (25–180 °C) nastává vypařování vody, a to jak z povrchu lignitu, tak i z jeho pórů. Naproti tomu, teplotní maxima lokalizovaná v oblasti vyšších teplot pyrolyzního procesu odpovídají kondenzačním reakcím alkyl- a aryl-hydroxylových skupin. V této souvislosti je nutné poznamenat, že v teplotním rozmezí 480–500 °C obvykle nastává i dehydratace anorganických sloučenin obsažených v OM.

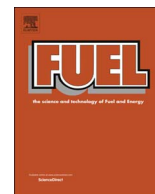
# Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites

Leoš Doskočil, Jana Burdíková-Szewieczková, **Vojtěch Enev**, Lukáš Kalina, Jaromír Wasserbauer

*Fuel*, **2018**, *213*, 123–132.

Impact factor (2020): 6,609

JCR Category: Energy & Fuels-Scie – Q1



## Full Length Article

## Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites



Leoš Doskočil\*, Jana Burdíková-Szewieczková, Vojtěch Enev, Lukáš Kalina, Jaromír Wasserbauer

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno 612 00, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Humic acids  
Lignite  
Fluorescence  
UV/Vis  
FTIR  
XPS

## ABSTRACT

Humic acids isolated from seven lignite samples from six European coal basins were characterized using spectral methods and elemental analysis and compared with each other. X-ray photoelectron spectroscopy and fluorescence spectrometry are not commonly used for the investigation of lignite humic acids, although they may provide relevant information. Comparison of the examined lignite humic acids shows that they are very similar to each other in chemical nature regarding the at least degree of aromaticity, molecular weight, and the distribution of functional groups. Fluorophores of lignite humic acids lie within the A region with typical maxima centred in the range 255–265/460–510 nm. EEM spectra have the character of fingerprints for humic acids, and lignites (as the starting material). In this work, the capacity of lignite as a parent source of humic acids for agricultural applications is appreciated mainly on the base of extractability and ash content.

## 1. Introduction

Lignites are low-rank coals formed from original phytomass during peatification followed by coalification, and are considered as intermediate forms between peat and bituminous coal. Lignites are mainly used as fuel and for energy production, even though they have low calorific values and high amounts of water, oxygen, and ash. In this respect, the sorption of hazardous species [1], the production of small compounds (e.g. malonic acid, succinic acid) [2], and use in agricultural practice [3] may be regarded as more suitable ways of processing these immature coals.

Lignites represent heterogeneous systems composed of numerous components in various portions. For example, lipids represent a minor part ranging from 1 to 10 wt%, being extractable with non-polar solvents such as chloroform and hexane [5]. In contrast, a considerable proportion of lignite is composed of humic substances traditionally divided on the basis of their alkaline and acid solubility into three classes: humic acids, fulvic acids, and humin. Humic substances are naturally occurring molecules, ubiquitous not only in sediments (peat, coal, leonardite) but also in water and soil. Humic acids are insoluble under acidic conditions (pH 1–2), but become soluble and extractable in alkaline solutions. Lignites are the most abundant fossil fuel, which are rich in humic acids and can be regarded as their major source [4]. Lignite humic acids may be used effectively as natural fertilizer and soil conditioner to remediate soil structure and to improve plant growth [6–9]. The active and positive role of humic acids in soil is related to

their slow release of plant nutrients, cation exchange capacity, pH-buffering alkalinity, water-holding capacity, and interaction with metal ions and xenobiotic organic molecules [3,10]. For agricultural purposes, the chemical properties of lignite humic acids should be optimal, i.e. as similar as possible to the humic acids commonly present in soils. To improve the properties of these natural products, different treatments have been applied, so-called regeneration and modifications, using oxidizing agents (oxygen, nitric acid, hydrogen peroxide etc.) and different cross-linking reagents like formaldehyde [11–13]. Unfortunately, lignitic humic acids are the subject of less interest compared to humic acids originating from other sources. Lignite humic acids contain various functional groups (e.g. carboxylic, hydroxyl groups) and moieties (aliphatic chains and aromatic rings) which characterize their composition and properties [14]. They are characterized by higher carbon content, lower oxygen and nitrogen content, more aromatic moieties, and less carboxylic groups in comparison with humic acids from soil and peat [11,15,16]. The recognizable differences between soil, peat, and coal humic acids can mainly be related to varying degrees of maturity [16]. From a molecular standpoint, lignite humic acids are characterized by the presence of methylene and ethylene bridges between the aromatic rings [2]. Grasset et al. [17] showed that low rank coal humic acids contain intact lignin monomers of predominantly gymnosperm origin. In contrast to soil humic acids, lignite humic acids were shown to contain saturated long chain alkanic acids with a strong predominance of even numbered homologues [16].

\* Corresponding author.

E-mail address: [doskocil@fch.vutbr.cz](mailto:doskocil@fch.vutbr.cz) (L. Doskočil).

Elemental analysis and spectrometric methods including ultraviolet-visible (UV-Vis) and Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry are often used in the characterization of coal humic acids. Advanced techniques such as fluorescence spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) are applied to a lesser extent, even though they can provide a more coherent picture of this molecular system with coal provenance. Furthermore, the paucity of available experimental data in the literature makes comparison between lignite humic acids and humic acids of different origins difficult. Nuclear magnetic resonance (NMR) and pyrolysis-gas chromatography combined with mass spectroscopy (pyr-GC-MS) are very helpful techniques in investigating the structure of humic acids and their aromaticity [18,19]. The disadvantage of this approach is the lack of availability of such equipment.

The present study is focused on the characterization and mutual comparison of humic acids from different origin, i.e. seven lignite samples from various European basins. The analysis was based on a multiple-technique approach including traditional and commonly available methods (elemental analysis, FTIR, UV-Vis spectrometry) and advanced methods (fluorescence spectrometry, XPS). Of the various fluorescence spectrometry methods available, excitation-emission matrix spectroscopy (EEM) appears to be particularly useful for the investigation of different lignite humic acids, inasmuch as EEM spectra can be used as fingerprints.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Seven lignite samples from different coal basins in Central and Eastern Europe were selected for the extraction of humic acids. These basins included Balsha and Maritza East (Bulgaria), Dragačevo (Tijanje deposit) and Kostolac (Serbia), Konin (Poland), and the South Moravian Coalfield (the northern part of the Vienna basin in the Czech Republic). Two lignites from the Kazimierz (sample K1) and Lubstów (sample L2) mines belonging to the Konin basin were also subject to extraction; the sample codes (K1 and L2) correspond to the designation used in Fabiańska and Kurkiewicz [20] for these coals. Detailed characteristics of all the lignites, including their geochemical and petrographic descriptions, have been published elsewhere [20–24].

Humic acids were extracted from lignites using a modified procedure recommended by the International Humic Substances Society [25]. Briefly, the lignite samples were finely milled (to a grain size of under 0.2 mm) and demineralized with 0.1 M HCl in the ratio of 1:10 (sample:solution), and, after decalcification, the suspensions were washed with distilled water until almost neutral pH was achieved. All samples were shaken overnight with 0.1 M NaOH and 0.1 M pyrophosphate solution under N<sub>2</sub> in the ratio of 1:10 (sample:extractant). After centrifugation (4000 rpm, 30 min), humic acids were precipitated by acidification to pH < 2 with 6 M HCl, and further separated by centrifugation (4000 rpm, 20 min). Precipitated humic acids were treated with a mixture of 0.5 vol% HCl-HF for a period of 24 h and subsequently separated by centrifugation. The humic acids were purified and dialysed using a Spectrapore membrane (MWCO 3500) until free chloride ions were washed out, and finally freeze-dried. The samples were left to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C, which resulted in the final equilibrium moisture.

### 2.2. Sample characterization

#### 2.2.1. Elemental analysis

Elemental compositions of the humic acids were determined using a CHNS-O EA 3000 Elemental Analyzer. The % oxygen content was calculated by difference and the data obtained were corrected for moisture and ash content.

#### 2.2.2. UV-Vis spectrometry

UV-Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/Vis spectrophotometer by recording the absorption spectra between 200 nm and 900 nm. Samples were measured in a 10 mm quartz cuvette and with a phosphate buffer blank (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### 2.2.3. FTIR spectrometry

FTIR spectra were obtained by means of a Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) technique using a Nicolet iS50 spectrometer. Approximately 2 mg of powder was ground with 200 mg of KBr in an agate mortar and then transferred to the sample holder cup. The DRIFT accessory sample holder cup was filled with the mixture and the top was leveled off. All spectra were recorded over the range 4000–400 cm<sup>-1</sup> at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and were the average of 128 scans.

#### 2.2.4. Fluorescence spectrometry

For fluorescence measurements, lignite humic acids were dissolved at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> of organic carbon in phosphate buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). All spectra were run on a Fluorolog fluorescence spectrophotometer with a scan speed of 600 nm min<sup>-1</sup>, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. Emission spectra were collected in the ranges 330–600 nm and 390–600 nm with excitation wavelengths of 310 nm and 370 nm for the obtained biological fluorescence index (BIX) and fluorescence index (FI), respectively. The excitation-emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range 250–600 nm, with the emission and excitation increment set at 5 nm. For the determined of Milori index [26] and humification index (HIX) or Zsolnay index [27], emission spectra were recorded over the range of 460–650 nm and 280–600 nm using excitation wavelengths of 400 nm and 254 nm, respectively. The sample cell with humic acid solution was kept at a temperature of 20 °C during each measurement. Primary and secondary inner filter effects were corrected. The fluorescence intensity values of samples (in counts per second, CPS) were corrected using the method devised by Lakowicz [28].

#### 2.2.5. XPS spectrometry

XPS spectra were measured with a Kratos AXIS Ultra DLD spectrometer using a monochromatic Al K $\alpha$  source operating at 150 W (10 mA, 15 kV). Milled samples were molded into a disc with a diameter of 10 mm. High resolution spectra were obtained using an analysis area of ~300  $\mu$ m  $\times$  700  $\mu$ m and 20 eV pass energy with a step size of 0.1 eV. The analyzer chamber pressure was less than 2.10<sup>-7</sup> Pa. The Kratos charge neutralizer system was used for all analyses. The spectra were corrected using the random hydrocarbon peak at 284.6 eV. Spectra were analyzed using CasaXPS software (version 2.3.15).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Yields and elemental analysis

The yields and elemental analyses of lignite humic acids are summarized in Table 1. The yield of humic acids ranged from 3.0% to 11.4% depending on the type of lignite. The highest yields (11.4% and 11.1%) were obtained for humic acids isolated from South Moravian and K1 lignites. In contrast, the lowest yields (3.0% and 3.2%) were determined for humic acids extracted from Maritza East and Kostolac lignites. It is worth noting that yields depend on the selected methods of isolating and purifying humic acids, and therefore they reflect the degree of proportion of humic acids in lignite rather than the total content. Likewise, ash content of humic acids can depend both on the sample preparation procedure as well as on the origin of the source material. Extremely high ash contents were determined for humic acids originating from Kostolac and Balsha lignites. Lignites (e.g. Kostolac, Balsha) with high ash contents and low contents of humic acids appear

**Table 1**

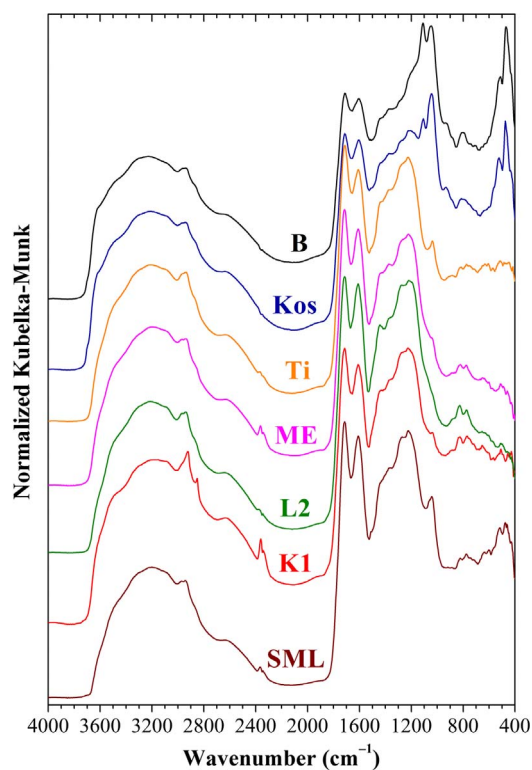
Ultimate, proximate analyses, and yields of humic acids.

Lignite	Yield (%)	Moisture (wt%)	Ash (wt%)	Elemental composition (at.%)					Atomic ratios		
				C	H	N	S	O <sup>diff.</sup>	H/C	O/C	N/C
SML <sup>a</sup>	11.4	4.0	0.5	41.4 ± 0.4	35.7 ± 2.0	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.8	21.8 ± 2.4	0.86 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.02 ± 0.01
ME <sup>b</sup>	3.0	6.3	2.5	42.9 ± 0.7	37.2 ± 0.9	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.7	17.4 ± 2.0	0.87 ± 0.03	0.41 ± 0.05	0.04 ± 0.01
Balsha	5.0	5.5	23.5	35.8 ± 0.7	35.6 ± 2.1	1.9 ± 0.3	0.5 ± 0.6	26.2 ± 2.6	0.99 ± 0.05	0.73 ± 0.08	0.05 ± 0.01
Kostolac	3.2	6.8	15.0	38.0 ± 0.8	35.3 ± 1.4	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.5	24.4 ± 2.1	0.93 ± 0.04	0.64 ± 0.06	0.04 ± 0.01
Tijanje	6.5	3.5	1.4	42.0 ± 0.6	38.4 ± 1.2	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.4	17.0 ± 1.5	0.91 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.04 ± 0.01
K1	11.1	2.7	1.0	43.9 ± 0.6	38.9 ± 0.9	0.8 ± 0.6	0.6 ± 0.4	15.9 ± 1.4	0.89 ± 0.04	0.36 ± 0.09	0.02 ± 0.01
L2	7.6	3.9	0.7	44.7 ± 1.0	38.6 ± 1.5	0.7 ± 0.4	0.3 ± 0.4	16.0 ± 1.2	0.86 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.01 ± 0.01

<sup>a</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.<sup>b</sup> ME, the abbreviation for Maritza East lignite.**Table 2**

Calculated absorbance ratios, fluorescence indexes, and values of fluorescence maxima in EEM spectra with values of fluorescence intensities for lignite humic acids.

Spectrometric characteristics	SML <sup>a</sup>	K1	Kostolac	Balsha	L2	Maritza East	Tijanje
E <sub>Et/Bz</sub>	0.70 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.79 ± 0.05	0.74 ± 0.05
E <sub>250/365</sub>	2.64 ± 0.00	2.63 ± 0.01	2.61 ± 0.03	2.70 ± 0.01	2.66 ± 0.02	2.65 ± 0.02	2.71 ± 0.01
E <sub>254/410</sub>	4.11 ± 0.02	4.14 ± 0.05	3.98 ± 0.01	4.18 ± 0.00	4.40 ± 0.15	4.15 ± 0.03	4.16 ± 0.02
E <sub>4/6</sub>	5.91 ± 0.26	4.84 ± 0.53	4.91 ± 0.36	5.16 ± 0.25	5.98 ± 0.36	5.30 ± 0.12	5.23 ± 0.30
ΔlogK	0.75 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.73 ± 0.03	0.77 ± 0.01	0.73 ± 0.03	0.73 ± 0.03
FI	0.96 ± 0.02	0.95 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.10 ± 0.00	1.08 ± 0.01	0.94 ± 0.02	1.09 ± 0.01
BIX	0.44 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.40 ± 0.02	0.56 ± 0.00
HIX	12.64 ± 1.10	13.42 ± 0.59	15.18 ± 0.79	14.67 ± 0.19	11.51 ± 2.32	16.71 ± 1.26	11.92 ± 3.23
Milori index (10 <sup>8</sup> )	1.28 ± 0.34	1.36 ± 0.17	1.92 ± 0.11	1.75 ± 0.25	1.35 ± 0.21	1.67 ± 0.29	1.54 ± 0.15
Ex/Em (I <sub>F</sub> ) <sup>b</sup>	505/260 (2.5)	490/260 (2.9)	495/260 (4.0), 505/260 (4.1)	480/265 (3.3), 485/ 255 (3.3), 495/260 (3.3)	460/255 (4.9), 475/ 255 (5.0), 500/260 (5.0)	505/260 (2.8), 510/265 (2.8)	475/260 (3.3), 485/ 260 (3.3), 495/255 (3.3)

<sup>a</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.<sup>b</sup> Excitation wavelength (nm)/Emission wavelength (nm) and value of fluorescence intensities (I<sub>F</sub>) for corresponding lignite humic acids, I<sub>F</sub> × 10<sup>6</sup> CPS (counts per second).**Fig. 1.** FTIR spectra of humic acids extracted from various lignite samples. Abbreviations: Balsha (B), Kostolac (Kos), Tijanje (Ti), Maritza East (ME), South Moravian lignite (SML).

to be less suitable as sources of humic acids for agricultural purposes.

The elemental compositions are presented in Table 1 in atomic percent, because, in contrast to weight percent, it better reflects the proportion of hydrogen in the structure of humic acids. Despite their different origins, the elemental compositions of the humic acid samples are comparable: C, 35.8–44.7 at.%; H, 35.3–38.9 at.%; N, 0.7–1.9 at.%; S, 0.2–1.1 at.% and O, 15.9–26.2 at.%. The elemental composition of humic acids from our sample set was similar to that of lignite humic acids from other regions of the world [16,18,29–31].

The H/C atomic ratio is considered as an indicator of aromaticity and, for our set of samples, lay within a narrow range, i.e. from 0.86 to 0.99. It appears that the aromaticity of humic acids from Balsha lignite was the lowest of all the samples. In lignite humic acids, the H/C atomic ratio is generally lower than values published in previous studies [18,29,30] and values for our samples were within the range. However, some H/C atomic ratios for lignite humic acids with values greater than 1 have been reported [16,31,32], even though such values are mainly characteristic of soil humic acids [16]. The O/C atomic ratio reflects the amount of oxygen-containing groups (e.g. carboxylic acid) in organic material. This ratio ranges from 0.32 to 0.54 in lignite humic acids, as previously reported in the literature [18,31], with a typical value of around 0.4 [29,30]. For our samples set, the O/C ratio was extended over a broader range than that reported in the literature – specifically, from 0.36 to 0.73. We assume that the higher values for the O/C ratio for humic acids from Balsha and Kostolac lignites can be attributed to the high ash content rather than be related to differences in the structure of humic acids. The N/C atomic ratio reflects the amount of nitrogen in organic material. N/C ratio values were situated at about 0.02 and 0.05 for our series of samples. Higher values of the N/C ratio (frequently around 0.05) are characteristic of humic acids from soil and peat, while lignite humic acids usually exhibit values < 0.05 [16,18,29,31].



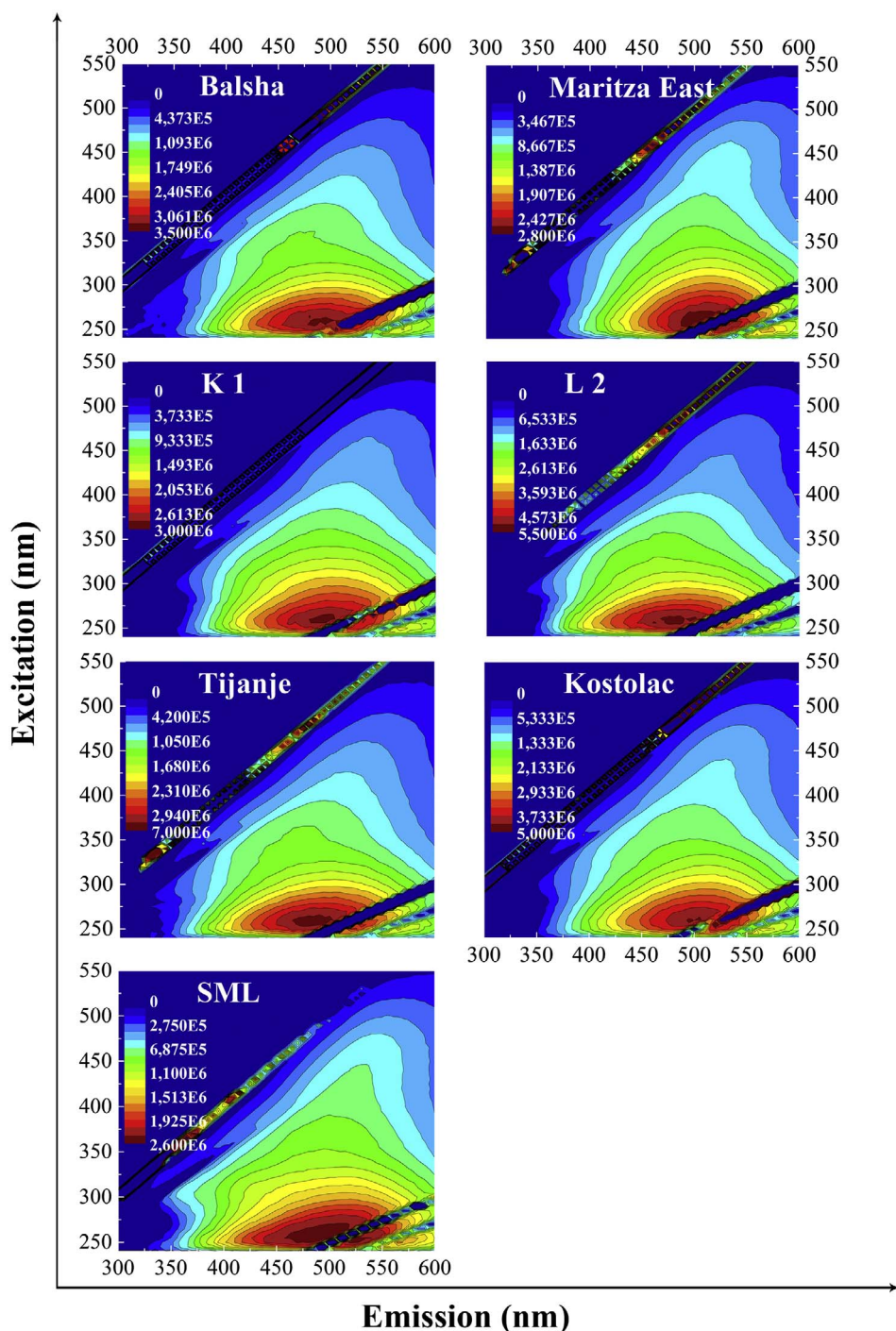


Fig. 2. EEM spectra of humic acids extracted from various lignite samples.

### 3.2. UV–Vis spectrometry

UV–Vis absorbance spectra (not shown) of humic acids from lignites are featureless and characterized by the absence of maxima and/or minima; absorbance exponentially decreases with increasing acquisition wavelength.

In our study, lignite humic acids absorbed radiation significantly at wavelengths between 200 and 400 nm. This indicates that the vast majority of chromophores include aromatic groups with various degrees and types of substitution, such as monosubstituted and polysubstituted phenols and different aromatic acids [33]. Some authors have considered humic acid UV–Vis spectra to be of little usefulness, although a number of studies have shown that the analysis of these

spectra by means of absorption ratios may provide valuable information on the chemical structure of humic acids that may also complement information obtained using other analytical techniques [34]. The  $E_{ET/Bz}$  ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to that at 203 nm) indicates the presence of aromatic rings substituted predominantly with aliphatic functional groups, or scarce substitution in aromatic rings if the ratio is low. On the other hand, higher  $E_{ET/Bz}$  ratios are associated with the presence of aromatic rings substituted with hydrophilic groups such as hydroxyl, carbonyl, ester, and carboxyl groups [33]. In our study, the values of the  $E_{ET/Bz}$  ratio ranged from 0.70 to 0.79 (Table 2). These results suggest that the substitution of aromatic rings with oxygen-containing functional groups was comparable for all the lignite humic acids from our sample set. Unfortunately, experimental data on

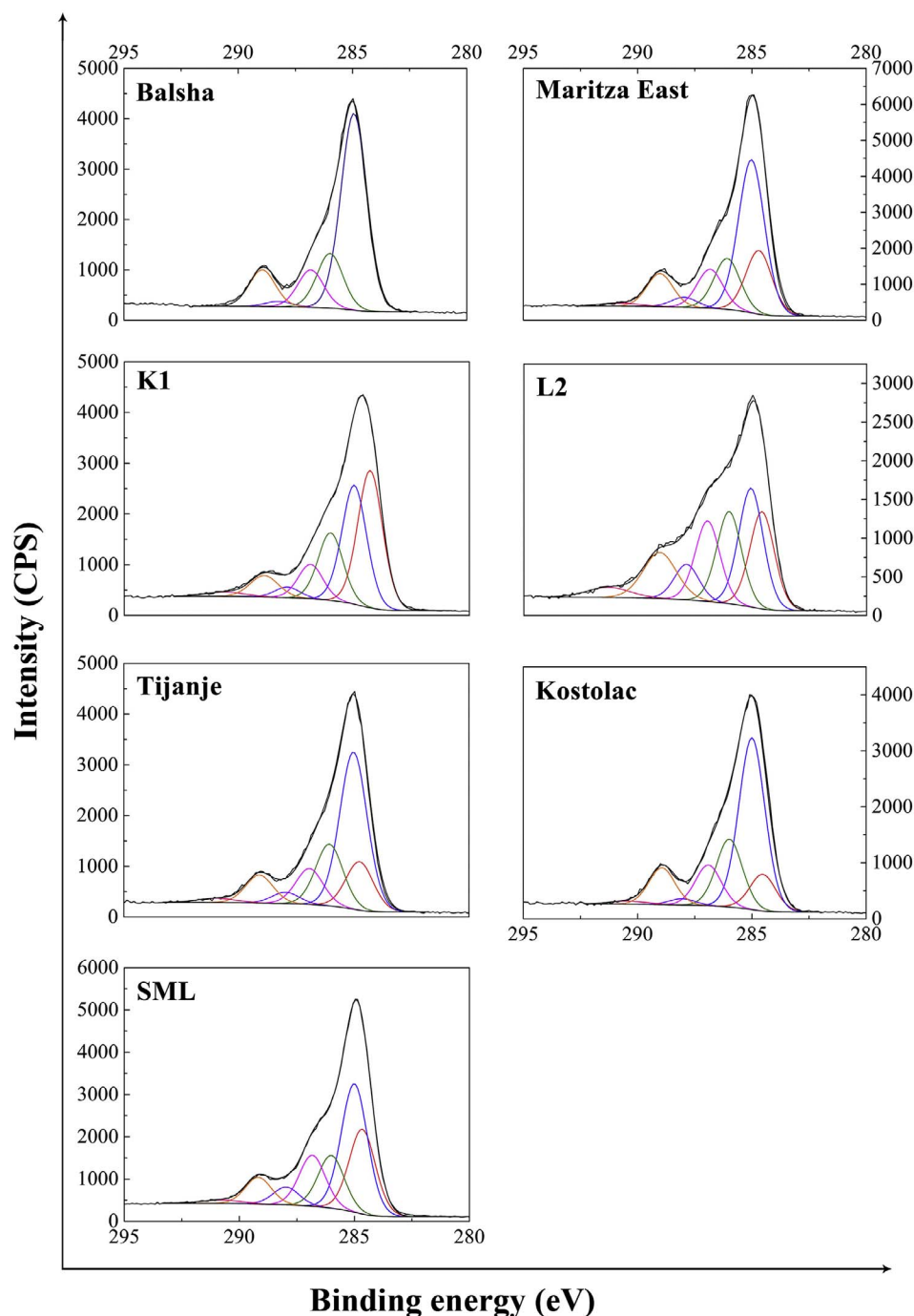


Fig. 3. XPS carbon (C 1s) spectra for lignite humic acids. Functional groups: red – aromatic, blue – aliphatic, green – ether/alcohol, purple – ketonic, violet – pyrrole, orange – carboxylic, and pink –  $\pi$ - $\pi^*$  shake-up satellite. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

comparisons with other humic acids are missing in the literature. The frequently used  $E_{4/6}$  ratio (the ratio of absorbance at 465 nm to that at 665 nm) reflects the degree of aromaticity and molecular weight. For the lignite humic acids studied, this ratio demonstrated a high standard deviation (Table 2), because absorption at wavelengths above 500 nm was approximately zero. As a result, the  $E_{265/465}$  ratio (the ratio of absorbance at 265 nm to that at 465 nm), being consistent with the  $E_{4/6}$  ratio, is a more appropriate ratio to determine. In addition, the ratio  $E_{2/3}$  (the ratio of absorbance at 250 nm to that at 365 nm), the ratio  $E_{254/410}$  (the ratio of absorbance at 254 nm to that at 410 nm), and  $\Delta \log K$  (the logarithm of the ratio of absorbances at 400 nm and 600 nm) reflect the degree of aromaticity and molecular weight: the lower the ratios, the higher the aromaticity and molecular weight [35,36]. It is obvious from the data in Table 2 that differences in the absorption

ratios for lignite humic acids are not significant enough to enable UV–Vis ratios to be used to determine the degree of aromaticity or molecular weight. This observation is in contradiction with published studies dealing with humic acids derived from other sources (e.g. soils). One possible explanation could be that the examined samples originate from coals covering the same range of rank and are probably formed by transformations of very similar organic materials characterized by a comparable maturity rank.

### 3.3. FTIR spectrometry

The FTIR spectra of lignite humic acids are presented in Fig. 1 and their interpretation have been done according to the literature data [37]. All the spectra contain a sharp and intensive band at  $1712 \text{ cm}^{-1}$

**Table 3**  
Relative distribution of carbon functionalities in lignite humic acids determined by XPS.

Lignite	Aromatic		Aliphatic		Ether/alcohol		Ketonic		Pyrrole		Carboxylic		$\pi$ - $\pi^*$ shake-up satellite	
	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>	BE <sup>a</sup>	RP <sup>b</sup>
K1	284.3	34.3	285.0	29.7	286.0	16.9	286.9	8.6	287.9	2.7	288.9	6.1	290.6	1.8
ME <sup>c</sup>	284.7	17.4	285.0	43.1	286.1	14.4	286.8	11.0	288.0	2.9	289.0	9.4	290.8	1.3
Balsha	–	–	284.9	59.2	286.0	16.6	286.8	11.3	288.2	1.7	289.0	11.1	–	–
Kostolac	284.5	10.0	285.0	47.0	286.0	18.6	286.9	11.2	288.1	1.8	288.9	10.2	290.4	1.3
L2	284.6	19.2	285.1	23.5	286.0	18.3	287.0	16.0	287.9	7.1	289.1	12.4	291.3	3.5
Tijanje	284.8	13.9	285.0	45.0	286.1	17.7	286.9	10.3	288.0	3.3	289.1	8.1	290.0	1.8
SML <sup>d</sup>	284.7	23.1	285.0	35.0	286.0	14.4	286.8	13.9	288.0	4.9	289.2	7.3	290.8	1.5

<sup>a</sup> BE, binding energy (in eV).

<sup>b</sup> RP, relative proportion (in%) of each functional group corresponding to fitted curves in Fig. 3.

<sup>c</sup> ME, the abbreviation for Maritz East lignite.

<sup>d</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.

corresponding to carboxylic groups, which are also indicated by the broad band centred at about  $2625\text{ cm}^{-1}$  resulting from the OH stretching vibrations of the hydrogen-bonded COOH. Another distinctive band occurring at  $1610\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to stretching C=C groups in aromatic rings, even though C=CO vibrations of conjugated carbonyl groups cannot be completely excluded. Three out-of-plane C–H deformation bands were observed in the  $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  region and were assigned to aromatic structures with isolated aromatic hydrogens ( $880\text{ cm}^{-1}$ ), two adjacent hydrogen per ring ( $830\text{ cm}^{-1}$ ), and four adjacent hydrogens ( $776\text{ cm}^{-1}$ ). The first of these bands was observed only as a weak shoulder in the spectra, while it was entirely missing in the humic acids from South Moravian and Kostolac lignites. In the case of humic acids from Balsha and Kostolac lignites, the position of the band was shifted to  $810\text{ cm}^{-1}$  probably due to the presence of mineral matter. The appearance of aliphatic chains is revealed in the  $3000\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$  zone, where the asymmetric and symmetric C–H stretching of methylene groups at  $2925\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$ , respectively, can be resolved. The deformation vibrations of methylene and methyl groups occur in the spectra at  $1440\text{ cm}^{-1}$  and  $1380\text{ cm}^{-1}$ . The broad band centred at about  $3200\text{ cm}^{-1}$  indicates the presence of OH groups. The main differences among the spectra of lignite humic acids appear in the regions  $1100\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$  and  $1320\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ . The latter region is characterized by a shoulder at  $1270\text{ cm}^{-1}$  and a weak band at  $1223\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the C–O vibration in aryl ethers, and to the C–O stretching and O–H bending of carboxylic acids and/or phenolic units, respectively. In comparison with other samples, the humic acids from Balsha lignite did not contain the vibration at  $1223\text{ cm}^{-1}$ . In the first region, only a band at  $1110\text{ cm}^{-1}$  is present in the spectra of humic acids isolated from Balsha and Kostolac lignites, which most probably arises from the Si–O vibration in silica. The band at  $1040\text{ cm}^{-1}$  is dominant in the spectra of humic acids from Balsha and Kostolac lignites, mainly due to the high ash content, whereas it is absent in the sample isolated from L2. The other samples contain this band with a lower intensity. The appearance of the band at  $1040\text{ cm}^{-1}$  is most probably associated with the Si–O stretching vibration in silica, although a contribution from alcohol and alkyl ethers cannot be excluded in this region. Bands and shoulders at wavenumbers less than  $700\text{ cm}^{-1}$  are attributed to mineral matter, from which bands at  $522\text{ cm}^{-1}$  and  $473\text{ cm}^{-1}$  are the most obvious. The bands at  $3696\text{ cm}^{-1}$ ,  $3622\text{ cm}^{-1}$ ,  $935\text{ cm}^{-1}$ ,  $522\text{ cm}^{-1}$ , and  $473\text{ cm}^{-1}$  clearly show the presence of kaolinite in the humic acids originating from Balsha and Kostolac lignites. The FTIR spectra show that the studied samples mainly differ with respect to the content of inorganic constituents.

### 3.4. Fluorescence spectrometry

A number of studies have demonstrated the relevance of fluorescence spectrometry in characterizing and discriminating between

different types of humic substances [34]. To the best of our knowledge, there is very little available information about the application of this method for the study of coal humic acids.

The Fluorescence index (FI) is a recently developed parameter used to distinguish terrestrially- and microbially-derived organic matter and is defined as the ratio of emission intensities at  $450/500\text{ nm}$  for emission spectra measured at an excitation wavelength of  $370\text{ nm}$ . The literature reports that the FI is about 1.9 for aquatic and microbial sources and about 1.3 for terrestrial and soil sources [38,39]. In the present study, FI values for lignite humic acids ranged between 0.94 and 1.10 (Table 2) and is in the region of humic acids of terrestrial origin. With respect to scant previously published results and ours, it appears that the FI value for coal humic acids is  $\sim 1$  [39].

Another index has recently been proposed to assess the relative contribution of autochthonous organic matter, called the biological index (BIX). The index is calculated from the ratio of emission intensities at  $380/430\text{ nm}$  at an excitation wavelength of  $370\text{ nm}$ . Values of BIX greater than 1 correspond to biological and microbial origins, whereas humic acids with lower values of the index are considered to contain little autochthonous organic matter [39,40]. For lignite humic acids in this study, the calculated BIX values ranged from 0.40 to 0.56 (Table 2) and indicate low autochthonous components. Unfortunately, the absence of experimental data does not allow comparison with other studies.

To determine the degree of aromaticity in humic acids by means of fluorescence spectrometry, the Zsolnay index or humification index (HIX) [27] and Milori index [26] are commonly applied. HIX is calculated as the ratio of the areas of two regions ( $435\text{--}480\text{ nm}$  and  $300\text{--}345\text{ nm}$ ) using a fixed excitation wavelength of  $254\text{ nm}$ . Milori index represents the total area under an emission spectrum using a fixed excitation wavelength of  $440\text{ nm}$ . The HIX and Milori indexes reflect higher aromaticity if their values increase. Subtle differences among the values of both indices (Table 2) suggest that the examined samples have a similar degree of aromaticity. This assumption is consistent with the results from the UV–Vis spectrometry experiments. It appears that fluorescence spectrometry, as well as UV–Vis spectrometry, is also unable to reliably distinguish the degree of aromaticity among individual lignite humic acids, although these techniques are commonly used. In accordance with our conclusions, NMR data published in literature [18,19,41] reveal that aromaticity of lignite humic acids varies within a narrow range from 46 to 52%, reflecting a similar degree of aromaticity.

EEM spectra or EEM contour maps of the studied lignite humic acids (Fig. 2) were not corrected for Rayleigh scattering peaks, appearing in the form of diagonal bands. First order and second order Rayleigh scattering peaks occur at the same wavelength as the excitation light and at twice this wavelength, respectively. The first notable observation from the EEM spectra is that humic acids contain fluorophores which ultimately participate in the fluorescence of lignites. Individual EEM

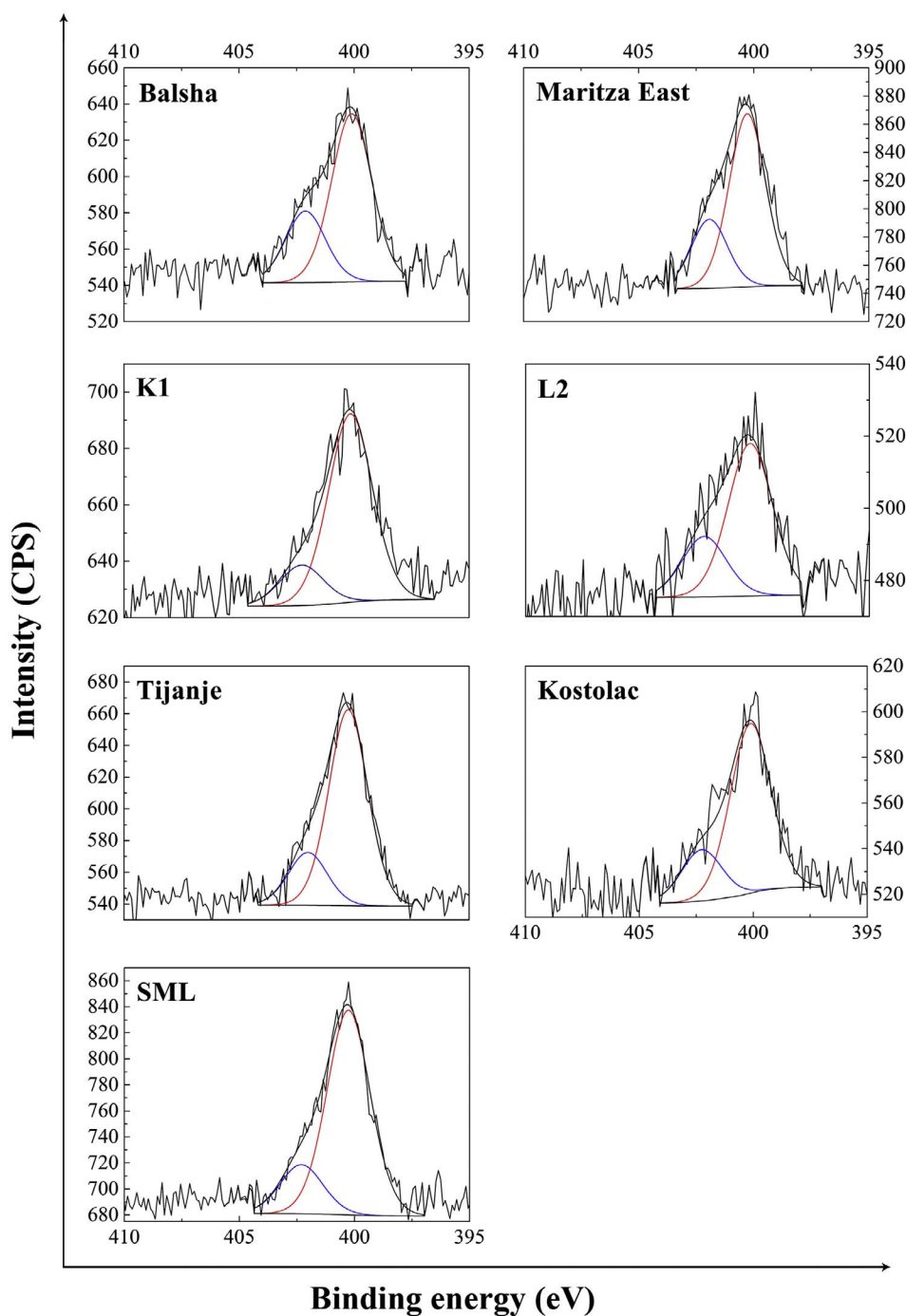


Fig. 4. XPS nitrogen (N 1s) spectra for lignite humic acids. Red and blue curves correspond to pyrroles and ammonium groups, respectively.

spectra are characterized by peaks of maximum intensity which differ in their number and position, and correspond to specific fluorophores or fluorophore families. The values of the fluorescence intensity and excitation-emission wavelength pairs of the main peaks in the EEM spectra from our samples set are presented in Table 2. The maxima are only located at excitation wavelengths in the ultraviolet region in the range 255–265 nm and at emission wavelengths in the range 460–510 nm. These maxima lie within the region referred to as the A region, according to the terminology proposed by Coble [42]. It is obvious that humic acids are characterized by significant spectral overlapping and peak broadening due to their heterogeneous nature. The fluorescence region ( $\lambda_{\text{ex}} \geq 400$  nm,  $\lambda_{\text{em}} \geq 470$  nm), designated as V, occurring usually in coal humic acids [35,43], was not observed in the spectra from our samples. Maxima in this region are associated with

intramolecular charge-transfer states, rather than with independent fluorophores such as linearly condensed aromatic rings [44] or lipids [5]. The absence of the V domain in the examined samples can be explained by the different methods used to isolate and purify humic acids from the original matrix. The discrepancy between our results and already published spectra could also be due to the fact that the latter were collected up to excitation wavelengths lower (220 nm) than those employed in our study (240 nm) [45]. It is worth noting that the characteristic C domain for humic substances originating from soils and peats with fluorescence maxima corresponding to excitation/emission wavelength pairs of 320–360/420–460 nm was also not observed in our spectra. More detailed scrutiny of the EEM spectra and their fluorescence maxima reveals that they differ from each other in contour plots and the number and values of their excitation/emission wavelength



**Table 4**  
Relative distribution of nitrogen functionalities in lignite humic acids determined by XPS.

Lignite	Pyrrole nitrogen		Ammonium nitrogen	
	BE <sup>a</sup> (eV)	RP <sup>b</sup> (%)	BE <sup>a</sup> (eV)	RP <sup>b</sup> (%)
K1	400.2	82.3	402.3	17.7
ME <sup>c</sup>	400.3	71.5	401.9	28.5
Balsha	400.1	70.1	402.1	29.8
Kostolac	400.1	76.8	402.3	23.2
L2	400.1	71.6	402.2	28.4
Tijanje	400.3	78.8	402.0	21.2
SML <sup>d</sup>	400.3	80.6	402.3	19.4

<sup>a</sup> BE, binding energy.

<sup>b</sup> RP, relative proportion of each functional group corresponding to fitted curves in Fig. 4.

<sup>c</sup> ME, the abbreviation for Maritza East lignite.

<sup>d</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.

pairs. Hence, providing that the same extraction and purification procedures are used, EEM spectra could be used as a potential fingerprint and for rapid differentiation among humic acids derived from various coal basins, as well as to distinguish the parent lignites. For the humic acids in our sample set, typical maxima were restricted to wavelengths in the range 255–265/460–510 nm, suggesting that all of them have similar structures and components. Some maxima for the different humic acids occur at the same, or very similar excitation/emission positions (e.g. 260/505 nm), implying that the fluorophores in these humic acids are either the same or from the same fluorophore family. Using the differences in wavelength and fluorescence intensity, various structural units in the humic acids can be elucidated. At nearly the same excitation wavelength, some peaks in region A shift toward a longer emission wavelength, while the fluorescence intensity remains substantially unchanged. The shorter emission wavelengths measured in the EEM spectra can be associated with simple aromatic structures (1- to 3-ring) and low molecular weight components. In contrast, the longer emission wavelengths can indicate the presence of condensed aromatic rings and electron-withdrawing groups such as carbonyl-containing substituents, and hydroxyl and alkoxy groups. It is well known that polycyclic aromatic hydrocarbons fluoresce at wavelengths ranging from 310 to > 400 nm when subjected to excitation at 245–280 nm [46]. The lower emission wavelengths between 340 and 430 nm could be associated with three-ring and/or four-ring aromatic structures, whereas higher emission wavelengths over 430 nm could be attributed to more than four-ring aromatic structures [46–49]. According to a recently published work [5], region A can be ascribed not only to aromatic ring systems but also to lipids such as steroids.

### 3.5. XPS analysis

XPS spectrometry is a surface analysis technique capable of supplying chemical composition to a depth of several nanometers under the sample surface.

XPS carbon 1s spectra were fitted after spectra deconvolution and seven chemical states were distinguished, see Fig. 3. Components associated with (1) unsubstituted aromatic carbon, (2) aliphatic carbon, (3) ether/alcohol carbon, (4) ketonic carbon, (5) pyrrole/amide carbon, (6) carboxylic carbon, and (7)  $\pi$ - $\pi^*$  shake-up satellite from the aromatic structure were present in all the C 1s spectra, except for humic acids prepared from Balsha lignite, whose resolved-curves did not contain peaks (1) and (7). The binding energy values, chemical assignments, and experimental area percentages for each component of the C 1s spectra of lignite humic acids are listed in Table 3. Inasmuch as a unique binding energy is expected per type of oxidized function regardless of whether it belongs to a saturated or aromatic chain, it was not possible to estimate the aromaticity of humic acids [50]. For the same reason, the abundance of phenolic groups could not be deduced from

**Table 5**  
Relative distribution of sulfur functionalities in lignite humic acids determined by XPS.

Lignite	Sulfide/thiophene		Sulfoxide		Sulfone	
	BE <sup>a</sup> (eV)	RP <sup>b</sup> (%)	BE <sup>a</sup> (eV)	RP <sup>b</sup> (%)	BE <sup>a</sup> (eV)	RP <sup>b</sup> (%)
Tijanje	163.8	69.4	165.9	10.1	168.0	20.5
Maritza East	163.8	60.3	165.8	6.8	168.0	32.9
K1	163.5	66.9	165.3	12.1	167.7	21.0
SML <sup>c</sup>	163.9	69.5	165.8	3.7	168.0	26.8

<sup>a</sup> BE, binding energy.

<sup>b</sup> RP, relative proportion of each functional group corresponding to fitted curves in Fig. 5.

<sup>c</sup> SML, the abbreviation for South Moravian lignite.

the spectra. In this case, not only phenolic groups cannot be distinguished from non-aromatic hydroxyl but they also overlap with ether carbons [50]. Only minor differences were observed in the distribution of the carbon forms between the studied samples, despite differences in the origin of lignite humic acids. As mentioned above, the near binding energy of the aromatic and aliphatic carbon does not reliably quantify the contributions of both components; it is preferable to consider the total amount. XPS spectra show that the total proportion of functional groups containing a heteroatom (O or N) decreases according to the sequence ether/alcohol (about 14–19%) > C=O (about 9–16%) > COOH (about 6–12%) > pyrrolic/amide (about 2–7%). These results are consistent with, and complementary to those obtained from UV–Vis spectrometry (especially in the case of the E<sub>Bz/ET</sub> ratio) and fluorescence spectrometry because they reflect very similar distribution of structural groups in individual humic acids.

For the XPS nitrogen (1s) signals, two peaks were fitted as shown in Fig. 4. The peaks were centred at about 400.0 eV and 402.2 eV, and can be assigned to pyrroles/amides and ammonium groups, respectively [50,51]. It is not possible to distinguish unequivocally between pyrrolic and amide nitrogen in the XPS spectra due to their very close binding energies [52,53], although we refer to the 400.0 eV peak exclusively as indicative of pyrrolic nitrogen. Amides are relatively easily transformed into heterocyclic nitrogen and the resulting pyrroles generally represent the predominant fraction of organic nitrogen in lignites. Amides are more characteristic of soil humic acids than the lignite ones due to their lower degree of transformation in soil [50]. The data in Table 4 clearly demonstrate that pyrrolic nitrogen (70–82%) is the most abundant form of organic bound nitrogen in lignite humic acids, followed by the ammonium groups (18–30%).

Using the XPS method, the presence of sulfur was detected in all samples, but XPS sulfur signals could only be fitted for the four humic acids isolated from Tijanje, Maritza East, K1 and South Moravian lignites. The S2p spectra line of lignite humic acids and peak-splitting results are presented in Fig. 5. They indicate three different structural groups with binding energies of about 163.8 eV, 165.9 eV, and 168.0 eV corresponding to sulfide and thiophene, sulfoxide, and sulfone type sulfur functionalities, respectively. The first peak with the lowest binding energy represents the sum of contributions of sulfide and thiophene because their signals overlap due to their very close binding energies. The occurrence of sulfoxides and sulfones is probably associated with the surface oxidation of sulfur-containing functional groups in humic acids. The XPS analysis shows that sulfur occurs primarily in the form of sulfides and thiophenes (67–69%) in lignite humic acids, and a smaller proportion in the form of sulfone (21–33%) and sulfoxide (4–12%), see Table 5.

The above results show that the studied humic acids are very similar and that the ash content and yield of humic acids from the studied lignites are the only decisive factors with respect to applications in agriculture.



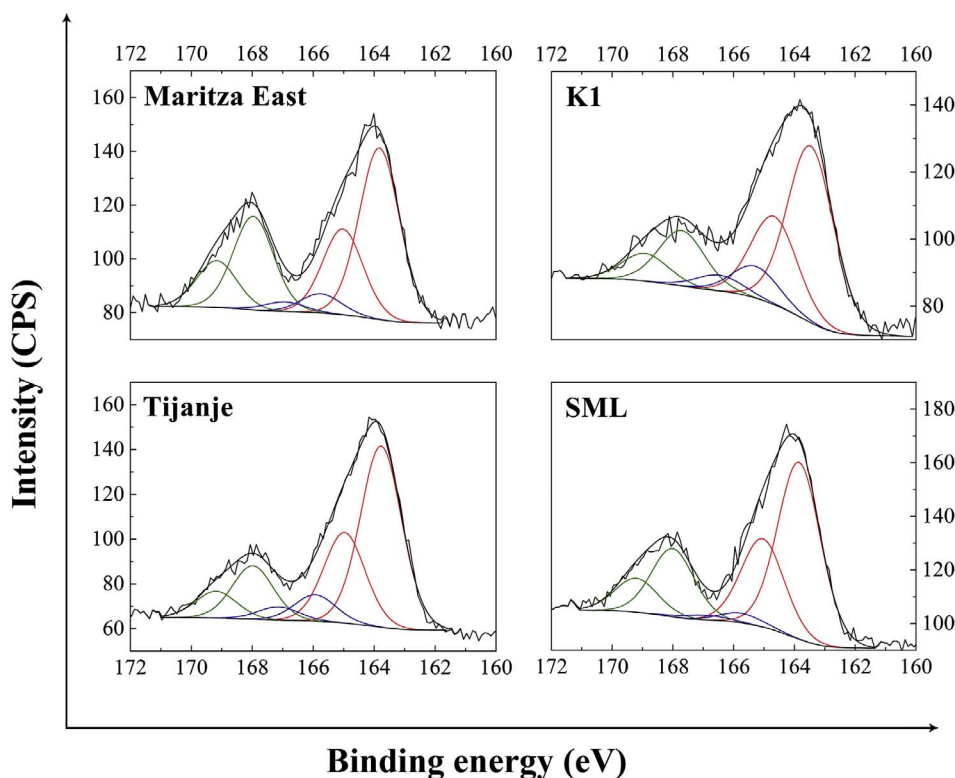


Fig. 5. XPS sulfur (S 2p) spectra for lignite humic acids. Functional groups: red – sulfide/thiophene, green - sulfone, and blue - sulfoxide. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 4. Conclusion

The yields of lignite humic acids under study ranged from 3.0% to 11.4%, depending on the source and the experimental conditions of isolation.

Lignite humic acids contain fluorophores in the A region which can be related to aromatic ring systems and also to lipids such as steroids. EEM spectra of lignite humic acids have typical maxima in the range 320–360/420–460 nm. Contrary to our expectations, neither area C nor area V were observed in the EEM spectra of lignite humic acids. EEM spectra of lignite humic acids can be used as fingerprints to distinguish humic acids isolated from different lignites and source lignites.

UV–Vis, FTIR, XPS and fluorescence spectrometric methods demonstrate that lignite humic acids are mutually very similar, i.e. with respect to aromaticity, molecular weight, and functional groups. It appears that ratios and indices from UV–Vis and fluorescence spectrometry, although they are commonly used, are unable unambiguously to differentiate among the degrees of aromaticity and molecular weights of lignite humic acids. The explanation could be that they cover the same range of coal rank and are formed by the transformation of very similar organic materials with a comparable degree of maturity. The variation of functional groups in lignite humic acids shows that they decrease according to the sequence aliphatic/aromatic carbons (about 42.7–64.0%) > ether/alcohol (about 14–19%) > C=O (about 9–16%) > COOH (about 6–12%) > pyrrolic (about 2–7%). Lignite humic acids contain nitrogen in the form of pyrrolic (70–82%) and ammonium (18–30%) groups. Sulfur is present in the form of sulfides and thiophenes (67–69%), sulfone (21–33%), and sulfoxide (4–12%), the latter two probably arising from the surface oxidation of sulfur-containing functional groups in humic acids.

It seems that the ash content and yield of humic acids from the studied lignites are the only decisive factors with respect to applications of humic acids in agriculture.

In the future, we will focus on the characterization and comparison of humic acids from lignites structured by predominant angiosperms of coal-forming vegetation.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. M. Stefanova, Prof. D. Životić, and Prof. M. Fabiańska for supplying the lignite samples. This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports). We also thank anonymous reviewers for suggesting improvements to the original manuscript.

#### References

- [1] Doskočil L, Pekař M. Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Process Technol* 2012;101:29–34.
- [2] Doskočil L, Grasset L, Válková D, Pekař M. Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel* 2014;134:406–13.
- [3] Giannouli A, Kalaitzidis S, Siavalas G, Chatziapostolou A, Christanis K, Papazisimou S, et al. Evaluation of Greek low-rank coals as potential raw material for the production of soil amendments and organic fertilizers. *Int J Coal Geol* 2009;77:383–93.
- [4] Das T, Saikia BK, Baruah BP, Das D. Characterizations of humic acid isolated from coals of two Nagaland Coalfields of India in relation to their origin. *J Geol Soc India* 2015;86:468–74.
- [5] Doskočil L, Enev V, Pekař M, Wasserbauer J. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. *Org Geochem* 2016;95:34–40.
- [6] Piccolo A, Pietramellara G, Mbagwu JSC. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* 1997;75:267–77.
- [7] Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol Biochem* 2002;34:1527–36.
- [8] Fong SS, Seng L, Majri NB, Mat HB. A comparative evaluation on the oxidative approaches for extraction of humic acids from low rank coal of Mukah, Sarawak. *J Brazil Chem Soc* 2007;18:34–40.
- [9] Ciarkowska K, Sołek-Podwika K, Filipek-Mazur B, Tabak M. Comparative effects of lignite-derived humic acids and FYM on soil properties and vegetable yield. *Geoderma* 2017;303:85–92.
- [10] Stevenson FJ. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York: Wiley-Interscience; 1994.
- [11] Dick DP, Mangrich AS, Menezes SMC, Pereira BF. Chemical and spectroscopical characterization of humic acids from two south brazilian coals of different ranks. *J Brazil Chem Soc* 2002;13:177–82.
- [12] Kučerík J, Cihlák Z, Vlčková Z, Drastík M. Regenerated humic acids obtained by the air oxidation of south moravian lignite. Part. 1. Production and characterization. *Pet Coal* 2008;50:49–55.

- [13] Cihlář Z, Vojtová L, Conte P, Nasir S, Kučerík J. Hydration and water holding properties of cross-linked lignite humic acids. *Geoderma* 2014;230–231:151–60.
- [14] Pehlivan E, Arslan G. Comparison of adsorption capacity of young brown coals and humic acids prepared from different coal mines in Anatolia. *J Hazard Mater* 2006;138:401–8.
- [15] Novák J, Kozler J, Janoš P, Čížková J, Tokarová V, Madronová L. Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field. *React Funct Polym* 2001;47:101–9.
- [16] Allard B. A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit. *Geoderma* 2006;130:77–96.
- [17] Grasset L, Vlčková Z, Kučerík J, Amblès A. Characterization of lignin monomers in low rank coal humic acids using the derivatization/reductive cleavage method. *Org Geochem* 2010;41:905–9.
- [18] Nasir S, Sarfaraz TB, Verheyen TV, Chaffee AL. Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Process Technol* 2011;92:983–91.
- [19] Peuravuori J, Žbáňková P, Pihlaja K. Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids. *Fuel Process Technol*. 2006;87:829–39.
- [20] Fabiańska MJ, Kurkiewicz S. Biomarkers, aromatic hydrocarbons and polar compounds in the Neogene lignites and gangue sediments of the Konin and Turoszów Brown Coal Basins (Poland). *Int J Coal Geol* 2013;107:24–44.
- [21] Stefanova M, Marinov SP, Magnier C. Aliphatic biomarkers from Miocene lignites desulphurization. *Fuel* 1999;78:1395–406.
- [22] Ercegovic M, Životić D, Kostić A. Genetic–industrial classification of brown coals in Serbia. *Int J Coal Geol* 2006;68:39–56.
- [23] Havelcová M, Šýkorová I, Trejtnarová H, Šulc A. Identification of organic matter in lignite samples from basins in the Czech Republic: geochemical and petrographic properties in relation to lithotype. *Fuel* 2012;99:129–42.
- [24] Doskočil L, Grasset L, Enev V, Kalina L, Pekař M. Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite: consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Environ Earth Sci* 2015;73:3873–85.
- [25] Schnitzer M. Chemical and Microbiological Properties. In: Page BL, Miller RH, Keeney DR, editors. *Methods of Soil Analysis, Part 2*. Madison: Soil Science Society of America Journal; 1982. p. 581–94.
- [26] Milori DMBP, Martin-Neto L, Bayer C, Mielniczuk J, Bagnato VS. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci* 2002;167:739–49.
- [27] Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccamandi F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 1999;38:45–50.
- [28] Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. third ed. New York: Springer; 2006.
- [29] Martin F. Humic acids from lignite. 1. Analytical characteristics and thermal degradation. *Fuel* 1975;54:236–40.
- [30] Gonzalez-Vila FJ, del Rio JC, Almendros G, Martin F. Structural relationship between humic fractions from peat and lignites from the Miocene Granada basin. *Fuel* 1994;73:215–21.
- [31] Francioso O, Montecchio D, Gioacchini P, Ciavatta C. Thermal analysis (TG–DTA) and isotopic characterization (13C–15N) of humic acids from different origins. *Appl Geochem* 2005;20:537–44.
- [32] Stefanova M, Velinova D, Marinov SP, Nikolova R. The composition of lignite humic acids. *Fuel* 1993;72:681–4.
- [33] Korshin GV, Li C-W, Benjamin MM. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Res* 1997;31:1787–95.
- [34] Fuentes M, González-Gaitano G, García-Mina JM. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org Geochem* 2006;37:1949–59.
- [35] Enev V, Pospíšilová L, Klučáková M, Liptaj T, Doskočil L. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil Water Res* 2014;9:9–17.
- [36] Andersen DO, Alberts JJ, Takács M. Nature of natural organic matter (NOM) in acidified and limed surface waters. *Water Res* 2000;34:266–78.
- [37] Milata V, Segla P. *Vybrané metody molekulovej spektroskopie*. Bratislava: Slovenská technická univerzita; 2007.
- [38] McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T, Andersen DT. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol Oceanogr* 2001;46:38–48.
- [39] Birdwell JE, Engel AS. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org Geochem* 2010;41:270–80.
- [40] Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org Geochem* 2009;40:706–19.
- [41] Conte P, Spaccini R, Šmejkalová D, Nebbioso A, Piccolo A. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. *Chemosphere* 2007;69:1032–9.
- [42] Coble PG. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation–emission matrix spectroscopy. *Mar Chem* 1996;51:325–46.
- [43] Tamamura S, Ueno A, Aramaki N, Matsumoto H, Uchida K, Igarashi T, et al. Effects of oxidative weathering on the composition of organic matter in coal and sedimentary rock. *Org Geochem* 2015;81:8–19.
- [44] Peuravuori J, Koivikko R, Pihlaja K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water Res* 2002;36:4552–62.
- [45] Rodríguez FJ, Schlenger P, García-Valverde M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Sci Total Environ* 2013;476–477:718–30.
- [46] Bugden JBC, Yeung CW, Kepkay PE, Lee K. Application of ultraviolet fluorometry and excitation–emission matrix spectroscopy (EEMS) to fingerprint oil and chemically dispersed oil in seawater. *Mar Pollut Bull* 2008;56:677–85.
- [47] Kister J, Pieri N, Alvarez R, Díez MA, Pis JJ. Effects of preheating and oxidation on two bituminous coals assessed by synchronous UV fluorescence and FTIR spectroscopy: relation to structure. *Energy Fuels* 1996;10:948–57.
- [48] Kashimura N, J-ichiro Hayashi, Chiba T. Degradation of a Victorian brown coal in sub-critical water. *Fuel* 2004;83:353–8.
- [49] Wang Z, Wei C, Shui H, Ren S, Pan C, Wang Z, et al. Synchronous fluorimetric characterization of heavy intermediates of coal direct liquefaction. *Fuel* 2012;98:67–72.
- [50] Monteil-Rivera F, Brouwer EB, Masset S, Deslandes Y, Dumonceau J. Combination of X-ray photoelectron and solid-state 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural characterisation of humic acids. *Anal Chim Acta* 2000;424:243–55.
- [51] Boudou J-P, Schimmelmann A, Ader M, Mastalerz M, Sebilo M, Gengembre L. Organic nitrogen chemistry during low-grade metamorphism. *Geochim Cosmochim Acta* 2008;72:1199–221.
- [52] Kelemen SR, Freund H, Gorbaty ML, Kwiatek PJ. Thermal chemistry of nitrogen in kerogen and low-rank coal. *Energy Fuels* 1999;13:529–38.
- [53] Kelemen SR, Afeworki M, Gorbaty ML, Kwiatek PJ, Sansone M, Walters CC, et al. Thermal transformations of nitrogen and sulfur forms in peat related to coalification. *Energy Fuels* 2006;20:635–52.

Další odborná práce, která byla publikována v prestižním časopise Fuel vzešla z potřeby komplexního přístupu při charakterizaci huminových kyselin (HK) izolovaných z lignitů pocházejících z rozličných evropských pánví. Konkrétně se jednalo o vzorky lignitů, jejichž naleziště byla situována v oblastech střední a východní Evropy. Hnědá uhlí, geograficky spadající do oblasti jižní Evropy byly získány z následujících uhelných pánví: Balsha a Maritza East (Bulharsko), Dragačevo-Tijanje a Kostolac (Srbsko). Ostatní vzorky lignitů byly získány z naleziště Konin (Polsko) a jihomoravské uhelné pánve (lokalita Mikulčice), která je severním výběžkem vídeňského naleziště těchto kaustobiolitů. Studium a komplexní charakterizace izolovaných HK byla založena na všestranném přístupu bádání, který zahrnoval tradiční a běžně používané instrumentální techniky, jako je elementární a termická analýza, UV/Vis a infračervená spektrometrie. Na druhou stranu, byla tato studie doplněna pokročilými spektrometrickými metodami (fluorescenční spektrometrie excitačně-emisního mapování, která je známa pod označením jako EEM a rentgenové fotoelektronové spektrometrie XPS), které jak se ukázalo, tak se staly nepostradatelnými instrumentálními technikami v oblasti studia OM resp. huminových látek. Toto tvrzení nabývá takřka dogmatického rozměru, pokud si uvědomíme, že tyto kaustobiolity jsou pro svůj vysoký obsah HK předurčeny k izolaci těchto biokoloidních sloučenin, jejichž neméně významné uplatnění lze nalézt v podobě půdních pomocných látek (PPL). Je zřejmé, že preparáty na bázi HK podléhají jistým legislativním zákonům, ať už máme na mysli ty tuzemské (zákon č. 156/1998 a č. 308/2000 Sb.) anebo ty, které jsou jim nadřazené (zákony EU), a z toho vyplývá jistá celoevropská snaha tyto PPL jednoznačně kvantifikovat.

Extrakční výtěžky lignitických HK se pohybovaly poměrně v úzkém rozmezí (konkrétně od 3,0 hm. % do 11,4 hm. %), přičemž nejvyšší extrakční výtěžek těchto biokoloidních sloučenin byl zaznamenán v případě jihomoravského lignitu.

Výsledky z elementární analýzy, FTIR spektrometrie a strukturních parametrů vypočtených z UV/Vis a emisních fluorescenčních spekter naznačují, že jednotlivé vzorky hnědouhelných HK jsou si vzájemně velmi podobné, pokud jako hodnotící kritéria jsou použita aromaticita, střední molekulová hmotnost  $\overline{M}_r$  a v neposlední řadě i obsah specifických funkčních skupin a substituentů, kterými jsou substituovány aromatické jednotky izolovaných HK. Nicméně na základě pečlivé interpretace infračervených spekter byla nalezena dominantnější diference, a to v případě absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti vlnočtů  $1110\text{ cm}^{-1}$ , který lze jednoznačně přiřadit valenční vibraci Si–O vazeb v silikátech, jako je kaolinit a dickit, které mají převážně  $\text{Al}^{3+}$  kationy situovány v oktaedrické poloze. Interpretace tohoto absorpčního pásu byla velmi ulehčena v souvislosti vysokého obsahu nespalitelného podílu tj. popela, kterými se vyznačují vzorky HK Balsha a Kostolac.

Všechny lignitické HK byly charakterizovány pouze jednou fluorescenční doménou A ( $\alpha$ ) – *fulvic-like*, která byla lokalizována v oblasti vlnových délek 255–265/460–505 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Jak je doloženo v předešlých publikacích, tak tato fluorescenční doména je obvykle spojována s různě substituovanými jednoduchými aromatickými systémy anebo lipidy, jako jsou steroidy. Na tomto místě je nutné říci, že oproti našemu očekávání nebyly v příslušných EEM spektrech identifikovány další fluorescenční maxima, a to C ( $\alpha$ ) – *humic-like* anebo V, které byly pozorovány ve vodných a chloroformových

extraktech těchto kaustobiolitů. Nicméně je zapotřebí zdůraznit, že EEM spektra HK izolovaných z lignitů lze použít jako otisky prstů (*fingerprint*) k rozlišení HK pocházejících z různých přírodních zdrojů tzn. rašelina, půda, sediment, sladkovodní zdroje, antropogenní OM aj.

Ačkoliv by se na první pohled mohlo zdát, že absorpční poměry a fluorescenční indexy nejsou schopny významnější senzitivity k prostudování jednotlivých strukturních a morfologických změn izolovaných HK, tak na druhé straně lze říci, že lignitické HK vznikají přeměnou velmi podobného organického materiálů se srovnatelným stupněm zralosti.

Rentgenová fotoelektronová spektrometrie (XPS) odhalila, že organický dusík je v hnědouhelných HK vázán ve formě pyrrolů (70–82 %) a amoniových kationů (18–30 %). Dále, síra je majoritně přítomna ve formě sulfidů a thiofenů (67–69 %). Nicméně ve struktuře těchto HK byly identifikovány i nezanedbatelná množství síry, které je vázána v podobě sulfonylů (21–33 %) a sulfoxidů (4–12 %). Poslední dvě zmíněné varianty organické síry jsou pravděpodobně ukazateli povrchové oxidace síry, která je přítomna v těchto HK.

V obecném pohledu na dosažené výsledky můžeme konstatovat, že obsah popela a extrakční výtěžek HK bude dominantním kritériem pro použití těchto kaustobiolitů v oblastech, jako jsou PPL, půdní kondicionéry, růstové stimulanty aj.

# The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soil

**Vojtěch Enev**, Leoš Doskočil, Leona Kubíková, Martina Klučáková

*The Journal of Agricultural Science*, **2018**, 156, 877–887.

Impact factor (2020): 1,476

JCR Category: Agriculture, Multidisciplinary – Q2



## Crops and Soils Research Paper

**Cite this article:** Enev V, Doskočil L, Kubíková L, Klučáková M (2018). The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils. *The Journal of Agricultural Science* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000874>

Received: 21 March 2018

Revised: 28 August 2018

Accepted: 27 September 2018

### Key words:

Humic acids; luvic chernozem; medium-term time; natural compost amendment; protein-like substances

### Author for correspondence:

M. Klučáková, E-mail: [klucakova@fch.vutbr.cz](mailto:klucakova@fch.vutbr.cz)

# The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils

V. Enev, L. Doskočil, L. Kubíková and M. Klučáková

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno, 612 00, Czech Republic

## Abstract

In the current work, humic acids (HAs) isolated from natural compost and unamended and amended soils in a medium-time field experiment were characterized to evaluate the effects of the amendment at rates of 124, 239 and 478 t/ha on their chemical, compositional and structural features. The impact of the application of compost on their properties was observed over 3 years. Humic acids were characterized using spectral methods and elemental analysis. Humic acid isolated from compost was predominantly aliphatic, with a larger content of nitrogen and low degree of aromaticity and humification. The typical maximum (280/345 nm) of HA obtained from compost lies within the T (tryptophan-like) region, which can be ascribed to proteinaceous organic materials. On the other hand, the HAs obtained from amended soil were mainly aromatic in character, with a larger distribution of oxygen-containing functional groups, molecular weight and greater aromaticity. Fluorophores of HAs obtained from amended soil lie within the C (humic-like) region with typical maxima centred in the range 430–450/500–540 nm, occurring usually in HAs isolated from soil, peat and lignite. According to ultra-violet/visible and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, the larger oxygen contents of these HAs are associated with the substitution of aromatic rings by oxygen-containing functional groups such as carboxylic, hydroxyls and ethers. On the basis of FTIR spectra, it was shown that HAs obtained from amended soil 2 and 3 years after compost application were enriched by peptid, aromatic and polysaccharide compounds absorbing at 1540, 1515 and 1040/cm, respectively.

## Introduction

Humic substances are one of the most widely distributed classes of natural organic compounds on earth and are found in water, soils and sediments such as lignite, Leonardite and peat (Doskočil *et al.*, 2015, 2017, 2018). Humic substances are heterogeneous mixtures of substances formed by the chemical and biological transformation of the plant, animal and microbial materials and have not yet been properly chemically defined. They are operationally divided into three classes (fulvic acid, humic acid (HA) and humin) on the basis of their alkaline and acid solubility. Humic acids are soluble at pH > 2, fulvic acids are soluble under all pH conditions and humin is insoluble at all pHs.

Humic acids play an important role in soils, as can be seen from the literature. For example, soil HAs represent an important source of macro and micronutrients for plants and microorganisms (Schulten and Schnitzer, 1997; Pedra *et al.*, 2008), contribute significantly to the acid-base buffering capacity of soils (Chen *et al.*, 1994), play an important role in metal speciation in soil (Senesi, 1992), interact with organic xenobiotics (Swift *et al.*, 1995), affect soil biological activity (García and Hernández, 1997) and are able to bind mineral particles together, promoting a good soil structure and thereby improving aeration and moisture retention (Piccolo and Mbagwu, 1994).

Soils with small contents of organic matter exhibit limited fertility and low production levels and greater exposure to degradation, erosion and desertification (Albaladejo *et al.*, 1994; Brunetti *et al.*, 2007). However, soil organic matter content is influenced strongly by agricultural management practices, with intensive cropping often leading to the loss of soil organic matter (Duong *et al.*, 2012).

Consequently, the use of organic amendments such as composts, manures, or crop residues has become a well-established management practice to improve and/or restore soil organic matter in agricultural ecosystems (García-Gil *et al.*, 2004a, 2004b; Serramiá *et al.*, 2013). It has also been reported that municipal solid waste compost promotes microbiological activity (de Araújo *et al.*, 2010).

The effects of compost on soil are expected to depend on several parameters, e.g. compost quality, soil type, the method used to apply compost to the soil, application rate and

environmental conditions. Compost quality itself depends on a multiplicity of factors, the main ones being the nature of the composted matter, availability of oxygen in the composting pile and composting time (Bernal *et al.*, 1998; Adani *et al.*, 2007).

The composition of soil organic matter after compost amendment is changed mainly by increases in lignin and alkyl/aromatic carbon of composts (hydrophobic carbon); also compost-derived polysaccharides are mineralized preferentially (Leifeld *et al.*, 2002; Aguiar *et al.*, 2013). However, lignin may also be substantially degraded during the composting of grass straw (Horwath *et al.*, 1995). A few studies have also shown increases in soil carbon, nitrogen and cation exchange capacity after compost application (González-Vila *et al.*, 1999; Ouédraogo *et al.*, 2001; Leifeld *et al.*, 2002; Adani *et al.*, 2006). Compost HAs are known to be different from typical soil HAs (Montoneri *et al.*, 2003; Adani *et al.*, 2006; Enev *et al.*, 2014). Compost HAs have higher carbon and nitrogen contents and lower oxygen contents than soil HAs. Humic acids from soils are commonly accompanied by higher total acidity (Adani *et al.*, 2006). Nuclear magnetic resonance spectra indicate that most carboxyl groups in compost HAs are in amide form, whereas free carboxylic groups prevail in soil HA (Adani *et al.*, 2006).

The amount and quality of HAs in composts are considered important indicators of their biological maturity and chemical stability and a guarantee of their safety and performance in soil (Benítez *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2007; Senesi *et al.*, 2007).

Among the various analytical methods which can be used to characterize HAs from organic materials, ultra-violet/visible (UV-Vis) and fluorescence spectrometry are particularly valuable approaches (Fuentes *et al.*, 2006). Numerical indices derived from these analytical methods have proven to be useful for evaluating the degree of humification of HAs extracted from organic materials of diverse origin (Brunetti *et al.*, 2007).

The objective of the current work was to examine the impact of compost application on the nature and content of HAs in soil from the Czech Republic. To better understand the effect of compost in amending the soil, experiments were performed over the medium-term (3 years) and isolated HAs were characterized by means of elemental analysis and spectrometric methods. Information on the modification of soil organic matter induced over time by the addition of compost addition over the time is still quite limited, especially in the case of soils in Central Europe, where composting conditions (precipitation, temperature, etc.) may differ from other parts of the world.

## Materials and methods

### Compost, soil and experimental design

Natural compost (NC) was obtained from the Crop Research Institute (CRI) in Prague, Czech Republic. The field experiment was conducted on a dark brown soil with low organic C content classified as a Luvic Chernozem (FAO 2006) in an experimental plot located at CRI Prague-Ruzyně, Czech Republic. The experimental design included non-irrigated 3 × 3 m<sup>2</sup> plots of cropped grassland and plots amended with NC at the rates of 124 (NC124), 239 (NC239) and 478 (NC478) t/ha in the first year (2008) of the experiment. One plot was not amended and represented the control soil (NC0). The main constituents of the compost were freshly cut grass, leaves, wood chips and a limited amount of straw. Three replicates were performed for each treatment. After the first year of compost application and then

subsequently in late March of each year from 2009 to 2011, surface soil sub-samples (Ap horizon, 0–15 cm depth) were collected using soil probes of 53 mm internal diameter. A composite soil sample was then obtained for each treatment by mixing equal amounts of three corresponding soil sub-samples.

### Soil and compost analysis

The pH and electrical conductivity (EC) were measured on a 1:5 sample/ultra-pure water (weight/weight) extract after shaking for 60 min (García-Gil *et al.*, 2004a, 2004b). The elemental composition of control soil and compost was determined using an EA 3000 CHNS/O analyser (Euro Vector, Pavia, Italy). Samples (12–15 mg) were packed in tin capsules and placed in an oven for combustion at 980 °C using pure oxygen as the combustion gas and pure helium as the carrier gas. Calibration curves for carbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N) and sulphur (S) were obtained using sulphanilamide as a reference standard sample. The moisture and ash content were determined using a Q50 TGA analyser (TA Instruments, New Castel, Delaware, USA). Organic C content was determined as the weight loss from 200 to 430 °C (Pallasser *et al.*, 2013). The samples were heated at a rate of 10 °C/min to an end temperature of 950 °C under a flow of atmospheric air. The results are presented in Table 1.

### Isolation of humic acids

One, 2 and 3 years after compost application using the modified procedure recommended by the International Humic Substances Society (Swift, 1996), HAs were extracted from compost, unamended control soil and soils amended with 124, 239 and 478 t/ha and sampled. Briefly, air-dried samples were decalcified with 0.1 mol/l hydrogen chloride (HCl) in the ratio of 1:10 (sample/solution) and the suspensions were then washed with distilled water until almost neutral pH was achieved. All samples were shaken overnight with 0.1 mol/l NaOH and 0.1 mol/l pyrophosphate solution under N<sub>2</sub> using a sample/extractant ratio of 1:10. After centrifugation at 2700 × g for 30 min, HAs were precipitated from the supernatant by means of acidification to pH <2 with 6 mol/l HCl and further separated by centrifugation at 2700 × g for 20 min. Precipitated HAs were treated (twice) with a mixture of 0.5 vol. % HCl-HF over a period of 24 h and subsequently separated in the centrifuge. Humic acids were purified and dialyzed using a Spectrapore membrane (MWCO 1000) until free Cl<sup>-</sup> ions were washed out and finally freeze-dried.

### Humic acids analysis

All samples were incinerated at a heating rate of 10 °C/min from room temperature to 900 °C under air atmosphere. The weight loss occurring at 105 °C was measured and taken as the moisture content. The final residue, after heating to 900 °C, was measured and taken as the ash content. The elemental composition was determined by a CHNSO Flash 1112 Microanalyser (Carlo Erba, Milano, Italy). The oxygen content was calculated according to the relationship % oxygen = 100 – (C + H + N + S) % and the data obtained were corrected for moisture and ash content.

The UV/V is spectra of aqueous solutions were measured by a Hitachi U-3900 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) in the wavelength range of 200–900 nm. The absorption coefficients of HAs were calculated from the absorbance (Chen *et al.*, 1977;

**Table 1.** pH values; electrical conductivities (EC); organic C, moisture, ash content and elemental compositions of control soil and natural compost

Parameters measured	Control soil	Natural compost
pH	6.7 ± 0.24	7.8 ± 0.09
EC (mS/cm)	0.2 ± 0.03	1.4 ± 0.13
Moisture (wt. %)	1.9 ± 0.12	2.2 ± 0.04
Ash (wt. %) <sup>a</sup>	90.0 ± 0.38	18.5 ± 0.23
Organic C (g/kg) <sup>b</sup>	36.1 ± 0.29	314.5 ± 0.67
C (at. %) <sup>b</sup>	13.4 ± 0.09	29.3 ± 0.13
H (at. %) <sup>b</sup>	68.8 ± 0.22	50.6 ± 0.19
N (at. %) <sup>b</sup>	0.8 ± 0.04	2.5 ± 0.09
S (at. %) <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>
O (at. %) <sup>b</sup>	17 ± 0.00	17.6 ± 0.00
C/N	16.99	11.62

<sup>a</sup>Moisture-free basis.<sup>b</sup>Moisture-free and ash-free basis.<sup>c</sup>None detected.

Kumada, 1987; Korshin *et al.*, 1997; Peuravuori and Pihlaja, 1997).

Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of powdered samples of HAs were recorded on a Nicolet iS50 spectrometer equipped with a deuterated lanthanum  $\alpha$  alanine doped triglycine sulphate (DLaTGS) detector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Infrared spectra obtained in Attenuated Total Reflection (ATR) mode were chosen as it required no sample or potassium bromide (KBr) preparation and therefore presented less opportunity for analyst-induced variation between samples. A disadvantage of the transmission technique with KBr is that, under certain conditions, the deprotonation and/or decarboxylation of carboxylic functional groups in humic substances may be catalyzed (Davis *et al.*, 1999). For these reasons, ATR infrared spectroscopy was used. All spectra were recorded over the range 4000–400/cm at 4/cm resolutions and were the average of 128 scans (Fernandes *et al.*, 2010; Vergnoux *et al.*, 2011). The spectrum of air on clean dry ATR diamond crystal was used as the background for infrared measurement. Thermo Scientific Omnic spectroscopy software was used to obtain the spectra and the Advanced ATR algorithm was used to correct for band intensity distortion, peak shifts and non-polarization effects.

Fluorescence spectra were recorded in aqueous solutions of 10 mg/l HAs using a FluoroLog luminescence spectrophotometer (Horiba Scientific, New Jersey, USA). The pH-value of samples was adjusted to seven using standard phosphate buffer. Emission spectra were recorded over the range 380–600 nm at a constant excitation wavelength of 360 nm. The excitation spectra were recorded over the range 300–500 nm at a fixed emission wavelength of 520 nm (Senesi *et al.*, 1991). Total luminescence spectra were obtained in the form of an excitation/emission matrix (EEM) by scanning the emission over the wavelength range 300–600 nm, with the excitation wavelength increasing in 5 nm steps from 240 to 550 nm (Alberts and Takács, 2004; Valencia *et al.*, 2013). The EEM spectrum of ultra-pure water (Mili-Q) was obtained and subtracted from the EEM spectra of all samples examined to decrease the influence of 1st- and 2nd-order Raman scattering (Chai *et al.*, 2012). The emission spectra of samples were scanned from 460 to 650 nm with an excitation

wavelength of 440 nm and the total area under these fluorescence spectra was calculated as the Milori index (Milori *et al.*, 2002).

#### Inner filter effect correction method

The fluorescence intensity values (in counts/second – CPS) of samples were corrected using the method devised by Lakowicz (2006). This method uses the relationship:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{\left[\frac{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})}{2}\right]} \quad (1)$$

where  $F_{\text{corr}}$  and  $F_{\text{obs}}$  are the corrected and uncorrected fluorescence intensities and  $A_{\text{ex}}$  and  $A_{\text{em}}$  are the absorbance values at the excitation and emission wavelengths. The path of the exciting light is assumed to be equal to the path of the emitted light. Primary inner filter effects are corrected as well as secondary inner filter effects.

## Results

### Soil and compost

Several chemical and physical properties of soil and compost, including pH, EC, moisture, organic C and ash content, elemental composition and C/N ratio are shown in Table 1. The compost exhibited a slightly alkaline pH, higher EC and organic C values, higher amounts of C, H, N and O and a C/N ratio (Giusquiani *et al.*, 1995). The control soil exhibited a slightly acidic to neutral pH, lower EC, lower contents of biogenic elements (C, N) and a higher C/N ratio.

### Humic acids

#### Extraction yield, elemental composition, atomic ratios

The extraction yields, elemental composition, ash contents and atomic ratios of HAs isolated from compost, control soil and amended soils are listed in Table 2. The elemental composition of NC-HA is markedly different from that of any soil HAs where there are higher H, N contents and lower C, O contents, lower amounts of ash and lower C/H, C/N and O/C ratios. These properties suggest that NC-HA is freshly and quickly formed and possibly incorporates protein-like and aliphatic materials. With respect to NC0-HA, the HAs isolated after 1 year from the amended soil had larger H and N contents and smaller C and O contents and C/H, C/N and O/C ratios. The HAs isolated after 2 and 3 years from the amended soil had similar and/or larger C and N contents and a smaller C/N ratio when compared with HAs from control soil.

#### Ultra-violet/visible spectrometry

The UV/Vis absorbance spectra of HAs isolated from compost and unamended and amended soils were featureless and characterized by the absence of identifiable maxima and/or minima with decreasing absorbance at increasing acquisition wavelength (not shown). Samples of different HAs absorbed light at wavelengths ranging between 200 and 700 nm. The values of different indexes calculated from the UV/Vis spectra are presented in Table 3. As can be seen, parameters obtained for NC differ from the values determined for HAs isolated from unamended and amended soils. The lowest  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$  ratio was determined for NC-HA, the highest for NC487-3-HA. This means that this ratio increases with NC amendment and for years after compost application. The  $E_4/E_6$  ratio for NC-HA was larger than that for

**Table 2.** Extraction yields, ash content, elemental composition and atomic ratios of humic acids (HAs) isolated from the control soil (NC0), NC and NC-amended soils

Origin of HA sample	Yield (g/kg) <sup>a</sup>	Ash (wt. %) <sup>a</sup>	C	H	N	S	O	C/H	O/C	C/N
NC	18.5	0.44	31.1	49.0	5.3	0.2	14.4	0.63	0.46	5.87
NC0-1	3.5	1.46	40.1	38.6	2.8	0.2	18.3	1.04	0.46	14.26
NC0-2	4.9	1.49	38.8	40.9	2.9	0.2	17.2	0.95	0.44	13.30
NC0-3	4.1	1.89	38.8	40.7	2.8	0.2	17.4	0.95	0.45	13.89
NC124-1 <sup>c</sup>	6.2	1.16	35.1	44.4	4.9	0.3	15.3	0.79	0.44	7.16
NC124-2 <sup>c</sup>	4.1	2.63	37.2	43.1	4.5	0.2	15.0	0.86	0.40	8.27
NC124-3 <sup>c</sup>	4.5	1.80	38.0	41.2	4.2	0.2	16.4	0.92	0.43	9.04
NC239-1 <sup>d</sup>	8.7	1.12	34.5	45.4	4.8	0.2	15.1	0.76	0.44	7.19
NC239-2 <sup>d</sup>	9.7	3.03	36.3	43.7	3.9	0.2	15.9	0.83	0.43	9.31
NC239-3 <sup>d</sup>	4.4	1.00	38.8	40.7	3.0	0.2	17.3	0.95	0.45	12.77
NC478-1 <sup>e</sup>	9.4	1.92	33.2	47.6	4.9	0.2	14.1	0.70	0.42	6.76
NC478-2 <sup>e</sup>	6.9	2.24	37.6	44.1	3.2	0.2	14.9	0.85	0.40	11.75
NC478-3 <sup>e</sup>	6.4	2.09	38.4	39.0	3.1	0.2	19.3	0.98	0.50	12.39

<sup>a</sup>Moisture-free basis.<sup>b</sup>Moisture-free and ash-free basis.<sup>c</sup>Soils amended with NC at a rate of 124 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.<sup>d</sup>Soils amended with NC at a rate of 239 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.<sup>e</sup>Soils amended with NC at a rate of 478 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.**Table 3.** Spectroscopic properties of HAs isolated from the control soil (NC0), NC and NC-amended soil

Origin of HA sample	UV-visible parameter				Fluorescence parameter
	$E_{E7}/E_{Bz}$ <sup>a</sup>	$E_4/E_6$ <sup>b</sup>	$\Delta \text{Log K}$ <sup>c</sup>	$E_2/E_3$ <sup>d</sup>	$A_{440} \times (10^8)$ <sup>e</sup>
NC	0.39	7.35	1.11	5.22	0.88
NC0-1	0.69	4.92	0.69	2.41	2.10
NC0-2	0.69	4.87	0.69	2.41	2.08
NC0-3	0.70	4.87	0.68	2.41	4.08
NC124-1 <sup>f</sup>	0.61	5.83	0.79	4.38	2.00
NC124-2 <sup>f</sup>	0.71	4.81	0.70	3.20	2.48
NC124-3 <sup>f</sup>	0.70	4.48	0.65	2.37	4.31
NC239-1 <sup>g</sup>	0.59	6.08	0.85	4.42	1.50
NC239-2 <sup>g</sup>	0.67	5.38	0.73	3.43	1.48
NC239-3 <sup>g</sup>	0.71	4.37	0.64	2.37	4.30
NC478-1 <sup>h</sup>	0.47	6.91	0.91	4.61	1.71
NC478-2 <sup>h</sup>	0.58	5.46	0.79	3.40	1.93
NC478-3 <sup>h</sup>	0.74	4.80	0.67	2.41	3.36

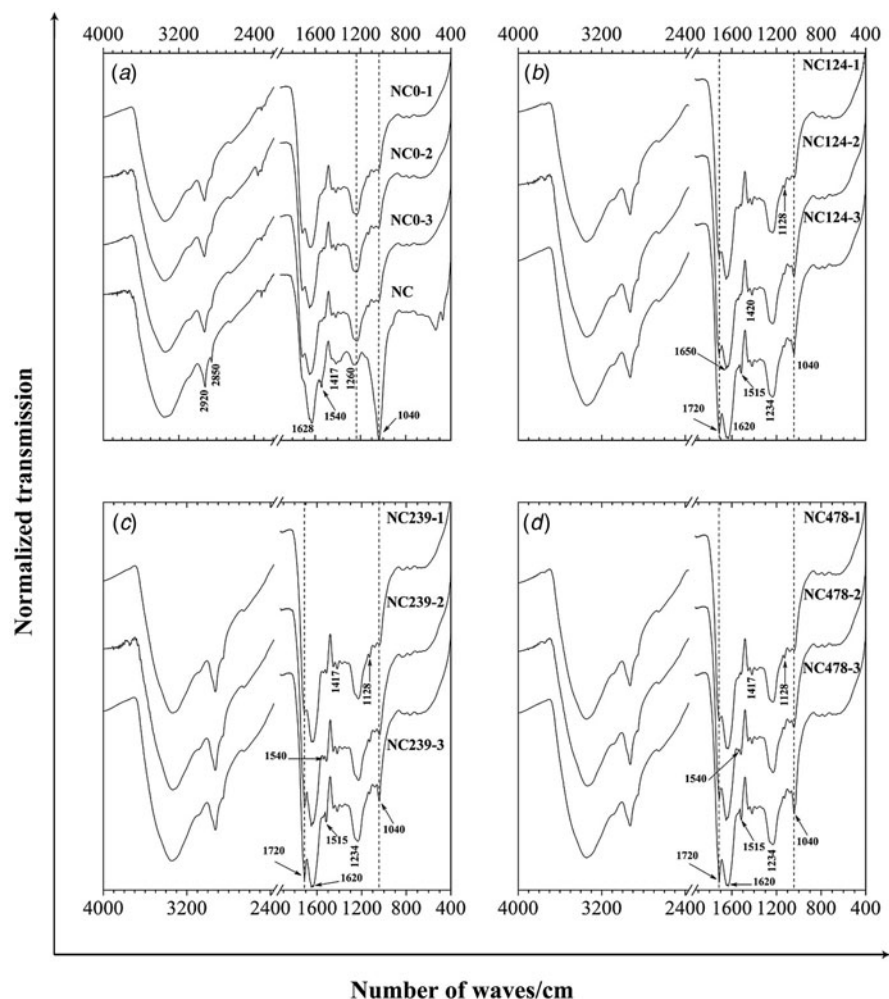
<sup>a</sup>Ratio of absorbances at 253 and 203 nm in the UV spectrum.<sup>b</sup>Ratio of absorbances at 465 and 665 nm in the Vis spectrum.<sup>c</sup>Difference of Log absorbances at 400 and 600 nm in the Vis spectrum.<sup>d</sup>Ratio of absorbances at 250 and 365 nm in the UV spectrum.<sup>e</sup>Milori index: area under fluorescence emission spectra with  $\lambda_{exc} = 440$  nm.<sup>f</sup>Soils amended with NC at a rate of 124 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.<sup>g</sup>Soils amended with NC at a rate of 239 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.<sup>h</sup>Soils amended with NC at a rate of 478 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.

any soil HAs, whereas the values for amended soil HAs were higher 1 and 2 years after compost application than the corresponding values for NC0-HA. The  $E_4/E_6$  ratios for HAs isolated 3 years after soil amendment were smaller than those for NC0-HA. These results suggest the humification of organic matter in the soil. The optical parameter  $\Delta \text{Log K}$  for NC-HA was larger than that for unamended and amended soils, whereas  $\Delta \text{Log K}$  values for amended soil HAs were larger 1–2 years after compost incorporation than those for HAs isolated from control soils. The highest value of the  $E_4/E_6$  ratio was obtained for NC-HA. The  $E_4/E_6$ ,  $E_2/E_3$  and  $\Delta \text{Log K}$  ratios were constant in over time for NC0-HA and decreased gradually for HAs isolated from all studied amended soils.

#### Fourier-transform infrared spectroscopy

The ATR-FTIR spectra of HAs isolated from soils amended with 124, 239 and 478 t/ha of compost are shown in Fig. 1(b)–(d), together with those of NC-HA and NC0-HA Fig. 1(a). The main features of these spectra can be described as follows: an intensive broad band at about 3400–3300/cm is present in all spectra and is attributed to H-bonded OH groups and, secondarily, to the N–H stretching of various functional groups. The band and the shoulder occurring at about 2935–2925 and 2850/cm are ascribed to the asymmetric and symmetric C–H stretching of  $\text{CH}_2$  groups and are more intensive in NC-HA than in soil HAs. An intensive band is apparent at 1715–1710/cm, due to the C=O stretching of COOH, the relative intensity of which increases with years after compost application. An intensive broadband with two peaks occurs in the region between 1650 and 1620/cm and is the result of aromatic C=C skeletal vibrations, the C=O stretching of quinone and amide groups (amide I band) and the C=O stretching of H-bonded conjugated ketones, which is relatively less intensive in NC-HA than in soil HAs. A band or





**Fig. 1.** ATR-FTIR spectra of humic acids isolated from: (a) control soil after 1, 2 and 3 years (NC0-1, NC0-2 and NC0-3) and compost (NC); (b) soils amended with 124 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC124-1, NC124-2 and NC124-3); (c) soils amended with 239 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC239-1, NC239-2 and NC239-3); and (d) soils amended with 478 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC478-1, NC478-2 and NC478-3).

shoulder is present at around 1540/cm, which is ascribed to N–H deformation and the C = N stretching of amides (amide II band), which is more intensive in NC-HA than in soil HAs. A band is apparent at 1520–1515/cm, due to the aromatic C = C stretching of lignin residues, the relative intensity of which increases with years after compost application. A band at about 1460/cm, attributed to aliphatic C–H, is evident exclusively in sample NC-HA and appears as a weaker band in soil HAs. A band at about 1420/cm, preferentially ascribed to O–H deformation and C–O stretching of phenolic OH, is apparent in all samples. A band at about 1376–1373/cm, is possibly the result of the C–H deformation of CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> groups and/or to the asymmetric stretching of COO– groups, which is relatively more intensive in NC0-HA. An intensive broad band at about 1280–1220/cm is generally ascribed to the C–O stretching and O–H deformation of COOH groups and the C–O stretching of aryl ethers and phenols, which is more intensive in soil HAs than in NC-HA. A faint band or shoulder at 1129–1127/cm, attributed to the C–O stretching of various alcoholic and ether groups, is present in all spectra. Further, a band appearing at 1080/cm is assigned to the silicate impurities (Si–O stretching vibration). Finally, a variable absorption band at about 1040/cm, which is generally attributed to the C–O stretching of polysaccharides and polysaccharide-like substances and/or Si–O silicate impurities, which is relatively more intensive in NC-HA than in soil HAs. The ATR-FTIR spectra

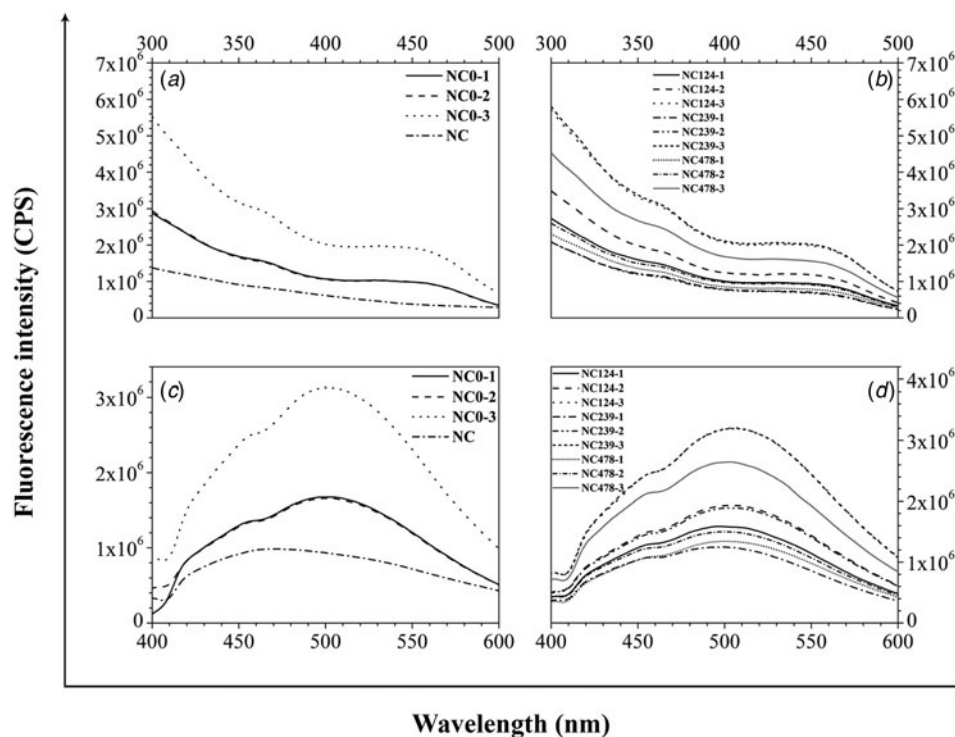
of HAs isolated from NC-amended soils are similar to one another and to those of NC0-HA.

#### Fluorescence spectroscopy

The value of the corrected fluorescence intensity (CFI) of NC-HA is much lower than that of NC0-HAs, whereas the CFI values of HAs isolated from NC-amended soils are larger and decrease with increasing amounts of compost added to the soil. The fluorescence emission, excitation and EEM spectra of the examined HAs are shown, respectively, in Figs 2 and 3. Representative fluorescence emission spectra of control soil HAs, NC-HA (Fig. 2(c)) and NC-amended soil HAs (Fig. 2(d)) are shown in Fig. 2. The main feature of the emission spectra is a unique, typical, broad-band with its maximum centred at a wavelength that is shorter for NC-HA (470 nm) than for any soil HAs (496–507 nm). Natural compost-amended soil HAs feature an emission maximum at a slightly longer wavelength than that of the emission maximum for NC0-HA.

The fluorescence excitation spectra of control soil HAs, NC-HA (Fig. 2(a)) and NC-amended soil HAs (Fig. 2(b)) are shown in Fig. 2. The fluorescence excitation spectrum of NC-HA is featureless and characterized by the absence of identifiable maxima with decreasing fluorescence intensity at increasing acquisition excitation wavelength. The excitation spectra of NC0-HA feature one prominent band at a longer wavelength





**Fig. 2.** Fluorescence excitation and emission spectra of HAs isolated from (a, c) control soil after 1, 2 and 3 years and compost (NC); (b, d) soils amended with compost at the rates of 124, 239 and 478 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application.

(363–364 nm) and a less intensive peak at 428–431 nm. The excitation spectra of NC-amended soil HAs are similar to one another and to those of NC0-HAs. However, with respect to NC0-HAs, NC-amended soil HAs exhibit a less intensive major band in the intermediate-wavelength region (357–365 nm) and a minor band at 420–437 nm.

Figure 3 shows the fluorescence spectra (EEM contour maps) of the HAs in the current study. The fluorescence EEM spectrum of NC-HA is characterized by four unique fluorophores centred at excitation/emission wavelength pairs (EEWP) of 250/420, 280/420, 305/425 and approximately 270/350 nm, the last appearing as a less intensive peak. The presence of peak C (humic-like organic compounds) centred at the EEWP of 305/425 nm indicates the formation of HAs in compost. The fluorescence EEM spectra of NC0-HAs are characterized by two prominent fluorescence maxima at the excitation/emission wavelength pairs of 270/500 nm and 430/505–510 nm. The EEM spectra of NC-amended soil HAs feature EEWPs with similar excitation/emission wavelengths as those of the EEWPs of NC0-HAs. The values of the fluorescence intensities and excitation/emission wavelength pairs of the main peaks in the EEM spectra are presented in Table 4. The Milori index is capable of reflecting very accurately the humic features of the different HAs considered; this is evident from Table 3. The smallest degree of humification was observed in NC-HA. The Milori index values for NC-amended soil HAs increased with increasing years after compost application.

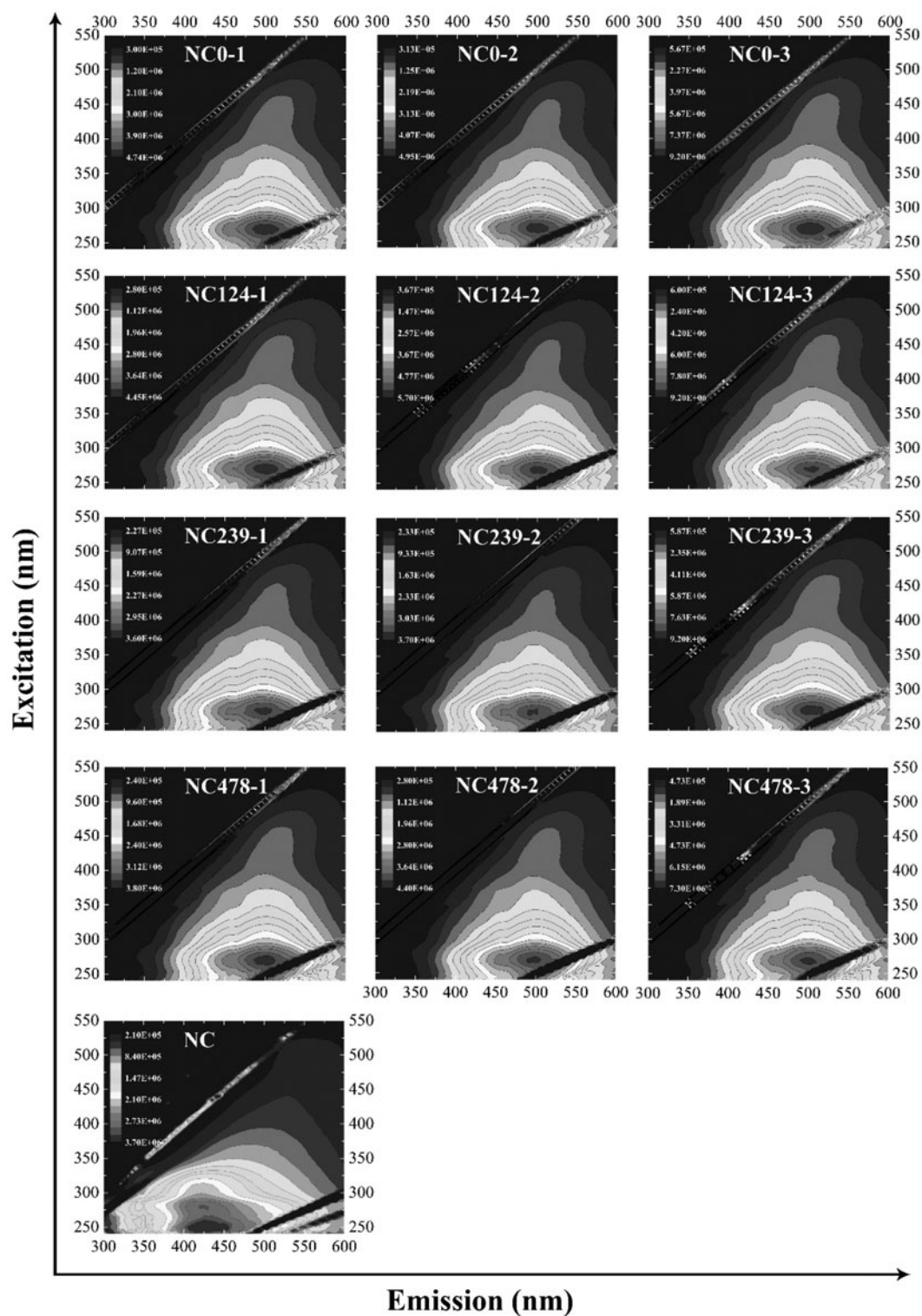
## Discussion

It was found that the extraction yield for the NC-HA sample was much higher than that for the NC0-HA sample, whereas the yields of NC-amended soil HAs were higher than those of HAs

isolated from control soil. These results are in general agreement with previous studies of compost HAs and unamended and amended soil HAs (Plaza *et al.*, 2003; García-Gil *et al.*, 2008).

The application of compost resulted in an increase in H and N contents and a decrease in C and O contents in NC-amended soil HAs, especially 1 year after soil amendment, which resulted in a diminution of the C/H, C/N and O/C ratios. The increase in N contents may feasibly be attributed to the incorporation of N-containing functional groups of a proteinaceous nature into native soil humic molecules (Campitelli *et al.*, 2006; Pedra *et al.*, 2008). In agreement with data published previously on similar types of soil HAs (Senesi *et al.*, 2007), these results suggest a decrease in C/H, C/N and O/C ratios with the organic amendment.

The UV/Vis absorbance spectra of HAs isolated from all studied samples were featureless and characterized by the absence of identifiable maxima and/or minima with decreasing absorbance at increasing acquisition wavelength. The same trend may be observed in humic substances isolated from soils and composts of different origin (Chen *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2006; Aranda *et al.*, 2011). Humic acids generally show strong absorbance in the UV/Vis range, particularly in the UV region, because of the presence of chromophores containing aromatic groups with various degrees and types of substitution such as mono- and/or poly-substituted phenols and different aromatic acids (Korshin *et al.*, 1997). The  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to that at 203 nm) is low for compounds in which the aromatic rings are largely substituted with aliphatic functional groups, whereas higher  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratios are associated with the presence of O-containing functional groups e.g. hydroxyl, carbonyl, ester and especially carboxyl groups on the aromatic ring (Korshin *et al.*, 1997; Morán Vieyra *et al.*, 2009; Valencia *et al.*,



**Fig. 3.** Fluorescence excitation-emission matrices (EEMs) of HA samples isolated from compost (NC); control soil after 1, 2 and 3 years (NC0-1, NC0-2 and NC0-3); soils amended with 124 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC124-1, NC124-2 and NC124-3); soils amended with 239 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC239-1, NC239-2 and NC239-3); and soils amended with 478 t/ha of compost for 1, 2 and 3 years (NC478-1, NC478-2 and NC478-3).

2013). These results suggest that the substitution of aromatic rings with aliphatic functional groups is higher for NC-HAs than for HAs obtained from unamended and amended soils (Morán Vieyra *et al.*, 2009). On the other hand, higher  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratios for HAs isolated from control and amended soils are associated

with the presence of aromatic rings substituted with polar groups such as hydroxyl, carbonyl, ester and carboxyl functional groups (Fuentes *et al.*, 2006). Furthermore, in the current study, HAs isolated 3 years after soil amendment with the two larger NC doses (NC239 and NC478) exhibited  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratios greater than the

**Table 4.** Position of the excitation-emission wavelength pairs of the main peaks and values of fluorescence intensities of HAs isolated from the control soil (NC0), NC and NC-amended soil

Origin of HA sample	Main fluorescence peaks							
	1 <sup>st</sup> maximum (peak A <sub>1</sub> )		2 <sup>nd</sup> maximum (peak A <sub>2</sub> )		3 <sup>rd</sup> maximum (peak C)		4 <sup>th</sup> maximum (peak T)	
	EEWP (nm) <sup>a</sup>	I <sub>F</sub> (CPS) <sup>b</sup>	EEWP (nm) <sup>a</sup>	I <sub>F</sub> (CPS) <sup>b</sup>	EEWP (nm) <sup>a</sup>	I <sub>F</sub> (CPS) <sup>b</sup>	EEWP (nm) <sup>a</sup>	I <sub>F</sub> (CPS) <sup>b</sup>
NC	250/420	3.51	280/420	3.00	305/425	2.26	280/345	1.70
NC0-1	270/500	4.74	nd <sup>c</sup>	nd	430/505	1.05	nd	nd
NC0-2	270/500	4.90	nd	nd	430/505	1.05	nd	nd
NC0-3	270/500	9.03	nd	nd	430/510	2.02	nd	nd
NC124-1 <sup>d</sup>	270/505	4.41	nd	nd	425/510	1.00	nd	nd
NC124-2 <sup>d</sup>	270/500	5.63	nd	nd	440/510	1.20	nd	nd
NC124-3 <sup>d</sup>	270/505	9.20	nd	nd	430/510	2.12	nd	nd
NC239-1 <sup>e</sup>	270/505	3.47	nd	nd	420/505	0.79	nd	nd
NC239-2 <sup>e</sup>	270/490	3.57	nd	nd	425/510	0.76	nd	nd
NC239-3 <sup>e</sup>	270/505	9.15	nd	nd	430/510	2.07	nd	nd
NC478-1 <sup>f</sup>	270/495	3.72	nd	nd	430/510	0.84	nd	nd
NC478-2 <sup>f</sup>	270/500	4.31	nd	nd	430/510	0.98	nd	nd
NC478-3 <sup>f</sup>	270/495	7.25	nd	nd	430/510	1.65	nd	nd

<sup>a</sup>Excitation/emission wavelength pair ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) at the maximum fluorescence intensity.

<sup>b</sup>I<sub>F</sub> × 10<sup>9</sup> CPS (counts per second) of main fluorescence peaks.

<sup>c</sup>Not detected.

<sup>d</sup>Soils amended with NC at a rate of 124 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.

<sup>e</sup>Soils amended with NC at a rate of 239 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.

<sup>f</sup>Soils amended with NC at a rate of 478 t/ha sampled 1, 2 and 3 years after compost application, respectively.

corresponding ratios for control soil HAs. The frequently used E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> and E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> ratios reflect the degree of aromaticity and the molecular weight of HAs of different origins. It is obvious that differences between the absorption ratios for NC-HA and for HAs obtained from unamended and amended soils are enough for UV/Vis ratios to be used in determining the degree of aromaticity or molecular weight. The E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> and E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> ratios for NC-HA were much larger than those for HAs isolated from control soil, whereas the values for amended soil HAs increased as a consequence of NC application. In contrast, the absorption coefficients for HAs obtained from amended soils decreased 2 and/or 3 years after compost application. Higher values of the absorption ratios (E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> and  $\Delta \log K$ ) for NC-HA are associated with the presence of lower molecular weight and/or more aliphatic structures. According to the optical parameter  $\Delta \log K$ , HAs obtained from the unamended and amended soils used in the current study were similar to types A and/or B in Kumada's classification system (Kumada, 1987). These types of HAs, especially type A, are characterized by higher stability, a higher degree of aromaticity and relatively lower concentration of aliphatic structures when compared with NC-HA (Barančíková *et al.*, 1997; Rivero *et al.*, 2004; Uyguner and Bekbolet, 2005). These results suggest the incorporation of structural units of NC-HA into soil HAs (Senesi *et al.*, 2007).

The assignment of the main infrared spectral bands in HAs is based on references (Hay and Myneni, 2007; Senesi *et al.*, 2007; Droussi *et al.*, 2009; Barje *et al.*, 2012). The main differences among the spectra of NC-HA and HAs obtained from unamended and amended soils are in the regions 1720–1600/cm, 1550–1500/cm and 1040/cm. The first region is characterized

by two sharp bands at 1720/cm and 1650–1620/cm corresponding to the C=O vibration in carboxylic acids and to the C=C stretching of aromatic rings and/or the C=O stretching of amide I units, respectively. In contrast with other samples, NC-HA did not contain the vibrations at 1720/cm. The band at 1720/cm is dominant in the spectra of HAs isolated from amended soil, mainly due to the contents of carboxylic acids. The latter region is characterized by sharp and/or weak bands at 1540/cm and 1515/cm corresponding to the N–H bending and C–O stretching of amide II groups and to C=C stretching in the aromatic ring. The band at 1540/cm is more evident in FTIR spectra of HAs obtained from the amended soil than in spectra of control HAs. In contrast with other samples, the HAs from NC did not contain the specific vibrations at 1515–1510/cm. The band at 1040/cm is most probably associated with C–O stretching vibrations in polysaccharides and/or polysaccharides-like groups; although a contribution from primary alcohol and silica cannot be excluded in this region. The ATR-FTIR spectra of HAs isolated from amended soils showed a pronounced polysaccharide and/or polysaccharide-like band that was evident in soil HAs 2 and/or 3 years after compost application. In agreement with data published previously on similar types of humic substances (Olsen *et al.*, 2015), the polysaccharides present in compost are primarily of plant and microbial origin. The results of ATR-FTIR analysis agree with those obtained by means of elemental composition and absorption ratios, suggesting a prevalent aliphatic structure, a larger presence of N-containing groups (band amide I, II) and lower contents of carboxyl and carbonyl functional groups in NC-HA in comparison soil HAs (García-Gil *et al.*, 2004a, 2004b; Pedra *et al.*, 2008). Furthermore, the

trends of absorption bands and their relative intensities confirm those of compositional data according to which the spectra of HAs obtained from amended soil are more similar to spectra of HAs isolated from NC than to spectra of control HAs (Brunetti *et al.*, 2007; Bertoncini *et al.*, 2008).

Fluorescence spectroscopy was used as a technique for classifying and distinguishing between humic substances of different origins and natures (Kalbitz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). Individual EEM spectra are characterized by peaks of maximum intensity which differ in their number and positions and correspond to specific fluorophores or fluorophore families (Senesi *et al.*, 1991). From the domains described, the fluorescence of HAs lies predominantly in the region of peak A (peak A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>), which is characteristic of HAs (Coble, 1996; McKnight *et al.*, 2001; Sierra *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014). In general, the peaks at intermediate excitation wavelengths (250–280 nm) and longer emission wavelengths (>380 nm) are related to fulvic-like organics (Coble, 1996; Peiris *et al.*, 2011). Region A, referred to as the fulvic-like region, is associated with the presence of polycyclic aromatics with three to four fused benzene rings and two to three conjugated systems in unsaturated aliphatic structures (He *et al.*, 2011). The different components derived from lignin and other degraded plant tissues are possible contributors to the fluorescence of fulvic-like fluorophores (Albrecht *et al.*, 2015). The maxima at 305–440/425–510 nm for the current sample set represent isolated fluorophores in the visible region; therefore, the maximum of this fluorescence domain has been denoted as peak C (humic-like). The peaks at longer excitation wavelengths (>280 nm) and longer emission wavelengths (420–540 nm) are related to humic-like organic compounds (Alberts and Takács, 2004; Parlanti *et al.*, 2000; Birdwell and Engel, 2010). Region C, denoted as the humic-like region, corresponds to polycyclic aromatics with five to seven fused benzene rings (Chen *et al.*, 2003). For HA isolated from NC, a typical maximum lies within the T region and is thus restricted to wavelengths at 280/345 nm. Protein-like organic materials are labile organics under microbial activity and are predominant, e.g. wastewater, compost, manure, municipal solid waste etc. (Marhuenda-Egea *et al.*, 2007; Hudson *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013). The EEM data for excitation wavelengths shorter than 280 nm and for intermediate emission wavelengths (345–360 nm) are related to protein-like compounds, including tryptophan-like materials (Coble, 1996; Henderson *et al.*, 2009). The protein-like region indicates the presence of proteinaceous materials and monoaromatic compounds (dos Santos *et al.*, 2010). The prevalence of fluorescence peaks and of bands with low CFI at short wavelengths, such as those measured for the peaks of NC-HA, is associated with the presence of structures of wide molecular heterogeneity and small molecular weight, a small degree of aromatic polycondensation, a small level of conjugated chromophores and a small degree of humification (Senesi *et al.*, 1991). Lower CFI values for NC-HA may be ascribed to more complex structures, but also to higher contents of metals, which presumably reduce the fluorescence intensity by quenching phenomena (Traversa *et al.*, 2014). In contrast, the long wavelengths and large CFI of prominent peaks of HAs obtained from unamended and amended soils may be ascribed to the presence of extended, linearly-condensed aromatic ring networks and of other unsaturated bond systems capable of a great degree of conjugation with respect to large molecular sizes and extensively humified macromolecules (Senesi *et al.*, 1991). The position of peak C (humic-like) in the region of excitation wavelengths (420–440 nm) for

HAs isolated from control and amended soils suggests that carboxylic groups predominate over phenolic groups (Rodríguez *et al.*, 2014).

According to the EEM spectra, fulvic- and/or humic-like organic compounds were the main components of the current sample set. In the current study, a tryptophan-like compound was one of the main components in HA isolated from NC.

To determine the degree of aromaticity and humification in humic substances by means of steady-state fluorescence spectroscopy, the Milori index was used (Milori *et al.*, 2002). Higher values of the Milori index reflect higher degrees of aromaticity and humification. For HA isolated from NC in the current study, the calculated fluorescence parameter was 0.88, indicating a low degree of aromaticity and humification. In the present study, Milori index values for HAs obtained from amended soil ranged between 1.48 and 4.31 and increased with time after compost application. Differences among the values of control HAs and HAs obtained from amended soil 1 and 2 years after compost application suggest that the HAs isolated from amended soil have a higher degree of aromaticity. This assumption is consistent with the values of the absorption coefficients E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> and Δ log K obtained from the spectrometry experiments.

In the current study, different yields of HAs ranging from 3.5 g/kg to 18.5 g/kg were extracted from NC and soils. The HA isolated from NC had a predominantly aliphatic character and a low degree of aromaticity and humification. The nitrogen content of NC-HA was relatively large and included nitrogen functional groups such as amides (including protein-like components). The EEM spectrum of NC-HA shows that fluorophores occur predominantly in regions A (fulvic-like) and T (tryptophan-like) and these maxima are in the range 240–280/400–500 nm and 270–280/345–360 nm, while, HAs obtained from amended soil have a considerable aromatic character, a larger molecular weight and higher degrees of aromaticity and humification. Further, the oxygen contents of HAs isolated from amended soil were shown to have increased 2 and 3 years after compost application. The results of UV/Vis and FTIR spectroscopy suggest that the substitution of aromatic rings with oxygen-containing functional groups such as carboxylic, hydroxyls (including phenols and primary alcohols) and ethers was greater for HAs obtained from amended soil. Uniquely, the HAs isolated from amended soil also contain maxima in the C (humic-like) region which are in the range 430–450/500–540 nm. The EEM spectra of HAs can be used as fingerprints to distinguish between HAs isolated from different origins, i.e. soil and compost.

**Financial Support.** This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

**Conflict of interest.** None.

**Ethical standards.** Not applicable.

## References

- Adani F, Genevini P, Tambone F and Montoneri E (2006) Compost effect on soil humic acid: a NMR study. *Chemosphere* **65**, 1414–1418.
- Adani F, Genevini P, Ricca G, Tambone F and Montoneri E (2007) Modification of soil humic matter after 4 years of compost application. *Waste Management* **27**, 319–324.
- Aguilar NO, Olivares FL, Novotny EH, Dobbss LB, Balmori DM, Santos-Júnior LG, Chagas JG, Façanha AR and Canellas LP (2013) Bioactivity



- of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil* **362**, 161–174.
- Albaladejo J, Stocking M, Diaz E and Castillo V** (1994) Land rehabilitation by urban refuse amendments in a semi-arid environment: effect on soil chemical properties. *Soil Technology* **7**, 249–260.
- Alberts JJ and Takács M** (2004) 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* **35**, 243–256.
- Albrecht R, Verrecchia E and Pfeifer H-R** (2015) The use of solid-phase fluorescence spectroscopy in the characterisation of organic matter transformations. *Talanta* **134**, 453–459.
- Aranda V, Ayora-Cañada MJ, Domínguez-Vidal A, Martín-García JM, Calero J, Delgado R, Verdejo T and González-Vila FJ** (2011) Effect of soil type and management (organic vs. conventional) on soil organic matter quality in olive groves in a semi-arid environment in Sierra Mágina Natural Park (S Spain). *Geoderma* **164**, 54–63.
- Barančíková G, Senesi N and Brunetti G** (1997) Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma* **78**, 251–266.
- Barje F, El Fels L, El Hajjouji H, Amir S, Winterton P and Hafidi M** (2012) Molecular behaviour of humic acid-like substances during co-composting of olive mill waste and the organic part of municipal solid waste. *International Biodeterioration & Biodegradation* **74**, 17–23.
- Benítez E, Nogales R, Masciandaro G and Ceccanti B** (2000) Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm (*Eisenia fetida*)-processed sewage sludges. *Biology and Fertility of Soils* **31**, 489–493.
- Bernal MP, Navarro AF, Sánchez-Monedero MA, Roig A and Cegarra J** (1998) Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **30**, 305–313.
- Bertoncini EI, D’Orazio V, Senesi N and Mattiazzo ME** (2008) Effects of sewage sludge amendment on the properties of two Brazilian oxisols and their humic acids. *Bioresource Technology* **99**, 4972–4979.
- Birdwell JE and Engel AS** (2010) Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* **41**, 270–280.
- Brunetti G, Plaza C, Clapp CE and Senesi N** (2007) Compositional and functional features of humic acids from organic amendments and amended soils in Minnesota, USA. *Soil Biology & Biochemistry* **39**, 1355–1365.
- Campitelli PA, Velasco MI and Ceppi SB** (2006) Chemical and physico-chemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil. *Talanta* **69**, 1234–1239.
- Chai X, Liu G, Zhao X, Hao Y and Zhao Y** (2012) Fluorescence excitation–emission matrix combined with regional integration analysis to characterize the composition and transformation of humic and fulvic acids from landfill at different stabilization stages. *Waste Management* **32**, 438–447.
- Chen Y, Senesi N and Schnitzer M** (1977) Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal* **41**, 352–358.
- Chen Y, Magen H and Riou J** (1994) Humic substances originating from rapidly decomposing organic matter. Properties and effects on plant growth. In Senesi N and Miano TM (eds), *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health: Proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, pp. 427–443.
- Chen J, Gu B, LeBoeuf EJ, Pan H and Dai S** (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **48**, 59–68.
- Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA and Booksh K** (2003) Fluorescence excitation – emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* **37**, 5701–5710.
- Coble PG** (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* **51**, 325–346.
- Davis WM, Erickson CL, Johnston CT, Delfino JJ and Porter JE** (1999) Quantitative Fourier Transform Infrared spectroscopic investigation humic substance functional group composition. *Chemosphere* **38**, 2913–2928.
- de Araújo ASF, de Melo WJ and Singh RP** (2010) Municipal solid waste compost amendment in agricultural soil: changes in soil microbial biomass. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **9**, 41–49.
- Doskočil L, Grasset L, Enev V, Kalina L and Pekař M** (2015) Study of water-extractable fractions from South Moravian lignite. *Environmental Earth Sciences* **73**, 3873–3885.
- Doskočil L, Enev V, Grasset L and Wasserbauer J** (2017) The characterization of South Moravian lignite in its natural and treated forms using thermal degradation methods. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **128**, 83–91.
- Doskočil L, Burdíkova-Szewieczkova J, Enev V, Kalina L and Wasserbauer J** (2018) Spectral characterization and comparison of Humic acids isolated from some European lignites. *Fuel* **213**, 123–132.
- dos Santos LM, Simões ML, de Melo WJ, Martin-Neto L and Pereira-Filho ER** (2010) Application of chemometric methods in the evaluation of chemical and spectroscopic data on organic matter from Oxisols in sewage sludge applications. *Geoderma* **155**, 121–127.
- Droussi Z, D’Orazio V, Provenzano MR, Hafidi M and Ouattmane A** (2009) Study of the biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Hazardous Materials* **164**, 1281–1285.
- Duong TTT, Penfold C and Marschner P** (2012) Amending soils of different texture with six compost types: impact on soil nutrient availability, plant growth and nutrient uptake. *Plant and Soil* **354**, 197–209.
- Enev V, Pospíšilová L, Klučáková M, Liptaj T and Doskočil L** (2014) Spectral characterization of selected humic substances. *Soil & Water Research* **9**, 9–17.
- FAO** (2006). *World Reference Base for Soil Resources. A Framework for International Classification, Correlation and Communication*. World Soil Resources Reports 103. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fernandes AN, Giovanela M, Esteves VI and de Souza Sierra MM** (2010) Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances. *Journal of Molecular Structure* **971**, 33–38.
- Fuentes M, González-Gaitano G and García-Mina JM** (2006) The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry* **37**, 1949–1959.
- García C and Hernández T** (1997) Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology & Biochemistry* **29**, 171–177.
- García-Gil JC, Plaza C, Senesi N, Brunetti G and Polo A** (2004a) Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils* **39**, 320–328.
- García-Gil JC, Ceppi SB, Velasco MI, Polo A and Senesi N** (2004b) Long-term effects of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. *Geoderma* **121**, 135–142.
- García-Gil JC, Plaza C, Fernández JM, Senesi N and Polo A** (2008) Soil fulvic acid characteristics and proton binding behavior as affected by long-term municipal waste compost amendment under semi-arid environment. *Geoderma* **146**, 363–369.
- Giusquiani PL, Pagliai M, Gigliotti G, Businelli D and Benetti A** (1995) Urban waste compost: effects on physical, chemical, and biochemical soil properties. *Journal of Environmental Quality* **24**, 175–182.
- González-Vila FJ, Almendros G, del Rio JC, Martín F, Gutiérrez A and Romero J** (1999) Ease of delignification assessment of wood from different *Eucalyptus* species by pyrolysis (TMAH)-GC/MS and CP/MAS 13C-NMR spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **49**, 295–305.
- Hay MB and Myneni SCB** (2007) Structural environments of carboxyl groups in natural organic molecules from terrestrial systems. Part 1: infrared spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 3518–3532.
- He X, Xi B, Wei Z, Guo X, Li M, An D and Liu H** (2011) Spectroscopic characterization of water extractable organic matter during composting of municipal solid waste. *Chemosphere* **82**, 541–548.
- Henderson RK, Baker A, Murphy KR, Hambly A, Stuetz RM and Khan SJ** (2009) Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review. *Water Research* **43**, 863–881.



- Horwath WR, Elliott LF and Churchill DB** (1995) Mechanisms regulating composting of high carbon to nitrogen ratio grass straw. *Compost Science & Utilization* **3**, 22–30.
- Hudson N, Baker A, Ward D, Reynolds DM, Brunson C, Carliell-Marquet C and Browning S** (2008) Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England. *Science of the Total Environment* **391**, 149–158.
- Kalbitz K, Geyer S and Geyer W** (2000) A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. *Chemosphere* **40**, 1305–1312.
- Korshin GV, Li C-W and Benjamin MM** (1997) Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Research* **31**, 1787–1795.
- Kumada K** (1987) Classification of humic acids based on shape of the absorption spectrum and  $\Delta \log K$ . In Kumada K (ed.) *Chemistry of Soil Organic Matter*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, pp. 25–26.
- Lakowicz JR** (2006) Instrumentation for fluorescence spectroscopy. In Lakowicz JR (ed.) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA, USA: Springer, pp. 27–61.
- Leifeld J, Siebert S and Kögel-Knabner I** (2002) Changes in the chemical composition of soil organic matter after application of compost. *European Journal of Soil Science* **53**, 299–309.
- Marhuenda-Egea FC, Martínez-Sabater E, Jordá J, Moral R, Bustamante MA, Paredes C and Pérez-Murcia MD** (2007) Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: evaluation of the process by fluorescence excitation–emission matrix. *Chemosphere* **68**, 301–309.
- McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T and Andersen DT** (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* **46**, 38–48.
- Milori DMBP, Martin-Neto L, Bayer C, Mielniczuk J and Bagnato VS** (2002) Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* **167**, 739–749.
- Montoneri E, Savarino P, Adani F, Genevini PL, Ricca G, Zanetti F and Paoletti S** (2003) Polyalkylphenyl-sulphonic acid with acid groups of variable strength from compost. *Waste Management* **23**, 523–535.
- Morán Vieyra FE, Palazzi VI, Sanchez de Pinto MI and Borsarelli CD** (2009) Combined UV–Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. *Geoderma* **151**, 61–67.
- Olsen DJR, Endelman JB, Jacobson AR and Reeve JR** (2015) Compost carry-over: nitrogen, phosphorus and FT-IR analysis of soil organic matter. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **101**, 317–331.
- Ouédraogo E, Mando A and Zombré NP** (2001) Use of compost to improve soil properties and crop productivity under low input agricultural system in West Africa. *Agriculture, Ecosystems, & Environment* **84**, 259–266.
- Pallasser R, Minasny B and McBratney AB** (2013) Soil carbon determination by thermogravimetrics. *PeerJ* **1**, article no. e6.
- Parlanti E, Wörz K, Geoffroy L and Lamotte M** (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* **31**, 1765–1781.
- Pedra F, Plaza C, Fernández JM, García-Gil JC and Polo A** (2008) 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* **28**, 2183–2191.
- Peiris RH, Budman H, Moresoli C and Legge RL** (2011) Identification of humic acid-like and fulvic acid-like natural organic matter in river water using fluorescence spectroscopy. *Water Science & Technology* **63**, 2427–2433.
- Peuravuori J and Pihlaja K** (1997) Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta* **337**, 133–149.
- Piccolo A and Mbagwu JSC** (1994) Humic substances and surfactants effects on the stability of two tropical soils. *Soil Science Society of America Journal* **58**, 950–955.
- Plaza C, Senesi N, Polo A, Brunetti G, García-Gil JC and D’Orazio V** (2003) Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil and Tillage Research* **74**, 179–190.
- Rivero C, Chirenje T, Ma LQ and Martínez G** (2004) Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. *Geoderma* **123**, 355–361.
- Rodríguez FJ, Schlenger P and García-Valverde M** (2014) A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Science of the Total Environment* **476–477**, 718–730.
- Romero E, Plaza C, Senesi N, Nogales R and Polo A** (2007) Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma* **139**, 397–406.
- Schulten H-R and Schnitzer M** (1997) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* **26**, 1–15.
- Senesi N** (1992) Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of the Total Environment* **123–124**, 63–76.
- Senesi N, Miano TM, Provenzano MR and Brunetti G** (1991) Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* **152**, 259–271.
- Senesi N, Plaza C, Brunetti G and Polo A** (2007) A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology & Biochemistry* **39**, 1244–1262.
- Serramiá N, Sánchez-Monedero MA, Roig A, Contin M and De Nobili M** (2013) Changes in soil humic pools after soil application of two-phase olive mill waste compost. *Geoderma* **192**, 21–30.
- Sierra MMD, Giovanela M, Parlanti E and Soriano-Sierra EJ** (2005) Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **58**, 715–733.
- Swift RS** (1996) Organic matter characterization. In Sparks DL, Page AL, Helmke PA and Loeppert RH (eds). *Methods of Soil Analysis Part 3 Chemical Methods*. Madison: Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. pp. 1011–1069.
- Swift RS, Rate AW and McLaren RG** (1995) Interactions of copper with soil humic substances. In Huang PM, Berthelin J, Bollag J-M, McGill WB and Page AL (eds), *Environmental Impact of Soil Component Interactions vol. II: Metals, Other Inorganics and Microbial Activities*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 19–28.
- Traversa A, D’Orazio V, Mezzapesa GN, Bonifacio E, Farrag K, Senesi N and Brunetti G** (2014) Chemical and spectroscopic characteristics of humic acids and dissolved organic matter along two Alfisol profiles. *Chemosphere* **111**, 184–194.
- Uyguner CS and Bekbolet M** (2005) Implementation of spectroscopic parameters for practical monitoring of natural organic matter. *Desalination* **176**, 47–55.
- Valencia S, Marín JM, Restrepo G and Frimmel FH** (2013) Application of excitation–emission fluorescence matrices and UV/Vis absorption to monitoring the photocatalytic degradation of commercial humic acid. *Science of the Total Environment* **442**, 207–214.
- Vergnoux A, Guiliano M, Di Rocco R, Domeizel M, Théraulaz F and Doumenq P** (2011) Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research* **111**, 205–214.
- Wan S, Xi B, Xia X, Li M, Iv D, Wang L and Song C** (2012) Using fluorescence excitation–emission matrix spectroscopy to monitor the conversion of organic matter during anaerobic co-digestion of cattle dung and duck manure. *Bioresource Technology* **123**, 439–444.
- Yu H, Song Y, Tu X, Du E, Liu R and Peng J** (2013) Assessing removal efficiency of dissolved organic matter in wastewater treatment using fluorescence excitation emission matrices with parallel factor analysis and second derivative synchronous fluorescence. *Bioresource Technology* **144**, 595–601.

Snahou mnoha evropských zemí, ale i České republiky je efektivní nakládání s biologicky rozložitelnými odpady (BRO), které by omezilo ukládání této organické hmoty na běžné skládky komunálního odpadu. Aby byla naše představa o této problematice ucelená, tak si zde položíme výčet hlavních producentů biologicky rozložitelného odpadu. Jedná se zejména o odpady zemědělské, zahradnické, lesnické, potravinářského a celulózářského průmyslu, dále bychom mohli do této kategorie zařadit odpady pocházející z kožedělného a papírenského průmyslu, tak jako i odpady čistírenských a vodárenských kalů. Nicméně poslední dva jmenované druhy BRO si zaslouží zvýšenou naši pozornost, a to zejména z důvodu jejich možného environmentálního rizika při jejich zpracování a následného použití ve formě kompostů či jiných stabilizovaných forem OM. Tato obezřetnost vyplývá z často nadlimitních koncentrací těžkých kovů, antropogenních organických sloučenin, jako jsou barviva, léčiva, PAH (polyaromatic hydrocarbons) v těchto odpadních surovinách. V dnešní době je nakládání s těmito odpady reprezentováno dvěma hlavními cestami, a to buď v podobě jejich průmyslového kompostování, anebo použití jako vstupní suroviny při výrobě tzv. biouhlu. Na tomto místě je nutné říci, že právě pyrolyzní zpracování čistírenských a vodárenských kalů je velmi dobrou alternativou zpracování těchto environmentálně rizikových odpadů.

Pokud bychom měli v krátkosti definovat proces kompostování, tak se jedná o aerobní exotermní přeměnu biologicky rozložitelného materiálu na stabilní OM, která je bohatá nejen na obsah HL, ale také na další organické sloučeniny vykazující jistou biologickou aktivitu.

V této souvislosti byl publikován odborný článek s názvem: „The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soil”.

Design této studie spočíval ve střednědobém sledování vlivu aplikace kompostu na strukturní a chemické vlastnosti půdních HK izolovaných z Černozemě luvické. Tento maloparcelní pokus byl realizován na půdě Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. Na pokusná políčka o rozměrech 3×3 m byl aplikován přírodní kompost ve třech různých dávkách, a to 124, 239 a 478 t·ha<sup>-1</sup>, který byl následně zapraven do nejsvrchnějšího půdního horizontu A<sub>p</sub>. Celková doba tohoto pokusu trvala 3 roky, přičemž jednotlivé neporušené půdní vzorky byly odebírány po každém roce inkubace kompostu. Hlavními surovinami pro založení kompostu byly čerstvě posečená tráva, listí, dřevní štěpka a omezené množství slámy. Jednotlivé vzorky HK byly izolovány z nativní a ošetřené půdy, tak i z přírodního kompostu, který byl na pokusná políčka aplikován. Hlavním metodickým přístupem této studie bylo ověřit do jaké míry je schopna organická hmota resp. „mladé HK“ přítomné v kompostu ovlivnit stávající půdní HK, a to zejména z morfologického, chemického a strukturního pohledu. Za tímto účelem byly vybrány termické a spektrometrické instrumentální techniky tzn. termogravimetrická a elementární analýza, UV/Vis, FTIR a fluorescenční spektrometrie.

Extrakční výtěžky HK jasně ukazují, že bezprostředně po aplikaci kompostu dochází v půdě k jejich evidentnímu zvýšení, avšak v delším časovém horizontu je jejich určitá část eliminována v procesu mineralizace, jejímiž konečnými produkty jsou CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Ale na druhou stranu lze vidět, že určitá část OM je vůči mineralizaci netečná, a stává se tak plnohodnotnou součástí půdní organické hmoty resp. HK.

Nicméně, co bylo v této studii zajímavé, je, že v důsledku aplikovaného kompostu byly půdní HK charakterizovány vyšším obsahem reaktivních funkčních skupin, jako jsou karboxylové, -OH fenolické, etherové a alkoholové, které plní nezastupitelnou úlohu při výživě rostlin a půdních mikroorganismů. Jelikož je humifikace dynamickým a v každém okamžiku stále probíhajícím biochemickým procesem, tak vznik těchto funkčních skupin je silně závislý na uplynulé době od aplikace organické hmoty do půdy.

Dále bylo zjištěno, že po aplikaci a následné inkubaci kompostu jsou půdní HK signifikantně charakterizovány vyšším stupněm aromaticity a střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_r$ , o čemž nejen vypovídají vypočtené absorpční koeficienty a fluorescenční indexy, ale i absorpční pásy lokalizované při  $1510\text{ cm}^{-1}$ , které jsou zpravidla připisovány valenční symetrické vibraci C=C vazeb aromatických struktur pocházejících z dekompozice ligninu.

V EEM spektru vzorku HK izolované z přírodního kompostu byly lokalizovány tři fluorescenční domény, z nichž dvě byly klasifikovány jako A ( $\alpha$ ) – *fulvic-like* a třetímu fluoroforu byl připsán původ T ( $\delta$ ) – *tryptofan-like*, který byl lokalizován v oblasti vlnových délek  $280/345\text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Tento fluorofor je v průběhu humifikačního procesu zcela eliminován, avšak lze předpokládat, že se stává součástí nově vzniklých anebo postupně „zrajících“ půdních HK. Tato hypotéza je velmi věrohodně podpořena výsledky z elementární analýzy a infračervené spektrometrie, kde jak se ukázalo, se zdají být vhodnými markery posouzení, jak atomový poměr C/N, tak i absorpční pás odpovídající valenční symetrické vibraci C–N a deformační vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech.

Tato studie jednoznačně ukázala nezastupitelnou úlohu termických a spektrometrických technik při studiu a charakterizaci HK, které jsou v dynamickém procesu humifikace předmětem neustálých strukturních, chemických a morfologických změn.

# Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure

Ales Hanc, **Vojtech Enev**, Tereza Hrebeckova, Martina Klucakova, Miloslav Pekar

*Waste Management*, **2019**, 99, 1–11.

Impact factor (2020): 7,145

JCR Category: Engineering, Environmental-Scie – Q1



## Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure



Ales Hanc<sup>a,\*</sup>, Vojtech Enev<sup>b,1</sup>, Tereza Hrebeckova<sup>a</sup>, Martina Klucakova<sup>b</sup>, Miloslav Pekar<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 00, Prague 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, Brno 612 00, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 June 2019

Revised 16 August 2019

Accepted 19 August 2019

Available online 24 August 2019

#### Keywords:

Humic acids

Chemical and spectroscopic techniques

Vermicomposting

Continuous-feeding system

Horse manure

### ABSTRACT

The increasing numbers of kept horses create problems with processing horse manure as important local waste. This work was focused on horse manure vermicomposting in a real-field continuous-feeding system under controlled conditions, and on the complex study of the maturity and stability of the produced vermicompost. Commonly used simple indicators such as the C/N ratio,  $N-NH_4^+/N-NO_3^-$  ratio, DOC or ion exchange capacity, and also more advanced spectroscopic and thermoanalytic techniques were used and applied on the humic substances isolated from the vermicompost during its maturation (12 months in total). When compared with the original horse manure, vermicomposting decreased the aliphatic, protein-like, and polysaccharide humic components, whereas vermicomposting increased the aromaticity and contents of oxygen-containing functional groups. The typical tryptophan-like fluorophores in the manure, corresponding to the freshly produced organic matter of biological or microbial origin, were progressively transformed to humic-like fluorophores during vermicomposting. The most thermally labile humic fraction disappeared quickly during the very early vermicomposting stages. The results of spectroscopic and thermogravimetric analyses suggest that stable and mature vermicompost was produced after 6–9 months of vermicomposting, which was also supported by biologically-based maturity indicators.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The global horse population is about 58 million (FAOSTAT, 2018). The increasing numbers of horses kept within or near urban areas creates environmental problems, as there is a lack of arable land for spreading manure and insufficient methods or capacity for manure storage (Hadin et al., 2016). Manure is typically applied to soils as fertilizer for agricultural production due to its favorable physico-chemical properties. However, manure is also considered as an environmental pollutant (He et al., 2016). Leaching or runoff of nitrogen and phosphorus impair both ground - and surface waters (Hooda et al., 2000). Manure can also increase global climate change via emissions of methane and nitrous oxide (Leytem et al., 2011).

Manure has little stability (Moral et al., 2005), but it is very suitable for composting or vermicomposting. Garg et al. (2005) studied the effect of various animal wastes (manures) on the growth and reproduction of an epigeic earthworm *Eisenia foetida* under identical laboratory conditions. The net biomass gain/earthworm in dif-

ferent animal manures was in the order of: sheep > donkey > buffalo > goat ≈ cow ≈ horse > camel. The number of cocoons produced per earthworm per day in different wastes was in the order: sheep > cow ≈ horse ≈ goat > camel > donkey > buffalo. The increase in the number of earthworms was 39.5-fold in horse manure and 26-fold in cow manure. Stability can be distinguished as temporary (caused by, for example, lack of water in the raw material) or permanent (creation of stable humic substances). The amount and especially the quality of organic substances in products of biomass recovery are considered as important indicators of their biological maturity and chemical stability (Peev et al., 2017). The humified fraction of organic matter is resistant to microbial degradation, and thus is important for maintaining long-term soil fertility (Bernal et al., 2009).

Immature and slightly stabilized “compost or vermicompost” can cause many problems when stored and used. Oxygen-free spaces are formed, which in turn spontaneously smell and produce substances toxic to plants. Continued decomposition of these unstable materials after their application to the soil has a negative influence on plant growth due to decreasing oxygen and/or available nitrogen with associated phytotoxic effects (Jeong et al., 2017). They also release nutrients more quickly and can promote the re-development of pathogenic microorganisms. Immature

\* Corresponding author.

E-mail address: [hanc@af.czu.cz](mailto:hanc@af.czu.cz) (A. Hanc).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



composts can contain high levels of ammoniacal nitrogen and ammonia, organic acids, or slightly soluble compounds that can reduce seed germination and root plant growth. On the other hand, a stable and mature compost or vermicompost exhibits complete organic matter decomposition, and has significant sorption and ion exchange properties, and releases nutrients gradually, and thus optimizes the soil solution composition. In addition, mature vermicompost is not an odor problem without access to the air and during long-term storage (Wichuk and McCartney, 2010).

The stability can be precisely assessed using instrumental techniques such as elemental analysis (CHNS/O), ultraviolet–visible spectroscopy (UV/Vis), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and fluorescence spectroscopy or thermogravimetric analysis (TGA). Elemental analysis is a basic chemical characteristic of humic acids that quantitatively determines the contents of C, H, N, O, S in their molecules. The content and ratio of each element reveals the specialties of humus substances (Droussi et al., 2009). The UV/vis technique is used to determine the maturity of compost by measuring the rate of humification in wavelength ranges from about 200 to 800 nm or greater (Gieguzynska et al., 1998). The FTIR spectroscopy is a qualitative technique for differentiating functional groups of organic substances, and is usually utilized in the investigation of soil organic matter, organic wastes, and their compost (Amir et al., 2010). Fluorescence Excitation-Emission Matrix (EEM) spectroscopy is among the most promising tools for characterising heterogeneous organic matter by providing comprehensive information on the composition, properties, and behaviour of the samples (Coble et al., 2014; Ohno and He, 2011). Given its sensitivity, selectivity, and non-destructive nature, EEM is widely used to differentiate the changes and transformations of OM in natural environments (Albrecht et al., 2015; Wu et al., 2009). TGA is an easy method which aids in illustrating the end product by providing chemical characteristics of samples (Wu et al., 2011).

Humification of organic matter during composting is manifested by the formation of humic substances which consist of a humic and fulvic acid fraction (Inbar et al., 1990). Several different structural models of humic acids (HAs) have been suggested (Stevenson, 1994; Al-Faiyz, 2017). HAs are synthesized as the most important by-product during composting, because they are widely utilized for the sorption of nutrients and remediation of environmental pollution (Yuan et al., 2017).

The aim of the study was to evaluate the process of vermicomposting of horse manure in a continuous-feeding system with a focus on the quality of HAs produced. Based on the results, the optimal time of vermicomposting and the use of the vermicompost can be predicted. The novelty of the work consists in more accurately determining the stability of vermicompost from horse manure using advanced spectroscopic techniques, unlike commonly used simple indicators such as the C/N ratio,  $N-NH_4^+/N-NO_3^-$  ratio, or cation exchange capacity. Thus far, experimental data on humic acids isolated from vermicompost of horse manure are missing and this is the first study. Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) technique was used for characterization of humic acids, although this method is routine. Infrared spectra obtained by means of a DRIFT were chosen as it required no mechanical treatment of the sample (transmission technique, e.g. tablet pressing) and therefore less opportunity for analyst-induced variation between samples can be presented.

## 2. Material and methods

### 2.1. Feedstock and vermicomposting set-up

The experiment was set up at a family vermicomposting company in Kyjov, Czech Republic (N 49°1.61737', E 17°7.32838').

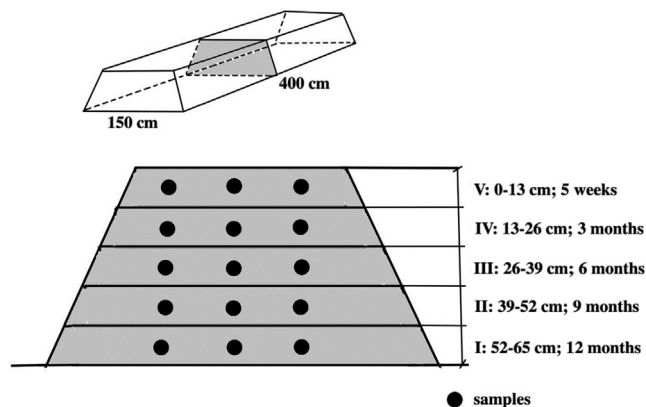


Fig. 1. Diagram of the continuous-feeding vermicomposting system with horse manure at a family vermicomposting company in Kyjov, Czech Republic.

The concrete container for vermicomposting occupied a ground plan  $4 \times 1.5$  m, and was placed in a stone room to avoid the influence of weather conditions, especially precipitation (Fig. 1). The temperature of the vermicomposted material partially copied the outside temperature of the temperate climate. However, the high temperatures in the summer and the low in the winter were moderated by being placed in a container in the room even though it was without air conditioning. The bedding layer consisted of mature horse manure with earthworms (*Eisenia andrei*), with a density of about 50 earthworms per liter (10 g of earthworms per kilogram), and was placed first. Subsequent 5 cm layers of mature horse manure were added every week to avoid high temperature above 35 °C that is lethal to earthworms. Selected physico-chemical properties of the feedstock used are shown in Table 1.

Besides the raw horse manure samples, other samples were taken up from the cross profiles of different depths. Depth placement and the average age of each layer were as follows:

- V: 0–13 cm, 5 weeks
- IV: 13–26 cm, 3 months
- III: 26–39 cm, 6 months
- II: 39–52 cm, 9 months
- I: 52–65 cm, 12 months

Potential earthworms were separated, counted, and weighted. The resulting vermicompost sample without earthworms was divided into 3 parts and treated as required for laboratory analyses. One part of the vermicompost sample was stored at 4 °C until the pH and electrical conductivity (EC) could be determined. The second part was dried at 30 °C to a constant weight and ground. This was then used for analyses of the total and available contents of elements and the ion exchange capacity (IEC). The third part of the vermicompost sample was frozen at –20 °C and then lyophilized for subsequent determination of the groups of microorganisms by the phospholipid fatty acid (PLFA) method.

### 2.2. Chemical and biological analyses

Measurements of active pH and EC (1:5 w/v) were conducted with use of a WTW pH 340 i and Testo 240, respectively according to EN 13037. The CHNS Vario MACRO cube analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) was used for determination of total carbon ( $C_{tot}$ ) and nitrogen ( $N_{tot}$ ). The total contents of P, K, and Mg were determined by decomposition utilizing a wet method in a closed system with microwave heating using an Ethos 1 microwave system (MLS GmbH, Germany). The contents of

**Table 1**  
Selected physico-chemical properties of the horse manure used in the experiment.

	Dry matter [%]	Volatile solids	pH/H <sub>2</sub> O	EC [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]	C/N	P <sub>tot.</sub> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	K <sub>tot.</sub> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	Mg <sub>tot.</sub> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]
Horse manure	26.7 ± 2.0	80.9 ± 1.3	7.9 ± 0.1	1039 ± 202	33.1 ± 1.3	5200 ± 400	20800 ± 1200	4400 ± 300

Values are means ± SD (n = 3).

ammonium nitrogen (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), dissolved organic carbon (DOC), and the available portions of P, K, and Mg were determined in calcium chloride/DTPA (CAT) solution (0.01 mol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> and 0.002 mol l<sup>-1</sup> diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)) at a ratio of 1:10 (w/v) according to the International BSI Standard EN 13651. The NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N contents in the extracts were measured colorimetrically using a SKALAR SANPLUS SYSTEM®. The element concentrations were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, VARIAN VistaPro, Varian, Australia) with axial plasma configuration. The ion-exchange capacity (IEC) was determined conductometrically (Váchalová et al., 2014). Samples for the PLFA analysis were extracted in triplicate using a mixture of chloroform, methanol, and phosphate buffer (1:2:0.8; v/v/v). Detailed description of the method is shown in Šnajdr et al., (2011).

### 2.3. Extraction of humic acids

Humic acids were extracted from horse manure before and after the vermicomposting process using a modified procedure recommended by the International Humic Substances Society (Swift, 1996). Briefly, air-dried samples were demineralized with 0.1 M HCl at a ratio of 1:10 (sample/solution), and the suspensions were then washed with distilled water until an almost neutral pH was achieved. All samples were shaken overnight with 0.1 M NaOH and 0.1 M pyrophosphate solution under N<sub>2</sub> using a sample/extractant ratio of 1:10. After centrifugation at 2700 × g for 30 min, humic acids were precipitated from the supernatant by means of acidification to pH < 2 with 6 M HCl, and further separated by centrifugation at 2700 × g for 20 min. Precipitated humic acids were treated (twice) with a mixture of 0.5 vol% HCl-HF over a period of 24 h, and subsequently separated in the centrifuge. Humic acids were purified and dialysed using a Spectrapore membrane (MWCO 1000) until free Cl<sup>-</sup> and F<sup>-</sup> ions were washed out and finally freeze-dried. The samples were left to equilibrate in the ambient laboratory atmosphere at about 25 °C, which resulted in the final equilibrium moisture. Strictly speaking, that which is isolated from vermicompost and/or compost is not a true humic acid, such as HAs extracted from coal, soil, and peat (Stevenson, 1994). In this work we will use this designation for our isolated samples, which were obtained by the standard extraction method. The designation of extracted humic acids is as follows: humic acid isolated from raw horse manure – HARHM; humic acid isolated after 5 weeks of the vermicomposting process – HA5W; humic acids isolated after 3, 6, 9, and 12 months of the vermicomposting process – HA3, HA6, HA9, and HA12.

### 2.4. Humic acids analysis

#### 2.4.1. Elemental analysis

The elemental composition of all humic acids was determined using an EA 3000 CHNS/O analyser (Euro Vector, Pavia, Italy). Samples (1–1.5 mg) were packed in tin capsules and placed in an oven for combustion at 980 °C using pure oxygen as the combustion gas and pure helium as the carrier gas. Calibration curves for carbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N), and sulphur (S) were obtained using sulphanilamide as a reference standard sample. The percent oxygen content was calculated by the difference, and the data

obtained were corrected for moisture and ash content. All samples were incinerated at a heating rate of 10 °C/min from room temperature to 900 °C under air atmosphere. The weight loss occurring at 105 °C was measured and taken as the moisture content. The final residue, after heating to 900 °C, was measured and taken as the ash content.

#### 2.4.2. UV/Vis spectrometry

UV/Vis spectra were obtained on a Hitachi U-3900H UV/Vis spectrometer (Hitachi, Tokyo, Japan) by recording the absorption spectra between 200 and 900 nm. Samples were measured in a 10 mm quartz cuvette and with a standard phosphate buffer blank (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### 2.4.3. FTIR spectrometry

FTIR spectra were obtained by means of a Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) technique using a Nicolet iS50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Approximately 4 mg of powdered HA samples were homogenized with 400 mg of KBr in an agate mortar, and then transferred to the sample holder cup of the diffuse reflectance accessory. All spectra were recorded over the 4000–400 cm<sup>-1</sup> range at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and were the average of 512 scans. The KBr infrared grade spectrum was used as the background for DRIFT measurement.

#### 2.4.4. Fluorescence spectroscopy

For fluorescence analysis, HAs were dissolved at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> of organic carbon in standard phosphate buffer. The pH-value of solutions was adjusted to seven using phosphate buffer. All spectra were obtained on a FluoroLog fluorescence spectrometer (Horiba Scientific, New Jersey, USA) with a scan speed of 600 nm min<sup>-1</sup>, using excitation and emission slit bandwidths of 5 nm. Total luminescence spectra (TLS) were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range 300–600 nm and 240–550 nm, with the emission and excitation increment set at 5 nm. The sample cell with humic acid solution was kept at a temperature of 20 °C during each measurement. The EEM spectrum of ultra-pure water (Mili-Q) was obtained and subtracted from the EEM spectra of all samples examined to decrease the influence of 1st- and 2nd- order Raman scattering. Primary and secondary inner filter effects were corrected. The fluorescence intensity values of samples (in counts per second, CPS) were corrected using the method devised by Lakowicz (Lakowicz, 2006).

#### 2.4.5. Thermogravimetric analysis

Thermal degradation of the isolated HAs was performed using a Q5000 TG analyzer (TA Instruments, New Castel, Delaware, USA) with ±1 °C temperature accuracy and ±0.1% mass accuracy. Approximately 3–5 mg of powdered HA was introduced into a platinum pan. The sample was heated at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup> from room temperature to 1000 °C under a flow of nitrogen (20 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>).

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using STATISTICA 12 software (StatSoft, Tulsa, USA). Due to the inhomogeneity of the data, a non-parametric statistical analysis of the comparison of several

independent groups using the Kruskal-Wallis test was used. Spearman's correlations were explored between the parameters at the 0.05 probability levels.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selected physico-chemical properties

As is evident from Table S1 (Supplementary material), the greatest dry matter content was found in the top layer. The increase of humidity with the age of the layers could be explained by vermicomposting in the concrete container without runoff to maintain a closed loop. Dry matter content in the bottom layer statistically differed from the top layer. Volatile solids decreased gradually caused by the loss of CO<sub>2</sub>. In the oldest layer, there were 80% and 58% of volatile solids of the vermicomposted material in the top layer and of the original horse manure, respectively. The pH values ranged from 7.75 to 8.74 which corresponds to Hanc et al. (2019) who vermicomposted distillery residues together with straw. EC initially increased over time and later decreased. The highest value was found in the 3rd layer. Some authors dealing with vermicomposting reported an increase trend of EC during the process due to degradation of the organic matter and the release of the mineral salts (Hanc and Chadimova, 2014). Nonetheless, the other studies have shown a decreasing trend for EC (Domínguez et al., 2018). The nitrogen content gradually increased with the age. This was due to the loss of organic matter causing a relative increase in the content of elements. Value of the C/N in the top layer (19.3) was significantly lower compared to the feedstock (33.1) due to a rapid transformation of organic matter through the earthworms. The decrease in the C/N ratio towards the lower layers is in agreement with the study of Hanc et al. (2017) who vermicomposted household biowaste under large-scale vermicomposting conditions. The decrease of C/N during one year ranged from 16.1 to 10.4. The C/N ratio of vermicompost mainly depends upon rate of C and N mineralization in waste stuff during the decomposition process (Negi and Suthar, 2018).

Table S2 shows parameters of maturity such as N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, DOC, IEC and IEC/C<sub>tot</sub>. With increasing age and depth, the maturity of vermicompost should increase. This was confirmed for all maturity parameters, although the differences were non-significant between the layers due to the use of strict non-parametric statistical test. The most marked decrease by 60% in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was observed between layers V and IV. The differences between the other layers were lower. The proportion of the most active fraction of carbon expressed as DOC in the C<sub>tot</sub> fluctuated between 2.6 and 2.9%. A very strong correlation was found between the two parameters (R = 0.98, p < 0.05). Similarly, DOC

positively correlated with C/N ratio (R = 0.87, p < 0.05). The processes of mineralization and humification during vermicomposting may result in changes in ion-exchange properties, which can be expressed and quantified by IEC. The IEC increased from 22 mmol<sub>+</sub> 100 g<sup>-1</sup> (layer V) to 28 mmol<sub>+</sub> 100 g<sup>-1</sup> (layer II and I). It was lower than in mentioned experiments of Hanc et al. (2017, 2019), where the values ranged from 52 to 60 mmol<sub>+</sub> 100 g<sup>-1</sup> and 55 to 71 mmol<sub>+</sub> 100 g<sup>-1</sup>, respectively. The IEC/C<sub>tot</sub> ratio that takes into account the mineralization of organic matter increased to 1.4 in the oldest layer but it was lower than in vermicompost from household biowaste (3.3) and distillery residues (2.0) found in studies of Hanc et al. (2017, 2019). Changes in total and available phosphorus, potassium, and magnesium contents in layers are illustrated in Fig. 1S.

#### 3.2. Earthworms and microorganisms

Most earthworms were in the youngest layer (Table S3) which corresponds to Castkova and Hanc (2019). The number of earthworms in this layer accounted for 73% of the total number. There were only 3 earthworms on average in the oldest layer of vermicompost, which made up 0.14% of the total number. It can be explained by a lack of food substrate for earthworms, probably the accumulation of some transformed compounds which might be toxic to the earthworms, as well as the lack of aeration. Similarly, the highest earthworm biomass proportion was found in top layer V (73%), followed by layer IV (25%), layer III (0.10%), layer II (0.5) and layer I (0.03%). Due to the lack of suitable food for earthworms, the average weight of earthworms in the bottom layers was lower by 30% compared to upper layers.

The total microbial biomass decreased usually directly proportional with the ages of the layers (Fig. 2S). The difference between the youngest layer (156 µg PLFA g<sup>-1</sup> dw) and the oldest layer (72 µg PLFA g<sup>-1</sup> dw) was 45%. With the increase in manure conversion into vermicompost and hence with a decrease in heterogeneity, the standard deviation among the taken samples also decreased. Microbial biomass positively correlated with number and biomass of earthworms (R = 0.85, p < 0.05 for both parameters) which demonstrates that vermicomposting is the cooperation of earthworms and microorganisms. The lowest bacterial/fungal ratio (11) was found in the youngest layer and gradually increased to 28 in layer II.

#### 3.3. Yields, ash contents and elemental analysis

The extraction yields, elemental composition, ash contents, and atomic ratios of HAs isolated from raw and vermicomposted horse manures are summarized in Table 2.

**Table 2**  
Extraction yields, ash contents, elemental compositions, and atomic ratios of HAs.

Origin of HA	Yield (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Ash (wt. %) <sup>a</sup>	C (at. %) <sup>b</sup>	H	N	O	H/C	O/C	C/N
HARHM1 <sup>c</sup>	13.1 ± 1.8	1.4 ± 0.1	36.69 ± 0.15	46.39 ± 0.16	2.67 ± 0.10	14.25	1.26	0.39	13.72
HA5W <sup>d</sup>	25.7 ± 3.3	1.7 ± 0.3	38.16 ± 0.22	43.36 ± 0.10	2.14 ± 0.06	16.34	1.14	0.43	17.82
HA3 <sup>e</sup>	22.2 ± 1.4	1.7 ± 0.4	38.29 ± 0.16	43.01 ± 0.08	2.22 ± 0.05	16.88	1.12	0.44	17.28
HA6 <sup>f</sup>	26.6 ± 0.9	1.4 ± 0.1	38.44 ± 0.45	42.97 ± 0.15	2.17 ± 0.02	17.15	1.12	0.45	17.70
HA9 <sup>g</sup>	26.2 ± 0.9	1.6 ± 0.4	38.44 ± 0.65	42.67 ± 0.16	2.15 ± 0.04	17.18	1.11	0.45	17.90
HA12 <sup>h</sup>	28.7 ± 2.9	1.6 ± 0.9	38.42 ± 0.47	42.36 ± 0.07	2.29 ± 0.08	17.94	1.10	0.47	16.76

Values of extraction yield, ash content and elemental compositions are means ± SD (n = 3).

<sup>a</sup> On moisture-free basis.

<sup>b</sup> On moisture-free and ash-free basis.

<sup>c</sup> HA isolated from raw horse manure.

<sup>d</sup> HA isolated from vermicompost of average age 5 weeks.

<sup>e</sup> HA isolated from vermicompost of average age 3 months.

<sup>f</sup> HA isolated from vermicompost of average age 6 months.

<sup>g</sup> HA isolated from vermicompost of average age 9 months.

<sup>h</sup> HA isolated from vermicompost of average age 12 months.

The yield of HAs ranged from 13.1% to 28.7% depending on the time of the vermicomposting process. The greatest yield (28.7%) was obtained for HA isolated from vermicompost which was composted for 12 months. In contrast, the least yield (13.1%) was determined for HA extracted from raw horse manure. In addition, yields depend on the procedures selected for isolating and purifying the HAs (Doskočil et al., 2018). Similarly, the ash content of HAs can depend both on the origin of the source material as well as on the sample purification procedure. The ash content of HAs isolated from raw horse manure and our sample set of vermicomposts was similar. Slightly greater ash contents were observed for HAs originating from vermicomposts of average ages 5 weeks and 3 months.

The elemental compositions are shown in Table 2 in atomic percent (at. %), because, in contrast to weight percent (wt. %), it better reflects the content of hydrogen in the structures of humic substances. The carbon content increased slightly during the vermicomposting process, while the hydrogen content decreased. The nitrogen level decreased in the first stages of vermicomposting and then very slightly increased at the end of this process. A greater increase in oxygen content was observed for the HAs extracted from vermicomposts compared with HAs isolated from raw horse manure. The elemental composition of HAs from our sample set was similar to that of HAs extracted from different composts and/or vermicomposts from other studies (Enev et al., 2018; Li et al., 2011).

The H/C atomic ratio is considered as an indicator of the degree of aromaticity, and, for our samples, lay within a range (i.e. from 1.10 to 1.26). The aromaticity of HAs isolated from raw horse manure was the least of all the samples, whereas it increased during the vermicomposting process. The H/C level decreased with the vermicomposting process, which could be attributed to an increase of the aromatic and/or a decrease of the aliphatic structures. In the studied HAs, the H/C atomic ratio is similar to values published in previous studies (Senesi, 1989; Zhang et al., 2015). The O/C atomic ratio reflects the amount of oxygen-containing functional groups (e.g. carboxylic and phenolic) in humic substances. The O/C atomic ratio significantly increased during the composting process. These results suggest that during vermicomposting, a progressive transformation of the polysaccharides and polysaccharide-like compounds to other oxygenated compounds such as aromatic carboxylic acids and phenols occurs. The C/N atomic ratio reflects the amount of nitrogen in humic substances. The C/N ratio values were in the range from 13.72 to 17.90. The C/N ratio obtained in this study for the HA isolated from raw horse manure was relatively small, indicating that the organic matter of raw material contained a large amount of nitrogenous substances. The C/N level significantly increased at the first stage of the vermicomposting

process, which could be attributed to a decrease in the amounts of nitrogen-containing compounds, such as protein and protein-like substances.

### 3.4. UV/Vis spectroscopy

The UV/Vis absorbance spectra of HAs isolated from all studied samples were typically featureless and characterized by the absence of identifiable maxima and/or minima with decreasing absorbance at increasing acquisition wavelength (not shown).

In our study, HAs absorbed light significantly at wavelengths ranging between 200 and 700 nm. Absorption in this UV/Vis region indicates that the vast majority of the chromophores include aromatic rings with various degrees and substitution types, such as monosubstituted and polysubstituted phenolic compounds and various monoaromatic and/or polyaromatic acids (Korshin et al., 1997). A number of studies have shown that the analysis of UV/Vis spectra by means of absorption ratios may provide valuable information on the chemical structure and properties of HAs, that may also complement the information obtained using other analytical methods, such as potentiometric titration, size exclusion chromatography, NMR etc. (Asakawa et al., 2011; Ephraim et al., 1995; Novák et al., 2015) The  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to that at 220 nm) is small for compounds in which the aromatic rings are largely substituted with aliphatic functional groups, whereas greater  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratios are associated with the presence of oxygen-containing functional groups e.g. hydroxyl, carbonyl, ester and especially carboxyl groups on the aromatic ring (Korshin et al., 1997; Enev et al., 2018). In our study, the  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio values ranged from 0.50 to 0.54 (Table 3). These results suggest that the substitution of aromatic rings with polar functional groups was comparable for the vermicompost HAs. The  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio for HA isolated from raw horse manure was less than that for any vermicompost HAs. The frequently used  $E_4/E_6$  ratio (the ratio of absorbance at 465 nm to that at 665 nm) reflects the degree of aromaticity and the molecular weight of humic substances of different origins (Li et al., 2011). For the HAs studied, this ratio demonstrated less sensitivity (Table 3), because absorption in the 500–800 nm range was approximately zero. For this reason, it is appropriate to utilize the  $E_2/E_4$  ratio (the ratio of absorbance at 265 nm to that at 465 nm), as it is consistent with the  $E_4/E_6$ . In our study, the  $E_2/E_4$  ratio values ranged from 9.31 to 11.11 (Table 3). The  $E_2/E_4$  ratio for HAs isolated from raw horse manure was much less than those for vermicomposted HAs. The  $E_2/E_4$  values followed an upward waving trend with increased composting time. It is apparent from the data in Table 3 that non-humic substances (e.g. lignin, polysaccharides, and protein-like substances)

**Table 3**  
UV/Vis and FTIR calculated ratios.

Origin of HA	UV/Vis ratios			FTIR intensity ratios	
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_4/E_6$	$E_2/E_4$	$I_{Ar}/I_{Al}^a$	$I_{Ar}/I_{COOH}^b$
HARHM <sup>c</sup>	0.50 ± 0.00	7.77 ± 0.03	9.31 ± 0.14	1.10	1.08
HA5W <sup>d</sup>	0.52 ± 0.00	8.56 ± 0.13	9.62 ± 0.05	1.14	1.02
HA3 <sup>e</sup>	0.53 ± 0.00	8.66 ± 0.05	10.11 ± 0.31	1.14	1.01
HA6 <sup>f</sup>	0.52 ± 0.01	8.40 ± 0.38	9.87 ± 0.18	1.28	0.99
HA9 <sup>g</sup>	0.52 ± 0.01	8.69 ± 0.17	10.91 ± 0.24	1.30	0.99
HA12 <sup>h</sup>	0.54 ± 0.00	8.53 ± 0.40	11.11 ± 0.10	1.39	0.97

Values of UV/Vis ratios are means ± SD (n = 3).

<sup>a</sup> FTIR ratio calculated as ratio of intensity at 1510 cm<sup>-1</sup> to intensity at 2940 cm<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> FTIR ratio calculated as ratio of intensity at 1510 cm<sup>-1</sup> to intensity at 1420 cm<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> HA isolated from raw horse manure.

<sup>d</sup> HA isolated from vermicompost of average age 5 weeks.

<sup>e</sup> HA isolated from vermicompost of average age 3 months.

<sup>f</sup> HA isolated from vermicompost of average age 6 months.

<sup>g</sup> HA isolated from vermicompost of average age 9 months.

<sup>h</sup> HA isolated from vermicompost of average age 12 months.



were transformed into humic substances during vermicomposting, thus increasing the humification and stability of the vermicompost. This observation is in good agreement with published studies regarding HAs derived from composts (Li et al., 2017).

### 3.5. FTIR spectroscopy

The DRIFT spectra of HAs are shown in Fig. 2, and interpretation of their absorption bands was conducted according to the literature data (Stuart, 2004).

Table S4 shows overview of the main absorption bands which were identified in the FTIR spectra. All the spectra of vermicompost HAs contain a sharp and intensive band at  $1710\text{ cm}^{-1}$  corresponding to carboxylic groups, whereas it is absent in the sample isolated from raw horse manure. The carboxylic groups are also indicated by the broad band centered at about  $2640\text{ cm}^{-1}$  resulting from the O–H stretching vibrations of the hydrogen-bonded COOH which forms dimers. A band at about  $1420\text{ cm}^{-1}$ , preferentially ascribed to C–O–H in-plane bending of carboxylic groups, is apparent in all sample sets. The degree of carboxylic content was determined using the  $I_{Ar}/I_{COOH}$  ratio (the ratio of the intensity at  $1510\text{ cm}^{-1}$  to the intensity at  $1420\text{ cm}^{-1}$ ). The content of the carboxylic groups is greatest for the HA isolated from horse manure after 12 months of vermicomposting. Further, the content of COOH groups increases with the composting time. Another significant band occurring at  $1600\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to stretching C=C groups in aromatic rings, eventually C=O stretching of H-bonded conjugated ketones and quinones. This band was observed only as a weak shoulder in the spectrum of HA isolated from raw horse manure. Another aromatic band is apparent at  $1510\text{ cm}^{-1}$ , due to the aromatic C=C stretching of lignin residues, the relative inten-

sity of which decreases with the vermicomposting process. This is supported by the  $I_{Ar}/I_{Al}$  ratio (the ratio of the intensity at  $1510\text{ cm}^{-1}$  to the intensity at  $2940\text{ cm}^{-1}$ ), which was used to estimate the degree of aromaticity. The intensity ratio (Table 3) shows that the aromaticity of HAs increases during the vermicomposting process. These results are in good agreement with the elemental analysis (and H/C ratios) listed in Table 2. Two out-of-plane C–H deformation bands were observed in the  $850\text{--}760\text{ cm}^{-1}$  region and were assigned tri-substitution per ring ( $840\text{ cm}^{-1}$ ), and di-substitution per ring ( $768\text{ cm}^{-1}$ ). The first of these bands was observed as a sharp and intensive band in the all spectra, while the second of these bands was found as a weak band and/or shoulder. The broad band centered at about  $3310\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the O–H stretching of various functional groups, which are connected with an intermolecular hydrogen-bond. The appearance of aliphatic chains is observed in the  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  range. The presence of aliphatic groups is revealed by the band at  $2940\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to asymmetric C–H stretching in methylene groups. A band at about  $2850\text{ cm}^{-1}$ , attributed to symmetric C–H stretching of  $-\text{CH}_2-$  groups, is evident exclusively in HA isolated from raw horse manure. The deformation vibrations of the  $-\text{CH}_2-$  and  $-\text{CH}_3$  groups occur in the spectra at  $1454\text{ cm}^{-1}$ . All the spectra of HAs contain a sharp and intensive band at  $1662\text{ cm}^{-1}$  corresponding to secondary amide groups (amide II). Many authors consider the band at  $1660\text{ cm}^{-1}$  to be an indicator of protein-like substances (Calderón et al., 2011; Enev et al., 2018). The main differences among the spectra of HAs appear in the fingerprint regions  $1280\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  and  $1145\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ . The first region is characterized by a weak band and/or shoulder at  $1260\text{ cm}^{-1}$  and a relatively intense band at  $1230\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the C–O vibration in aryl ethers, and to the C–O stretching and O–H bending of phenols. In comparison with other samples, the HAs isolated from raw horse manure did not contain the vibration at  $1260\text{ cm}^{-1}$ . The relative intensity of this band increased with the vermicomposting time. The latter region is characterized by a sharp band at  $1130\text{ cm}^{-1}$  and a shoulder and/or weak band at  $1090\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the C–O–C vibration in various alkyl ethers, and to the C–O stretching of secondary alcohols. In the spectra of all samples, the band at  $1090\text{ cm}^{-1}$  gradually reduces with increasing vermicomposting time and its relative intensity decreases. The band at  $1037\text{ cm}^{-1}$  is dominant in the spectrum of HAs isolated from raw horse manure, mainly due to the large polysaccharide substance content. The other samples contain this band with a lesser intensity. Bands and shoulders at wavenumbers less than  $650\text{ cm}^{-1}$  are attributed to mineral matter such as kaolinite, from which bands at  $644\text{ cm}^{-1}$ ,  $536\text{ cm}^{-1}$  and  $500\text{ cm}^{-1}$  are the most obvious.

### 3.6. Fluorescence spectroscopy

The fluorescence spectra or EEM contour maps of the studied HAs (see Fig. 3) were not corrected for Rayleigh scattering peaks, which appear in the form diagonal bands.

The Rayleigh scattering corresponds to the line in the EEM spectra where excitation wavelength equals emission wavelength. The first observation from the EEM contour maps is that humic substances contain fluorophores which are responsible in the fluorescence of composted and/or vermicomposted organic materials (Benítez et al., 2000; Mobed et al., 1996; Xing et al., 2012). The excitation-emission wavelength pairs of the main peaks in the EEM spectra and their fluorescence intensity values from our sample set are listed in Table 4.

The maxima are located at excitation wavelengths in the ultra-violet region (e.g. UVA, UVB, and UVC region) in the  $250\text{--}390\text{ nm}$  range and at emission wavelengths in the  $340\text{--}480\text{ nm}$  range. Several fluorophores have been reported previously in the literature,

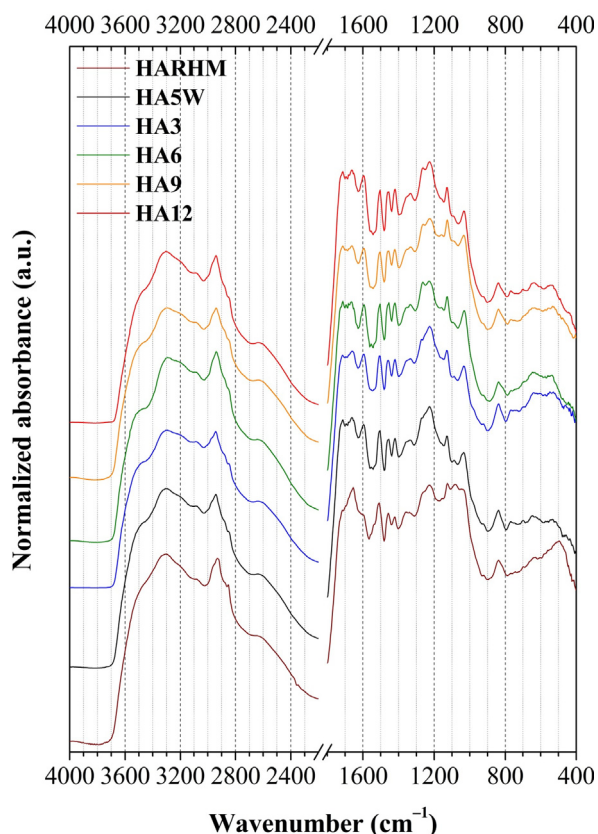
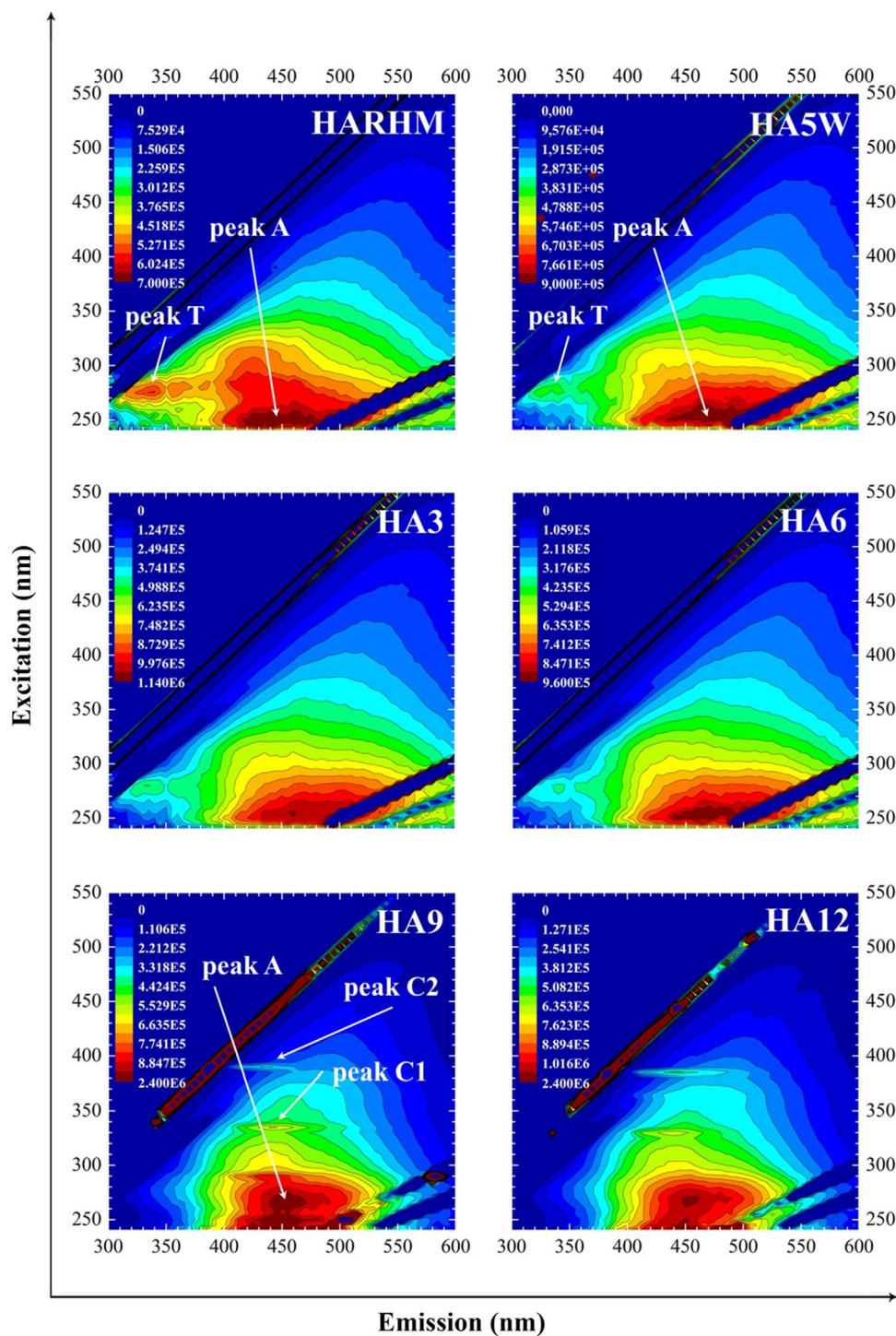


Fig. 2. DRIFT spectra of HAs isolated from raw horse manure and vermicomposts of different ages.





**Fig. 3.** EEM spectra of HAs isolated from raw horse manure and vermicomposts of different ages. Individual fluorophores of the HAs samples are marked with the corresponding symbols (A, T, C1, C2) and arrows.

such as peak A at 240–280/400–500 nm (excitation/emission wavelengths pair), peak C at 300–380/400–500 nm, peak M at 290–310/370–410 nm, peak B at 270–280/300–315 nm, and peak T at 270–280/345–360 nm (Coble 1996; Birdwell and Engel, 2010). Non-humic fluorophores indicative of biological activity and/or protein-like material include tyrosine-like peaks and tryptophan-like peaks (Birdwell and Engel, 2010). From the domains described (Fig. 3) the fluorescence of raw horse manure and vermicomposted materials lies primarily in the peak A region,

which is characteristic of humic substances. However, there are maxima having excitation wavelengths greater than 400 nm (including those for terrestrial HAs). The fluorescence region (400–480/460–550 nm), referred to as V (Alberts and Takács 2004; Rodríguez et al., 2013; Enev et al., 2014), usually occurs in coal and/or soil HAs, and was not determined in the spectra from our samples. The absence of the peak V in the examined samples can be explained by the lesser average age of the vermicomposts, which did not exceed one year. The characteristic C domains (des-

**Table 4**  
Positions of excitation–emission wavelength pairs for fluorescence peaks and values of fluorescence intensities for HAs isolated from raw horse manure and different vermicomposts.

Origin of HA	Fluorescence peak region							
	A		C				T	
			C1		C2			
	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>a</sup>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>a</sup>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>a</sup>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sup>a</sup>
HARHM <sup>b</sup>	250/460	0.70					275/335	0.55
HA5W <sup>c</sup>	255/480	0.84					275/340	0.40
HA3 <sup>d</sup>	250/475	1.01					280/335	0.50
HA6 <sup>e</sup>	250/460	0.94					275/340	0.40
HA9 <sup>f</sup>	250/445	1.06	335/440	0.61	390/435	0.35		
HA12 <sup>g</sup>	270/450	1.10	330/440	0.68	385/440	0.52		

<sup>a</sup>  $I_F \times 10^6$  CPS (counts per second) of fluorescence peaks.

<sup>b</sup> HA isolated from raw horse manure.

<sup>c</sup> HA isolated from vermicompost of average age 5 weeks.

<sup>d</sup> HA isolated from vermicompost of average age 3 months.

<sup>e</sup> HA isolated from vermicompost of average age 6 months.

<sup>f</sup> HA isolated from vermicompost of average age 9 months.

<sup>g</sup> HA isolated from vermicompost of average age 12 months.

ignated as humic-like fluorophores) for humic substances originating from soils, peats, lakes, and rivers, with fluorescence maxima corresponding to excitation/emission wavelength pairs of 300–380/400–500 nm, were observed in HAs after 9 and 12 months of the vermicomposting process. Because HA9 and HA12 have a greater contribution from fluorophores C compared to humic substances originating from soils and peats, we chose the designation C1 and C2 and for all maxima located in this region. Peaks C1 and C2 (330–335/440 nm and 385–390/435–440), which occur only in HAs after 9 and 12 months of the vermicomposting process, exhibited the greatest excitation wavelength of all the EEM spectra and a lesser fluorescence intensity than the peaks in region A. We conclude that the maximum position is probably related to single aromatic systems and substituents. Some authors (Sierra et al., 2005; Rodríguez et al., 2013) have suggested that the C domain can be attributed to the presence of hydroxybenzoic acids and other substituted phenolic units originating from lignin, hydroxycoumarin-like structures, xanthone and/or quinoline derivatives which originated from degraded plant materials. According to previous studies, peak C may be interpreted such as fluorophores from autochthonous microbial processes (McKnight et al., 2001). The comparison of EEM spectra of HAs from vermicompost and HA-like fractions (HAL) from vermicomposted winery and distillery wastes (Romero et al., 2007) suggests that HAL fractions may also participate in the fluorescence of HAs in the C region. Moreover, the presence of peaks with an emission wavelength greater than 470 nm is in agreement with previous studies which suggest such maxima originate from intramolecular charge-transfer states, rather than from independent fluorophore families in humic substances (Boyle et al., 2009). This assumption is consistent with the values of the absorption coefficients  $E_{ET}/E_{Bz}$  and  $I_{Ar}/I_{COOH}$  obtained from the spectrometry experiments. It indicated that the time of the composting process could increase the content of humic-like materials in the HAs from the vermicomposting product. For most of the HAs (HA isolated from raw horse manure and HAs extracted from vermicomposts younger than 9 months), typical maxima lie within the T region and are thus restricted to wavelengths in the 275–280/335–340 nm range, suggesting they all have similar structures and components. According to this T domain, protein-like compounds were decomposed during the first nine months of vermicomposting (Fig. 3). In contrast, the fulvic-like compounds increased slightly during the vermicomposting process. The location of the C1 and C2 domains were independent of the excitation and emission wavelengths without any trend with respect to the composting time. Compared with the T domain loca-

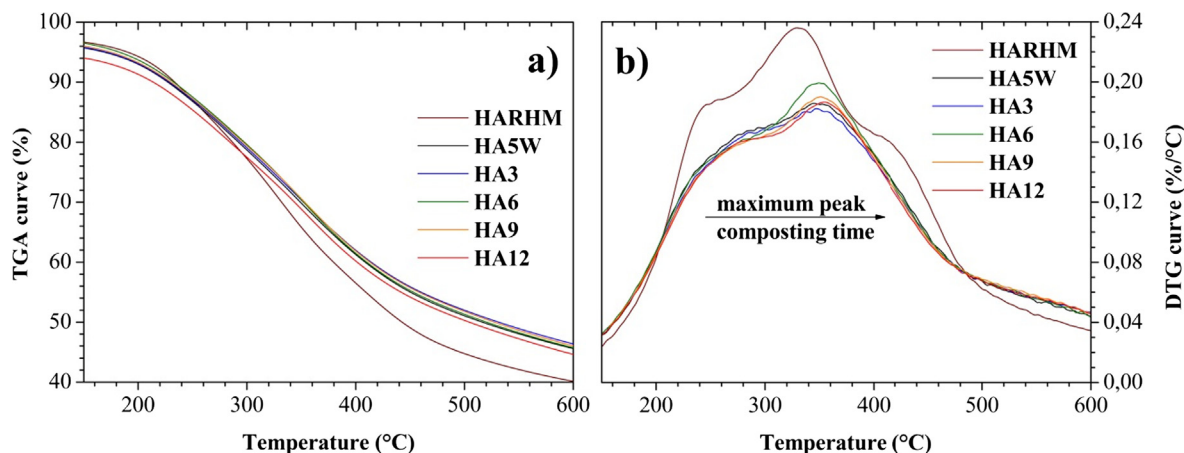
tion of protein-like compounds (peaks T at 276–281/340–370 nm) (Baker, 2001; Lannan et al., 2013), the locations of tryptophan-like peaks of the HA samples all showed a blue shift in terms of emission wavelengths. Fluorophore families at the intermediate excitation wavelengths (250–280 nm) and shorter emission wavelengths (<380 nm) are related to soluble microbial by-product-like materials (Coble, 1996). Protein-like fluorophores were found to occur at enhanced levels in compost originating from municipal solid waste (MSW), sewage sludge (SS), and/or wastewater (WW) (Benítez et al., 2000; Wei et al., 2007; Pan et al., 2018). Further, the tryptophan-like compound may have originated by different manners where tryptophan is present as ‘free’ molecules or bound in proteins and/or humic substances (Wang et al., 2014).

Using the differences in the location of peaks (fluorophores) and fluorescence intensity, various structural units in the humic substances can be elucidated. At nearly the same excitation wavelength, some peaks in region A, fluorophores which correspond to the fulvic-like compounds, shift toward a lesser emission wavelength, while the fluorescence intensity increases. The shorter emission wavelengths and greater fluorescence intensity measured in the EEM spectra can be associated with simple aromatic structures and low average molecular weight components. In contrast, the longer emission wavelengths can indicate the presence of condensed aromatic rings and electron-withdrawing functional groups such as carbonyl-containing substituents, and hydroxyl and alkoxy groups. It is well known that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) fluoresce at emission wavelengths from 400 to 500 nm when subjected to excitation at 250–380 nm. Hence, the emission wavelengths ranging from 340 to <430 nm could be associated with three-ring and/or four-ring aromatic structures (Doskočil et al., 2018). The PAHs with four or more aromatic ring per fluorophore emit light in the 400–500 nm wavelengths range.

### 3.7. Thermogravimetric analysis

Subsequently, all the studied HAs were subjected to detailed thermogravimetric analysis. The respective thermograms (TGA and DTG) are shown in Fig. 4. It can be clearly seen that the weight of all the HAs samples drops in a stepwise manner.

TGA curves separated into two main groups. The first group contained only one member – the humic acid isolated from the original manure, whereas all composted HAs were concentrated in the second group. More detailed information can be seen in the DTG curves (Fig. 4b). The DTG curve for the HA isolated from original manure indicates three principal weight-loss steps are located around 240,



**Fig. 4.** Thermogravimetric analyses (a) TGA; (b) DTG and results for HAs isolated from raw horse manure (wine curve), vermicompost of average ages 5 weeks (black curve), vermicompost of average ages 3 months (blue curve), vermicompost of average ages 6 months (green curve), vermicompost of average ages 9 months (orange curve), and vermicompost of average ages 12 months (red curve). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

330, and 410 °C. The second step represents the largest weight-loss step and will be called the main peak; in fact, its dominating shape distorted the other two peaks in shoulders. The DTG curves obtained for HAs isolated from vermicomposts also demonstrate the first two peaks, while the last peak practically disappeared. Moreover, the temperatures of the peak maxima were shifted to higher temperatures when compared with the DTG record of the HA extracted from original manure. The differences among the vermicomposted HAs are not significant. The differences among the HAs isolated from various vermicomposts are not significant. The shifts indicate that the corresponding compounds in HAs obtained from vermicomposts are of greater thermal stability than in the HA isolated from the original manure. In other words, the most thermally labile components seemed to be consumed during the composting process. On contrary, the disappearance of the third peak points to the degradation of the most stable thermal fractions.

The thermal behaviour of organic matter from natural compost with recycled compost in this study was somewhat different from the behaviour reported for composts prepared from agricultural wastes where only two peaks in the 200–600 °C range were reported (Dell'Abate et al., 2000). Three peaks are reported for some types of soil HAs or soil organic matter (Capel et al., 2005; Montecchio et al., 2006). The overlapping character of our TG records points to the continuous complex mixture without components of sharply different thermal stability. The first peak (shoulder) is attributable to the loss of organic volatiles and decomposition of the least stable fractions (e.g., decarboxylation of organic acids); loss of residual (bound) moisture also cannot be excluded. The main degradation is produced by the combustion of polysaccharides or aliphatic compounds (Montecchio et al., 2006). The last peak (shoulder) could be attributable to the decomposition of aromatic moieties. Because it was not distinct in the HAs isolated from vermicomposts it could also represent original polymers depolymerized during the composting process into less stable oligomers or monomers. Further, it can be hypothesized that the shoulder disappearance is due to the release of (labile) organics from the organo-mineral fractions by the action of agents released by decomposing microorganisms. In any case, it is seen that the most thermally stable fraction disappears during the first stages of the composting process.

#### 4. Conclusion

In this study, advanced spectroscopic techniques and thermogravimetric analysis combined with the routine measurements of chemical indicators such as the content of biogenic elements, C/N

ratio,  $\text{N-NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  ratio, DOC, and ion exchange capacity brought new information on manure vermicomposting in a real-field continuous-feeding system, and enabled the complex characterization of HAs isolated from original horse manure and vermicomposts of different ages. Fluorescence spectroscopy (TLS) is a relatively simple and effective technique to study the maturity and stability of the produced vermicompost.

Horse manure vermicomposting resulted, over time, in an increase in pH, IEC,  $\text{IEC}/C_{\text{tot}}$ ,  $\text{N}_{\text{tot}}$ ,  $\text{P}_{\text{tot}}$ ,  $\text{K}_{\text{tot}}$ ,  $\text{Mg}_{\text{tot}}$ ,  $\text{K}_{\text{avail}}$  and a decrease in dry matter, volatile solids, C/N ratio,  $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ , DOC,  $\text{P}_{\text{avail}}$ ,  $\text{Mg}_{\text{avail}}$ , number and earthworm biomass, and microbial biomass including fungi and bacteria. Thus, the maturity of the vermicompost improved.

The results suggest that vermicomposting decreased the aliphatic, protein-like, and polysaccharide humic components, whereas vermicomposting increased the aromaticity and contents of oxygen-containing functional groups (e.g. carboxylic, phenolic, and etheric groups in the HAs). The typical tryptophan-like fluorophores lie within the T region (275/335 nm), which can be ascribed to the freshly produced organic matter of biological or microbial origin. This non-humic component was progressively transformed to humic-like fluorophores during vermicomposting. Humic-like fractions with Ex/Em wavelength pairs of 330–335/400 nm and 385–390/435–440 nm were observed after nine months of vermicomposting. These fluorophores lie in the EEM C region, which implies that the components are of the same form, or from very similar fluorophore families. Fulvic-like fluorophores were observed in the EEM spectra of HAs throughout the vermicomposting period. EEM spectra are comparable to fingerprints for HAs during the vermicomposting, and they can be regarded as indicators to assess the maturity of vermicomposts.

Spectroscopic characterization is a useful and relatively quick way of obtaining new knowledge on vermicomposting of manure in a real-field continuous-feeding system.

#### Acknowledgement

The authors would like to thank Ladislav Palecek and his wife for experiment maintenance and Christina Baker Starrman for revision of the English text.

#### Funding

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic [grant number QK1910095]; and the Ministry of



Education, Youth, and Sports [grant numbers LO1211, and SV19-02-21140].

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.08.032>.

## References

- Alberts, J.J., Takács, M., 2004. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Org. Geochem.* 35, 243–256.
- Albrecht, R., Verrecchia, E., Pfeifer, H.R., 2015. The use of solid-phase fluorescence spectroscopy in the characterization of organic matter transformations. *Talanta* 134, 453–459.
- Al-Faiyz, Y.S.S., 2017. CPMAS<sup>13</sup>C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arab. J. Chem.* 10, S839–S853.
- Amir, S., Jouraiphy, A., Meddich, A., Gharous, M. El, Winterton, P., Hafidi, M., 2010. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR. *J. Hazard. Mater.* 177, 524–529.
- Asakawa, D., Imura, Y., Kiyota, T., Yanagi, Y., Fujitake, N., 2011. Molecular size fractionation of soil humic acids using preparative high performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 6448–6453.
- Baker, A., 2001. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environ. Sci. Technol.* 35, 948–953.
- Benítez, E., Nogales, R., Masciandaro, G., Ceccanti, B., 2000. Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm (*Eisenia foetida*)-processed sewage sludges. *Biol. Fertil. Soils* 31, 489–493.
- Bernal, M.P., Alburquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100, 5444–5453.
- Birdwell, J.E., Engel, A.S., 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.* 41, 270–280.
- Boyle, E.S., Guerriero, N., Thiallet, A., Vecchio, R.D., Blough, N.V., 2009. Optical properties of humic substances and CDOM: Relation to structure. *Environ. Sci.* 43, 2262–2268.
- Calderón, F.J., Mikha, M.M., Merle, F.V., Nielsen, D.C., Benjamin, J.G., Reeves III, J.B., 2011. Diffuse-reflectance mid-infrared spectral properties of soils under alternative crop rotations in a semi-arid climate. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 42, 2143–2159.
- Capel, E.L., Sohi, S.P., Gaunt, J.L., Manning, D.A.C., 2005. Use of thermogravimetry-differential scanning calorimetry to characterize modelable soil organic matter fractions soil. *Sci. Soc. Am. J.* 69, 136–140.
- Castkova, T., Hanc, A., 2019. Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding. *Waste Manage. Res.* <https://doi.org/10.1177/0734242X18819276>.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325–346.
- Coble, P.G., Lead, J., Baker, A., Reynolds, D.M., Spencer, R.G.M., 2014. *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge University Press, New York.
- Dell'Abate, M.T., Benedetti, A., Sequi, P., 2000. Thermal methods of organic matter maturation monitoring during a composting process. *J. Therm. Anal. Calorim.* 61, 389–396.
- Domínguez, J., Gómez-Brandón, M., Martínez-Cordeiro, H., Lores, M., 2018. Bioconversion of Scotch broom into a high quality organic fertiliser: vermicomposting as sustainable option. *Waste Manage. Res.* <https://doi.org/10.1177/0734242X18797176>.
- Doskočil, L., Burdíkova-Szewieczkova, J., Enev, V., Kalina, L., Wasserbauer, J., 2018. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel* 213, 123–132.
- Droussi, Z., ÓRazio, V., Hafidi, M., Ouattmane, A., 2009. Elemental and spectroscopic characterization of humic-acid-like compounds during composting of olive mill by-products. *J. Hazard. Mater.* 163, 1289–1297.
- Enev, V., Doskočil, L., Kubíková, L., Klučáková, M., 2018. The medium-term effect of natural compost on the spectroscopic properties of humic acids of Czech soils. *J. Agric. Sci.* 156, 877–887.
- EN 13037 Soils improvers and growing media – Determination of pH 1999 CEN Brussels
- EN 13651, Soil improvers and growing media – extraction of calcium chloride/DTPA (CAT) soluble nutrients, 2001.
- Enev, V., Pospíšilová, L., Klučáková, M., Liptaj, T., Doskočil, L., 2014. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil Water Res.* 9, 9–17.
- Ephraim, J.H., Pettersson, C., Norden, M., Allard, B., 1995. Potentiometric titrations of humic substances: Do ionic strength effects depend on the molecular weight? *Environ. Sci. Technol.* 29, 622–628.
- FAOSTAT, 2018. <<http://faostat.fao.org/>> (cit. 2018-10-13).
- Garg, V.K., Chand, S., Chhillar, A., Yadav, A., 2005. Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. *Appl. Ecol. Env. Res.* 3, 51–59.
- Gieguzynska, E., Kocmit, A., Gołębiewska, D., 1998. Studies on humic acids in eroded soils of Western Pomerania. In: Zaujec, A., Bielek, P., Gonet, S.S. (Eds.), *Slovak Agricultural University, Nitra*.
- Hadin, A., Eriksson, E., Hillman, K., 2016. A review of potential critical factors in horse keeping for anaerobic digestion of horse manure. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 65, 432–442.
- Hanc, A., Castkova, T., Kuzel, S., 2019. Vermicomposting of distillery residues in a vertical-flow windrow system. *Waste Biomass. Valor.* <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00671-4>.
- Hanc, A., Castkova, T., Kuzel, S., Cajthaml, T., 2017. Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system. *Waste Manage. Res.* 35, 1121–1128.
- Hanc, A., Chadimova, Z., 2014. Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology. *Bioresour. Technol.* 168, 240–244.
- He, Z., Pagliari, P., Waldrip, H.M., 2016. Applied and environmental chemistry of animal manure: a review. *Pedosphere* 26, 779–816.
- Hooda, P.S., Edwards, A.C., Anderson, H.A., Miller, A., 2000. A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Sci. Total Environ.* 250, 143–167.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., 1990. Humic substances formed during the composting of organic matter. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 53, 1316–1323.
- Jeong, K., Kim, J.K., Ravindran, B., Lee, D.J., Wong, J.W., Selvam, A., Karthikeyan, O.P., Kwag, J., 2017. Evaluation of pilot-scale in-vessel composting for Hanwoo manure management. *Bioresour. Technol.* 245, 201–206.
- Korshin, G.V., Li, C.-V., Benjamin, M.M., 1997. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Res.* 31, 1787–1795.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Baltimore.
- Lannan, A.P., Erich, M.S., Ohno, T., 2013. Compost feedstock and maturity level affect soil response to amendment. *Biol. Fert. Soil* 3, 273–285.
- Leytem, A.B., Dungan, R.S., Bjorneberg, D.L., Koehn, A.C., 2011. Emissions of ammonia, methane, carbon dioxide, and nitrous oxide from dairy cattle housing and manure. *J. Environ. Qual.* 40, 1383–1394.
- Li, Q., Lu, Y., Guo, X., Shan, G., Huang, J., 2017. Properties and evolution of dissolved organic matter during co-composting of dairy manure and Chinese herbal residues. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 8629–8636.
- Li, X., Xing, M., Yang, J., Huang, Z., 2011. Compositional and functional features of humic acid-like fractions from vermicomposting of sewage sludge and cow dung. *J. Hazard. Mater.* 185, 740–748.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46, 38–48.
- Mobed, J.J., Hemmingsen, S.L., Autry, J.L., McGown, L.B., 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3061–3065.
- Montecchio, D., Francioso, O., Carletti, P., Pizzeghello, D., Chersich, S., Previtali, F., Nardi, S., 2006. Thermal analysis (TG-DTA) and drift spectroscopy applied to investigate the evolution of humic acids in forest soil at different vegetation stages. *J. Therm. Anal. Calorim.* 83, 393–399.
- Moral, R., Moreno-Caselles, J., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Rufete, B., Paredes, C., 2005. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresour. Technol.* 96, 153–158.
- Negi, R., Suthar, S., 2018. Degradation of paper mill wastewater sludge and cow dung by brown-rot fungi *Oligoporus placenta* and earthworm (*Eisenia fetida*) during vermicomposting. *J. Clean. Prod.* 201, 842–852.
- Novák, F., Šestauerová, M., Hrabal, R., 2015. Structural features of lignohumic acids. *J. Mol. Struct.* 1093, 179–185.
- Ohno, T., He, Z., 2011. Fluorescence spectroscopic analysis of organic matter fractions: the current status and a tutorial case study. In: He, Z. (Ed.), *Environmental Chemistry of Animal Manure*. Nova Science Publishers, New York, pp. 83–103.
- Pan, H., Yu, H., Wang, Y., Lei, H., 2018. Investigating variations of fluorescent dissolved organic matter in wastewater treatment using synchronous fluorescence spectroscopy combined with principal component analysis and two-dimensional correlation. *Environ. Technol.* 39, 2495–2502.
- Peev, B., Tashva, Y., Christova-Bagdassarian, V., Ahamad, M.A., 2017. Introduction to various indicators for quality evaluation of the end product from composting process: a review. *Eur. J. Chem. Environ. Eng. Sci.* 1 (1), 1–6.
- Rodríguez, F.J., Schlenger, P., García-Valverde, M., 2013. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. *Sci. Total Environ.* 476–477, 718–730.
- Romero, E., Plaza, C., Senesi, N., Nogales, R., Polo, A., 2007. Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma* 139, 397–406.
- Senesi, N., 1989. Composted materials as organic fertilizers. *Sci. Total Environ.* 81–82, 521–542.
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J., 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58, 715–733.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons Inc, New York, p. 497. ISBN: 0-471-59474-1.
- Stuart, B.H., 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Swift, R.S., 1996. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H. (Eds.), *Methods of Soil Analysis Part 3 Chemical Methods*. Inc., Madison, pp. 1011–1069.

- Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petránková, M., Spetz, P., Leppänen, K., Baldrian, P., 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes the microbial community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 291–303.
- Váchalová, R., Borová-Batt, J., Kolář, L., Váchal, J., 2014. Selectivity of ion exchange as a sign of soil quality. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 2673–2679.
- Wang, K., Li, X., He, C., Chen, C.-L., Bai, J., Ren, N., Wang, J.-Y., 2014. Transformation of dissolved organic matters in swine, cow and chicken manures during composting. *Bioresour. Technol.* 168, 222–228.
- Wei, Z., Xi, B., Zhao, Y., Wang, S., Liu, H., Jiang, Y., 2007. Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere.* 68, 368–374.
- Wichuk, K.M., McCartney, D., 2010. Compost stability and maturity evaluation - a literature review. *Can. J. Civil Eng.* 37, 1505–1523.
- Wu, H., Zhao, Y., Long, Y., Zhu, Y., Wang, H., Lu, W., 2011. Evaluation of the biological stability of waste during landfill stabilization by thermogravimetric analysis and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 102, 9403–9408.
- Wu, H., Zhou, Z., Zhang, Y., Chen, T., Wang, H., Wenjing, L., 2009. Fluorescence-based rapid assessment of the biological stability of landfilled municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 110, 174–183.
- Xing, M., Li, X., Yang, J., Huang, Z., Lu, Y., 2012. Changes in the chemical characteristics of water-extracted organic matter from vermicomposting of sewage sludge and cow dung. *J. Hazard. Mater.* 205–206, 24–31.
- Yuan, Y., Xi, B., He, X., Tan, W., Gao, R., Zhang, H., Yang, C., Zhao, X., Huang, C., Li, D., 2017. Compost-derived humic acids as regulators for reductive degradation of nitrobenzene. *J. Hazard. Mater.* 339, 378–384.
- Zhang, J., Lv, B., Xing, M., Yang, J., 2015. Tracking the composition and transformation of humic and fulvic acids during vermicomposting of sewage sludge by elemental analysis and fluorescence excitation-emission matrix. *Waste Manag.* 39, 111–118.



Jednou z možných cest jak významně urychlit primární fázi kompostování a následnou stabilizaci vloženého biologicky rozložitelného odpadu (BRO) je využití specifických druhů rozkladačů, kam zpravidla řadíme určité zástupce dekompozičních mikroorganismů termofilního typu (bakterie rodu *Thermus* a *Bacillus sp.*) anebo bezobratlé živočichy řádu Haplotaxida (např. *Eisenia andrei*). Pokud jsou při zakládání kompostu a jeho následném kompostování využívány žížaly, tak v této souvislosti mluvíme o tzv. *vermikompostování*. Na tomto místě je nutné podotknout, že dostatečně nevyzrálý a málo stabilizovaný kompost může způsobovat mnoho environmentálních problémů či rizik. Jedná se především o výraznou mobilitu fosforu a dusíku, které mohou být velmi lehce vyluhovány do půdního prostředí, pokud je takto nestabilní kompost použit jako přírodní hnojivo. Toto tvrzení nabývá na váze, kdy je jako výchozí surovina použita chlévská mrva anebo statkový hnůj s výrazným podílem močůvky. Je nadmíru jasné, že v těchto případech je nejen ohrožen, půdní ekosystém, ale i rozsáhlé zdroje podzemních vod. Dalším faktorem negativně ovlivňujícím růst rostlin je pokračující dekompozice ne zcela rozloženého kompostu, v důsledku čehož je velmi rychle spotřebováván kyslík, jehož insuficience primárně nahrává vzniku fyto toxických látek. Použití nezralých kompostů má velmi často za následek kolonizaci půdního prostředí patogenními mikroorganismy, které mohou vlivem dešťových srážek kontaminovat zdroje podzemních a artézských vod. Tyto komposty rovněž obsahují vysoké hladiny amoniakálního dusíku, organických kyselin a méně rozpustných sloučenin, které snižují klíčení semen a růst kořenového systému rostlin. Naproti tomu, vyzrálé a stabilní komposty jsou cennými zdroji nejen huminových látek (HL) a lehce hydrolyzovatelných organických sloučenin (DOM), ale i rozsáhlé skupiny výživových prvků tzn. draslík, fosfor, hořčík, atd.

Hlavním backgroundem odborného článku s názvem: „Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure“ bylo komplexní zhodnocení procesu vermikompostování, a to na základě podrobného studia a charakterizace HK, jejichž geneze a kvalitativní vlastnosti byly sledovány po celou dobu kompostovacího procesu. Za tímto účelem byly použity přístupy vycházející nejen z teoretické a fyzikální chemie, ale i ty, které v sobě nesou aspekty biologické a mikrobiologické analýzy.

Hlavním metodickým přístupem této studie bylo ověřit, zda jsme schopni nalézt nějaký specifický ukazatel tzn. marker, na jehož základě bychom byli schopni jednoznačně určit okamžik, kdy již vermikompostovaný materiál nepředstavuje environmentální a toxické riziko, a to z hlediska jeho následného použití jako „zeleného“ hnojiva. Obecně, organická hmota kompostovaného anebo vermikompostovaného BRO obsahuje celou řadu organických sloučenin, které se nacházejí v určitých fázích chemické přeměny, a tudíž by bylo takřka nemožné studovat tento složitý chemický systém v jeho nativní podobě. Naproti tomu, je velmi dobře známo, že v průběhu dekompozice OM jsou z jednotlivých stavebních jednotek, které již prošly určitou fází přeměny „syntetizovány“ stabilní frakce OM, kam zpravidla řadíme huminové látky, lépe řečeno HK. Z toho vyplývá, že právě tyto biokoloidní sloučeniny se zdají být vhodnými indikátory jakosti resp. zralosti kompostů a vermikompostů. Další neocenitelná výhoda těchto sloučenin spočívá v tom, že jsme schopni tyto biokoloidní látky poměrně velmi

lehce izolovat z původní matrice, aniž bychom se dopustili jejich významné kontaminace ostatními organickými sloučeninami přítomnými v původní matrici OM.

Za účelem studia a kvalitativní charakterizace těchto biokoloidních sloučenin byly vybrány jak termické a spektrometrické instrumentální techniky, tak i metody mikrobiologické analýzy.

Extrakční výtěžky HK jasně poukazují na velmi rychlou dynamiku jejich geneze v průběhu vermikompostování koňského hnoje, jelikož již v prvotní fázi kompostování tzn. po pěti týdnech se jejich obsah zvýšil takřka dvojnásobně. Nicméně si můžeme povšimnout, že tento trend byl v dalších fázích vermikompostovacího procesu nahrazen jistým zlomem, od kterého se obsah HK zvyšoval jen velmi pozvolna anebo zůstával takřka neměnný tj. stáří kompostu 6–12 měsíců. Lze jasně doložit, že právě od této doby se HK stávají spíše strukturně stabilnějšími resp. jejich molekulární morfologie je významně pozměňována chemickými procesy, jako jsou *kondenzace*, *demethylace* a *oxidace*.

Tyto výsledky jsou ve velmi dobré shodě se závěry vyplývajících z infračervené spektrometrie (DRIFT), kdy jako hodnotící kritéria byly použity absorpční poměry vypovídající o aromaticitě/alifaticitě a relativním obsahu karboxylových funkčních skupin, kterými jsou aromatická jádra HK substituována. V celkovém pohledu na získané výsledky lze konstatovat, že v průběhu kompostování dochází u vzniklých HK k evidentnímu nárůstu aromaticity a obsahu reaktivních –COOH funkčních skupin. Avšak poměrně zajímavým zjištěním v této studii bylo, že v průběhu vermikompostovacího procesu dochází i k postupnému snížení střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_r$  izolovaných HK. Jistou přitažlivost tohoto zjištění můžeme vidět zejména v tom, že v případě geneze přírodních HK, ať už jsou izolovány ze sedimentů, rašeliny, půdy (přírodních ekosystémů) se s jejich postupným stářím zvyšuje i jejich molekulová hmotnost. Tento fenomén lze jednoduše vysvětlit tím, že „čerstvé“ HK izolované z vermikompostu obsahují doposud ne zcela degradované biopolymerní sloučeniny, jako je lignin, celulóza, bílkoviny atd. viz např. absorpční pásy odpovídající sekundárním amidům, ligninu a v poslední řadě i polysacharidům.

Jak se ukázalo, tak k signifikantnímu posouzení zralosti vermikompostu lze bez jakýchkoliv pochybností použít instrumentální techniku fluorescenční spektrometrie resp. měření excitačně-emisních spekter (EEM). Jako indikátory zralosti a stability (vermi)kompostů lze použít specifické fluorescenční domény, které jsou tradičně rozděleny na dvě skupiny, a to na: (i) huminové fluorofory a (ii) ne-huminové fluorofory, které odpovídají bílkovinným sloučeninám a polypeptidovým fragmentům. V EEM spektrech HK průměrného stáří 1–6 měsíců byly identifikovány fluorescenční domény T ( $\delta$ ) – *tryptofan-like*, které byly lokalizovány takřka při stejných vlnových délkách excitace a emise tzn. 275–280/335–340 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Naproti tomu, vzorky HK, které byly izolovány z vermikompostů starších jak 6 měsíců, byly od těchto ne-huminových fluoroforů prosté, avšak v jejich EEM spektrech byly spatřeny dvě nové fluorescenční domény. Blíže se jednalo o fluorofory, které lze dle zavedené klasifikace specifikovat jako C ( $\alpha$ ) – *humic-like*, jejichž přesná pozice v EEM spektrech byla dána následujícími vlnovými délkami: (i) C<sub>1</sub> ( $\alpha_1$ ): 330–335/440 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) a (ii) C<sub>2</sub> ( $\alpha_2$ ): 385–390/445–440 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ).

Jelikož se tzv. ne-huminové fluorofory mohou obvykle vyskytovat i v HL a DOM značného stáří a k tomu odpovídající stabilitě, tak jako vhodný marker k posouzení stability a z ní vycházejícího kritéria environmentálního rizika či fytotoxicity byla určena přítomnost *humic-like* fluoroforů ve sledovaných EEM spektrech. Jinými slovy, výše zmíněné fluorescenční domény lze s jistou výhodou použít k posouzení zralosti vermikompostů, a možná, i obecně průmyslově kompostovaných BRO, při jejichž dekompozici nebylo použito specifických rozkladačů, jako jsou kalifornské žížaly.

Na základě mikrobiologické analýzy (populace hub, bakterií, aktinomycet, gram-pozitivních a gram-negativních bakterií) bylo zjištěno, že nejvyšší výskyt těchto rozkladačů byl v nejmladší vrstvě vermikompostu tzn. stáří 5 týdnů. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě, kdy byly v jednotlivých vrstvách vermikompostu počítány přítomní jedinci *Eisenia andrei*. Jednotlivé populace těchto rozkladačů se kvantitativně snižovaly ve směru od nejmladší vrstvy, až po tu nejstarší tzn. stáří 1 roku.

# How the Supramolecular Nature of Lignohumate Affects Its Diffusion in Agarose Hydrogel

Martina Klučáková, Michal Kalina, **Vojtěch Enev**

*Molecules*, **2020**, *25*, 1–13.

Impact factor (2020): 4,411

JCR Category: Biochemistry & Molecular Biology-Scie – Q1

Article

# How the Supramolecular Nature of Lignohumate Affects Its Diffusion in Agarose Hydrogel

Martina Klučáková \* , Michal Kalina  and Vojtěch Enev 

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118/464, 612 00 Brno, Czech Republic; kalina-m@fch.vutbr.cz (M.K.); enev@fch.vutbr.cz (V.E.)

\* Correspondence: klucakova@fch.vutbr.cz; Tel.: +42-054-114-9410

Academic Editor: Hiroyasu Yamaguchi

Received: 16 October 2020; Accepted: 8 December 2020; Published: 10 December 2020



**Abstract:** Lignohumate, as an industrially produced analog of natural humic substances, is studied from the point of view of its diffusion properties. This work focuses on its permeation ability, important in agricultural and horticultural applications, connected with its penetration into plant organs as leaves and roots. The hydrogel based on agarose was used as a model material for the diffusion of lignohumate. Two types of experiments were realized: the diffusion of lignohumate in the hydrogel diffusion couple and the diffusion of lignohumate from its solution into hydrogel. The diffusion coefficient of lignohumate in the hydrogel was determined and used for the modelling of the time development of concentration profiles. It was found that the model agrees with experimental data for short times but an accumulation of lignohumate in front of the interface between donor and acceptor hydrogels was observed after several days. The particle size distribution of lignohumate and changes in the  $E_4/E_6$  ratio used as an indicator of molecular weight of humic substances were determined. The results showed that the supramolecular structure of lignohumate can react sensitively to actual changes in its environs and thus affect their mobility and permeability into different materials. A filtration effect at the interface can be observed as an accompanying phenomenon of the re-arrangement in the lignohumate secondary structure.

**Keywords:** lignohumate; supramolecular nature; diffusion; spreading; hydrogel

## 1. Introduction

Lignohumate is an industrially produced analog of natural humic substances, produced by thermal processing of technical lignosulfonate, which is based on the oxidation and hydrolytic destruction of lignin-containing raw material [1,2]. It can promote plant growth and therefore it is widely used for agricultural and horticultural purposes [2–8]. It was found that its application can reduce leaching of nitrogen into the soil solution [2], reduce the toxic effect of pesticides, improve the nitrogen balance of soils, increase the basal respiration of the soil, and has a positive effect on soil biological activity [9].

Lignohumate together with other humic and humic-like substances has a complex conformational arrangement and can be perceived as supramolecular structures, the functioning of which is determined by the composition, size of molecular units, and weak intermolecular forces [10]. A major aspect of the supramolecular arrangement is its stabilization by weak dispersion forces, where hydrophobic and hydrogen bonds are responsible for their apparent large molecular size [11]. In solutions, humic and humic-like substances can be micelle-like, supra-molecular assemblies of small entities and their secondary structure can change significantly with changing concentration and pH [12–21]. In soils, humic substances are spatially arranged in decreasing order of polarity. This means that highly polar supramolecular subunits shield less polar subunits against the free soil solution and form layers of decreasing polarity [22].



Initially, the term “lignohumate” was characterized by Springer [23] as the humic material with lower ripeness and nitrogen content and a relatively high proportion of sulfonic acidic groups (as distinguished from the “true” soil humic material). Lignohumate has structure and properties similar to humic substances isolated from native matrices. During its production, the lignosulfonate is transformed into a humic-like material (by means of a higher temperature and pressure). Chemical changes ongoing in the transformation are similar to the humification of plant litter in nature [2]. The final product (lignohumate) usually has a lower nitrogen content and higher content of sulfonic acidic groups as well as other O-containing groups (hydroxyl, carbonyl, carboxyl, ether and ester ones) in comparison with humic substances isolated from peat, soils, and sediments. In comparison with native humic substances, the lignohumate can be characterized by the presence of simple structural components of wide molecular heterogeneity, smaller molecular size and weight [2,24].

Present studies of lignohumate are focused mainly on its agricultural and horticultural applications [2–8]; therefore, studies dealing with its structural characterization and other properties are relatively scarce. Some works [2,24] used chemical (elemental analysis) and spectral (UV/VIS, FT-IR and  $^{13}\text{C}$ -NMR) methods for the characterization of lignohumate and its comparison with humic material extracted from different natural matrices. The diffusion of lignohumate through plant cuticles was studied in our previous work [8]. The cuticle was placed between two cuvettes filled by agarose hydrogels. The donor hydrogel was enriched by lignohumate, the acceptor hydrogels was prepared without it (i.e., with zero initial concentration of lignohumate), and the transport of lignohumate through cuticle was monitored. This work is focused on the intrinsic diffusion in the hydrogels. The diffusion couple was assembled by means of the donor and acceptor hydrogels, but no cuticle was placed between them and both hydrogels were in immediate contact at the interface. In consideration of the heterogeneous structure of lignohumate [1,2,24] and unusual results obtained for transport properties of agarose hydrogels containing humic substances [25], the diffusion of lignohumate in agarose hydrogels should be investigated in detail. If the diffusion is realized in the two hydrogels, the lignohumate has a concentration gradient in both parts (donor and acceptor). In contrast, the solution can be stirred, therefore it has no concentration gradient in the donor solution. Therefore, the diffusion of lignohumate from its aqueous solution into agarose hydrogel was also investigated in this work.

## 2. Results and Discussion

The first experimental task was to determine the diffusion coefficient of lignohumate in the agarose hydrogel on the basis of experimental data obtained for the diffusion couple described above. If the couple is composed of hydrogels of the same nature, differing only in the lignohumate content, the diffusion coefficient should be the same in both parts of couple—the donor and acceptor hydrogels—in conditions in which the diffusion coefficient is not dependent on the concentration of diffusing particles [26–28]. Mathematical description of diffusion in the diffusion couple is relatively easy. Before the start of diffusion, the donor hydrogel has a constant concentration of lignohumate  $c_0$  in the whole cuvette volume, whereas its concentration in the acceptor hydrogel is zero. If both parts of the diffusion couple can be considered as semi-infinite mediums (meaning that the concentrations on the outside borders of the couple are constant and do not change in time during diffusion), the solution of second Fick law is [26–28]

$$c_{x,t} = \frac{1}{2}c_0 \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{D_h t}}, \quad (1)$$

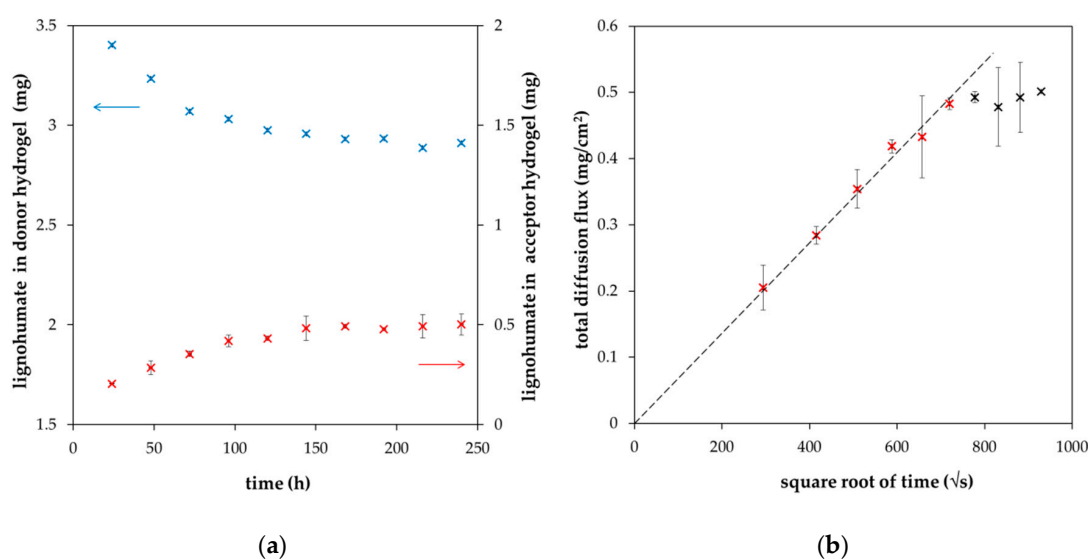
where  $c_{x,t}$  is the concentration of lignohumate at position  $x$  in time  $t$  and  $D_h$  is the effective diffusion coefficient of lignohumate in hydrogel. It can be seen that the concentration of the diffused component on the interface ( $c_i$ ) is time independent and equal to  $c_0/2$ .

Total diffusion flux  $m_t$  which goes through the interface between donor and acceptor hydrogels ( $x = 0$ ) in time  $t$  can be calculated as [26–28]

$$m_t = c_0 \sqrt{\frac{D_h t}{\pi}} \quad (2)$$

Equation (2) assumes that there is no accumulation of lignohumate at the interface, i.e., the diffusion flux from the donor hydrogel to the interface is equal to the diffusion flux from the interface into the acceptor hydrogel.

In Figure 1, the examples of experimental data are shown. As expected, the amount of lignohumate in the donor hydrogel decreased gradually as it diffused through the interface into the acceptor hydrogel. Our results confirm that the experimentally determined dependency of  $m_t$  on  $\sqrt{t}$  is linear up to a critical time, when the requirement of semi-infinite mediums is not fulfilled. Therefore, only the data corresponding with the abovementioned conditions are fitted by Equation (2).

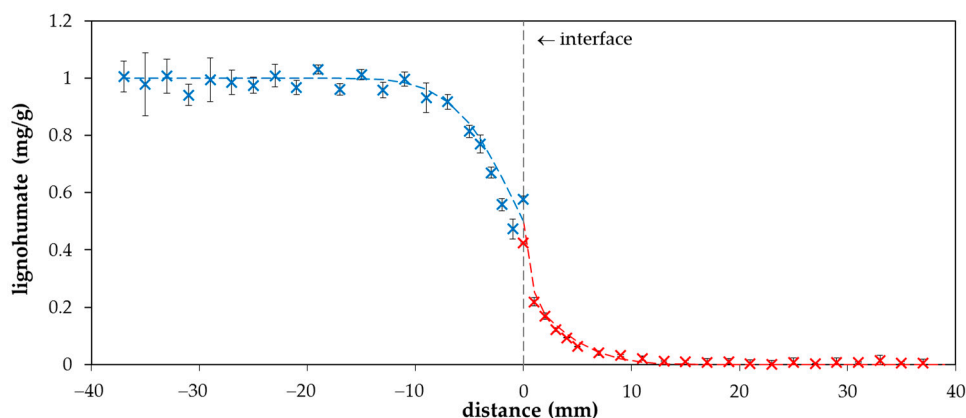


**Figure 1.** The time development of total amounts of lignohumate in donor (blue) and acceptor (red) hydrogels (a); experimental data fitted by Equation (2) (b).

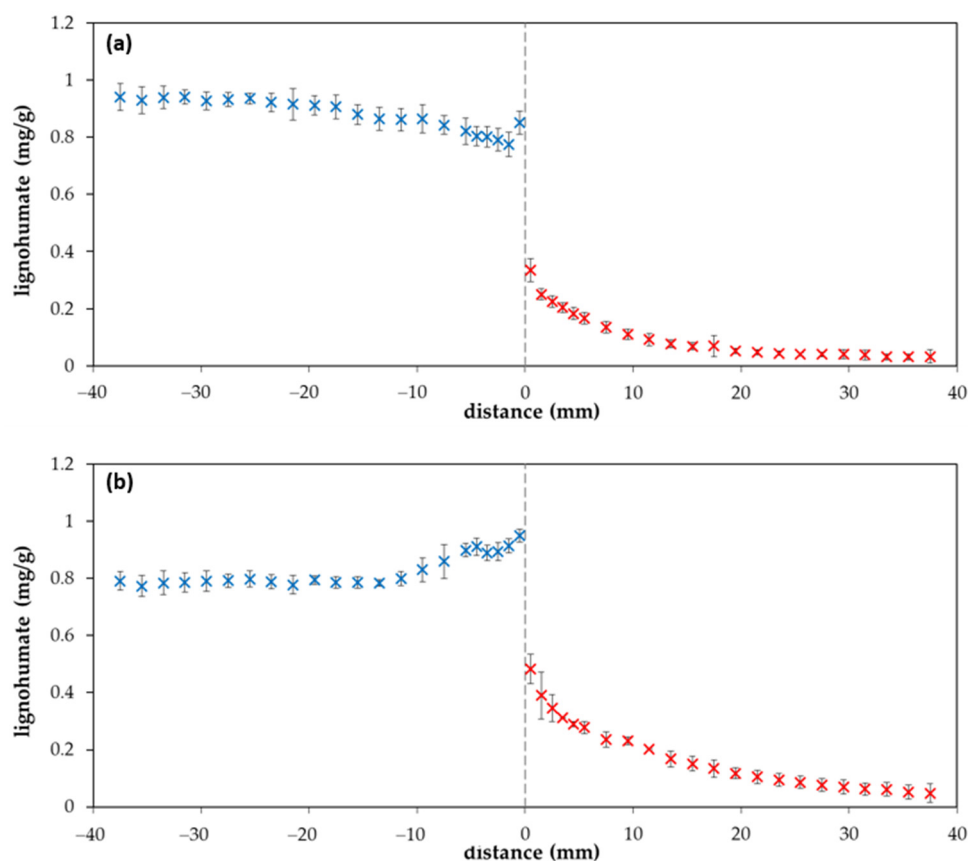
The diffusion coefficient of lignohumate in agarose hydrogel  $D_h$  was calculated on the basis of Figure 1b and Equation (2). Its value was determined as  $1.46 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  ( $\pm 8.66 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ), which agrees with values determined for humic substances by some other authors [29–33]. Cornel et al. [29] studied the diffusion of humic acids fractionated by means of ultrafiltration. They determined the diffusion coefficients between  $3.8 \times 10^{-11}$  and  $1.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  dependent on pH, ionic strength, temperature, and humic molecular weight. The dependence of the diffusion coefficient on molecular weights (according to the Stokes-Einstein equation) was weaker in comparison with the results obtained for synthetic polymers. This anomalous behavior of humic acids was interpreted to be an artefact of the determination of molecular weights by ultrafiltration. The authors concluded that true molecular weights of humic fractions were substantially lower than the nominal values of ultrafiltration. Pinheiro et al. [30] used voltammetric techniques for the determination of diffusion coefficients of humic and fulvic acids and their metal complexes. They obtained results in the range of from  $5 \times 10^{-12}$  to  $2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  for humic acids and their complexes and from  $6 \times 10^{-11}$  to  $1.2 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  for fulvic acids and their complexes. Lead et al. [31] studied the diffusion of humic and fulvic acids isolated from the Suwannee river (standard of International Humic Substances Society) by means of the fluorescence correlation spectroscopy. They determined the diffusion coefficients in the range of  $(2\text{--}3) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . They observed the aggregation of humic substances at lower pH values. No effect of concentration and ionic strength was observed. Lead and Wilkinson [32] used the

same method for the determination of diffusion coefficients of different humic substances in water and agarose hydrogel. In general, their results were in the range of  $(1.9\text{--}2.3) \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s for all samples under all conditions. Diffusion coefficients determined for hydrogel were approximately 10–20% lower in comparison with water, mainly due to increased path lengths and tortuosity. They assumed that large aggregates of humic substances were excluded from the hydrogel. In their subsequent work [33], the results obtained by means of the fluorescence correlation spectroscopy and classical diffusion cells were compared. Decreases in diffusion coefficients observed for some humic samples in hydrogel were too large to be explained by the tortuosity and obstructive effects of the hydrogel pore structure. Very hydrophobic humic substances were probably prevented from penetrating the hydrogel because of their aggregation. They stated that a potential complexation of humic substances with the hydrogel fibers is not important and can be neglected. In contrast, the diffusion coefficients of humic acids in water determined in ref. [34] were much lower. They varied between  $2.3 \times 10^{-12}$  and  $8.6 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s in the case of values measured by means of dynamic light scattering. The values based on voltammetry were in the range of  $4.4 \times 10^{-12}$  and  $1.3 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s.

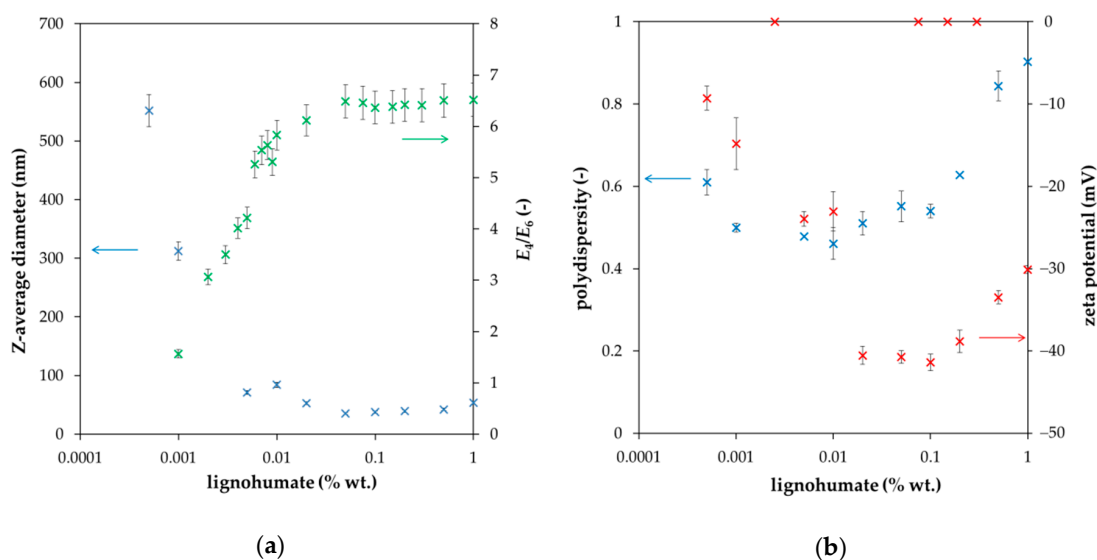
The value of the diffusion coefficient (determined in this work) was used for the calculation of the diffusion profile according to Equation (1). A comparison of experimental data with the computed curve is shown in Figure 2. It seems that our experimental data are in a good agreement with the simple mathematical model and the concentration of lignohumate at the interface between donor and acceptor hydrogels ( $c_i$ ) can be considered as the half  $c_0$ . However, an interesting phenomenon was observed when the diffusion was continued for several days. We can see that that one point close to the interface from the donor part is higher than the half  $c_0$  after one day of diffusion (Figure 2), as well as when the diffusion was prolonged (Figure 3a). After several days, the concentration of lignohumate on the outside border of the donor part decreased and the concentration close to the interface increased (Figure 3b). A concentration jump was observed at the interface for longer times. What is the reason for this? It is not easy to explain. One possibility is a filtration effect. The pore size of agarose hydrogel was determined by a simple spectrophotometric method [35] in our previous work [36]. Their average diameter was determined as 360 nm. The Z-average diameter of lignohumate decreased with the increasing concentration of its solution and its value was  $\sim 37$  nm for 0.1% wt. content (Figure 4a). This means that the pore size exceeds the Stokes hydrodynamic radius of lignohumate by almost ten times.



**Figure 2.** Concentration profile of lignohumate in agarose hydrogel after one day. The blue points belong to the donor hydrogel (distance  $x < 0$ ), and the red points belong to the acceptor hydrogel (distance  $x > 0$ ).



**Figure 3.** Concentration profiles of lignohumate in agarose hydrogel after two (a) and ten (b) days. The blue points belong to the donor hydrogel (distance  $x < 0$ ), the red points belong to the acceptor hydrogel (distance  $x > 0$ ).

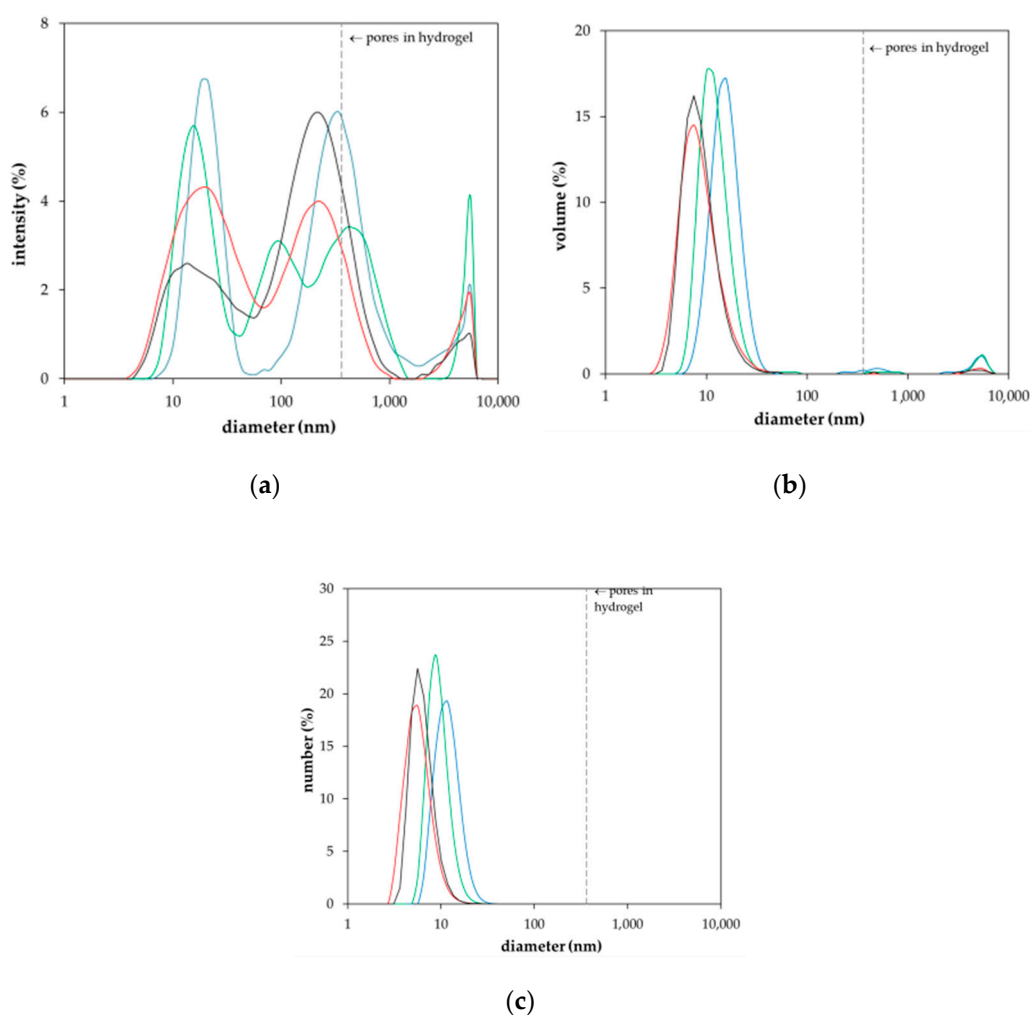


**Figure 4.** Z-average diameter and  $E_4/E_6$  ratio (a); polydispersity and zeta potential of lignohumate in the dependence on its concentration in aqueous solution (b).

The polydispersity for 0.1% wt. lignohumate content was approximately 0.5, zeta potential around  $-40$  mV. More negative zeta potential indicated a higher stability of particles of lignohumate. Many authors (e.g., [37–39]) used the ratio of absorbance at 465 to 665 nm ( $E_4/E_6$ , so called index of humification) as an indicator of the average molecular weight and size and with the oxygen content of

humic materials. The  $E_4/E_6$  ratio is usually  $<5$  for humic acids [1,24,37,38,40]. However, it was found that the values of the humification index  $E_4/E_6$  is higher than 5 for the content of lignohumate above 0.01% wt. (see Figure 4a). It may be indicative of the presence of O-containing functional groups (hydroxyl, carbonyl, carboxyl, and ester groups) and lower molecular weight.

As can be seen, the  $E_4/E_6$  ratio corresponds with the Z-average size of lignohumate, and therefore it may be considered as an indicator of its molecular size during the diffusion in the agarose hydrogel. However, the situation is more complex. In Figure 5, the intensity, volume, and number particle size distributions of lignohumate are shown. While the intensity and volume size distributions were tri-modal, their number-based distribution was mono-modal because the number of big particles occupying a large volume was very low. Despite the fact that the majority of lignohumate particles are smaller than the average pore size in the hydrogel, some of them can be limited in their motion, which can result in their higher concentration close to the interface. Some studies showed that the average size diameter is not a suitable parameter for characterizing humic substances and should be used only conditionally as the apparent mean particle size in comparison with other works [41,42]. As can be seen in Figures 4 and 5, the relatively high polydispersity and multi-modal character of particle size distributions can support this conclusion. This means that the lignohumate can contain more fractions with different mobilities. The knowledge of particle size distribution is thus very important. The colloidal stability can thus affect their molecular organization and re-arrangement in the studied system.



**Figure 5.** Intensity (a), volume (b) and number (c) particle size distributions of lignohumate with concentration 0.001% wt. (blue), 0.01% wt. (green), 0.1% wt. (red) and 1% wt. (black).

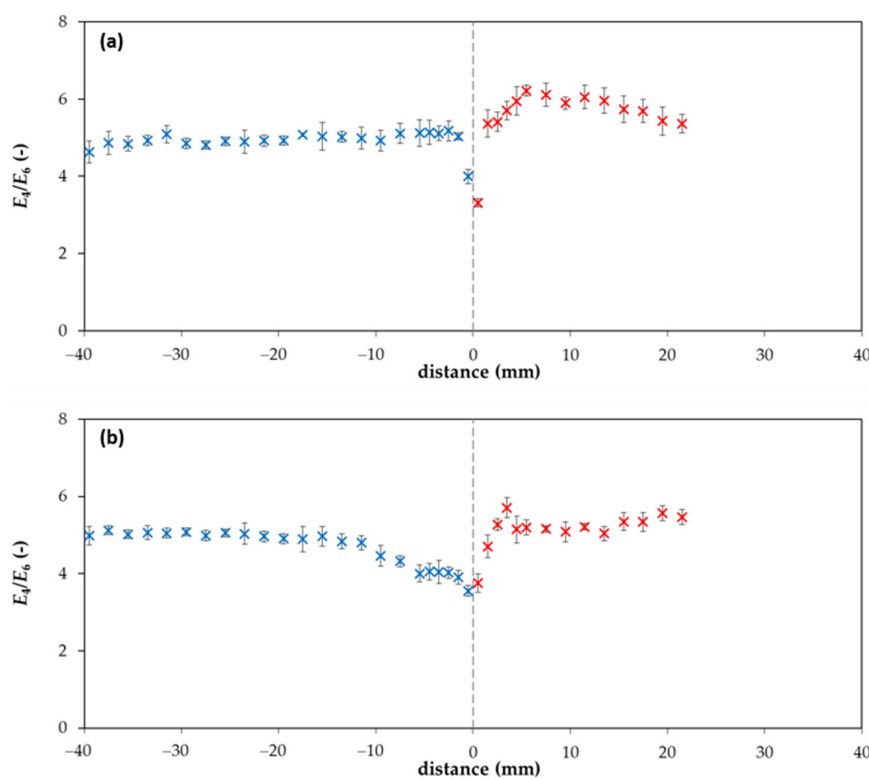


In the case of globular particles, their diffusion coefficient decreases with the square of diameter:

$$D = k_B T / (6\pi\eta r). \quad (3)$$

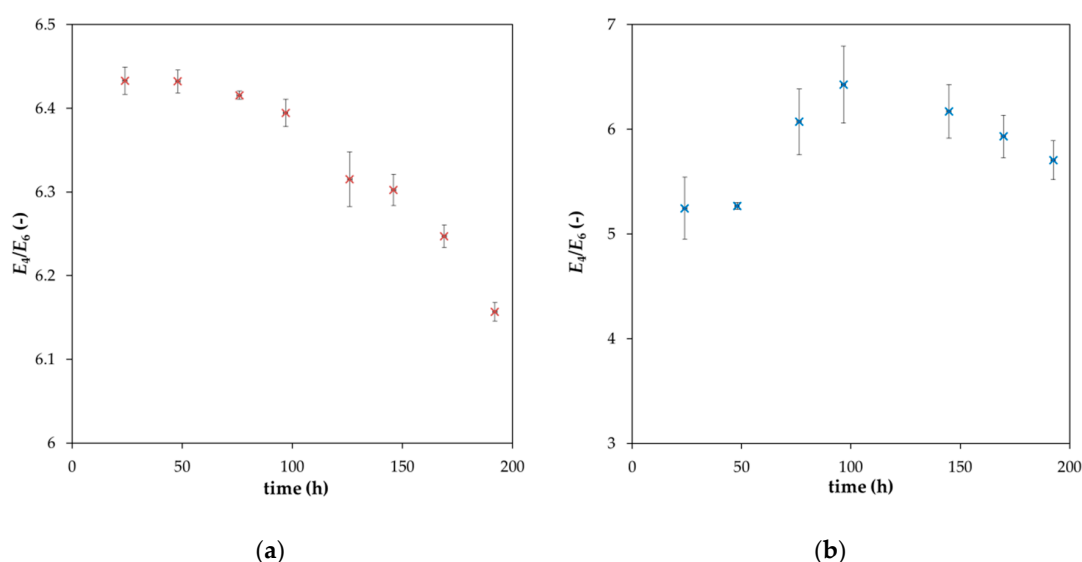
where  $D$  is the diffusion coefficient (equal to  $D_h$  in hydrogel and to  $D_s$  in solution),  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the temperature,  $\eta$  is the viscosity of the medium and  $r$  is the diameter of the diffusing particle [26,27,36]. The re-arrangement (e.g., aggregation and destruction of weak bonds in supramolecular structure of lignohumate) can result in changes in the size of particles, their mobility and the potential accessibility of active sites for other constituents in present natural systems.

As can be seen in Figure 6, the  $E_4/E_6$  ratio of lignohumate in the hydrogel changes with the position in the diffusion couple. The values of absorbance in the acceptor hydrogel for distances  $>20$  mm were too low, and therefore the  $E_4/E_6$  ratio was not calculated for these distances from the interface. If we compare Figures 3 and 6, we can see that the increase in lignohumate concentration in the donor hydrogel is connected with the decrease in the  $E_4/E_6$  ratio. This means that bigger particles cumulated in front of the interface and can pass through it only with difficulty. Simultaneously, the donor hydrogel is deprived of smaller particles diffused through the interface into the acceptor hydrogel, which caused the increase in the  $E_4/E_6$  ratio past the interface. Changes observed in particle size distributions during the diffusion can result in changes in lignohumate molecular organization. Smaller particles are leaving the donor hydrogel and the bigger particles accumulate in front of the interface. If smaller particles were constituents of the supramolecular structure of lignohumate and disappeared from the donor hydrogel, the remaining bigger particles accumulated in a relatively thin layer re-arranged and a new spatial organization of present particles can be established. New bonds between particles can form and others are destroyed. The supramolecular structure changes are dependent on the amount and composition of the present particles.



**Figure 6.**  $E_4/E_6$  ratio in agarose hydrogel after two (a) and ten (b) days. The blue points belong to the donor hydrogel (distance  $x < 0$ ), while the red points belong to the acceptor hydrogel (distance  $x > 0$ ).

In order to investigate the diffusion of lignohumate in agarose hydrogel in detail and understand the observed differences between the mathematical model for the diffusion couple (Equation (1)) and the obtained experimental data (Figure 3), the diffusion of lignohumate from its solution into the hydrogel was studied. As described above, the particle size distribution and the stability of molecular organization are strongly influenced by the content of lignohumate in its solution. The decrease in its concentration is connected with the decrease in the colloidal stability and increase in the average diameter and polydispersity. On the other hand, the decrease in lignohumate content in the solution caused by its diffusion into the hydrogel is connected with the depletion of smaller particles and re-arrangement of the supramolecular structure of lignohumate. As we can see in Figure 7, the  $E_4/E_6$  ratio decreases with the continuing diffusion, which indicates the increase in the particle diameter. The increase in particle size is connected with a faster mobility of smaller particles and their diffusion into the hydrogel as well as the re-organization of the supramolecular structure of lignohumate. In contrast, the  $E_4/E_6$  ratio in the vicinity of the interface in hydrogel has a maximum. This means that the first layer in the hydrogel is gradually saturated by smaller particles from the solution and these particles can leave it and diffuse into more distant layers of the hydrogel. It seems that particles of lignohumate in the hydrogel are bigger than its particles dissolved in solution (mainly at the start of the experiment). It is impossible to determine a particular size on the basis of the value of  $E_4/E_6$  ratio. This ratio should be considered as an indicator of the changes in particle size, and therefore it can indicate such processes as the formation of aggregates and disintegration of bigger agglomerates. It is necessary to take into consideration many factors and circumstances. One of these is the fact that it is difficult to compare particle size in different mediums—in solution and in hydrogel. The absorbance (used for the calculation of  $E_4/E_6$  ratio) must be corrected according to the effect that the absorbance of pure medium has subtracted from that measured for lignohumate in a given medium at a given wavelength. Our previous results [14,25] show that the addition of humic substances into agarose hydrogels can affect their behavior mainly from the point of view of its rheological properties. The hydrogels enriched by humic substances were more liquid in comparison with the pure agarose hydrogel and had a lower ability to resist mechanical stresses. Therefore, the background correction by means of the absorbance of pure agarose hydrogel can shift the values of  $E_4/E_6$  ratio at the interface between different mediums.



**Figure 7.**  $E_4/E_6$  ratio of lignohumate in its solution during its diffusion into the hydrogel (a); time development of  $E_4/E_6$  ratio of lignohumate in the hydrogel at a distance of 0.5 mm from the interface (b).

On the other hand, the behavior of lignohumate in different mediums can differ. Although the size of pores is sufficiently large in the comparison with lignohumate particles [36], the environs of

lignohumate can influence its molecular organization. The secondary structure of lignohumate is thus sensitive to its concentration and the medium in which it is located. The particle size distribution and the  $E_4/E_6$  ratio can change with the position in hydrogel as a result of proceeding diffusion, different mobilities of particles, their content in a given locality, etc. Therefore, the supramolecular structure of lignohumate can react sensitively on actual changes in the lignohumate arrangement and surrounding medium, which can affect their mobility and permeability into different materials. As mentioned above, the lignohumate is frequently used in agricultural and horticultural applications. Nowadays, foliar applications of fertilizers and bio-stimulants complement standard root fertilization [8,43]. Diffusion processes play an important role in both methods of fertilization because the application of fertilizers is connected with the penetration into plant organs such as leaves and roots. The supramolecular structure of lignohumate and its ability regarding structural re-arrangement thus can influence its mobility and permeability into plants.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals

Agarose (AG; routine use class; CAS 9012-36-6) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Lignohumate A was kindly provided by Amagro (Prague, Czech Republic). It represents a commercial mixture of humates and fulvates prepared by thermal conversion of technical lignosulfonates under strictly controlled conditions [1,2,44]. Its main characteristics, such as elemental composition and structural features, can be found in refs. [1,8,24].

The particle size distribution and zeta potential of lignohumate in water (0.005–10 g·dm<sup>-3</sup>) were measured by means of a Zetasizer Nano ZS with backscattering detection (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) The diameter of particles was calculated by means of the Z-average function (based on the Stokes-Einstein equation, assuming particles to be spherical) [29,40,45,46].

#### 3.2. Preparation of Hydrogels

The method of preparation of hydrogels was described in detail in our previous studies [8,14,25,36]. The preparation of hydrogels was based on the thermo-reversible gelation of AG aqueous solution. AG was dissolved in deionized water or in an aqueous solution of lignohumate, then heated (80 °C) and stirred to obtain a transparent solution, and finally sonicated to remove gases. Afterwards, the solution was poured into the PMMA spectrophotometric cuvette (inner dimensions: 10 × 10 × 45 mm). The donor hydrogel for diffusion couple was prepared from 1% wt. AG solution containing 0.1% wt. of lignohumate. The acceptor hydrogel was prepared using 1% wt. AG solution (free of lignohumate). The pure agarose hydrogel prepared in the same way as the acceptor one was also used for the diffusion experiments monitoring the transport of lignohumate from its aqueous solution (0.1% wt.).

The size of pores in agarose hydrogel was determined by the spectrophotometric method published by Aymard et al. [35]. The average diameter of pores was determined as 0.36 μm [36].

#### 3.3. Diffusion Experiments

Two types of diffusion experiments were realized. The first one was the diffusion of lignohumate in the diffusion couple formed by the donor and acceptor hydrogels, while the second one was the diffusion of lignohumate from its solution into the hydrogel.

##### 3.3.1. Diffusion Couple

The diffusion couple was realized by connecting two cuvettes filled by agarose hydrogels, as described in ref. [8]. The donor hydrogel contained homogeneously dispersed lignohumate (0.1% wt.), and the acceptor hydrogel was prepared as a pure one without lignohumate. During the diffusion experiments, all the diffusion couples were placed in a closed container above water level (in order to maintain constant humidity of the surroundings). Experimental conditions (relative humidity 100%,

temperature 25 °C) were held constant during the whole experimental period. The diffusion from the donor into the acceptor part of couple was monitored in time. The concentration profiles of lignohumate in both hydrogels were determined by means of UV/VIS spectrometry (Varian Cary 50 UV/VIS spectrophotometer, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The spectra were measured at various distances from the interface by means of the spectrophotometer equipped with the special accessory providing controlled fine vertical movement of the cuvette in the spectrophotometer [8,25,47]. The collected spectra (at different positions in hydrogels) were used for the calculation of the concentration profiles of lignohumate in the diffusion couple. The diffusion fluxes were determined as the amount of lignohumate transported from the donor hydrogel into the acceptor hydrogel through the interface (per unit of area). These diffusion experiments were performed with ten repetitions and data are presented as average values with standard deviation bars.

### 3.3.2. Diffusion from Solution into Hydrogel

The diffusion from the lignohumate solutions into the pure agarose hydrogel was realized by the following experimental arrangement. Ten cuvettes with agarose hydrogels (without lignohumate) were placed into five vessels filled by the solution of lignohumate (two cuvettes in 100 cm<sup>3</sup>). The initial concentration of lignohumate in solution was 0.1% wt. The solutions in vessels were stirred continuously (250 rpm). The decrease in the concentration of lignohumate in the solution was measured over time by means of UV/VIS spectrometer Hitachi U3900H (Hitachi, Tokyo, Japan). The concentration profiles in hydrogels were determined by the same method as in the case of the diffusion couple (described above). All experiments were performed at laboratory temperature (25 °C). Data are presented as average values with standard deviation bars.

## 4. Conclusions

In this study, the diffusion properties of lignohumate were studied in relation to its supramolecular character. The lignohumate, similarly to natural humic substances, contains particles with different sizes and shapes influencing their mobility and permeability into different materials. Since smaller particles are faster than bigger ones, their distribution in hydrogels changes with the distance from interface as well as with time of diffusion. The change in particle size distribution can result in the re-arrangement of secondary structure of lignohumate. The accumulation of bigger humic particles was observed in the donor hydrogel of diffusion couple, in spite of the fact that measured particle sizes were sufficiently small in comparison with pore sizes in the hydrogel. The re-arrangement of the lignohumate secondary structure as a result of the depletion of small particles can support the aggregation of lignohumate connected with the loss of its mobility. This phenomenon can affect the penetration of lignohumate into plant organs in its use for agricultural and horticultural purposes, its potential sedimentation, and in the decrease in active sites accessible for other substances in natural systems. In contrast, the destruction of weak bonds in the supramolecular structure of lignohumate can result in the formation of smaller particles with higher mobility. New bonds between particles can form and others are destroyed. The supramolecular structure changes are thus dependent on the amount and size distribution of lignohumate, its distance from the interface, and time. Our results show that the supramolecular structure of lignohumate can react sensitively on actual changes in its environs and thus affect their mobility and permeability into the hydrogel.

**Author Contributions:** M.K. (Martina Klučáková) performed the diffusion experiments, analysed the experimental data and wrote the paper. M.K. (Michal Kalina) determined the particle size distributions and colloidal stability of lignohumate in solution. V.E. contributed to the diffusion experiments by analysis of UV/VIS spectra and was responsible for evaluation and discussion of the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports), grant number REG LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Novák, F.; Šestauberová, M.; Hrabal, R. Structural features of lignohumic acids. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1093*, 179–185. [[CrossRef](#)]
2. Holub, P.; Klema, K.; Tuma, I.; Vavříková, J.; Surá, K.; Veselá, B.; Urban, O.; Záhora, J. Application of organic carbon affects mineral nitrogen uptake by winter wheat and leaching in subsoil: Proximal sensing as a tool for agronomic practice. *Sci. Total Environ.* **2020**, *717*, 137058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Vuorinen, I.; Hamberg, L.; Müller, M.; Seiskari, P.; Pennanen, T. Development of growth media for solid substrate propagation of ectomycorrhiza fungi for inoculation of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings. *Mycorrhiza* **2015**, *25*, 311–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Adani, F.; Genevini, P.; Zaccheo, P.; Zocchi, G. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* **1998**, *21*, 561–575. [[CrossRef](#)]
5. Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P.; Welch, C.; Metzger, J.D. Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. *Bioresour. Technol.* **2004**, *93*, 145–153. [[CrossRef](#)]
6. Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P.; Metzger, J.D.; Lucht, C. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia* **2005**, *49*, 297–306. [[CrossRef](#)]
7. Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P. Influences of vermicomposts on field strawberries: 2. Effects on soil microbiological and chemical properties. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 831–840. [[CrossRef](#)]
8. Smilková, M.; Smilek, J.; Kalina, M.; Sedláček, P.; Pekař, M.; Klučáková, M. A simple technique for assessing of the cuticular diffusion of humic acid biostimulants. *Plant Methods* **2019**, *15*, 83. [[CrossRef](#)]
9. Pozdnyakov, L.A.; Stepanov, A.L.; Gasanov, M.E.; Semenov, M.V.; Yakimenko, O.S.; Suada, I.K.; Rai, I.N.; Shchegolkova, N.M. Effect of lignohumate on soil biological activity on the Bali Island, Indonesia. *Eurasian Soil Sci.* **2020**, *53*, 653–656. [[CrossRef](#)]
10. Vialykh, E.A.; Salahub, D.R.; Achari, G. Metal ion binding by humic substances as emergent functions of labile supramolecular assemblies. *Environ. Chem.* **2020**, *17*, 252–265. [[CrossRef](#)]
11. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* **2001**, *166*, 810–832. [[CrossRef](#)]
12. Alvarez-Puebla, R.A.; Valenzuela-Calahorra, C.; Garrido, J.J. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation: A molecular modelling approach. *Sci. Total Environ.* **2006**, *358*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Klučáková, M.; Věžníková, K. The role of concentration and solvent character in the molecular organization of humic acids. *Molecules* **2016**, *21*, 1410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Klučáková, M.; Smilek, J.; Sedláček, P. How humic acids affect the rheological and transport properties of hydrogels. *Molecules* **2019**, *24*, 1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Christl, I.; Metzger, A.; Heidmann, I.; Kretzschmar, R. Effect of humic and fulvic acid concentrations and ionic strength on copper and lead binding. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5319–5326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Conte, P.; Piccolo, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 1682–1690. [[CrossRef](#)]
17. Piccolo, A.; Nardi, S.; Concheri, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere* **1996**, *33*, 595–602. [[CrossRef](#)]
18. Simpson, A.J.; Kingery, W.L.; Hayes, M.H.B.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Dvorsak, P.; Kerssebaum, R.; Godejohann, M.; Hofman, M. Molecular structure and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 84–88. [[CrossRef](#)]
19. Simpson, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S72–S82. [[CrossRef](#)]
20. Tarasevich, Y.I.; Dolenko, S.A.; Trifonova, M.Y.; Alexeenko, E.Y. Association and colloid-chemical properties of humic acids in aqueous solutions. *Colloid J.* **2013**, *75*, 207–213. [[CrossRef](#)]
21. Baalousha, M.; Motelica-Heino, M.; Galaup, S.; LeCoustumer, P. Supramolecular structure of humic acids by TEM with improved sample preparation and staining. *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *66*, 299–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



22. Fischer, T. Humic supramolecular structures have polar surfaces and unipolar cores in native soil. *Chemosphere* **2017**, *183*, 437–443. [[CrossRef](#)]
23. Springer, U. Der heutige Stand der Humusuntersuchungsmethodik mit besonderer Berücksichtigung der Trennung, Bestimmung und Charakterisierung der Huminsäuretypen und ihre Anwendung auf charakteristische Humusformen. *Bodenkd. Pflanzenernähr.* **1938**, *6*, 312–373. (In German) [[CrossRef](#)]
24. Enev, V.; Pospíšilová, L.; Klučáková, M.; Liptaj, T.; Doskočil, L. Spectral characterization of selected natural humic substances. *Soil Water Res.* **2014**, *9*, 9–17. [[CrossRef](#)]
25. Klučáková, M. Agarose hydrogels entrapped by humic acids as the complexation agent. *Polymers* **2020**, *12*, 687.
26. Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*; Clarendon Press: Oxford, UK, 1956; pp. 1–61.
27. Cussler, E.L. *Diffusion Mass: Transfer in Fluid Systems*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1984; pp. 13–35.
28. Klučáková, M.; Pekař, M. Transport of copper (II) ions in humic gel—New results from diffusion couple. *Colloid. Surf. A* **2009**, *349*, 96–101. [[CrossRef](#)]
29. Cornel, P.K.; Summers, R.S.; Roberts, P.V. Diffusion of humic acids in dilute aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, *110*, 149–164. [[CrossRef](#)]
30. Pinheiro, J.P.; Mota, A.M.; Simoes Goncalves, M.L.S.; van Leeuwen, H.P. The pH effect in the diffusion coefficient of humic matter: Influence in speciation studies using voltammetric techniques. *Colloid. Surf. A* **1998**, *137*, 165–170. [[CrossRef](#)]
31. Lead, J.R.; Wilkinson, K.J.; Starchev, K.; Canonica, S.; Buffle, J. Determination of diffusion coefficients of humic substances by fluorescence correlation spectroscopy: Role of solution conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1365–1369. [[CrossRef](#)]
32. Lead, J.R.; Wilkinson, K.J. Measurement of diffusion coefficients of humic substances in a hydrogel and in water by fluorescence correlation spectroscopy. *WIT Trans. Ecol. Environ.* **2001**, *49*, 487–494.
33. Lead, J.R.; Starchev, K.; Wilkinson, K.J. Diffusion coefficients of humic substances in agarose gel and in water. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 482–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pinheiro, J.P.; Mota, A.M.; d'Oliveira, J.M.R.; Martinho, J.M.G. Dynamic properties of humic matter by dynamic light scattering and voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *329*, 15–24. [[CrossRef](#)]
35. Aymard, P.; Martin, D.R.; Plucknett, K.; Foster, T.J.; Clark, A.H.; Norton, I.T. Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels. *Biopolymers* **2001**, *59*, 131–144. [[CrossRef](#)]
36. Sedláček, P.; Smilek, J.; Klučáková, M. How interactions with polyelectrolytes affect mobility of low molecular ions—Results from diffusion cells. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 1500–1509. [[CrossRef](#)]
37. Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, *41*, 352–358. [[CrossRef](#)]
38. Chen, J.; Gu, B.; LeBoeuf, E.J.; Pan, H.; Dai, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **2002**, *48*, 59–68. [[CrossRef](#)]
39. Fuentes, M.; González-Gaitano, G.; García-Mina, J.M. The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org. Geochem.* **2006**, *37*, 1949–1959. [[CrossRef](#)]
40. Klučáková, M.; Kalina, M. Composition, particle size, charge and colloidal stability of pH-fractionated humic acids. *J. Soil. Sediment.* **2015**, *15*, 1900–1908. [[CrossRef](#)]
41. Baalousha, M.; Motelica-Heino, M.; Le Coustumer, P. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloid. Surf. A* **2006**, *272*, 48–55. [[CrossRef](#)]
42. Klučáková, M. Size and charge evaluation of standard humic and fulvic acids as crucial factors to determine their environmental behavior and impact. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)]
43. Fageria, N.K.; Barbosa Filho, M.P.; Moreira, A.; Guimaraes, C.M. Foliar fertilization of crop plants. *J. Plant Nutr.* **2009**, *32*, 1044–1064. [[CrossRef](#)]
44. Gladkov, O.A.; Poloskin, R.B.; Polyakov, Y.J.; Sokolova, I.V.; Sorokin, N.I.; Glebov, A.V. Method for Producing Humic Acid Salts. U.S. Patent 7198805B2, 3 April 2007.
45. Klučáková, M.; Věžníková, K. Micro-organization of humic acids in aqueous solutions. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1144*, 33–40. [[CrossRef](#)]

46. Reid, P.M.; Wilkinson, A.E.; Tipping, E.; Jones, M.N. Aggregation of humic substances in aqueous media as determined by light-scattering methods. *J. Soil Sci.* **1991**, *42*, 259–270. [[CrossRef](#)]
47. Sedláček, P.; Smilek, J.; Klučáková, M. How interactions with polyelectrolytes affect mobility of ionic dyes in hydrogels. 2. Non-stationary diffusion experiments. *React. Funct. Polym.* **2014**, *75*, 41–50. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds (agarose, lignohumate) are available from the authors.

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

V současnosti se do popředí vědeckého zájmu stále více dostává využití odpadního produktu *lignosulfonanu*, který je druhotným produktem průmyslového zpracování dřevní hmoty. Nejčastěji se s tímto odpadním produktem můžeme setkat při sulfitovém zpracování buničiny, kde tento polyelektrolyt vzniká v tzv. procesu de-lignifikace surové buničiny, jehož primárním prekurzorem je biopolymerní sloučenina tj. lignin. Odstranění makromolekul ligninu ze surové buničiny spočívá v hydrolytickém štěpení etherových vazeb mezi jednotlivými stavebními jednotkami tohoto poměrně stabilního biopolymeru.

Tento odpadní produkt našel své uplatnění jako výchozí surovina při výrobě *lignohumátů* (LH), které jsou průmyslovými analogy přírodních HL. Tyto antropogenní organické sloučeniny jsou nejčastěji používány jako přírodní biostimulanty v odvětvích rostlinné a živočišné výroby. V krátkosti můžeme říci, že tyto biopolymerní sloučeniny mají poměrně široké spektrum využití, ať už máme na mysli zemědělské, průmyslové či veterinární aplikace. V odvětvích rostlinné výroby a zemědělství našly tyto sloučeniny uplatnění zejména pro svoje unikátní fyzikálně-chemické a biostimulační vlastnosti: (i) významně snižují vyluhování dusíku do půdního roztoku, čímž zlepšují bilanci tohoto prvku v půdním ekosystému; (ii) jsou schopny snižovat ekologické dopady pesticidů a dalších xenobiotik; (iii) příznivě ovlivňují bazální respiraci půdy a biologickou aktivitu půdních mikroorganismů.

Jelikož při samotném procesu de-lignifikace je makromolekula ligninu degradována na velikostně a strukturně jednodušší stavební kameny, tak se dá předpokládat, že mezi jednotlivými komponenty se budou významně uplatňovat slabé vazebné interakce, stejně tak, jak je tomu v případě supramolekulárního pojetí struktury přírodních HL. Jak již bylo zmíněno v hlavní části této habilitační práce, tak supramolekulární struktura je výhradně stabilizována hydrofobními interakcemi a nesčetnými počty vodíkových vazeb, lépe řečeno můstků. Pokud bychom měli zmínit hlavní diference, kterými se odlišují ty antropogenní „HL“ od těch přírodních, tak se zejména jedná o obsah sulfonových skupin, které se v přírodních HL a DOM prakticky nevyskytují, a pokud ano, tak jsou indikátory sekundární oxidace přírodních matric tzn. nejsou charakteristickými funkčními skupinami vznikajícími v procesu geneze těchto biokoloidních sloučenin. V obecném pohledu můžeme dále zmínit, že lignohumáty ve svých strukturách obsahují vyšší množství kyslík obsahujících funkčních skupin, jako jsou hydroxylové, alkoxylové, karbonylové, karboxylové a etherové skupiny. Nicméně je jasné, že v rámci těchto antropogenních sloučenin bude panovat i jistá strukturní rozdílnost, která je převážně spjata s podmínkami výroby tzn. *teplota, tlak, složení atmosféry v reaktor*u atd. a v neposlední řadě i s původním druhem použité suroviny, jako je měkké a tvrdé dřevo.

V odborné publikaci s názvem: „How the Supramolecular Nature of Lignohumate Affects Its Diffusion in Agarose Hydrogel“ jsme se zabývali studiem permeace lignohumátu v agarózových hydrogelech, jakož to vhodného modelového systému hodícího se k popisu transportu tohoto biostimulantu do rostlinných orgánů, jako jsou listy a kořeny.

Nezbytným krokem pro popis difuzních experimentů je faktické stanovení difuzního koeficientu  $D_h$  permeované sloučeniny tj. lignohumátu v agarózovém hydrogelu pomocí tzv. *difuzních párů*, které jsou tvořeny donorním a akceptorovým médiem. Pokud se obě

části difuzního páru považují za semi-nekonečná média, tak difuzní koeficient může být vypočten dle druhého Fickova zákona:

$$c_{x,t} = \frac{1}{2} c_0 \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{D_h t}}; \quad (1)$$

kde  $c_{x,t}$  je koncentrace lignohumátu v určité vzdálenosti a čase;  $D_h$  je efektivní difuzní koeficient. Z matematického zápisu vyplývá, že koncentrace difundované složky na rozhraní ( $c_i$ ) je časově nezávislá a rovna  $\left(\frac{c_0}{2}\right)$ .

Celkový difuzní tok  $m_t$ , který prochází rozhraním mezi dárcovským (donorovým) a akceptorovým hydrogelem ( $x = 0$ ) v čase  $t$  je definován vztahem:

$$m_t = c_0 \sqrt{\frac{D_h t}{\pi}}. \quad (2)$$

Efektivní difuzní koeficient lignohumátu v agarózovém hydrogelu byl vypočten na základě rovnice (2) a jeho průměrná hodnota byla stanovena na  $1,46 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Následně byla tato hodnota difuzního koeficientu použita pro výpočet difuzních profilů lignohumátu v připravených hydrogelech.

Experimentální data jasně dokládají, že tento matematický model je ve velmi dobré shodě s faktickým průběhem difuze realizovaným pomocí tzv. difuzního párů. Nicméně v této práci byly pozorovány poměrně zajímavé aspekty, které můžeme rozdělit do následujících bodů: (i) koncentrace lignohumátu donorového média v blízkosti rozhraní byla vyšší než  $\frac{1}{2}c_0$  po prvním dni difuze; (ii) po několika dnech probíhajícím difuzním experimentu se koncentrace lignohumátu na vnější straně donorového média snížila, ale zároveň byl pozorován nárůst koncentrace na vnitřní straně donorového média (rozhraní difuzního páru); (iii) s rostoucím časem difuze byly pozorovány skokové změny koncentrací lignohumátu. Jednou z možných myšlenek, jak toto poněkud anomální chování vysvětlit lze nalézt v tzv. filtračním účinku agarózy, jež je ve skutečnosti dána průměrnými hodnotami velikosti pórů a Stokesova hydrodynamického poloměru částic lignohumátu.

Na základě dynamického rozptylu světla (DLS) byla stanovena hodnota polydisperzity 0,1 hm. % roztoku lignohumátu a také jeho průměrná hodnota  $\zeta$ -potenciálu, která poukazovala na poměrně vysokou stabilitu těchto disperzních částic ( $\zeta$ -potenciál  $\sim -40 \text{ mV}$ ). Poměrně cenným výsledkem této studie bylo, že hodnoty absorpčního koeficientu  $E_4/E_6$  jsou dobrými indikátory střední molekulové hmotnosti  $\overline{M}_r$ . Interpretace distribuce velikosti částic lignohumátu resp. HL je poněkud složitější, a to zejména z důvodu, že k danému popisu lze použít následující distribuční funkce: (i) intenzitní; (ii) objemovou a (iii) početní. Tuto interpretační nevýhodu můžeme spatřit, pokud srovnáme distribuční křivky intenzitní anebo objemové s křivkami početními, které reflektují faktický počet částic určitých velikostí. Jinými slovy, distribuční početní křivka měla mono-modální charakter, oproti ostatním distribučním křivkám, které se vyznačovaly tri-modálním průběhem. Tento eminentní rozdíl je ve skutečnosti způsoben tím, že velkých částic zabírajících velký objem bylo ve vzorku lignohumátu jen velmi málo. Avšak v obecném pohledu na dosažené výsledky můžeme říci, že lignohumát obsahuje více frakcí, jež se odlišují zejména svojí pohyblivostí. Nicméně musíme mít na paměti, že každý studovaný systém, ať už máme na mysli roztok lignohumátu či

nativních HL se vyznačuje specifickou koloidní stabilitou, která hraje velmi důležitou úlohu v jejich (supra)molekulární organizaci.

Hodnota absorpčního koeficientu  $E_4/E_6$  se velmi citlivě mění s polohou v difuzním páru, a to tak, že zvýšení koncentrace lignohumátu v donorové části hydrogelu je doprovázeno snížením tohoto Vis koeficientu. Ve skutečnosti to znamená, že větší frakce lignohumátu se hromadily před rozhraním difuzního páru, a tudíž mohly procházet jen s velkými obtížemi. Naproti tomu je vidět, že donorový prostor efektivně opouští menší frakce lignohumátu, které difundují přes rozhraní do prostoru akceptorové květy (hodnoty absorpčního koeficientu byly v tomto prostoru vyšší). Tyto změny distribuce velikosti částic v donorovém a akceptorovém prostoru jasně dokládají, že difuzní procesy mohou vést k reorganizaci supramolekulární struktury. Jinými slovy, v průběhu difuzního procesu mohou vznikat a zanikat slabé vazebné interakce, kterými jsou lignohumáty resp. HL formovány do tzv. *supramolekulární struktury*.

Abychom mohli podrobně porozumět mechanismu difuze lignohumátu, tak byla tato studie doplněna o další experimenty spočívající v difuzi této bioaktivní sloučeniny (roztok LH) do agarózového hydrogelu. Vypočtené hodnoty absorpčního koeficientu  $E_4/E_6$  (zdrojový roztok lignohumátu) v průběhu difuzního procesu klesají, a proto se můžeme domnívat, že v roztoku zůstávají méně mobilní frakce LH, které se vyznačují vyšší střední molekulovou hmotností. Naproti tomu, menší částice velmi ochotně difundují do objemu agarózového hydrogelu. Mimo jiné si nelze nepovšimnout, že absorpční koeficient v blízkosti rozhraní nabývá své maximální hodnoty, což bychom mohli interpretovat tak, že vrstva hydrogelu v blízkosti rozhraní je postupně nasycena částicemi o nižší  $\overline{M}_r$ . Nicméně pokud porovnáme získané experimentální data, a to jak ze zdrojového roztoku, tak i z média akceptoru, lze poměrně jasně vidět, že difundované frakce LH jsou v porovnání s donorovým médiem poněkud větší. Tento aspekt je zejména zřetelný v počátku difuzního experimentu tzn. 0–50 h. Jelikož molekulární resp. nadmolekulární organizace lignohumátu může v různých prostředích probíhat odlišně, tak je zapotřebí se touto problematikou zabývat i nadále. Na tomto místě si dovoluji uvést další experimentální podmínky, které si zaslouží naši zvýšenou pozornost: (i) koncentrace zdrojového roztoku LH a HL; (ii) velikost pórů v objemu hydrogelu a s ní spojená homogenita; (iii) hodnoty pH a iontové síly roztoku; (iv) molekulární organizace těchto biokoloidních sloučenin s ohledem na zvolené experimentální podmínky.



# Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids

**Vojtěch Enev**, Petr Sedláček, Leona Kubíková, Šárka Sovová, Leoš Doskočil, Martina Klučáková, Miloslav Pekař

*Agronomy*, **2021**, *11*, 1–19.

Impact factor (2020): 3,417

JCR Category: Agronomy-Scie – Q1

## Article

# Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids

Vojtěch Enev<sup>1,\*</sup>, Petr Sedláček<sup>1,†</sup>, Leona Kubíková<sup>1</sup>, Šárka Sovová<sup>1</sup>, Leoš Doskočil<sup>2</sup>, Martina Klučáková<sup>1</sup> and Miloslav Pekař<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physical and Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; sedlacek-p@fch.vut.cz (P.S.); kubikova@fch.vut.cz (L.K.); xcsovova@fch.vut.cz (Š.S.); klucakova@fch.vut.cz (M.K.); pekar@fch.vut.cz (M.P.)

<sup>2</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; doskocil@fch.vut.cz

\* Correspondence: enev@fch.vut.cz; Tel.: +420-541-149-483

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** A sequential chemical extraction with a defined series of eluotropic organic solvents with an increasing polarity (trichloromethane < ethyl acetate < acetone < acetonitrile < *n*-propanol < methanol) was performed on peat-bog humic acid. Six organic fractions were obtained and subjected to a physicochemical characterization utilizing methods of structural and compositional analysis. Advanced spectroscopic techniques such as Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR), total luminescence, and liquid-state <sup>13</sup>C NMR spectrometry were combined with elemental analysis of the organic fractions. In total, the procedure extracted about 57% (wt.) of the initial material; the individual fractions amounted from 1.1% to 19.7%. As expected, the apolar solvents preferentially released lipid-like components, while polar solvents provided organic fractions rich in oxygen-containing polar groups with structural parameters closer to the original humic material. The fraction extracted with acetonitrile shows distinct structural features with its lower aromaticity and high content of protein-like structural motifs. The last two—alcohol extracted—fractions show the higher content of carbohydrate residues and their specific (V-type) fluorescence suggests the presence of plant pigment residues. The extraction procedure is suggested for further studies as a simple but effective way to decrease the structural complexity of a humic material enabling its detail and more conclusive compositional characterization.

**Keywords:** transitional peat-bog; Eutric Histosol; humic acid; organic fraction; sequential chemical extraction; absorption parameters; FTIR; excitation-emission matrix; <sup>13</sup>C NMR; aromaticity; molecular weight



**Citation:** Enev, V.; Sedláček, P.; Kubíková, L.; Sovová, Š.; Doskočil, L.; Klučáková, M.; Pekař, M.

Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acids. *Agronomy* **2021**, *11*, 587. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030587>

Academic Editor: Maria Roulia

Received: 11 February 2021

Accepted: 17 March 2021

Published: 19 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Natural organic matter (by which only the non-living part should be understood here) is an extremely complex pool of organic substances. Traditionally, its non-aqueous part was and is studied after extraction by an alkaline agent from solid natural matrix-like soil, peat, or coal. The alkaline extraction is criticized by some for its potential change in the structure and composition of isolated matter [1] but this view is refuted by others [2] and this debate remains still open [3]. Although there are attempts, increasing in number, to study the natural organic matter directly in its natural environment, i.e., without extraction [4], isolation of organics from natural matrix remains an important part of natural organic matter research, which is motivated mainly by efforts to reduce the inevitable structural complexity of the natural organic matter before subjecting it to the intended analyzes.

Besides alkaline extractants, various alternatives have been proposed and tested which were believed to be gentler or more specific to a certain class of organic matter constituents [5]. Hayes [5] overviewed solvent systems used for the isolation of organic

components from soils. He states that, in contrast to the traditional mixture of aqueous base and pyrophosphate, organic solvents are much less used, usually because of problems with recovering solutes. As the important parameters of organic solvents, Hayes presents the relative permittivity, the dipole moment, and the ability to make and break hydrogen bonds. Parameters like the boiling point, density, or viscosity are said to be of minor importance for the isolation but may be relevant in the recovery of the extracted solutes. A useful concept for predicting solubility is the solubility parameter concept developed mainly by Hildebrand et al. [6] and Hansen [7].

The aforementioned review [5] reports mainly on experience with the dissolution of classically isolated humic acids (HAs) in various organic solvents. Nevertheless, there is also a long history of work focused on the extraction or fractionation of organic matter directly from its raw natural sources. Senesi et al. [8] were the first researchers to use sequential extraction using organic solvents of increasing polarity to separate directly from soil organic matter fractions and characterize them chemically and spectroscopically. Independently on the source soil, chemical and structural properties of the extracted organic fractions varied according to the progression of the solvent series, with some similarities between the two successive extracts. Later on, Piccolo [9] extracted humic substances from three soils with several dipolar aprotic solvents (dimethylsulfoxide, dimethylformamide, acetone) applied in mixtures with dilute HCl. These mixtures were selected based on a preceding study that found their highest extracting capacity among various organic solvents. It is believed that the high dipole moment of the selected solvents permits disruption of the intermolecular hydrogen bonding in a natural matrix and to separate humic substances by the formation of strong hydrogen bonds with the solvent. The presence of HCl should help to break the polyvalent salt bridges with the soil mineral constituents and to keep humic substances in the protonated form which supports their solubilization by hydrogen bonding. The used solvent mixtures revealed lower extracting efficiency in comparison to the traditional alkaline extractants, but their extracts were of higher purity. The extracts were less contaminated with silicate compounds, contained a higher amount of organic carbon and oxygen-containing functional groups, and were richer in aliphatic components [10].

Aside from the extraction studies using organic solvents, numerous efforts were made also with fractionation procedures based on the traditional alkaline extraction process. Li et al. [11] used the traditional alkaline extraction but in a repetitive way and obtained eight humic fractions from the peat sample. The authors observed large variations in molecular, chemical, and functional properties among these fractions. For example, the O/C atomic decreased from the first to the last fraction as well as the contents of oxygen-containing and aromatic functional groups. On contrary, the contents of aliphatic groups increased in the same direction. The authors suggested the existence of two major subunits in the extracted HAs. An aliphatic subunit is derived biogeochemically from lipid-rich plant cell constituents and an aromatic subunit originating from lignin or plant tissue materials. The aliphatic subunit is less soluble in alkaline solution whereas the aromatic subunit is easily extracted due to its very good solubility in bases. The aliphatic subunit should have a major impact on the binding of less or nonpolar pollutants because of its relatively hydrophobic character. Each of the isolated fractions is then a specific mixture of these two subunits. Furthermore, Olk [12] reported on basic fractionation of soil organic matter into an unbound (mobile) fraction and a fraction bound to polyvalent cations. The fractionation was performed during the standard alkali extraction by a specific ordering of the extraction and acid-wash steps. The unbound fraction was found to cycle faster under land use than the cation-bound fraction. Shirshova et al. [13] isolated five fractions of humic substances from soil using three protocols. The protocols differed in the soil pre-treatment with the benzene-methanol mixture and in the use of sulfonate or carboxylate resins as an additional soil-pretreatment agent or as extractants. Resin-extracted materials were richer in carboxylic and phenolic groups and exhibited a higher fluorescence emission maximum.

Recently, an elaborate sequential extraction technique based also on organic liquids was designed and called the humeomics approach [14]. Humeomics is based on the supramolecular conception of humic substances [15] and designed as a sequential extraction procedure that releases constituents of humic supramolecular aggregate bound by weak intermolecular forces and ester or ether linkages. During each fractionation step, aqueous and organic fractions are obtained which are characterized for their structure by advanced analytical techniques. The humeomics extraction was applied to humic substances previously isolated from soil by the standard alkaline extraction [14] as well as directly on soil [16]. The authors report that the humeomics approach extracted about 2.35% higher yields of extracted soil organic carbon than the traditional alkaline extraction.

In this work, we applied an original sequential fractionation approach using organic solvents of increasing polarity on peat HA and subjected the obtained organic fractions to a complex physicochemical characterization utilizing methods of structural and compositional analysis. Peat HA was selected as a representative of the commonly studied isolates from natural organic matter. Fractionation according to the polarity of its constituents is put forward as a logical, easy to implement but yet still underestimated tool for reducing the structural complexity of an organic matter from various sources and of various origins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Origin and Isolation of Humic Acids

The sample of peat used in this study was obtained from the peat-bog Branná (48°57'10.953" N; 14°48'20.587" E) located in the Trebon basin, South Bohemia, Czech Republic. The transitional peat was classified to the FAO soil classification system as a Eutric Histosol which corresponds to the Czech classification equivalent of an Organozem. The peat soil was characterized by dark brown to black color, advanced decomposition of original plant materials (i.e., sapric type of peatland), and bulk density of the homogenized sample was determined to be approximately 0.47 g mL<sup>-1</sup>. A representative sample was collected from the surface layer 0–30 cm. The peat was used after drying at 105 °C for 24 h then let to equilibrate with ambient laboratory atmosphere at about 25 °C which resulted in the final equilibrium moisture content of about 8.2% by weight. The ash content was determined using a Q50 TG analyzer (TA Instruments, New Castel, DE, USA). The residual weight at 1000 °C (i.e., ash content) was determined of 54.1% by weight.

The detailed information on the isolation procedure of humic acid (SBPHA) from the peat sample is described in the Supplementary Materials (see Page S1).

### 2.2. Sequential Chemical Extraction

The as-extracted peat HA was subjected to the sequential chemical fractionation using organic solvents of increasing polarities [17] in the following order: trichloromethane (TCM), ethyl acetate (EAC), acetone (ACE), acetonitrile (ACN), 1-propanol (PRO), and methanol (MET). The physicochemical properties of used organic solvents are shown in the Supplementary Materials (see Table S1).

Briefly, HA was homogenized and 3500 mg was then inserted in a thimble, and Soxhlet sequential extracted for 48–120 h. The organic fractions extracted from the peat HA were concentrated using a rotary evaporator, and the yellow to dark brown extracts were dried in a vacuum desiccator using anhydrous sodium sulfate as a drying medium. The solid organic fractions will be referred to in the following text using the abbreviations of solvents and a number indicating the order of the extraction step (i.e., from TCM1 to MET6).

### 2.3. Organic Fractions Analysis

#### 2.3.1. Elemental Composition

Thermogravimetry of the extracted organic fractions was performed using a Q5000 TG analyzer (TA Instruments, New Castel, DE, USA). Approximately 5 mg of sample was weighed into a platinum pan. During the analysis, the residual sample weight was recorded continuously (with ±0.1% mass accuracy) as the sample was heated at a heating

rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  from ambient temperature to  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  under air atmosphere. Moisture content was determined from the relative weight loss at  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , while the residual weight at  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ , was assigned to the ash content.

The relative content of organic elements in the solid organic fractions was determined using an EA 3000 CHNS/O analyzer (Euro Vector, Pavia, Italy). Approximately  $0.5\text{--}1.0\text{ mg}$  of the sample was weighed in a tin capsule, the capsule was packed and combusted at  $980\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the analyzer using oxygen as the combustion gas and helium as the carrier gas. Calibration of the determination of relative contents of carbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N), and sulfur (S) from the obtained gas chromatograms were provided using sulfanilamide as a reference standard sample. The relative oxygen content was calculated from the residual combustible mass, and the data obtained were corrected for moisture and ash content. The analysis was triplicated for each extracted fraction. The sulfur content was under the limit of detection ( $0.5\text{ wt.}\%$ ) in all tested samples (SBPHA and organic fractions).

### 2.3.2. UV/Vis Spectrometry

The UV/Vis absorption spectra of alkaline aqueous solutions of the individual organic fractions at a concentration of  $10\text{ mg L}^{-1}$  were recorded on Hitachi U-3900H double beam UV/Vis spectrometer (Hitachi, Tokyo, Japan) in the spectral range between 200 and 800 nm. Standard phosphate buffer ( $0.1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) was used as a solvent of the fractions as well as a blank solution.

### 2.3.3. ATR-FTIR Spectrometry

The Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR) technique was used for a deeper structural characterization of organic fractions. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the fractions were recorded on Nicolet iS50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the Attenuated Total Reflectance (ATR) measuring technique (single-reflection built-in diamond ATR crystal). All measurements were taken at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the spectral range  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  at  $4\text{ cm}^{-1}$  resolutions as an average of 256 scans. A background spectrum was collected from the clean dry surface of the ATR crystal in an ambient atmosphere. Raw absorption infrared spectra with no artificial processing (such as baseline or ATR corrections, atmospheric suppression) are presented and evaluated.

### 2.3.4. Fluorescence Spectrometry

For fluorescence analysis, organic fractions were dissolved at a concentration of  $10\text{ mg L}^{-1}$  of organic carbon in standard phosphate buffer ( $\text{pH} = 7$ ). All spectra were obtained by FluoroLog fluorescence spectrometer (Horiba Scientific, New Jersey, USA) with a scan speed of  $600\text{ nm min}^{-1}$ , using excitation and emission slit bandwidths of  $5\text{ nm}$ . Excitation emission matrix (EEM) spectra were obtained by scanning the emission and excitation wavelengths over the range  $300\text{--}600\text{ nm}$  and  $240\text{--}550\text{ nm}$ , respectively, with the wavelength increment of  $5\text{ nm}$ . The temperature of the sample cell was kept at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  during the measurement. The background EEM spectrum of ultra-pure water (Milli-Q) was recorded and subtracted from the EEM spectra of the analyzed samples to eliminate the spectral signs of 1st- and 2nd- order Raman scattering. Primary and secondary inner filter effects were corrected according to the method proposed by Lakowicz [18]. For this purpose, absorbance spectra of the analyzed samples were recorded on Hitachi U-3900H UV/Vis spectrometer.

### 2.3.5. Liquid-state $^{13}\text{C}$ NMR Spectroscopy

$^{13}\text{C}$  NMR spectra of the fractions were obtained using a liquid-state NMR technique using a Bruker Avance 500 DRX NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) with the working frequency of  $125.77\text{ MHz}$ . Organic fractions were dissolved at a concentration of  $20\text{ mg mL}^{-1}$  of organic carbon in  $0.5\text{ M NaOD}$ . All liquid-state spectra were obtained with the following settings of  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometer: temperature  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , number of scans 25 000, excitation pulse  $10.5\text{ }\mu\text{s}$ , acquisition time  $0.52\text{ s}$ , spectral width  $31\text{ 250 Hz}$  pulse repetition



delay 2.0 s and NMR-cell diameter 5 mm. The aromaticity  $f_a$  of the organic fraction was calculated from the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra as a ratio of the areas of two chemical-shift regions  $I_{(106-165\text{ ppm})}/I_{(0-165\text{ ppm})}$  [19] by integrating their relevant intensities.

### 2.3.6. Statistical Analysis

The relationships between the spectroscopic properties and other physicochemical indicators of organic fractions and peat HA were examined by principal component analysis (PCA). The main goal of statistical data processing was to find similarities and dissimilarities between the organic fractions and the original unfractionated peat HA. Origin 2019b (OriginLab, Northampton, MA, USA) was used to process data for PCA and create a bi-plot graph i.e., two-dimensional projection.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Yields, Ash Contents, and Elemental Analysis

The extraction yields, elemental composition, ash content, and atomic ratios (H/C, O/C, and C/N) of individual organic fractions, sequentially extracted from peat HA, are presented in Table 1, together with the relevant properties of the unfractionated HA.

**Table 1.** Extraction yields, ash contents, elemental compositions, and atomic ratios of organic fractions extracted from peat humic acid (HA). Relevant parameters of compositional analysis for original HA (SBPHA) are included for comparison.

	Yield	Ash	C	H	N	O	H/C	O/C	N/C
	(wt.%) <sup>1</sup>	(wt.%) <sup>1</sup>	(at.%) <sup>2</sup>						
SBPHA	-	0.7	35.00 ± 0.24	49.84 ± 0.16	1.12 ± 0.09	14.03	1.42	0.40	0.032
TCM1	3.76	0.07 ± 0.02	30.83 ± 0.11	67.10 ± 0.32	0.15 ± 0.02	1.92	2.18	0.06	0.005
EAC2	1.10	1.81 ± 0.09	33.30 ± 0.16	65.65 ± 0.28	0.63 ± 0.05	0.42	1.97	0.01	0.019
ACE3	13.00	0.34 ± 0.04	43.78 ± 0.20	34.62 ± 0.13	0.82 ± 0.05	20.77	0.79	0.47	0.019
ACN4	7.83	4.10 ± 0.08	30.52 ± 0.34	49.87 ± 0.19	3.30 ± 0.10	16.31	1.63	0.53	0.108
PRO5	19.74	0.83 ± 0.17	37.22 ± 0.21	44.23 ± 0.36	0.94 ± 0.07	17.61	1.19	0.47	0.025
MET6	11.91	2.99 ± 0.12	34.62 ± 0.37	46.18 ± 0.22	1.43 ± 0.12	17.77	1.33	0.51	0.041

<sup>1</sup> weight content calculated on a moisture-free basis. <sup>2</sup> atomic percentages calculated on a moisture-free and ash-free basis. Values of ash content and elemental compositions are means ± SD ( $n = 3$ ).

The extraction yield of organic fractions ranged from 1.1% to 19.7% (relative to the initial weight of the unfractionated HA) varying with the polarity of the organic agent used. The highest extraction yields (13.0% and 19.7%, respectively) were obtained for organic fractions extracted with acetone (ACE3) and 1-propanol (PRO5). In contrast, the lowest yield of organic compounds (1.1%) was obtained in the case of the organic fraction EAC2 extracted using ethyl acetate, which may be caused by the similar values of polarity indices of the first two applied solvents (TCM and EAC). The enhanced release of organic constituents from HA to more polar extractants is not surprising with respect to HAs' high relative content of polar structural constituents rich in the oxygen-containing functional groups (such as carboxylic, phenolic, and carbonyl groups). It should be noted that the applied extraction procedure most likely releases only free organic compounds and/or weakly bound molecules from the complex organic matrix as indicated by the significant amount of an insoluble residuum in Soxhlet thimble after completion of the last extraction step. The content of residual, not-extracted organic compounds in peat HA was 43% (relative to the initial weight of unfractionated HA).

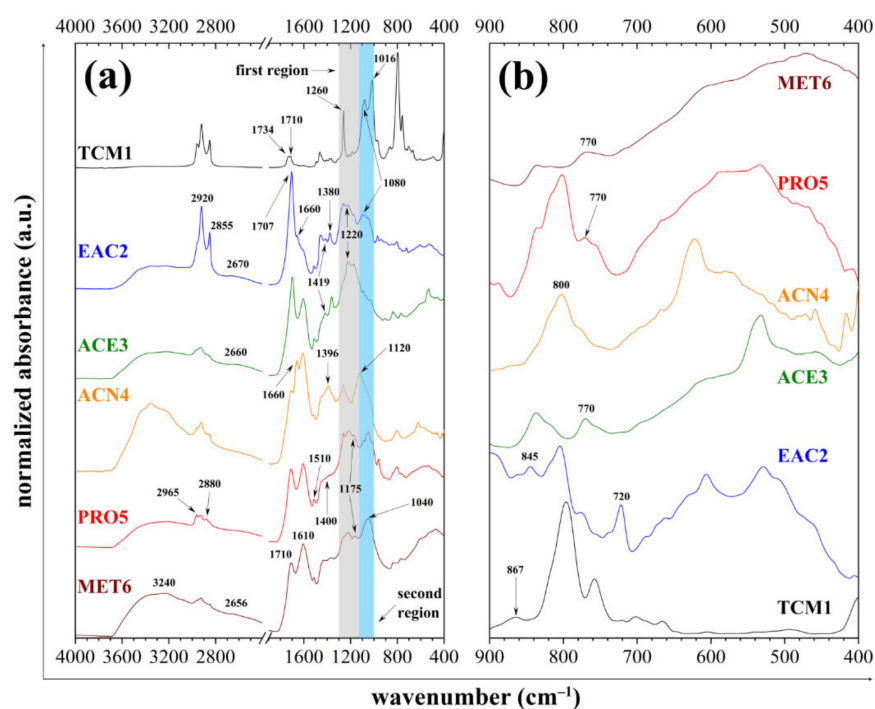
The organic elemental compositions of all obtained fractions are summarized in Table 1 in the form of an atomic percentage (calculated from the determined weight content based on dry-ash free organic content). Generally, the carbon content increased unevenly with increasing the polarity of the organic agent, while the hydrogen content decreased. The highest atomic content of carbon (43.78%) was found for organic fraction extracted using acetone (ACE3). Nitrogen represents a minor component of all obtained fractions and its content ranged from 0.15% to 3.30%, deviating on both sides from the nitrogen content of

the original HA (1.12%). As expected, non-polar organic fractions (i.e., TCM1 and EAC2) were relatively poor in oxygen. In general, the elemental composition of these two fractions was similar to that of lipid compounds extracted from various lignite and peat materials in other studies [20,21].

Atomic ratios are often used as basic markers of the main structural character of the analyzed material. For instance, H/C atomic ratio is considered an indicator of aliphaticity. For the isolated peat HA fractions, the value of the H/C ratio varied within a range from 0.79 to 2.18. The highest values of this parameter were obtained for the first two fractions (TCM1 and EAC2), which could be attributed to their prevailing aliphatic character and content of compounds with long carbon chains such as fatty acids and their esters. In contrast, the lower values of the H/C atomic ratio determined for the other samples indicate the presence of organic compounds with a higher degree of aromaticity.

As another fundamental compositional marker, O/C atomic ratio reflects the amount of oxygen-containing functional groups (e.g., carboxylic, phenolic, and carbonyl) in an organic matter. For our organic fractions, the determined values of the O/C ratio covered a broader range (0.06 to 0.53) than those reported in the literature [13]. In general, higher values of the O/C atomic ratio in humic substances indicate a high relative content of oxygenated compounds such as aromatic carboxylic acids, phenols, and/or polar substituted carboxylic compounds (e.g., amides). For the samples extracted using acetonitrile and methanol (ACN4 and MET6), a combination of the highest determined O/C ratios with relatively high H/C can be attributed to a presence of oxygen bonded alkyl groups, such as alkyl ethers and esters originated from lignin and/or polysaccharides residues. The O/C values of the most polar fractions are also in good agreement with the O/C ratio of the unfractionated HA material (0.40).

Finally, N/C atomic ratio reflects the amount of nitrogen in organic fractions and is commonly used as a proxy for the maturity of the organic material. Increasing N/C is usually attributed to a decrease in C rates in the decomposition process and higher values of the ratio are hence related to higher humified materials and vice-versa [22]. The N/C ratio values vary significantly among the analyzed HA fractions, ranging from 0.005 to 0.108, while the original HA show an N/C ratio of 0.032. While the lowest content of nitrogenous constituents was found for the fraction isolated with the most apolar solvent (TCM1), the highest content of nitrogen was detected in the fractions ACN4 and MET6. As far as these fractions were relatively rich also in oxygen, the nitrogen is likely introduced in these fractions mainly in form of amide groups of the protein-like compounds. This result is in good agreement with the FTIR spectrum (ACN4) listed in Figure 1. The van Krevelen diagram of atomic H/C ratio versus atomic O/C ratio for the original HA and organic fractions is provided in Figure S3 (Supplementary Materials).



**Figure 1.** Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR) spectra of organic fractions extracted from peat HA, (a) spectral range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  and (b) spectral range of 900–400  $\text{cm}^{-1}$  for the visualization of less intense absorption bands.

### 3.2. UV/Vis Spectrometry

No distinctive spectral features were observed in the measured UV/Vis spectra of all tested samples. In other words, the curves of UV/Vis spectra were characterized without visible local maxima and/or shoulders whereas their absorbance quasi-exponentially increases with decreasing wavelength (not shown). The UV-spectral behavior of organic fractions in this study was rather different from the behavior reported for organic extracts isolated from commercial humic substances where absorption peaks and/or shoulders in the 200–350 nm wavelengths range were reported [23].

All organic fractions obtained and analyzed in this study absorb significantly in the ultraviolet region. Significant absorption in this part of the electromagnetic radiation indicates that the vast majority of the types of chromophores include aromatic rings with various degrees and types of substitution [24]. In the context of basic molecular structure, these are compounds such as monosubstituted and polysubstituted phenolic substances derived from lignin residues, tannins, hydroxyl- or polyhydroxy- coumarins, etc. and various monoaromatic and/or polyaromatic acids [25]. Although UV/Vis spectra of humic substances, because of their characteristic featureless nature, might be considered of limited usefulness for a detailed interpretation of the molecular structure, the number of scientific studies have already illustrated that advanced analysis of these spectra, such as determination and interpretation of specific absorption parameters, may contribute significantly to understanding chemical structure and properties of complex organic compounds (e.g., humic substances, dissolved organic matter) and that they may suitably complement the information obtained using other analytical techniques such as potentiometric titration, light scattering methods, NMR, etc. [5,26,27]. Therefore, selected absorption ratios ( $E_2/E_4$  and  $E_{ET}/E_{Bz}$ ) and  $SUVA_{254}$  parameters were used to characterize organic fractions obtained in this study.

Well known and traditionally used  $E_4/E_6$  ratio (the ratio of absorbance at 465 nm to that 665 nm), which is also referred to as color coefficient  $Q_{4/6}$  [28], reflects the degree of aromaticity and the average molecular weight of humic substances of different origins [29–31]. Unfortunately, the absorption in the 550–700 nm wavelength region of

the fractions studied was too low to allow calculation of the  $E_4/E_6$  ratio, thus the  $E_2/E_4$  ratio (the ratio of absorbance at 265 nm to that at 465 nm) was used in analyzing the fractions, as it is consistent with the  $E_4/E_6$  [32]. As can be seen in Table 2, the  $E_2/E_4$  ratio values ranged from 7.18 to 12.00 and followed a downward trend with increasing polarity of the organic solvent. Furthermore,  $E_2/E_4$  ratios likely indicate that high-molecular fractions (i.e., humic-like compounds) were extracted only with the most polar solvents (from ACN4 to MET6). Concerning the lowest  $E_2/E_4$  ratio determined for the unfractionated HA (5.53), it could be deduced that all the organic solvents preferentially extract less aromatic organic constituents with a lower molecular weight. Nevertheless, as far as the value of  $E_2/E_4$  ratio is increased also by the specific absorption of  $-C=O$  groups [33], it cannot be used as a reasonable marker of aromaticity and molecular weight among organic materials with widely differing content of oxygen-containing groups.

**Table 2.** Parameters calculated from UV/Vis and FTIR spectra.

	UV/Vis Ratios		UV Parameter	FTIR Intensity Ratios	
	$E_{ET}/E_{Bz}$	$E_2/E_4$	SUVA <sub>254</sub> <sup>1</sup>	$I_{Ar}/I_{COOH}$ <sup>2</sup>	$I_{CH2}/I_{CH3}$ <sup>3</sup>
SBPHA	0.74 ± 0.06	5.53 ± 0.12	5.68	1.26	1.06
TCM1	0.51 ± 0.02	11.87 ± 0.15	0.24	0.22	1.81
EAC2	0.70 ± 0.02	12.00 ± 0.06	0.66	0.34	1.87
ACE3	0.74 ± 0.01	9.77 ± 0.11	5.89	0.80	1.11
ACN4	0.66 ± 0.00	9.53 ± 0.10	2.03	1.44	1.11
PRO5	0.74 ± 0.04	7.64 ± 0.14	6.40	1.06	0.98
MET6	0.83 ± 0.02	7.18 ± 0.22	5.79	1.21	1.04

Values of UV/Vis ratios are means ± SD ( $n = 3$ ). <sup>1</sup> calculated as absorbance at 254 nm divided by the concentration of total dissolved organic carbon in the solution (in mg L<sup>-1</sup>). <sup>2</sup> FTIR ratio calculated as the ratio of intensity at 1610 cm<sup>-1</sup> to an intensity at 1710 cm<sup>-1</sup>. <sup>3</sup> FTIR ratio calculated as the ratio of intensity at 2920 cm<sup>-1</sup> to an intensity at 2965 cm<sup>-1</sup>.

Therefore, we calculated also the SUVA<sub>254</sub> parameter (the ratio of absorbance at 254 nm to total organic carbon) which was found to positively correlate with the aromaticity and molecular weight of humic substances without the interference of the carbonyl content [32]. In our study, the values of the SUVA<sub>254</sub> ranged from 0.24 to 6.40 (see Table 2) and followed an upward trend with increasing polarity of the organic solvent, except for the fraction ACN4. These results agree with  $E_2/E_4$  in that significantly lower aromaticity is indicated for the organic fractions which were isolated in the first two steps of the extraction procedure. On the other hand, the organic fractions extracted with the acetone and alcohol solvents (ACE3, PRO5, and MET6) show SUVA<sub>254</sub> values close to that of the SBPHA (5.68) indicated a similar degree of aromaticity and molecular weight as the source HA. Interestingly, a significantly lower SUVA<sub>254</sub> value of ACN4 fraction indicates lower aromaticity of this fraction, not revealed by  $E_2/E_4$ . In this perspective, SUVA<sub>254</sub> seems to be a more suitable proxy for the determination of aromaticity of the obtained organic fractions.

The  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio (the ratio of absorbance at 253 nm to that at 220 nm) is higher for compounds in which the aromatic structural units are predominantly substituted with oxygen-containing functional groups (e.g., hydroxyl, carbonyl, ester, and especially carboxyl groups), whereas lower values are associated with aliphatic substituents [24,34]. For the studied organic fractions, the  $E_{ET}/E_{Bz}$  ratio values ranged from 0.51 to 0.83 (see Table 2). Fractions isolated between the second and the fifth extraction step show  $E_{ET}/E_{Bz}$  values close to that of the unfractionated HA (0.74) indicating a similar type of substituents on the aromatic structures as distributed in the original peat HA. On the other hand, the organic fractions extracted with the least polar (TCM1) and the most polar (MET6) solvent, show  $E_{ET}/E_{Bz}$  values indicating considerably higher content of aliphatic (TCM1) and oxygen-containing (MET6) substituents, respectively, as compared to the original HA.

The optical parameters used in this work or numerous others proposed in the literature [32–35] do not represent the only way of extracting structural information from UV/Vis

spectra of humic substances and their constituents. For instance, second-order derivative UV/Vis spectra provide enhanced spectral resolution [36] and may hence be useful in the evaluation of weak and broad absorption bands such as the perylenequinone-type bands appearing in Vis spectra of humic acids as a result of fungal activity contributing to the humification process [37].

### 3.3. ATR-FTIR Spectrometry

The ATR-FTIR technique was chosen as it requires no mechanical pressing treatment of the sample which is necessary for the KBr transmission technique and, therefore, less opportunity is given for experimental artifacts such as pressure-induced deprotonation and/or decarboxylation of acidic functional groups [38]. The ATR-FTIR spectra of organic fractions are presented in Figure 1a,b. Interpretation of their absorption bands has been carried out according to the literature data [8,39,40].

The spectra of all fractions show several common features but also relevant differences. The first set of spectral attributes includes bands assigned to O-containing functional groups: (a) The broad absorption band centered at about  $3240\text{ cm}^{-1}$  corresponds to O–H stretching of various functional groups (including the carboxylic), which are connected with an intermolecular hydrogen-bond. This band is well pronounced in FTIR spectra of all extracts except for the one extracted with the least polar solvent (TCM1) where the absorption is markedly suppressed. (b) A sharp band with variable intensity located at around  $1710\text{ cm}^{-1}$  is attributed to symmetric C=O stretching in carboxylic groups. This band is common for all extracted fractions, whereby in the spectrum of TCM1 it is accompanied also by the band at  $1734\text{ cm}^{-1}$  assigned carbonyl stretching in esters. The presence of the protonated carboxylic groups is often manifested also by a broad shoulder centered at about  $2660\text{ cm}^{-1}$  resulting from the O–H stretching vibrations of the hydrogen-bonded dimers of COOH [41]. This weak band/shoulder is recognizable in fractions EAC2, ACE3, PRO5, and MET6, while it is reduced in the TCM1 and ACN4 fractions, where the formation of hydrogen-bonded dimers of carboxylic acids is reduced by their partial conversion to esters and carboxylates (see part (d) of this paragraph), respectively. (c) A characteristic band at  $1660\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to stretching C=O groups in secondary amides (amide I) of the protein-like structures. This band is apparent only in the spectra of EAC2 and ACN4 samples. The assignment of this absorption band to amide groups is supported by the presence of accompanying amide II bands ( $1570\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$ ) in deconvoluted spectra in the overlapping region  $1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  (see Figure S4 in Supplementary Materials) (d) The deformation vibrations of carboxylate groups occur in the spectra as a weak band and/or shoulder at around  $1395 \pm 5\text{ cm}^{-1}$  [42]. This absorption band is well-identified only in the spectra of ACN4 and, considering the high relative ash content of this sample, it probably represents the presence of metal chelates in this fraction. (e) A weak band or shoulder at  $1420\text{ cm}^{-1}$  can be ascribed to C–O–H in-plane bending in carboxylic groups. This band is easily recognized in the less polar fractions (TCM1, EAC2, and ACE3) while it is overlapped with other oxygen-containing functional groups in the more polar ones (ACN4, PRO5, and MET6). (f) Further differences among the isolated fractions concerning O-containing groups can be deduced from the deeper evaluation of fingerprint regions  $1300\text{--}1125\text{ cm}^{-1}$  and  $1120\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ . The first region (marked grey in Figure 1a) is characterized by a sharp and intensive C–O stretching band at  $1260\text{ cm}^{-1}$  (aryl ethers) and relatively intensive bands and/or shoulders at  $1220\text{ cm}^{-1}$  (C–O stretching and O–H bending of carboxylic groups, C–O stretching in phenoxy structures and ethers) and  $1175\text{ cm}^{-1}$  (C–O stretching of phenols and ethers). Unlike other samples, ACN4 did not contain the vibration at  $1220\text{ cm}^{-1}$ , as a result of the lower content of protonated carboxyls. The latter fingerprint zone (marked blue in Figure 1a) is characterized by two bands at  $1120\text{ cm}^{-1}$  and  $1080\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the C–O–C vibration in alkyl ethers, and to the C–O stretching of secondary alcohols. The first of these bands was found only in the ACN4 sample. The band at  $1040\text{ cm}^{-1}$  is the most intensive in the spectra of organic fractions extracted by alcohols (PRO5, MET6) due to the higher extracted amount of polysaccharide-like substances. The prominent band



at  $1016\text{ cm}^{-1}$  which can be attributed to asymmetric C–C–O stretching in alkyl ethers [43] is visible only in the spectrum of TCM1 and is accompanied by symmetric stretching absorption at  $867\text{ cm}^{-1}$ .

The second set of spectral features that are in common for all the fractions refer to their content of aliphatic molecular moieties. (a) The relative content of aliphatic chains is evaluated primarily in the  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  spectral range. The presence of aliphatic groups is revealed by the bands at  $2920\text{ cm}^{-1}$  and  $2855\text{ cm}^{-1}$  which are attributed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups, respectively. These bands are the most dominant in TCM1 and EAC2 but are also relatively intense in ACN4 samples. Additional bands at  $2965\text{ cm}^{-1}$  and  $2880\text{ cm}^{-1}$  were ascribed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methyl groups. These bands are well recognizable mainly in the spectrum of the PRO5 sample, occurring as a weak band and/or shoulder in the rest of the samples. (b) The deformation vibrations of the  $\text{--CH}_2\text{--}$  and  $\text{--CH}_3$  groups at  $1465\text{ cm}^{-1}$  and  $1380\text{ cm}^{-1}$ , respectively, only occur in the TCM1 and EAC2 spectra. (c) The presence of long carbon chains with more than four atoms (e.g., in fatty acids) was revealed by the band at  $720\text{ cm}^{-1}$  which is ascribed to C–H in-plane bending of methylene groups. This band was found only for TCM1 and EAC2 samples, which supports the expectations that the least polar solvents would be the most efficient in the extraction of long-chain lipidic structures from the complex matrix of HA.

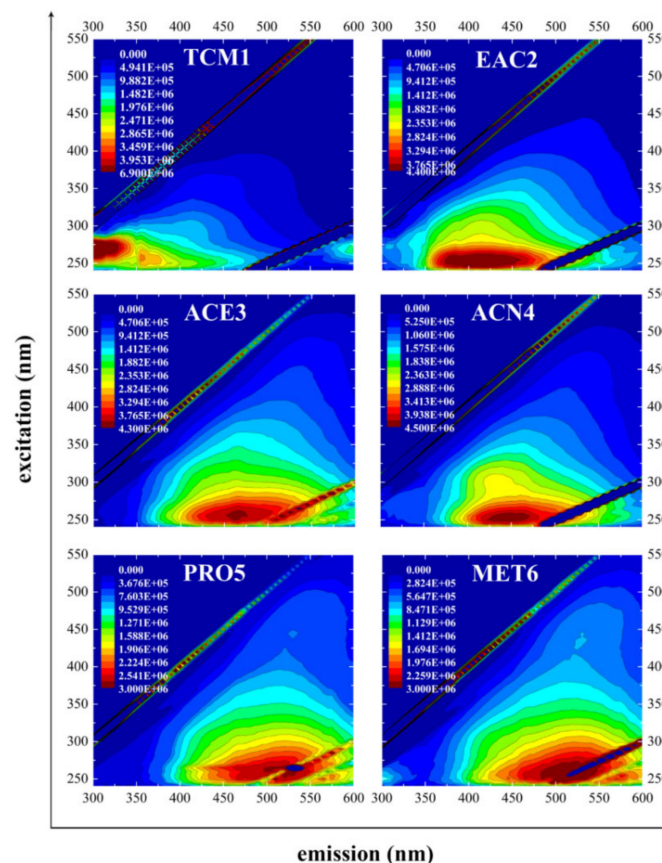
The third set of spectral absorptions that can be attributed to aromatic structures comprises: (a) the relatively intense symmetric ring stretching band occurring at  $1610\text{ cm}^{-1}$ , which was observed only as a very weak shoulder in the spectrum of TCM1 sample, indicating low aromaticity of this fraction; (b) Another characteristic aromatic band is located at  $1511\text{ cm}^{-1}$ , due to the aromatic C=C stretching of lignin residues. While this band is again apparently absent in the spectrum of TCM1, its relative intensity is comparable for all other fractions; (c) Out-of-plane C–H deformation bands were found in the  $870\text{--}750\text{ cm}^{-1}$  region. The position of these peaks is used as a specific marker of the type of substitution of the aromatics, as far as it can distinguish aromatic structures with isolated hydrogens with aromatic carbon ( $870\text{ cm}^{-1}$ ), two and/or three adjacent hydrogens per ring ( $845\text{ cm}^{-1}$  and  $800\text{ cm}^{-1}$ ), and four adjacent hydrogens ( $770\text{ cm}^{-1}$  and  $750\text{ cm}^{-1}$ ) [41,44]. Spectral bands that can be assigned to two and more adjacent aromatic hydrogens are apparent in the spectra of all fractions except for TCM1 (see Figure 1b), di-substituted aromatic rings being prevailing in fractions ACE3 and MET6 while tri- and/or tetra-substituted aromatic rings in EAC2, PRO5, and MET6. It should be noted that significant absorption in the spectral region of  $800\text{ cm}^{-1}$  to  $750\text{ cm}^{-1}$  can be found also for TCM1 fraction. Nevertheless, the above discussed spectral evidence of low content of aromatics in the sample indicates that this vibration should be assigned to some other structural motifs (out-of-plane C–H bending in lactones, C–Cl stretching in residual solvent).

Aside from the qualitative information on the structure of the extracted fractions, results of FTIR spectroscopy can also be used for semiquantitative analysis of the content of the main structural groups. The degree of carboxylic content in humic substances is usually represented by the  $I_{Ar}/I_{COOH}$  ratio (the ratio of the intensity at  $1610\text{ cm}^{-1}$  to the intensity at  $1710\text{ cm}^{-1}$ ) [44]. The value of this ratio (Table 2) is the lowest for the organic fraction extracted by chloroform (TCM1). Nevertheless, the usability of this value for evaluating the carboxylic content quantitatively is questionable for fractions with significantly reduced aromaticity like it can be seen for TCM1 (note very weak absorption band at  $1610\text{ cm}^{-1}$  for this fraction) and also for ACN4, where a significant portion of carboxyl groups occurs in the form of carboxylates. Among the other fractions which all show significant absorption bands both at  $1710\text{ cm}^{-1}$  and  $1610\text{ cm}^{-1}$ , the  $I_{Ar}/I_{COOH}$  ratio shows that the relative content of COOH groups (normalized on the content of aromatics) decreases in the following order of samples: EAC2 > ACE3 > PRO5 > MET6. Similarly, aliphatic structural moieties can be evaluated in a semiquantitative way by the  $I_{CH_2}/I_{CH_3}$  ratio (the ratio of the intensity at  $2920\text{ cm}^{-1}$  to the intensity at  $2965\text{ cm}^{-1}$ ), which is used to estimate the length and degree of branching of aliphatic chains. The intensity ratio (Table 2) shows that longer (which

agrees with the presence of  $720\text{ cm}^{-1}$  band) and less branched aliphatic chains are obtained in TCM1 and EAC2 samples compared with the other organic fractions.

### 3.4. Fluorescence Spectrometry

The EEM spectra and contour maps of the studied fractions are shown in Figure 2 (Rayleigh scattering peaks appear in the form of diagonal lines). In general, the shorter emission wavelengths and greater fluorescence intensity measured in EEM spectra belong to the fluorescence of simple aromatic structures and lower molecular weight organic components, while a shift of the fluorescence maximum to higher wavelengths indicates the presence of condensed aromatic structural units and electron-withdrawing substituents [45]. The emission maximum of organic compounds ranging from 340 to about 430 nm could be associated with three- and/or four-ring aromatic structures, four or more aromatic rings per structural unit of a fluorophore result in the light emission at longer wavelengths (i.e., from 400–500 nm). Furthermore, several authors observed in the EEM spectra of terrestrial HAs unique fluorescence domains located at even longer excitation and emission wavelengths in the visible spectral region [46–48], which are interpreted as fluorophores derived from phytochlorin (chlorophyll degradation by-product). Contemporary classification of the types of fluorophore domains in humic substances [49,50] is summarized in Table S2 (Supplementary Materials).



**Figure 2.** Excitation–emission matrix (EEM) spectra of organic fractions extracted from peat HA.

Organic fractions, isolated and analyzed in this study, contain fluorophores typical for fluorescence of caustobiooliths (e.g., lignite, leonardite, and peat) and soil humic substances [51–53]. The excitation–emission wavelength pairs (EEWP) of the main peaks in the EEM spectra, their fluorescence intensity values, and assignments to the specific fluorophore classes are provided in Table 3. It can be seen that, except for the TCM1 fraction, excitation–emission characteristics of the primary fluorescence maxima of all other fractions

(250–265/415–505 nm) corresponds to the “A”—domain fluorophores typical for fulvic acids and dissolved organic matter (DOM). It means that isolated fluorophores excited in the UVC region are the main contributors to the fluorescence of all these fractions (from EAC2 to MET6). On the other hand, the fluorescence maximum of the fraction isolated with the least polar solvent (TCM1) lie within the “B” region which is most often assigned to the fluorescence of tyrosine in protein-like structures contained in the organic matter [54,55]. However, because no significant content of protein residues was revealed in the TCM1 fraction by the elemental and FTIR analyses, it is more likely that the blue shift of the emission maximum is caused rather by lower molecular weight and electron detaining ester substituents [56].

**Table 3.** Positions of excitation-emission wavelength pairs for fluorescence domains and values of fluorescence intensities for organic fractions and original peat HA.

	Fluorescence Peak Region									
	A		C		V		B		H	
	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sub>1</sub>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sub>1</sub>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sub>1</sub>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sub>1</sub>	Ex/Em (nm)	$I_F$ (CPS) <sub>1</sub>
SBPHA	255/495	1.77								
TCM1							270/305	6.86	255/355	3.23
EAC2 <sup>2</sup>	250/415	4.36					270/305	0.99		
ACE3	255/465	4.22								
ACN4	255/445	4.49	300/435	2.74			270/315	0.98		
PRO5	265/500	2.76			445/530	0.80				
MET6	260/505	2.57			435/525	0.72			250/300	0.99

<sup>1</sup>  $I_F \times 10^6$  CPS (counts per second) of fluorescence peaks. <sup>2</sup> The C domain (humic-like) was observed in the EEM spectrum of the EAC2 sample as less pronounced shoulder.

Furthermore, from a detailed evaluation of the EEM spectra, secondary fluorescence maxima representing other types of fluorophores contained in the structure of isolated fractions can also be revealed (see the spectral cut-outs presented in Figure S5 in Supplementary Materials). As can be seen in Table 3, B-type fluorophores were determined in the EEM spectra of EAC2 and ACN4 fractions. One of the possible assignments of this fluorescence peak is represented by tyrosine-like fluorophores, which is also to some extent supported by results of elemental analysis (higher relative content of N) and FTIR (presence of characteristic amide I band) indicating a presence of protein residues. Tyrosine-like fluorophores were also recently found in DOM fractions isolated from the tropical peatlands [57]. Nevertheless, direct identification of these particular structural moieties in these fractions is beyond the resolving power of the methods used in this study and should be resolved in future work.

For the first (TCM1) and the last (MET6) extracted fractions, an additional fluorescence maximum was found with the EEWP in the range 250–255/300–355 nm. This emission is often assigned to the soluble microbial by-product-like compounds [58,59]. Doskočil et al. [21] in their work, focused on EEM spectra of lipids isolated from various coal basins, has introduced the term “peak H” attributed to fluorescence band if its maximum is situated in the UVA region with an excitation wavelength at about 250 nm. No structural model of fluorophore H has yet been proposed. Nevertheless, this signal can in general be attributed to simple aromatic structures (without condensed rings) with electron-donating substituents, such as the alkyl or methoxyl groups identified in TCM1 and MET6, respectively, by the other techniques.

Humic-like fluorophores referred to as the C-domain fluorophores (300–380/400–500 nm) are also typical for humic substances and DOM originating from peats, soils, and natural waters [60]. Fluorescence in this spectral domain reveals as a well-distinguished peak for ACN4, while it forms a less pronounced shoulder on the primary fluorescence peak in the spectrum of EAC2. Cao and Jiang observed this type of fluorescence in EEM spectra

of low molecular weight fractions of humic acids from bulk Leonardite HA [61]. Some authors [52,62] have suggested that the humic-like fluorophore can be attributed to the presence of phenolic acid derivatives and other substituted phenolic units originating from lignin, hydroxycoumarin-like, and/or quinone-like structures which originated from degraded terrestrial biomaterials such as plant tissue. Furthermore, McKnight et al. [63] reported in a study on spectrofluorometric characterization of DOM that the C may be interpreted such as domains from the autochthonous microbial process. We hence conclude that the C-domain fluorescence in the analyzed organic fractions is probably related to autonomous low-molecular fluorophores formed by aromatic systems highly substituted with reactive functional groups, especially –COOH substituents.

In the EEM spectra of the two fractions extracted with alcohols (PRO5 and MET6), fluorescence maxima having excitation wavelengths greater than 400 nm were also found. Fluorescence peaks in this spectral region are referred to as V and/or  $\alpha$  [53,62] and usually occur in lignite, peat, and humus-rich soils. In general, for the fluorescence maxima with an emission wavelength greater than 470 nm it is suggested that the fluorescence originates from a transition of electronic charge from one region of a molecular species to another and/or from one molecular species to another rather than from independent fluorophores [64]. For PRO5 and MET6 fraction, the fluorescence peaks located in the V region thus probably reflect a presence of high-molecular fluorophores (e.g., linearly condensed networks of aromatic rings) substituted with electron-withdrawing functional groups. This is in good agreement with the results of UV/Vis (see the high values of SUVA<sub>254</sub> and E<sub>ET</sub>/E<sub>BZ</sub> and their discussion in Section 3.2) and with the high content of carboxylic groups confirmed by FTIR and NMR. The V-region fluorescence was not apparent in the EEM matrix of original HA used in this study (see Figure S2), nevertheless, as it was previously observed for another HAs isolated from a similar natural source [65], it may be suggested that the structural moieties responsible for fluorescence of peat HAs in the V region are preferentially extracted into the polar alcoholic fractions.

### 3.5. Liquid-State <sup>13</sup>C NMR Spectrometry

As the last part of the spectrometric study, the <sup>13</sup>C NMR spectra of the isolated organic fractions (see Figure S6 in the Supplementary Materials) were measured in the liquid state. EAC2 and ACN4 fractions were not analyzed by this technique because of their too low extraction yields. Relative distribution of individual carbon types typical for the natural organic matter was obtained from the integration of the raw spectra in the corresponding regions of resonance: alkyl carbon (0–45 ppm), carbohydrates and/or peptides (45–106 ppm); aromatic carbon (106–145 ppm), phenolic carbon (145–165 ppm), carboxylic carbon (165–190 ppm) and carbonyl carbon (190–220 ppm) [19,66]. The results of the integration are provided in Table 4.

**Table 4.** Average distribution of individual carbon types and calculated aromaticity index ( $f_a$ ) for the studied organic fractions from the liquid-state <sup>13</sup>C NMR spectra.

Organic Fractions	Average Distribution of Individual Carbon Types (%)						$(f_a)$ <sup>1</sup>
	0–45 ppm	45–106 ppm	106–145 ppm	145–165 ppm	165–190 ppm	190–220 ppm	
TCM1	78	8	8	2	3	1	0.10
ACE3	23	19	36	11	9	2	0.53
PRO5	24	22	33	9	10	2	0.48
MET6	16	30	31	8	13	2	0.46

<sup>1</sup> Aromaticity index calculated as the ratio of the intensity at 106–165 ppm to the intensity at 0–165 ppm.

As expected, the relative content of alkyl carbon, manifested in the spectra as methyl groups (20–22 ppm) and/or methylene groups (27, 31, and 40 ppm), varies within a broad range among the analyzed fractions, being the highest (78%) for the fraction extracted by the least polar solvent (TCM1). The opposite was found for the relative content of hydrophilic components such as polysaccharide residues and protein-like compounds (relative area

in 45–106 ppm) which was lowest for the TCM1 fraction while the highest for the most polar solvent used (MET6). Detailed analysis of the region of *O*-alkyl and peptide carbon resonances reveals the presence of quaternary carbons, methine groups (lignin, cellulose, and/or hemicellulose residues), and  $\alpha$ -carbons (amino acids and/or polysaccharides). A common feature for all analyzed fractions is the signal at 56 ppm which may be attributed to methoxyl or amide groups [11]. Bearing in mind quite low overall N content, it can be expected that the signal most likely originates from the methoxyl groups in lignin and suberin residues. Another signal at about 63 ppm, preferentially ascribed to oxygen bonded methylene groups, was found only in the spectra of the alcoholic extract (PRO5 and MET6).

The region of chemical shifts between 106 and 165 ppm reflects the content and structural composition of aromatic components. The relative integrated area in this region is, again, the lowest (10%) for the least polar fraction TMC1 while its value is comparable (39–47%) for other analyzed fractions. The aromaticity index  $f_a$  (i.e., the ratio of the integrated areas in 106–165 ppm and 0–165 ppm, respectively) is usually used as a more accurate quantitative parameter expressing sample aromaticity. As can be seen in Table 4, also this parameter confirms comparable aromaticity of all but the first extracted fraction. From the qualitative point of view, spectra of all these fractions with higher aromaticity (ACE3, PRO5, and MET6) include signals typical for lignin residues [67]: (a) A sharp and intensive signal at 115 ppm corresponds to coniferyl alcohol and the intensive signal at about 130 ppm to 4-hydroxycinnamyl alcohol. (b) The presence of sinapyl and coniferyl units is further revealed by the signals at 145 and 148 ppm, which are attributed to Ar–O–R and Ar–O–CH<sub>3</sub> structural moieties [68]. (c) Phenolic groups are manifested by a distinctive signal at 150 ppm [69].

The presence of carboxylic groups in the structure of the fraction is manifested in the <sup>13</sup>C NMR spectra by two bands in the range of chemical shifts 172–175 ppm. The relative signal of carbon in carboxylic groups increased gradually with increasing polarity of the extraction agent (in the range of 3–13%). Finally, the relative integrated area in the range of chemical shifts characteristic for carbonyl carbon (190–220 ppm) was comparably low for all the analyzed fractions.

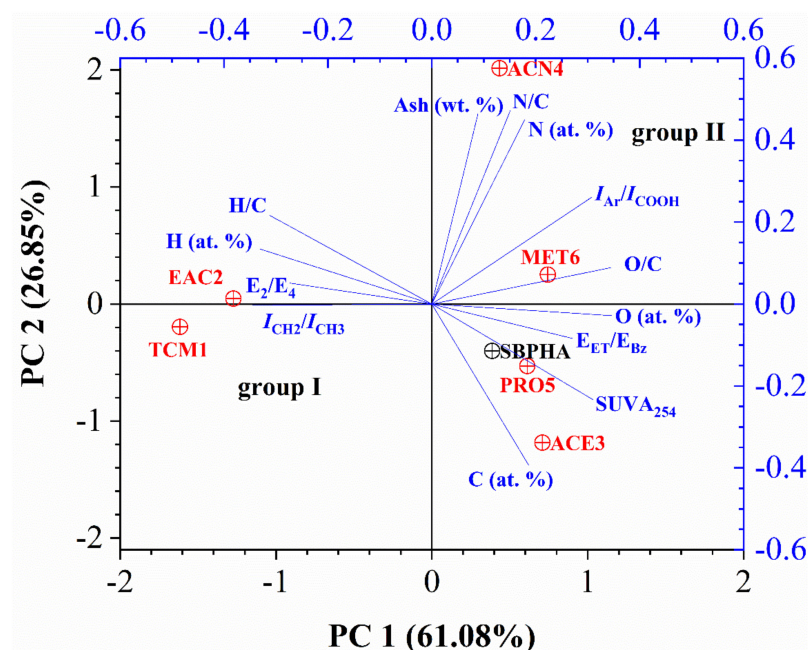
### 3.6. Statistical Analysis

The specific structural and compositional parameters provided by the individual physicochemical and spectroscopic assays were further subjected to statistical analysis using the principal component analysis (PCA) method. The dimension of the 13 input variables was reduced by PCA into two principal components with eigenvalues higher than one. These two principal components composed 88.0% of the variability of the original data set, of which 61.1% falls on the first (PC1) and 26.9% on the second principal component (PC2), respectively. Visual representation of the results of PCA is provided in form of a two-dimensional factor plane of principal components PC1 and PC2 in Figure 3.

It is observed from the bi-plot that *O*/*C* atomic ratio had the highest positive loading on PC1 while the opposite trend was observed for relative hydrogen content and *I*CH<sub>2</sub>/*I*CH<sub>3</sub> ratio. In the left-side quadrants of the loading bi-plot, there are projected parameters that indicate the presence of aliphatic structures with long carbon chains poor in *O*- and/or *N*-containing functional groups. On the other hand, on the right side of the loading bi-plot can be found projections of parameters that reflect the presence of heteroatom elements as well as the aromaticity of the sample.

The PCA bi-plot in Figure 3 shows that the PC1 component provides the clear separation of the non-polar organic fractions (samples TCM1 and EAC2, designed as Group I in Figure 3) from the other organic fractions and also from the original peat HA (samples ACE3 to MET6, and SBPHA, designed as Group II). Evidently, the group I fractions can be characterized by structural markers of aliphatic substances, whereas group II gathers structural and compositional parameters of the typical building-blocks for the humic substances.





**Figure 3.** Projection of characterized organic fractions and original peat HA using PCA.

The second principal component (PC2) provides further separation of the polar organic fractions mainly according to their elemental composition. It can be seen that polar organic fractions PRO5 and MET6 are projected near to zero value of PC2 forming a cluster with the original humic material (SBPHA). On the other hand, the fraction extracted with acetonitrile (ACN4) is separated from the others due to its higher ash (wt. %) and nitrogen (at. %) content. This is in good agreement with the conclusion that this fraction is distinctive with its high content of polypeptide-like structures such as tyrosine-like structures and/or microbial activity by-products.

#### 4. Conclusions

The results of our work support the current view that humic acids still represent a complex mixture of separable fractions with specific structural and physicochemical properties. For the analyzed peat-bog humic acid, it was confirmed that the individual fractions, isolated by the proposed polarity-resolved fractionation technique, are mutually different concerning their origin, molecular weight, aromaticity, and the content and composition of heteroatomic functional groups. In particular, the fractions extracted with the most apolar solvents (trichloromethane and ethyl acetate), as expected, show the structural features characteristic for basically lipidic compounds (low aromaticity, low oxygen, and nitrogen content, high  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  ratio), while the other fractions are in general more aromatic and richer in polar (mainly oxygen-containing) groups. Interestingly, among these more polar fractions, the fraction extracted with acetonitrile stands at a unique position with its surprisingly lower aromaticity and higher content of protein-like structural motifs. Furthermore, the last two-alcohol extracted-fractions (PRO5 and MET6) also show some mutual structural features, mainly the higher content of carbohydrate residues (as confirmed by FTIR and NMR) and content of specific (V-type) fluorophores which are often associated with plant pigments residues in humic acids.

The experimental study presented in this paper hence represents a pilot demonstration of a simple but useful approach to a structural analysis of complex heterogeneous organic matrices such as humic substances. Nevertheless, a systematic follow-up study is still needed to evaluate the general usability and overall benefit of this experimental approach. In this pilot study, we used only one HA sample, which represents the single type of organic material that originated from a particular soil system with specific humification conditions. Therefore, to be able to critically evaluate experimental limitations of the approach and

to obtain structural information that could be generalized to a wider range of humics, it is essential to focus the follow-up work on a comparative study performed with humic substances differing in their types (fulvic and humic acids, humins) and origins (terrestrial soil, aquatic).

Moreover, also the methodology proposed here is still open to further modifications and improvements. Above all, solid residues remaining after the last extraction step should also be subjected to detail structural and compositional analysis to provide a conclusive description of the structural impacts of the extraction process. Furthermore, one of the general aims of the study was to contribute to refining the current notion of the supramolecular structure of humic substances. In this work, we focused on how this could be managed by reducing the level of the structural complexity of humic substances followed by a separate analysis of individual groups of molecular constituents. Nevertheless, for a more complex understanding of how these constituents are bound in the HA matrix, this analytic step should be supplemented with the “synthetic” perspective where the compositional and structural parameters of the obtained fractions were synthesized with respect to their relative contents and these reassembled characteristics were compared with those of the parental humic material.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/3/587/s1>, Figure S1: ATR-FTIR and DRIFT spectrum of SBPHA, Figure S2: EEM spectrum of HA isolated from South Bohemian peat (SBPHA), Figure S3: Van Krevelen diagram of organic fractions and original SBPHA, Figure S4: Deconvolution of the overlapping region of ATR-FTIR spectra at 1800–1500 cm<sup>-1</sup>, Figure S5: EEM spectral cut-outs showing secondary fluorescence maxima, Figure S6: Liquid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of the studied organic fractions extracted from peat HA, Table S1: List of fundamental physicochemical properties of organic solvents used for extraction of organic fractions, Table S2: Summary of fluorescence domains characteristic of humic substances and/or dissolved organic matter.

**Author Contributions:** Investigation, methodology, writing—original draft, conceptualization, V.E. and P.S.; investigation, formal analysis, L.K., Š.S., L.D., and M.K.; writing—review and editing, supervision, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All discussed and analyzed data is contained within the article or Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Materials Research Centre is supported by the Ministry of Education, Czech Republic (project No. LO1211).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

1. Kleber, M.; Lehmann, J. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. *J. Environ. Qual.* **2019**, *48*, 207–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Olk, D.C.; Bloom, P.R.; Perdue, E.M.; McKnight, D.M.; Chen, Y.; Fahrenhorst, A.; Senesi, N.; Chin, Y.P.; Schmitt-Kopplin, P.; Hertkorn, N.; et al. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters. *J. Environ. Qual.* **2019**, *48*, 217–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Myneni, S.C.B. Chemistry of Natural Organic Matter—The Next Step: Commentary on a humic substances debate. *J. Environ. Qual.* **2019**, *48*, 233–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hu, Y.; Zheng, Q.; Noll, L.; Zhang, S.; Wanek, W. Direct measurement of the in situ decomposition of microbial-derived soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* **2020**, *141*, 107660. [[CrossRef](#)]
5. Hayes, M.H.B. Solvent systems for the isolation of organic components from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2006**, *70*, 986–994. [[CrossRef](#)]

6. Hildebrand, J.H.; Scott, R.L. *Regular Solutions*, 1st ed.; Prentice-Hall, Inc.: Englewood Cliffe, NJ, USA, 1962; p. 180.
7. Hansen, C.M. *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007; p. 544.
8. Senesi, N.; Testini, C.; Polemio, M. Chemical and spectroscopic characterization of soil organic matter fractions isolated by sequential extraction procedure. *J. Soil Sci.* **1983**, *34*, 801–813. [[CrossRef](#)]
9. Piccolo, A. Characteristic of soil humic extracts obtained by some organic and inorganic solvents and purified by HCl-HF treatment. *Soil Sci.* **1988**, *146*, 418–426. [[CrossRef](#)]
10. Fujitake, N.; Kusumato, A.; Tsukamoto, M.; Kawahigashi, M.; Suzuki, T.; Otsuka, H. Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs. I. Yield and particle size distribution. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1998**, *44*, 253–260. [[CrossRef](#)]
11. Li, L.; Huang, W.; Peng, P.; Sheng, G.; Fu, J. Chemical and molecular heterogeneity of humic acids repetitively extracted from a peat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2003**, *67*, 740–746. [[CrossRef](#)]
12. Oik, D.C. A Chemical fractionation for structure-function relations of soil organic matter in nutrient cycling. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2006**, *70*, 1013–1022. [[CrossRef](#)]
13. Shirshova, L.T.; Ghabbour, E.A.; Davies, G. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma* **2006**, *133*, 204–216. [[CrossRef](#)]
14. Nebbioso, A.; Piccolo, A. Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1187–1199. [[CrossRef](#)]
15. Vinci, G.; Mazzei, P.; Drosos, M.; Zaccone, C.; Piccolo, A. Molecular characterization of ombrotrophic peats by humeomics. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2020**, *7*, 18. [[CrossRef](#)]
16. Drosos, M.; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Vinci, G.; Spaccini, R.; Piccolo, A. A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Sci. Total Environ.* **2017**, *586*, 807–816. [[CrossRef](#)]
17. Reichardt, C.; Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 4th ed.; WILEY-VCH: Weinheim, Germany, 2010; p. 718.
18. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Baltimore, MD, USA, 2006; p. 954.
19. Novák, F.; Šestauberová, M.; Hrabal, R. Structural features of lignohumic acids. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1093*, 179–185. [[CrossRef](#)]
20. Thomas, J.D.R. Chemistry of peat bitumen: Fractionation and infra-red studies. *J. Appl. Chem.* **2007**, *12*, 289–294. [[CrossRef](#)]
21. Doskočil, L.; Enev, V.; Pekař, M.; Wasserbauer, J. The spectrometric characterization of lipids extracted from lignite samples from various coal basins. *Org. Geochem.* **2016**, *95*, 34–40. [[CrossRef](#)]
22. Martins, T.; Saab, S.D.C.; Milori, D.M.B.P.; Brinatti, A.M.; Rosa, J.A.; Cassaro, F.A.M.; Pires, L.F. Soil organic matter humification under different tillage managements evaluated by Laser Induced Fluorescence (LIF) and C/N ratio. *Soil Tillage Res.* **2011**, *111*, 231–235. [[CrossRef](#)]
23. Ma, X.; Green, S.A. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1425–1434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Korshin, G.V.; Li, C.-W.; Benjamin, M.M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Res.* **1997**, *31*, 1787–1795. [[CrossRef](#)]
25. del Vecchio, R.; Blough, N.V. On the origin of the optical properties of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 3885–3891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Baigorri, R.; Fuentes, M.; González-Gaitano, G.; García-Mina, J.M. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *302*, 301–306. [[CrossRef](#)]
27. Song, J.; Jin, X.; Wang, X.C.; Jin, P. Preferential binding properties of carboxyl and hydroxyl groups with aluminium salts for humic acid removal. *Chemosphere* **2019**, *234*, 478–487. [[CrossRef](#)]
28. Boguta, P.; Sokołowska, Z. Zinc binding to fulvic acids: Assessing the impact of pH, metal concentrations and chemical properties of fulvic acids on the mechanism and stability of formed soluble complexes. *Molecules* **2020**, *25*, 1297. [[CrossRef](#)]
29. Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, *41*, 352–358. [[CrossRef](#)]
30. Li, P.; Hur, J. Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2017**, *47*, 131–154. [[CrossRef](#)]
31. Zykova, M.V.; Schepetkin, I.A.; Belousov, M.V.; Krivoshechekov, S.V.; Logvinova, L.A.; Bratishko, K.A.; Yusubov, M.S.; Romanenko, S.V.; Quinn, M.T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules* **2018**, *23*, 753. [[CrossRef](#)]
32. Rodríguez, F.J.; Schlenger, P.; García-Valverde, M. Monitoring changes in the structure and properties of humic substances following ozonation using UV-Vis, FTIR and <sup>1</sup>H NMR techniques. *Sci. Total Environ.* **2016**, *541*, 623–637. [[CrossRef](#)]
33. Chen, J.; Gu, B.; LeBoeuf, E.; Pan, H.; Dai, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **2002**, *48*, 59–68. [[CrossRef](#)]
34. Maeng, S.K.; Timmes, T.C.; Kim, H.-C. Characterization of EfOM fraction responsible for short-term fouling in ultrafiltration. *Sep. Sci. Technol.* **2015**, *50*, 2697–2707. [[CrossRef](#)]
35. Tinoco, P.; Almendros, G.; González-Vila, F.J.; Sanz, J.; González-Pérez, J.A. Revisiting molecular characteristics responsive for the aromaticity of soil humic acids. *J. Soils Sediments* **2015**, *15*, 781–791. [[CrossRef](#)]
36. Yakimenko, O.; Khundzhua, D.; Izosimov, A.; Yuzhakov, V.; Patsaeva, S. Source indicator of commercial humic products: UV-Vis and fluorescence proxies. *J. Soils Sediments* **2018**, *18*, 1279–1291. [[CrossRef](#)]



37. Kumada, K.; Sato, O. Characteristics of the green fraction of P type humic acid. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **1980**, *26*, 309–316. [[CrossRef](#)]
38. Davis, W.M.; Erickson, C.L.; Johnston, C.T.; Delfino, J.J.; Porter, J.E. Quantitative fourier transform infrared spectroscopic investigation humic substance functional group composition. *Chemosphere* **1999**, *38*, 2913–2928. [[CrossRef](#)]
39. Senesi, N.; Sipos, S. Molecular weight distribution, analytical and spectroscopic characterization of humic fractions sequentially isolated by organic solvents from a brown coal humic acid. *Org. Geochem.* **1985**, *8*, 157–162. [[CrossRef](#)]
40. Stuart, B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2004; p. 244.
41. Baes, A.U.; Bloom, P.R. Diffuse reflectance and transmission fourier transform infrared (DRIFT) spectroscopy of humic and fulvic acids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1989**, *53*, 695–700. [[CrossRef](#)]
42. Terkhi, M.C.; Taleb, F.; Gossart, P.; Semmoud, A.; Addou, A. Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids. *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, *198*, 205–214. [[CrossRef](#)]
43. Tatzber, M.; Stemmer, M.; Spiegel, H.; Katzlberger, C.; Haberhauer, G.; Mentler, A.; Gerzabek, M.H. FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extraction procedures. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2007**, *170*, 522–529. [[CrossRef](#)]
44. Hanc, A.; Enev, V.; Hrebeckova, T.; Klucakova, M.; Pekar, M. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *Waste Manag.* **2019**, *99*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Senesi, N.; Miano, T.M.; Provenzano, M.R.; Brunetti, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* **1991**, *152*, 259–271. [[CrossRef](#)]
46. Enev, V.; Pospíšilová, L.; Klučáková, M.; Liptaj, T.; Doskočil, L. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil Water Res.* **2014**, *9*, 9–17. [[CrossRef](#)]
47. Stylianou, S.K.; Katsoyiannis, I.A.; Ernst, M.; Zouboulis, A.I. Impact of O<sub>3</sub> or O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment via a membrane contacting system on the composition and characteristics of the natural organic matter of surface waters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 12246–12255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gao, J.-F.; Dou, S.; Wang, Z.-G. Structural analysis of humic acid in soil at different corn straw returning modes through fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *Int. J. Anal. Chem.* **2019**, *2019*. [[CrossRef](#)]
49. Sierra, M.M.D.; Giovanela, M.; Parlanti, E.; Soriano-Sierra, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* **2005**, *58*, 715–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Liu, S.; Benedetti, M.F.; Han, W.; Korshin, G.V. Comparison of the properties of standard soil and aquatic fulvic and humic acids based on the data of differential absorbance and fluorescence spectroscopy. *Chemosphere* **2020**, *261*, 128189. [[CrossRef](#)]
51. 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. *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 243–256. [[CrossRef](#)]
52. Rodríguez, F.J.; Schlenger, P.; García-Valverde, M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Sci. Total Environ.* **2014**, *476–477*, 718–730. [[CrossRef](#)]
53. Doskočil, L.; Burdíkova-Szewieczkova, J.; Enev, V.; Kalina, L.; Wasserbauer, J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel* **2018**, *213*, 123–132. [[CrossRef](#)]
54. Fellman, J.B.; Hood, E.; Spencer, R.G.M. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnol. Oceanogr.* **2010**, *55*, 2452–2462. [[CrossRef](#)]
55. Yang, L.; Hur, J.; Zhuang, W. Occurrence and behaviors of fluorescence EEM-PARAFAC components in drinking water and wastewater treatment systems and their applications: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 6500–6510. [[CrossRef](#)]
56. Yu, M.-D.; Xi, B.-D.; Zhu, Z.-Q.; Zhang, L.; Yang, C.; Geng, C.-M.; He, X.-S. Fate and removal of aromatic organic matter upon a combined leachate treatment process. *Chem. Eng. J.* **2020**, *401*, 126157. [[CrossRef](#)]
57. Zhou, Y.; Martin, P.; Müller, M. Composition and cycling of dissolved organic matter from tropical peatlands of coastal Sarawak, Borneo, revealed by fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeosciences* **2019**, *16*, 2733–2749. [[CrossRef](#)]
58. Chen, W.; Westerhoff, P.; Leenheer, J.A.; Booksh, K. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 5701–5710. [[CrossRef](#)]
59. Sun, J.; Guo, L.; Li, Q.; Zhao, Y.; Gao, M.; She, Z.; Jin, C. Three-dimensional fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy with regional integration analysis for assessing waste sludge hydrolysis at different pretreated temperatures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 24061–24067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Birdwell, J.E.; Engel, A.S. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.* **2010**, *41*, 270–280. [[CrossRef](#)]
61. Cao, J.; Jiang, J. Reducing capacities in continuously released low molecular weight fractions from bulk humic acids. *J. Environ. Manag.* **2019**, *244*, 172–179. [[CrossRef](#)]
62. Coble, P.G.; Lead, J.; Baker, A.; Reynolds, D.M.; Spencer, R.G.M. *Aquatic Organic Matter Fluorescence*, 1st ed.; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2014; p. 418.
63. McKnight, D.M.; Boyer, E.W.; Westerhoff, P.K.; Doran, P.T.; Kulbe, T.; Andersen, D.T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 38–48. [[CrossRef](#)]
64. Boyle, E.S.; Guerriero, N.; Thiallet, A.; del Vecchio, R.; Blough, N.V. Optical properties of humic substances and CDOM: Relation to structure. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 2262–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Boguta, P.; D’Orazio, V.; Sokołowska, Z.; Senesi, N. Effects of selected chemical and physicochemical properties of humic acids from peat soils on their interaction mechanisms with copper ions at various pHs. *J. Geochem. Explor.* **2016**, *168*, 119–126. [[CrossRef](#)]
66. Conte, P.; Piccolo, A.; van Lagen, B.; Buurman, P.; de Jager, P.A. Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid- and solid-state <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Geoderma* **1997**, *80*, 339–352. [[CrossRef](#)]
67. Khatami, S.; Deng, Y.; Tien, M.; Hatcher, P.G. Formation of water-soluble organic matter through fungal degradation of lignin. *Org. Geochem.* **2019**, *135*, 64–70. [[CrossRef](#)]
68. Hatcher, P.G.; Waggoner, D.; Chen, H. Evidence for the existence of humic acids in peat soils based on solid-state <sup>13</sup>C NMR. *J. Environ. Qual.* **2019**, *48*, 1571–1577. [[CrossRef](#)]
69. Schnitzer, M. Soil organic matter—The next 75 years. *Soil Sci.* **1991**, *151*, 41–58. [[CrossRef](#)]



Jak již bylo na mnoha místech této habilitační práce uvedeno, tak do dnešní doby nepanuje mezi jednotlivými vědeckými týmy všeobecný konsenzus vyplývající z tak elementární záležitosti, jakou je struktura těchto biokoloidních sloučenin. Na tomto místě je nutné říci, že tato pluralita nevychází z faktického „rozluštění“ struktury HL, nýbrž z pouhého pohledu, zda tyto sloučeniny můžeme považovat za biomakromolekuly, které lze po jistém zjednodušení připodobnit např. *ligninu*, anebo se jedná o aglomeráty jednoduchých konstitučních jednotek (stavebních kamenů), které jsou stabilizovány do *supramolekulárního uskupení* pomocí slabých vazebných interakcí. „Těžkou vahou“ a zastáncem supramolekulární teorie HL je italský chemik A. Piccolo, který jako první definoval supramolekulární strukturu těchto unikátních sloučenin. V nedávné době byla vědeckým týmem A. Piccola vyvinuta frakcionační metoda, která vychází z postupné destabilizace inter- a intramolekulárních vazeb, přičemž v průběhu frakcionačního postupu jsou kovalentní vazby hybridizace uhlíku  $sp^3$  nedotčeny. Nicméně, od druhého kroku tohoto frakcionačního postupu jsou postupně štěpeny kovalentní vazby v následujícím pořadí: (i) kovalentní vazby ve slabě vázaných esterech; (ii) kovalentní vazby v silně vázaných esterech; (iii) kovalentní vazby etherů tzn. glykosidické vazby v polysacharidech. V tuto chvíli nás může napadnout myšlenka, zda je nevyhnutelně nutné při frakcionaci HK resp. postupném snížení její molekulární heterogenity přistoupit ke specifické hydrolýze výše zmíněných kovalentních vazeb, které jsou nedotknutelnými až dogmatickými aspekty vyplývajícími z makromolekulárního strukturního modelu.

V této souvislosti jsme se pokusili o navržení jiného frakcionačního postupu, který by neobnášel štěpení kovalentních vazeb, ani těch, které výše zmíněný autor pokládá za slabé. V této části komentáře můžeme podat důkaz o šetrném extrakčním postupu, který lze využít k významnému snížení molekulární heterogenity HK. Konkrétně, této problematice jsme se věnovali v odborné publikaci s názvem: „Polarity-Based Sequential Extraction as a Simple Tool to Reveal the Structural Complexity of Humic Acid“.

Metodický přístup, který byl použit v této odborné práci lze rozdělit na dvě hlavní cesty: (i) vhodné zvolení resp. definice použité eluotropní řady organických rozpouštědel, která ve své podstatě zahrnovala nejen hodnoty relativního polaritního indexu navrženého Reichardtem & Weltonem<sup>1</sup>, ale i další fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou hustota, teplota varu, dielektrická konstanta a v neposlední řadě i dipólový moment; (ii) následně byly vytipovány vhodné instrumentální techniky strukturní a kompoziční analýzy. Blíže se tedy jednalo o pokročilé spektrometrické techniky, jako je infračervená spektrometrie, steady-state fluorescenční spektrometrie a <sup>13</sup>C NMR spektrometrie v kapalném stavu tzn. liquid-state. Nicméně je zapotřebí říci, že bez použití termických metod (termogravimetrie a elementární analýzy) by byla celková synergie interpretace dosažených výsledků značně ztížena, a do jisté míry i „vědecky“ nekomfortní.

Vzorek rašelinové HK byl podroben sekvenční frakcionaci za použití eluotropní řady organických rozpouštědel se vzrůstající polaritou tzn.: trichlormethan (TCM) < ethylacetát (EAC) < aceton (ACE) < acetonitril (ACN) < *n*-propanol (PRO) < methanol

---

<sup>1</sup> Reichardt, C.; Welton, T. Solvents and solvent effects in organic chemistry, 4th ed.; WILEY-VCH, Weinheim, 2010, p. 718.

(MET). Jinými slovy, za použití Soxhletovy extrakce bylo získáno celkem šest organických frakcí, které jsou archetypálně spojeny s použitým organickým rozpouštědlem. Výtěžky extrakce jednotlivých organických frakcí se pohybovaly poměrně v širokém rozmezí, avšak nejvyšší extrakční účinnosti bylo dosaženo v případě acetonu a *n*-propanolu. Na tomto místě je nutné říci, že tímto extrakčním postupem, který nikterak neatakuje kovalentní vazby mezi jednotlivými stavebními kameny spoluvytvářejícími supramolekulární asociáty HK, jako jsou residua ligninu, celulózy, hemi-celulózy a dalších biopolymerů, bylo celkově extrahováno 57 hm. % výchozí organické hmoty rašeliništní HK. V této souvislosti se nabízí otázka, zda by ještě došlo k významnému snížení molekulární heterogenity residuální HK, pokud bychom na tento vzorek aplikovali další kolo výše zmíněného frakcionačního postupu. V tuto chvíli je zřejmé, že tato doposud nezodpovězené otázka se může stát námětem další experimentální činnosti.

V další části tohoto komentáře se omezíme na diskuzi těch nejzajímavějších experimentálních výsledků, které by mohli být námětem dalších potencionálních publikací či určovat směr dalšího vědeckého bádání.

V této souvislosti se ukázalo, že nepostradatelným ukazatelem manifestujícím aromaticitu a střední molekulovou hmotnost  $\overline{M}_r$ , a to nejen extrahovaných organických frakcí, ale i původní a residuální HK je specifická hodnota parametru SUVA<sub>254</sub>. Tento absorpční koeficient je ve velmi dobré shodě s vypočteným indexem aromaticity  $f_a$ , který vychází z exaktně získaných dat <sup>13</sup>C NMR spektrometrie. Pokud bychom měli doložit výše zmíněné tvrzení, tak koeficient determinace lineárního regresního modelu dosahuje mezi těmito strukturálními parametry hodnotu blížící se 0,97. Jinými slovy, absorpční parametr SUVA<sub>254</sub> se tak stává „levnějším“ a podstatně rychlejším indikátorem výše zmíněných vlastností HL a jejich organických frakcí, pokud si uvědomíme ekonomickou, experimentální a časovou náročnost, která je doprovázena měřením liquid-state <sup>13</sup>C NMR spekter.

Jak již bylo zmíněno v hlavní části této habilitační práce, tak poměrně často v případě interpretace infračervených spekter se dostáváme do svízelných situací, kdy nejsme schopni jednoznačně určit a identifikovat příslušné absorpční pásy, a to zejména v důsledku jejich silného překryvu. Ani v této odborné práci bychom se neobešli bez dekonvoluce překrývajících se absorpčních pásů, které se nacházejí v oblasti vlnočtů 1800–1500 cm<sup>-1</sup>. V této oblasti nastává absorpce nesčetných typů funkčních skupin a strukturálních jednotek, jako jsou: (i) alkyl- a aryl-estery; (ii) alkyl- a aryl-karboxylové kyseliny; (iii) karboxylové skupiny různého původu; (iv) aromáty; (v) a hlavně sekundární amidy, jejichž přítomnost v infračervených spektrech HL a jejich organických frakcí nelze jednoznačně určit. V této souvislosti se nám podařilo identifikovat celou řadu absorpčních pásů poukazujících na přítomnost bílkovinných residuí v organické frakci ACN4, jež se mimo jiné projevovala i v EEM spektrech tohoto vzorku.

Jak je doloženo experimentálními výsledky fluorescenční spektrometrie, tak použitá metoda extrakce vede k významnému snížení heterogenity původní HK, jejímž faktickým projevem je přítomnost specifických fluorescenčních domén, které nebyly v originálním vzorku HK přítomné anebo měly povahu méně výrazných fluorescenčních

ramen. Konkrétně se jedná o méně typické fluorofory, jako jsou V – *humic-like*, B ( $\gamma$ ) – *tyrosin-like* a H – *soluble microbial by-product-like*.

V EEM spektrech organických frakcí PRO5 a MET6 byla identifikována fluorescenční doména V – *humic-like*, která byla lokalizována v oblasti vlnových délek 435–445/525–530 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). Původ této fluorescenční domény je odvozen od specifických rostlinných pigmentů, jako jsou produkty degradace chlorofylu např. fytochlorin. Na druhé straně, v EEM spektrech organických frakcí TCM1 a MET6 byla identifikována fluorescenční doména H – *soluble microbial by-product-like*, která byla lokalizována v oblasti nejnižších vlnových délek excitace tzn. 250–255 nm. Tento fluorofor je považován za indikátor mikrobiální aktivity v průběhu geneze HL a DOM. V tuto chvíli je nadmíru jasné, že sekvenční frakcionace na základě rozdílné polaritativy organických rozpouštědel v sobě ukrývá značný potenciál stát se alternativním postupem k dekompoziční metodě PARAFAC (*Parallel factor analysis*), která je zobecněnou teorií multikomponentální analýzy PCA.

Tato studie představuje pilotní ukázkou jednoduchého, avšak užitečného experimentálního přístupu ke strukturní analýze, tak komplexních a heterogenních organických sloučenin, jakými jsou bezesporu HK. Jelikož se jedná o prvotní experimentální přístup, tak by bylo vhodné systematicky ověřit jeho obecnou použitelnost a celkový přínos, a to především v souvislosti s dalšími HL, které jsou diferenciovány např. místem a způsobem jejich geneze. Jinými slovy, tento extrakční postup je stále otevřen dalším metodickým úpravám a vylepšením. Tato cesta může být spatřena v podrobné strukturní a kompoziční analýze residuálního vzorku, který zůstává v patroně Soxhletova přístroje po posledním extrakčním kroku.

Nicméně pro komplexnější pochopení, jakým způsobem jsou vázány či stabilizovány jednotlivé stavební kameny v těchto přírodních maticích, by měl být tento experimentální přístup doplněn o další fyzikálně-chemický pohled, který lze jednoznačně spatřit v tzv. „syntetické“ perspektivě. V důsledku by to znamenalo, pokusit se o následnou kompozici strukturních parametrů připadajících jednotlivým organickým frakcím, a to i s ohledem na jejich relativní zastoupení v původní matici. Jinými slovy, tyto nově složené charakteristiky by byly porovnány s původním vzorkem HK.

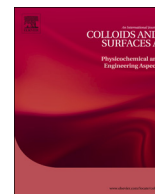
# ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels

**Vojtěch Enev**, Petr Sedláček, Sabína Jarábková, Tomáš Velcer, Miloslav Pekař

*Colloids and Surfaces A-physicochemical And Engineering Aspects*, **2019**, 575, 1–9.

Impact factor (2020): 4,539

JCR Category: Chemistry, Physical-Scie – Q2



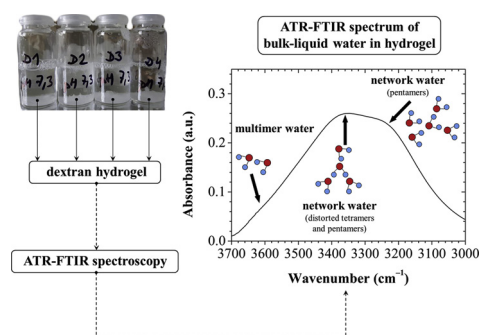
# ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels



Vojtěch Enev<sup>1</sup>, Petr Sedláček<sup>1</sup>, Sabína Jarábková, Tomáš Velcer, Miloslav Pekař\*

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, Brno, 612 00, Czech Republic

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Hydration  
Hydrogels  
Infrared spectroscopy  
Thermogravimetry  
Water

## ABSTRACT

Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA) were evaluated as useful techniques to study bulk and hydration water in hydrogels. Hydrogels formed by cationized dextran (DEAE-dextran) and anionic surfactants were used as model materials. The IR technique was applied both on fresh samples and on dehydrating samples during the evaporation process. Not only overall IR spectra but especially the deconvoluted OH band was used in the analysis. IR spectroscopy was shown to provide especially structural information which is nicely complemented by the mainly quantitative data provided by TGA. Significant differences between the dehydration processes for the model gels with different surfactants were revealed. The DEAE-dextran-based hydrogels were characterized by a continuous step dehydration with different drying rates in the initial evaporation period. Three different water subpopulations were identified in all model hydrogel samples. Water molecules in these hydrogels containing a higher concentration of surfactants demonstrated a more ordered hydrogen network, which was formed by subpopulations of pentamers, tetramers and/or distorted pentamers.

## 1. Introduction

Hydrogels are well-known colloids in which the dispersion medium (phase) is formed by water (aqueous solution) and the dispersed phase is in a solid state formed usually by chains of hydrophilic polymers

forming the hydrogel network. Hydrogels find applications in a broad range of products such as pharmaceutical, food, cosmetic, agricultural or horticultural products [1,2]. Biocompatible hydrogels are important materials for drug delivery or tissue engineering where they are applied as soft contact lenses, artificial implants, actuators, wound healing

\* Corresponding author.

E-mail address: [pekar@fch.vut.cz](mailto:pekar@fch.vut.cz) (M. Pekař).

<sup>1</sup> These authors contributed equally as first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.089>

Received 27 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 30 April 2019

Available online 03 May 2019

0927-7757/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



dressings, etc. [3,4]. Hydrogel applications benefit from the high content of water which is embedded in their solid-like matrix. Due to the high water content, the transport of low molecular weight compounds in hydrogels is not greatly slower than in liquids but hydrogels retain shapes and can be easily deformed, cut, or even injected [5]. Hydrogels are viscoelastic and therefore moderate deformations of their structural network are reversible (recoverable).

Water content is among the principal characteristics of any hydrogel. This basic and gross parameter can be supplied by a more detailed insight into the water state and binding within the hydrogel meshwork. NMR spectroscopy is a fine tool to address this task [6,7] but even IR spectroscopy, which is much less expensive and in its ATR version easily applicable, can provide valuable information. The IR absorption bands of water (especially those in the range of 3800–3000  $\text{cm}^{-1}$ ) can provide a molecular-level information related to the involvement of water subpopulations in specific structural arrangements such as water multimers and the water network. Recently, two ways for determining these water subpopulations have been successfully utilized in describing the hydration of polymers: Fourier self-deconvolution and fitting the measured envelope band by the summation of usually three Gaussian components using non-linear fitting tools (i.e. data analysis software) [8–10].

In our previous work, we have focused on preparation and characterization of hydrogels prepared by mixing oppositely charged polyelectrolyte with surfactant in the micellar form [11]. Experimental data suggests that physical crosslinks in these materials are formed preferably by electrostatic interactions between surfactant micelles and charged groups on the polyelectrolyte. Furthermore, by means of a rheological analysis of the gels we have shown that their viscoelasticity can be controlled in a broad range by the molecular weight of the polyelectrolyte and the concentration of micelles. Obviously, water in these hydrogels is expected to form not only a dispersion medium but also to create a hydration shell around micelles and biopolymer chains. Therefore, the current study is aimed at IR-spectroscopic study of water in the polyelectrolyte/surfactant hydrogels. In particular, we focus on hydrogels formed via mixing cationic polyelectrolyte (amino-modified dextran) with anionic surfactants as model materials to evaluate the capability of the IR technique. IR spectroscopy was applied not only on the fresh (fully hydrated) samples but used also in order to follow water loss from hydrogels during evaporation over time in order to detect any changes in the amount of water in the hydrogel. From this perspective, thermogravimetry was also employed as a supporting technique routinely used in monitoring the drying process in highly hydrated materials.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of polyelectrolyte-surfactant hydrogels

In this study diethylaminoethyl-dextran (in the hydrochloride form) was used as a model cationic polyelectrolyte. It was selected on the basis of preliminary tests as a representative of cationic polysaccharides which formed hydrogels with surfactants readily and without specific pH control. It belongs to the class of the low charge density polyelectrolytes [12], similarly as hyaluronan used in our previous work [11]. Dry polymer was purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic; product number D9885, batch number BCBQ8681) and used without any further treatment. The weight averaged molar weight ( $573 \pm 9 \text{ kDa}$ ) and polydispersity index (2.2) of the DEAE-dextran were determined via gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system, PLgel MIXED-C column) with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos II) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-rEX) detection. The nitrogen content reported by the producer was 3%. Two model anionic surfactants were used: sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium tetradecyl sulfate (STS). Both surfactants were purchased from Sigma-

**Table 1**

Concentration of initial stock solutions of DEAE-dextran, SDS and STS used to prepare hydrogels.

Sample of hydrogel	DEAE-dextran % (wt/vol)	SDS mM	STS
D1	4	400	
D2	4	100	
D3	4		200
D4	4		150

Aldrich (Czech Republic).

Hydrogels were prepared via mixing a stock solution of biopolymer and a stock solution of surfactant in the volume ratio 1:1. The exact compositions of the respective stock solutions were selected on the basis of preliminary tests (formation of sufficient amount of gel-like material) are summarized in Table 1. The resulting mixtures were left on a shaker overnight to complete the gelation process after which the system was centrifuged, the supernatant was discarded and the gel collected for further experiments. All the stock solutions were prepared in 0.15 mol/L NaCl using ultra-pure water (Purelab Flex, ELGA system, Lane End, United Kingdom). The composition of the formed hydrogels was estimated on the basis of the residual component contents in the supernatant and is given in Table S1 (Supplementary material).

### 2.2. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetry of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels was performed using a Q5000 TG analyzer (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Approximately 15 mg of fresh hydrogel was weighted into a platinum pan. After inserting the pan into the TG analyser, the sample was either heated from room temperature at a defined heating rate in the air or under a nitrogen atmosphere (dynamic TGA) or the sample temperature was instantaneously equilibrated and maintained at 70 °C in a nitrogen atmosphere (isothermal TGA). In both types of TG analyses, the relative sample weight was recorded continuously with  $\pm 0.1\%$  mass accuracy.

### 2.3. Infrared spectroscopy

Steady-state and time-resolved FTIR spectra were obtained by means of an Attenuated Total Reflectance (ATR) technique using a Nicolet iS50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). All measurements were taken at room temperature (in an air-conditioned room) on the built-in diamond ATR crystal. Steady-state FTIR spectra were recorded over the range 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  at 4  $\text{cm}^{-1}$  resolutions and represented an average of 128 scans. The spectrum of the clean dry diamond ATR crystal in ambient atmosphere (air) was used as the background for infrared measurement. For time-resolved measurement, a small amount (approximately 200  $\mu\text{L}$ ) of the polyelectrolyte-surfactant hydrogel was placed directly on the clean dry surface of the ATR crystal and the data collection using Omnic Series data collection software was started. The time-resolved FTIR spectra were collected at regular time intervals while water evaporated from the hydrogels. The individual FTIR spectrum was collected every 5 s as an average of 8 scans with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  over the course of the drying experiment (total time 200 min at minimum). In order to monitor the water content of hydrogels over time, raw absorption spectra were evaluated with no artificial processing (e.g. baseline or ATR corrections, atmospheric suppression). In order to investigate the change in the water structure in polyelectrolyte-surfactant hydrogels, the absorption band that corresponds to O–H stretching in hydroxyls (3800–3000  $\text{cm}^{-1}$ ) was processed by deconvolution into individual overlapping components attributed to three states of the water molecule. The positions of the overlapping bands were acquired by the 2nd derivative method according to [13]. Subsequently, the deconvolution was made

by fitting the experimental band to three calculated Gaussian components using Origin 8.1 software. Interpretation of three calculated components was based on the literature [9].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. TGA analysis of the gel-drying process

Thermogravimetry (TGA) regularly represents the first experimental choice when a drying of highly hydrated materials (such as hydrogels) is to be analyzed. The method is based on monitoring the weight of the sample during a user-defined thermal program (i.e. heating/cooling of the sample) in a controlled ambient atmosphere. Therefore, TGA was included in this study to complement and to support the interpretation of the results of the method of that mainly interests us here, i.e. the FTIR spectroscopic drying assay.

Initially, the thermal stability of the gel-forming components was checked via the standard TGA procedure. The respective compound in its original (powder) state was heated to 600 °C with a heating rate of 10 °C/min and the decomposition temperature was determined from the onset of the drop in the sample weight that corresponds to the thermal decomposition. It was confirmed that all the individual gel components in their dry state are on the time scale of the performed experiments thermally stable up to 200 °C.

Subsequently, all the studied polyelectrolyte-surfactant hydrogels were subjected to a similar TGA assay. The respective thermograms are shown in Fig. 1. It can be clearly seen that the weight of all the hydrogel samples drops in a stepwise manner. The first two stages of the sample weight drop, which proceed from the very start of the experiment until the sample reaches a temperature around 120–150 °C, can be attributed to the removal of water from the hydrogel matrix, while at higher temperatures thermal decomposition of the dry content of the hydrogel proceeds. When focusing on the drying behavior of the tested gels, it is noticeable that the main character of the drying process is similar for all four considered hydrogel compositions. Removal of water from a sample proceeds in two steps, the first one arising immediately when the experiment starts, while the second drying step begins when the temperature is approaching the boiling point of water (100 °C). These results indicate that at least two distinguishable types of water are found in the sample, namely more freely bound water which evaporates faster and more strongly bound hydration water removed at higher temperatures. From the thermograms shown in Fig. 1, it is also evident that the latter step of water removal is continuously followed by thermal decomposition of the hydrogel matrix (note the partially overlapping peaks in derivative thermograms represented by dashed

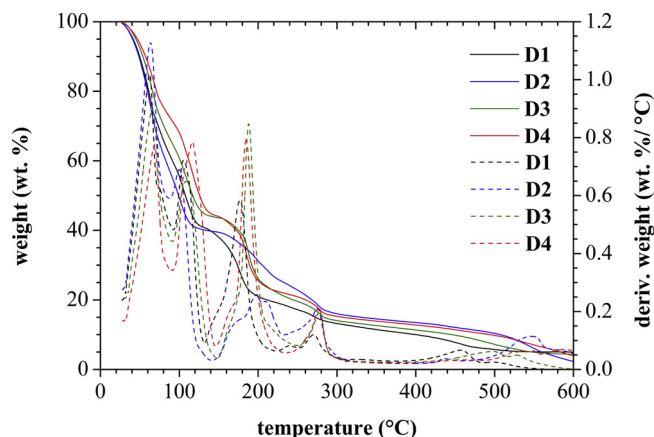


Fig. 1. TGA thermograms provided as time evolution of relative weight (solid curves) and the rate of the weight loss (dashed curves) during heating of tested hydrogels in air (heating rate 10 °C/min). Analyzed gels are labeled according to Table 1.

curves in the temperature region 100–200 °C). For this reason, it is not possible to determine the dry content weights of the tested hydrogels based solely on this basic TGA assay. Therefore, further TGA analyses were performed to provide a more comprehensive view of the drying of the studied gels.

At first, lower heating rates (5 °C/min and 2 °C/min, respectively) were applied. The results of these analyses are shown in the Supplementary material (see Fig. S1). Application of lower heating rates aimed primarily at separating the individual drying steps and also the drying and decomposition processes during the sample heating. Nevertheless, it was found that even at the lowest heating rate applied (2 °C/min), the drying of the sample passes continuously to the thermal decomposition (see Fig. S1). Furthermore, also the drying process maintains its character of more drying steps continuously following each other. The main difference in the drying behavior at the lower drying rates is represented by the shift of the drying steps to the lower temperatures. Similar information was provided also from TGA analysis performed in an inert (nitrogen) atmosphere. Fig. S2 (Supplementary material) shows a comparison of the thermograms of the tested hydrogels obtained under an air and a nitrogen atmosphere, respectively. It can be seen that the zero humidity of the inert atmosphere supports and accelerates drying. This is again represented by the shift of drying rate peaks to the lower temperature. Furthermore, it can be seen that more water is removed during the first drying step in nitrogen than in air (note the increased relative height of the first peak in the drying rate curve). Similarly to drying in air atmosphere, no significant difference in the drying behavior of the tested hydrogels was revealed in the inert ambient atmosphere either.

As far as monitoring of the drying process is concerned, a major limitation of the above-mentioned dynamic (heating) TGA experiments is represented by the fact that decomposition of the thermally labile polymer-surfactant network begins soon after or even during the water-removal process. Therefore, we complemented our study with an isothermal TGA experiment, where the weight of the measured sample and the rate of its change are monitored over time at a constant temperature (at 70 °C in our case). This method has previously been successfully utilized for instance in differentiation of intracellular and extracellular water in microbial cell cultures [14,15]. Fig. 2 shows the initial period (0–20 min) of the isothermal drying process for all tested hydrogels. It can be seen that for all samples the drying rate first increases while the temperature is raised, followed by a substantial decrease in the drying rate during the equilibration of the measurement temperature and isothermal drying. When comparing the particular thermograms of samples D1–D4, several tiny but noticeable differences can be found. Firstly, in agreement with the results of the dynamic TGA analysis presented above, it is evident that when comparing the gels prepared using the same surfactant (D1/D2 and D3/D4), the hydrogel prepared with a higher concentration of surfactant applied is always represented by a lower drying rate in the initial drying period (see the respective maxima in the drying rate curves), but at later times its drying rate curve crosses and exceeds the curve of its counterpart prepared with a lower concentration of surfactant. This can be interpreted as a manifestation of the more densely cross-linked hydrogel network with more strongly-bound hydration water where the higher concentration of the cross-linking agent (surfactant) is used. A more pronounced difference is found for DEAE-dextran gels cross-linked by SDS (D1 and D2) than for those prepared with STS, which is probably caused by the greater difference in the applied surfactant concentrations and, correspondingly, in the density of cross-links in gels with SDS. Furthermore, in these gels (D1 and D2) a sudden change in the drying-rate curve can be found in the initial period (indicated with arrows in Fig. 2). These sudden changes in the drying rate curves are often assigned to a change in the drying mechanism [16]. This indicates that the initial mechanism of the drying process is changed during this initial period for SDS-containing hydrogels but is maintained for the STS-based gels where no such feature is found in the drying curves.

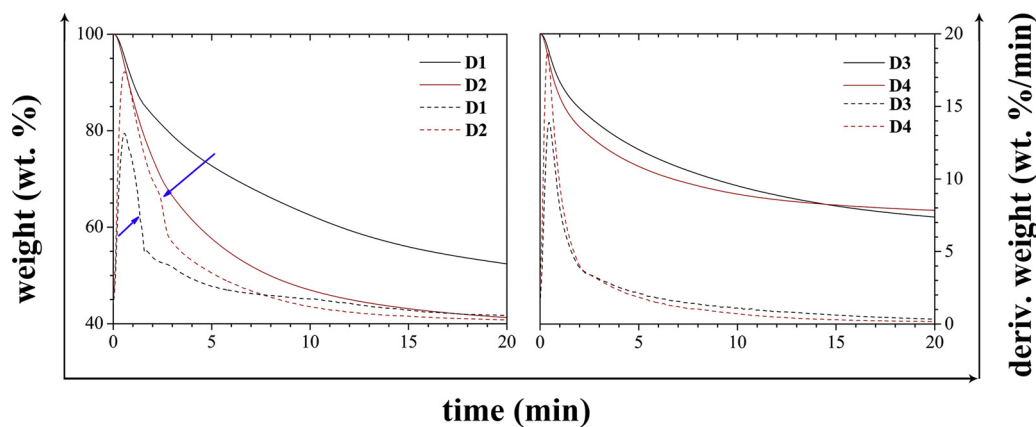


Fig. 2. Initial part (0–210 min) of TGA thermograms recorded during isothermal drying of all tested gels. Evolution over time of the sample weight (solid), drying rate (dashed) and temperature (dash dotted) is shown.

### 3.2. Steady-state FTIR spectrometry

As a first part of the spectroscopic study of the tested DEAE-dextran hydrogels, the FTIR spectra of the gels were measured immediately after their preparation to see their basic IR features and to characterize their molecular structure in the fully hydrated state. The steady-state ATR-FTIR spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels are presented in Fig. 3. Interpretation of their absorption bands has been carried out according to the literature data [17–19]. The spectra are mainly characterized by bands of aliphatic, alcohol and polysaccharide groups. All the spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels contain a broad band at  $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the O–H stretching of bulk liquid water. The water molecules are also indicated by the broad deformation band centered at about  $1645\text{ cm}^{-1}$  resulting from bending vibration.

The presence of aliphatic chains is demonstrated in the spectral

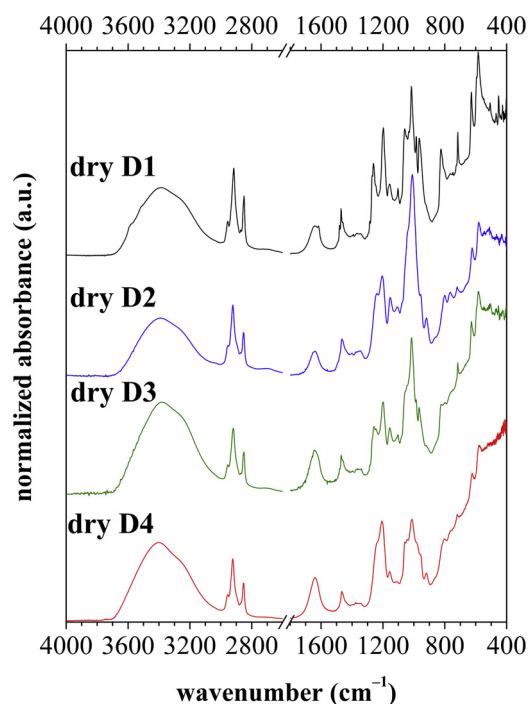


Fig. 3. ATR-FTIR spectra of all tested dry polyelectrolyte-surfactant hydrogels. DEAE-dextran gels with SDS (black and blue solid curve) and DEAE-dextran gels with linear STS (green and red solid curve) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

range of  $2960\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ . Sharp and intensive bands at  $2919\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  were ascribed to asymmetric and symmetric C–H stretching in methylene groups, respectively. An absorption band of asymmetric stretching in methyl groups ( $2956\text{ cm}^{-1}$ ) was only observed for sample D1; it occurred as less pronounced shoulders in the rest of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels. The deformation vibrations of  $-\text{CH}_2-$  and  $-\text{CH}_3$  groups occur in the spectra at  $1470\text{ cm}^{-1}$ . The relative intensity of this band was higher for hydrogels prepared from SDS surfactant. Deformation vibrations of methyl groups are only present in ATR spectra of D1 and D2 hydrogels at  $1382\text{ cm}^{-1}$ .

The presence of long carbon chains with more than four atoms (e.g. surfactants), was revealed by the band at  $719\text{ cm}^{-1}$ , which is ascribed to C–H in-plane bending of methylene groups. Another significant band occurring at  $1300\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to out-of-plane C–H bending (methylene twisting) in aliphatic chains. The out-of-plane C–H vibration (methylene wagging) of methylene groups occurs in the spectra at  $1315\text{ cm}^{-1}$ . This band was found as a weak band and/or shoulder.

All the spectra of DEAE-dextran hydrogels contain a sharp and intensive band at  $1200\text{ cm}^{-1}$  corresponding to tertiary amine groups. All the spectra also contain a less intensive band and/or shoulder at  $1260\text{ cm}^{-1}$  corresponding to primary and/or secondary alcohol. Many authors consider the band at  $1260\text{ cm}^{-1}$  to be an indicator of C–O stretching in cyclic ethers [18]. In all ATR spectra bands are apparent at  $1159\text{ cm}^{-1}$  and  $1100\text{ cm}^{-1}$  due to the glycoside C–O–C stretching of polysaccharides.

The main difference among the spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels appear in the fingerprint region  $1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ . A band at about  $1018\text{ cm}^{-1}$ , preferentially ascribed to S=O stretching of sulfate groups (salt form), or possibly C–O stretching of primary and secondary alcohols, is apparent in all samples. The sulfate sodium salt groups are also indicated by the sharp band centered at about  $1195\text{ cm}^{-1}$  resulting from the S=O symmetric stretching vibrations of the  $\text{R-O-SO}_2\text{-O}^-$ . Bands and shoulders at wavenumbers less than  $850\text{ cm}^{-1}$  are attributed to asymmetric C–H bending of the methylene groups from which bands at  $815\text{ cm}^{-1}$  and  $580\text{ cm}^{-1}$  are more evident in hydrogels with SDS.

### 3.3. Time-resolved FTIR analysis of polyelectrolyte-surfactant hydrogels

In Fig. 4 we show the temporal course of the FTIR spectra of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels, i.e., of the D1–D4 samples, during drying. Naturally, drying of the samples is accompanied by decreasing intensity of the O–H vibration bands, which are observed in the regions  $3700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  (stretching vibrations) and  $1680\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$  (bending vibration) (see the decrease of the vibration modes depicted in Fig. 2), whereas the relative intensity of the aliphatic, polysaccharide and alcohol bands increase with drying time. These bands were

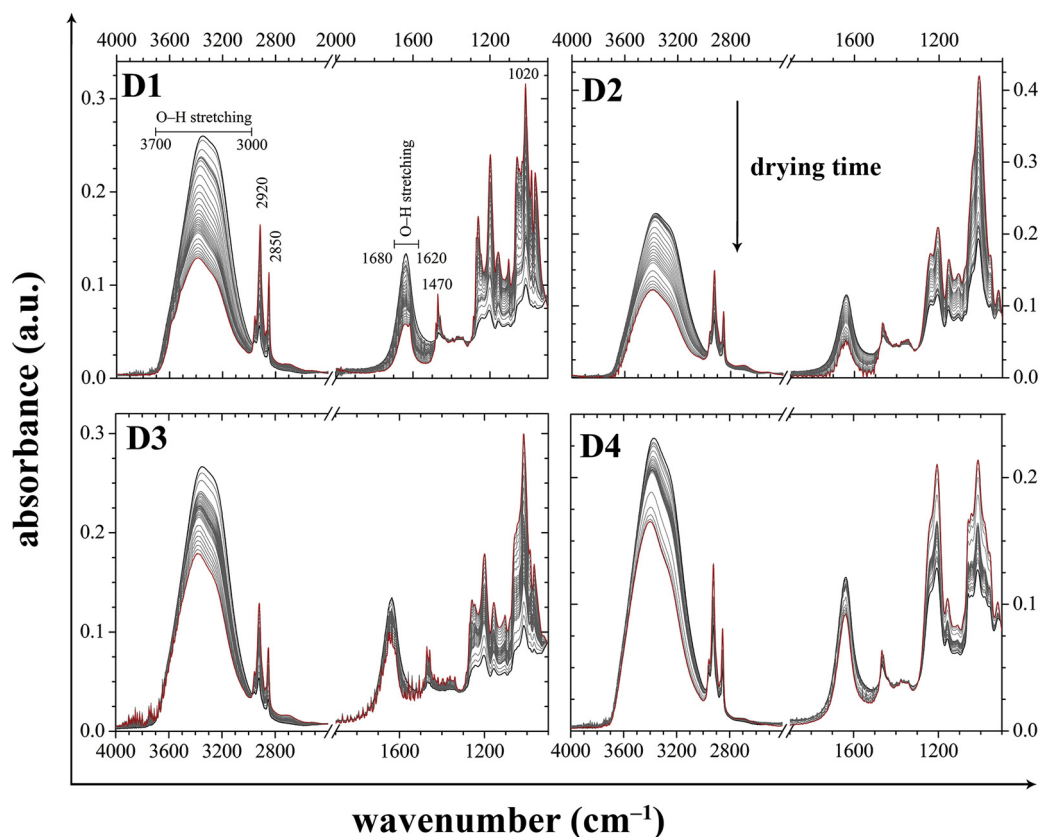


Fig. 4. Development over time of the ATR-FTIR spectra of tested polyelectrolyte-surfactant hydrogels.

observed at around  $2956\text{ cm}^{-1}$ ,  $2920\text{ cm}^{-1}$ ,  $2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $1470\text{ cm}^{-1}$ ,  $1260\text{ cm}^{-1}$ ,  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1100\text{ cm}^{-1}$  and  $1020\text{ cm}^{-1}$ .

The broad  $\nu\text{-OH}$  stretching band within the  $3700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  range represents in fact a convolution envelope which comprises as well FTIR bands arising from different subpopulations of water molecules as the bands that correspond to the hydroxyl groups in DEAE-dextran. In the FTIR spectra of all samples, the position of this broad envelope band was shifted to higher frequencies during the dehydration process. Generally, an increase in the frequency of the  $\text{O-H}$  vibrations mode is an indicative of a decrease in the degree of hydrogen bonding. The positions of  $\nu(\text{OH})$  bands and  $\Delta\nu$  values which correspond to the middle frequency of the  $\text{O-H}$  stretching vibrations before and after drying are listed in Table 2. Interestingly, the value of the red shift of the middle frequency of the  $\text{O-H}$  stretching band seems to correlate with cross-linking density – hydrogel D1, prepared with a higher concentration of SDS, shows a more pronounced red shift in comparison with the less densely cross-linked gel D2. For the two gels cross-linked by STS micelles (D3 and D4), the mutual difference in the red shifting caused by sample dehydration was much less pronounced, nevertheless also the concentration of the surfactant in the gelling mixture used differed

Table 2

The positions of  $\nu(\text{OH})$  bonds and  $\Delta\nu$  values.

Sample of hydrogel	frequency of $\nu(\text{OH})$ band ( $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>a</sup>		$\Delta\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
	before drying	after drying	
D1	3350	3384	34
D2	3366	3389	23
D3	3351	3382	31
D4	3370	3400	30

<sup>a</sup> Frequency was determined as the centre of gravity of absorption band.

<sup>b</sup>  $\Delta\nu$  value calculated as difference of centre of gravity of absorption band before and after drying process.

much less for these two gels when compared to their SDS-based analogues.

The results of the time-resolved FTIR-assisted drying assay can be provided in several different ways. Aside from the overlap of the individual FTIR spectra recorded at different times (shown in Fig. 4), it can be also presented as a time-frequency 2D absorbance map (Fig. 5) or temporal evolution of absorbance at a selected frequency (Fig. 6). In Figs. 5 and 6, it can be seen that the dehydration of the samples can be clearly monitored and the completion of the dehydration can be easily identified by means of these types of data projection.

The smooth character of the 2D time-resolved FTIR spectra without any abrupt changes points to the continuous character of the dehydration process of the analyzed gels. Nevertheless, under a closer look, it can be revealed that the drying process can be divided into several drying steps. These separate drying steps are even more clearly seen in Fig. 6 where temporal evolutions of absorbances at  $3350\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-OH}$  groups) and  $1158\text{ cm}^{-1}$  (glycosides) are shown.

For all samples, the initial dehydration step is accompanied by a rapid decrease in the intensity of water-related bands (see the decrease in absorbance at  $3350\text{ cm}^{-1}$  in Fig. 6) while the relative intensity of the vibration bands of the dry matter components increases (note an increase in absorbance at  $1158\text{ cm}^{-1}$  in Fig. 6) as the dry matter concentrates at the ATR crystal. This initial time period is probably connected with an equilibration in the contact between the ATR crystal and the gel matrix.

In the second stage of the sample drying, the temporal change in the absorbances at the selected frequencies is much slower. In fact, for samples D1 and D3 the absorbances are almost constant and, surprisingly, for D2 the absorbance at  $3350\text{ cm}^{-1}$  even slightly increases during this period. The steady FTIR signal in this stage indicates that drying of the gel proceeds at the meniscus of the gel drop and that the respective change in the water content at this air/gel boundary does not manifest in the FTIR spectra collected at the ATR/gel interface.



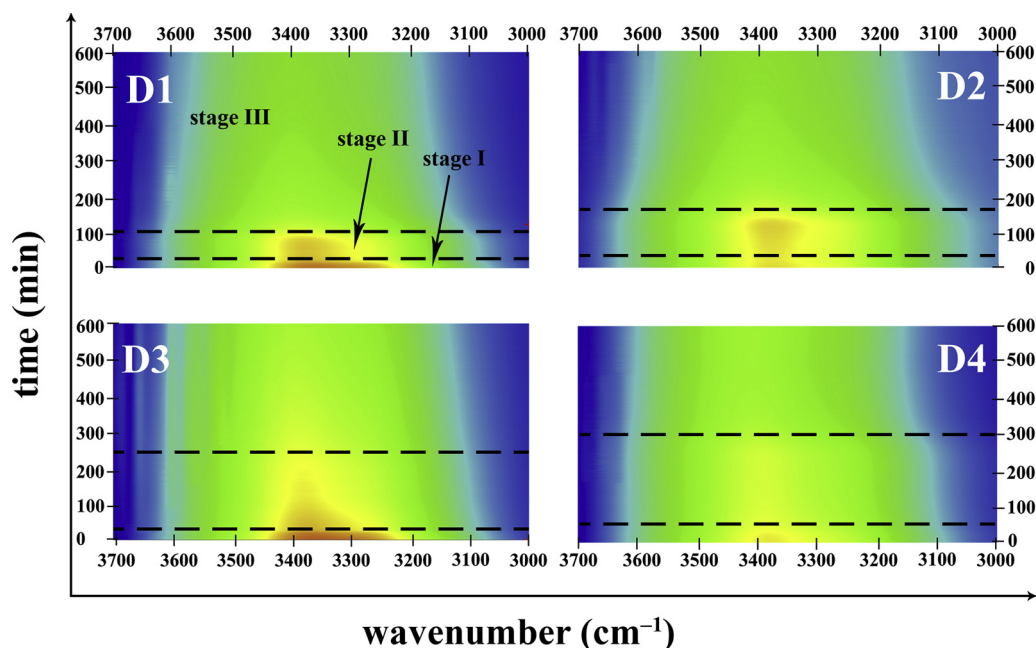


Fig. 5. 2D time-resolved FTIR spectra of the drying of tested polyelectrolyte-surfactant hydrogels. Detail on spectral region with characteristic water molecules vibration band ( $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ). Individual stages of the samples drying are separated by black dashed curves.

The final stage of the sample drying then follows. This stage is characterized by a continuous removal of water from the sample, as illustrated by the gradual decrease in the intensity of the  $-\text{OH}$  related band and the corresponding increase in the intensity of vibration of the dry matter content (represented by glycosides in Fig. 6).

In general, the main qualitative features found in the results of the time-resolved FTIR analysis stand in good agreement with the TG

analysis of the gel drying process. Consistently with the TG results, the FTIR results indicate that the drying proceeds in several steps. Furthermore, the differences between the individual drying steps are less pronounced in the STS-based gels than in the SDS-based ones (note the similar conclusion of the isothermal TG analysis). Nevertheless, there are also several contradictory features found when the results of the two analyses are compared. For instance, the FTIR results indicate a

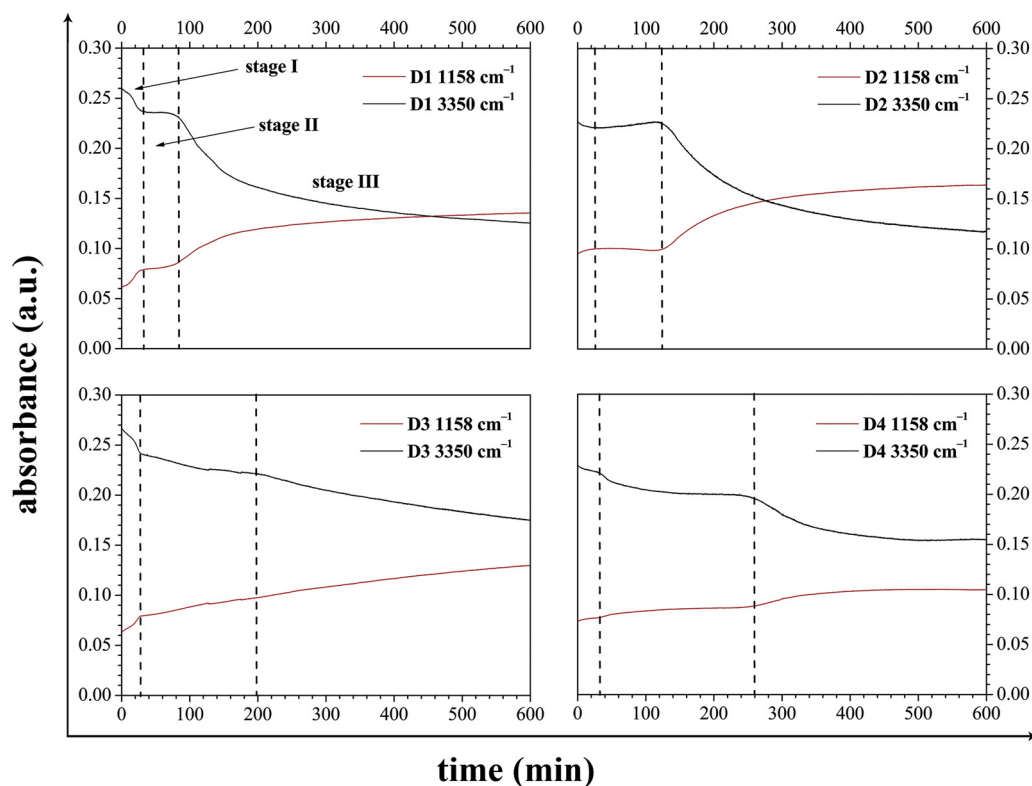


Fig. 6. Time dependences of absorbances at frequencies characteristic for water ( $-\text{OH}$  at  $3350\text{ cm}^{-1}$ ) and for dry matter content (glycosidic bond at  $1158\text{ cm}^{-1}$ ), respectively, during the FTIR-assisted drying of the gels.



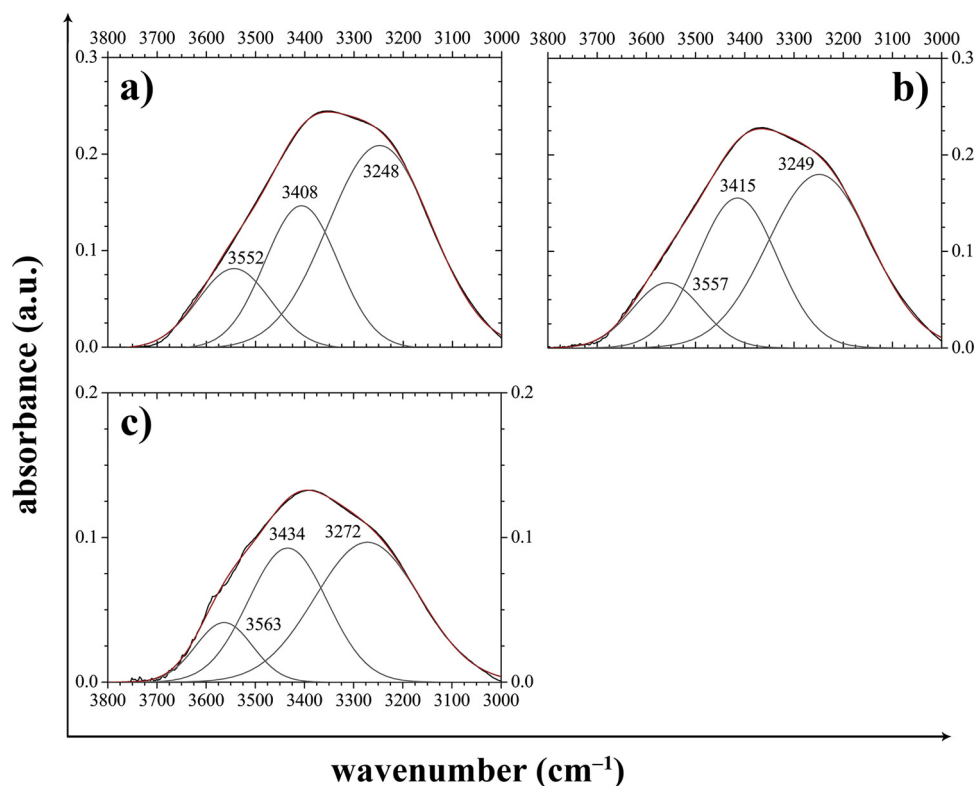


Fig. 7. Example of deconvolution of O–H stretching band for D1 hydrogel at time 0 (a), 60 (b) and 360 min (c), respectively.

slower drying process for the D2 sample as compared to D1 (compare the second stages for the two gels in Fig. 6). It conflicts with the conclusion of the TG analysis that the more densely cross-linked gels have a higher content of bound water. Nevertheless, it is necessary to take into account fundamental differences in the experimental arrangement of the two drying assays. Firstly, the FTIR results may be seriously influenced by the fact that the composition of the gel may affect the wetting of the surface of the ATR crystal and, therefore, the shape of the measured drop. Consequently, different ratios of air/gel to gel/crystal surface areas will necessarily lead to different drying rates detected in the FTIR results. Furthermore, we must bear in mind that contrary to TG analysis performed under a defined atmosphere (dry air or nitrogen), FTIR assisted drying proceeds under ambient laboratory conditions. Therefore, it is almost impossible to maintain the same conditions during different drying experiments. Even slight changes in temperature or relative humidity in close vicinity to the hydrogel drop may result in severe alteration of the drying kinetics (for instance, the above-mentioned temporal increase in absorbance at  $3350\text{ cm}^{-1}$  for sample D2 in the drying stage II or a similar feature found in the spectra of D4 at the end of the drying experiments could in fact be an indicator of reverse absorption of the air humidity). Therefore, without adjusting and controlling for the drying atmosphere, the results of the time-resolved ATR FTIR drying assay should be interpreted rather in qualitative and structural terms than for determination of any quantitative parameters describing particular drying kinetics.

### 3.4. Water structure assay by deconvolution of O–H stretching band

Therefore, we focused our further interpretation of the time-resolved FTIR analysis on a more detailed evaluation of structural changes in gels that take place during their dehydration. It has already been discussed that the drying is accompanied by a red shift of the O–H stretching band (in particular its middle frequency). From this observation it was concluded that drying of the gels is accompanied by weakening of the hydrogen bonding in the system, but no structural

interpretation of this information can be provided without further analysis of the shape of this complex vibration band.

Generally, bulk liquid water molecules in hydrogels can form up to four hydrogen bonds, which results in formation of various structural motifs such as multimer and network water clusters. Several spectroscopic techniques such as X-ray spectrometry, IR and Raman spectrometry were used to determine different local structures in bulk water that arise from variations in the arrangement of hydrogen bonds [20,21]. The FTIR approach is based on a detailed analysis of the broad vibration band centered at about  $3350\text{ cm}^{-1}$  which corresponds to the O–H stretching of water molecules and is sensitive to the proportional representation of the local structures of liquid water.

Three principal water subpopulations with specific component vibration bands are usually distinguished in the OH stretching envelope. An intensive component peak centered at about  $3250\text{ cm}^{-1}$  is ascribed to water molecules strongly bonded via linear hydrogen bonds into tetrahedrally coordinated water pentamers (often called quasi-crystalline water). Another significant peak occurs near  $3400\text{ cm}^{-1}$  and is assigned to out-of-phase O–H stretching in less perfectly organized structures such as distorted pentamers and tetramers (solid-like water). These structures are usually characterized by non-linear and/or partially disrupted hydrogen bonds. The two above-mentioned subpopulations are often collectively referred to as network water. The less intensive band centered at about  $3560\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the water molecules with a highly disturbed hydrogen bond network (liquid-like water).

In our work, a time-resolved variant of such a structural analysis was performed on the OH stretching band in order to reveal any observable effects of the dehydration process on the local structures of water molecules in the tested hydrogel samples. For this purpose, deconvolution of the broad envelope band was performed in the region  $3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  at three sample-specific times. These times were chosen in order to cover the three main stages of the drying process as described in the previous text (see Fig. 6). For example, Fig. 7 shows the results of this deconvolution for the sample D1. The specific times for

**Table 3**  
Position and proportional representation of subpopulation water molecules in DEAE-dextran hydrogels (and in reference dry DEAE-dextran for comparison).

	t (min)	frequency of the component peak ( $\text{cm}^{-1}$ )			relative peak area (% of total peak area)		
		liquid-like	solid-like	quasi-crystalline	liquid-like	solid-like	quasi-crystalline
D1	st. I (0 min)	3552	3408	3248	18%	28%	54%
	st. II (60 min)	3557	3415	3249	13%	35%	52%
	st. III (360 min)	3563	3434	3272	12%	37%	51%
D2	st. I (0 min)	3551	3415	3253	20%	28%	52%
	st. II (60 min)	3550	3416	3255	15%	32%	53%
	st. III (400 min)	3550	3437	3292	12%	26%	62%
D3	st. I (0 min)	3564	3409	3236	19%	35%	46%
	st. II (120 min)	3561	3417	3248	11%	40%	49%
	st. III (500 min)	3560	3435	3276	10%	33%	57%
D4	st. I (0 min)	3553	3416	3254	20%	29%	51%
	st. II (170 min)	3559	3423	3261	14%	38%	48%
	st. III (510 min)	3557	3431	3278	11%	37%	52%
DEAE-dextran		3510	3367	3222	7%	63%	30%

sample D1 were chosen as follows: the start of the drying process (representing stage I of the drying process, Fig. 7a), at 60 min of the drying process (stage II of the drying process, Fig. 7b) and at 360 min of the drying process (stage III of the drying process, Fig. 7c), respectively.

The results of the deconvolution of the OH stretching band at the specific times are summarized for all tested samples in Table 3. For the three deconvolution components, both the frequency and the relative proportion of the total area of the envelope stretching band are provided in the Table 3. Apparently, the time evolution of the relative areas of the component bands could lead to the interpretation that no significant changes over time were revealed for the relative representation of the component bands, although it can be seen that the relative area of the more structured water subpopulations (quasi-crystalline and solid-like) slightly increase over time at the expense of a corresponding decrease in the area of the liquid-like water component. Nevertheless, at this point it should be emphasized that the relative area of the respective bands is not equal to the relative content, because hydrogen bonded structures always show a significantly increased intensity of the respective infrared band [17]. Therefore, the absolute content of the least-structured subpopulation will in fact be significantly higher compared to the percentage values provided in Table 3. The relative decrease in the representation of this component between the first evaluated time (the start of the experiment) and the last (stage III) is approaching 50% of its initial relative content, which is not negligible. Evidently, the highest losses of liquid-like water molecules occur at first step of drying process. This step took place in the time range from 0 min to 60 min for hydrogels with SDS, while this step was significantly longer for STS-based hydrogels. We also see that the relative content of the multimer (liquid-like) subpopulation at the beginning of the drying process is very similar for all DEAE-dextran hydrogels, which indicates that the relative representation of the network forming and liquid-like water subpopulations is controlled primarily by the polysaccharide component rather than by the density and nature of the cross-links in the gel matrix.

Moreover, it is evident from the results shown in Table 3 that for all hydrogel samples, the position of absorption bands which correspond to the network water molecules shifts to higher frequencies during the drying process (red shifts up to  $40 \text{ cm}^{-1}$  were found). On the contrary, the position of the liquid-like water components remains almost unaltered. In the first step of the evaporation process, a less-pronounced shift to higher frequencies was observed while the red-shift of network subpopulations such as pentamers, tetramers and/or distorted pentamers was more apparent in the subsequent drying step (stage III). These results suggest that during the excess dehydration stage, a progressive distortion of the hydrogen bonds takes place in the structure of network water molecules. Most likely, the gradual destruction of the hydrogen bonded structures during the drying process can be attributed to the

increasing relative content of water that is strongly bound in the hydration layer of the polysaccharide content where the water molecules are less accessible to network-forming water-water interactions. This finding is in good agreement with the generally-accepted strong hydration of hydrophilic polysaccharides, i.e. hyaluronic acid, chitosan and phytoglycogen [9], and of the high relative content of strongly-bound hydration water (referred to as “high-density” water [22],) in the hydrogels of these biopolymers [23]. Last but not least, it is necessary to take into account also the fact that as a result of excess drying of the gel, the intrinsic OH groups of the DEAE-dextran participate more in the overall shape of the OH stretching band. Nevertheless, as can be seen in Fig.S3 and Table 3, results of the deconvolution of dry DEAE-dextran are significantly shifted in frequencies as well as in relative peak areas which indicates that even in the final drying stage, the discussed results of –OH stretching band deconvolution do represent the residual water content rather than the dry mass of the gel.

#### 4. Conclusion

ATR-IR spectroscopy is a relatively simple and effective technique to study the structure of water molecules in polyelectrolyte/surfactant hydrogels. Structural details can be obtained particularly from the deconvolution of the broad band located around  $3350 \text{ cm}^{-1}$  that corresponds to the O–H stretching of water molecules. The effect of the water content can be addressed by taking the spectra over time during the drying of the gel sample. IR spectroscopy provides limited quantitative information. It was shown that thermogravimetry is a suitable complementary technique providing the quantitative data, including kinetic data on the drying (dehydration) process, while being much less informative about the structural details. Thermogravimetry also enables simpler control of the measurement atmosphere. The usefulness of the combination of these two techniques was demonstrated using the example of polyelectrolyte/surfactant hydrogels, but we believe that it can be applied to other hydrogel systems as well.

#### Acknowledgement

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 16-12477S); the Materials Research Centre is supported by the Ministry of Education, Czech Republic (project No. LO1211).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.089>.

## References

- [1] E.M. Ahmed, Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [2] K.J. De France, F. Xu, T. Hoare, Structured macroporous hydrogels: progress, challenges, and opportunities, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) 1700927, <https://doi.org/10.1002/adhm.201700927>.
- [3] S.K. Shukla, A.W. Shaikh, N. Gunari, A.K. Bajpai, R.A. Kulkarni, Self assembled hydrophobic nanoclusters of poly(methyl methacrylate) embedded into polyvinyl alcohol based hydrophilic matrix: preparation and water sorption study, *J. Appl. Polym. Sci.* 111 (2009) 1300–1310, <https://doi.org/10.1002/app.29155>.
- [4] K.M. Park, D. Lewis, S. Gerecht, Bioinspired hydrogels to engineer cancer micro-environments, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 19 (2017) 109–133, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044619>.
- [5] K.H. Bae, L.-S. Wang, M. Kurisawa, Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges, *J. Mater. Chem. A* 40 (2013) 5371–5538, <https://doi.org/10.1039/C3TB20940G>.
- [6] I.D. Kuntz, W. Kauzmann, Hydration of proteins and polypeptides, *Adv. Protein Chem.* 28 (1974) 239–345, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60232-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60232-6).
- [7] E.V. Sillatta, M.I. Velasco, C.G. Gómez, R.H. Acosta, M.C. Strumia, G.A. Monti, Evaporation kinetics in swollen porous polymeric networks, *Langmuir* 30 (2014) 4129–4136, <https://doi.org/10.1021/la500031t>.
- [8] P. Musto, M. Galizia, M. Pannico, G. Scherillo, G. Mensitieri, Time-resolved fourier transform infrared spectroscopy, gravimetry, and thermodynamic modeling for a molecular level description of water sorption in poly( $\epsilon$ -caprolactone), *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 7414–7429, <https://doi.org/10.1021/jp502270h>.
- [9] M. Grossutti, J.R. Dutcher, Correlation between chain architecture and hydration water structure in polysaccharides, *Biomacromolecules* 17 (2016) 1198–1204, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00026>.
- [10] E.A. Disalvo, M.A. Frias, Water state and carbonyl distribution populations in confined regions of lipid bilayers observed by FTIR spectroscopy, *Langmuir* 29 (2013) 6969–6974, <https://doi.org/10.1021/la304390r>.
- [11] T. Venerová, M. Pekař, Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants, *Carbohydr. Polym.* 170 (2017) 176–181, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.087>.
- [12] D.E. Wingrove, P. Ander, Conductivity of aqueous solutions of ionic polysaccharides containing simple salts, *Macromolecules* 12 (1979) 135–140, <https://doi.org/10.1021/ma60067a028>.
- [13] A. De Nino, A. Congiu Castellano, E. Del Giudice, The supramolecular structure of liquid water and quantum coherent processes in biology, *J. Phys. Conf. Ser.* 442 (2013) 1–9, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/442/1/012031>.
- [14] S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, V. Krzyzanek, J. Nebesarova, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, K. Hrubanova, M. Milerova, I. Marova, The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments, *N. Biotechnol.* 39 (2017) 68–80, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>.
- [15] P. Sedlacek, E. Slaninova, V. Enev, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, K. Hrubanova, V. Krzyzanek, O. Samek, S. Obruca, What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2019), <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>.
- [16] P. Sedlacek, E. Slaninova, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances, *N. Biotechnol.* 49 (2019) 129–136, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>.
- [17] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed., John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, Hoboken, 2004.
- [18] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo, Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments, *Biopolymers* 72 (2003) 10–20, <https://doi.org/10.1002/bip.10245>.
- [19] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo, Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake, *Biopolymers* 72 (2003) 149–161, <https://doi.org/10.1002/bip.10342>.
- [20] M.W. Mahoney, W.L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions, *J. Chem. Phys.* 112 (2000) 8910–8922, <https://doi.org/10.1063/1.481505>.
- [21] A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, Perspective on the structure of liquid water, *Chem. Phys.* 389 (2011) 1–34, <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2011.07.021>.
- [22] P.M. Wiggins, High and low density water in gels, *Prog. Polym. Sci.* 20 (1995) 1121–1163, [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(95\)00015-8](https://doi.org/10.1016/0079-6700(95)00015-8).
- [23] P.M. Wiggins, R.T. Vanryn, D.G.C. Ormrod, Donnan membrane equilibrium is not directly applicable to distributions of ions and water in gels or cells, *Biophys. J.* 60 (1991) 8–14, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82026-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82026-4).

Z hlediska koloidní chemie můžeme *hydrogely* definovat jako koloidní disperzní systémy, ve kterých je disperzní prostředí tvořeno vodou a dispergovaná fáze je obvykle tvořena hydrofilními polymery resp. polyelektrolyty, jež v těchto systémech vytvářejí spojitou síť. V dnešní době tyto koloidní systémy nacházejí své uplatnění především v oblastech, jako je farmacie, medicína, kosmetika a v neposlední řadě i potravinářském a zemědělském průmyslu. Nicméně, s ohledem na využití biokompatibilních polymerních sloučenin, které v sobě nesou velmi důležitou fyziologickou vlastnost, a tou je především jejich biodegradabilita, se tyto materiály zdají být vhodnými matricemi pro cílenou distribuci léčiv, anebo jako tzv. scaffoldy, jež jsou předmětem intenzivního zkoumání v oboru tkáňového inženýrství. Již dnes tyto biomateriály nacházejí své uplatnění jako kontaktní čočky, umělé implantáty oční rohovky, hemostatické přípravky, obvazový materiál s hojivými účinky atd. Medicínské využití těchto materiálů spočívá zejména v tom, že v jejich strukturách je vázáno vysoké množství vody, a tudíž transport inkorporovaných nízkomolekulárních sloučenin není nikterak omezen a ve skutečnosti není výrazně pomalejší než v kapalných systémech. Očividná výhoda hydrogelových systémů spočívá především v jejich tvarové stálosti, přičemž je lze velmi lehce deformovat, řezat a vstříkovat. Tyto mechanické vlastnosti jsou dány jejich viskoelastickými vlastnostmi, kdy po mírné deformaci jejich strukturální sítě dochází k následnému obnovení (reverzibilnímu) stabilizujících vazeb reprezentovaných slabými disperzními silami.

Jak již bylo zmíněno výše, tak obsah vody je jednou z dominantních charakteristik každého hydrogelu, a tudíž podrobnější studium disperzního prostředí tzn. vody, se zdá být logickým vyústěním k hlubšímu porozumění vazby vody v hydrogelové síti. Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (NMR) má v této oblasti své nezastupitelné místo, avšak pro její cenovou a technickou náročnost se zdá být vhodnější instrumentální technikou infračervená spektrometrie, která, a to je důležité, je schopna nám podat srovnatelně cenné experimentální výsledky. Jinými slovy, tato technika je schopna reflektovat nejen vodou jako spojitě disperzní prostředí hydrogelů, ale ve skutečnosti jsme schopni molekulární diferenciaci jednotlivých subpopulací, jako jsou vodní multimery či molekuly vytvářející vodní síť tzn. tetramery a pentamery. Tyto subpopulace vody jsou zodpovědné za tzv. volnou a vázanou vodu v hydrogelových systémech. Této problematice jsme se věnovali v odborné publikaci s názvem: „ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels“. V této práci jsme se zabývali studiem objemové a hydratační vody hydrogelových systémů tvořených kladně nabitým polysacharidem dextranu a anionovými povrchově aktivními látkami, které byly použity jako síťovací činidla k formaci hydrogelů.

V této studii byl jako modelový kationový polyelektrolyt použit diethylaminoethyl-dextran, a to ve formě hydrochloridu. Jako zástupci síťovacích činidel byly vybrány anionové povrchově aktivní látky dodecylsulfát sodný (SDS) a tetradecylsulfát sodný (STS), které jak se ukázalo, jsou vhodnými a efektivními činidly k formaci hydrogelových systémů. Hydrogely byly připraveny velmi jednoduchým způsobem, který spočíval v prostém smísení zásobního roztoku biopolymeru a příslušného surfaktantu. Tímto způsobem byly připraveny čtyři vzorky hydrogelů (D1–D4), které se ve skutečnosti lišily v použitém typu a koncentraci síťovacího činidla. Experimentální přístup této studie

můžeme rozdělit do dvou kategorií: (i) časově rozlišená infračervená spektrometrie, která nám poskytla nejen kinetické informace v průběhu dehydratace (sušení) příslušných hydrogelů, ale co je cennější, tak jsme na základě dekonvoluce absorpčního pásu odpovídajícímu různým subpopulacím vody byli schopni blíže specifikovat jejich jednotlivé zastoupení v průběhu sušení resp. jejich dehydratace na xerogel; (ii) termogravimetrická analýza nám poskytla cenné informace, které velmi pěkně doplňují závěry z infračervené spektrometrie a v neposlední řadě se stala vhodnou instrumentální technikou popisující dehydrataci a charakterizaci hydrogelů, a to jak z makroskopického, tak i z kvantitativního pohledu.

Příslušné termogramy pro jednotlivé vzorky jasně ukazují, že úbytek hmotnosti je v procesu sušení kontinuální, avšak můžeme v jejich průběhu jednoznačně určit tepelné oblasti připadající dehydrataci vzorku (laboratorní teplota – cca 130°C) a tepelné dekompozici sušiny xerogelu. Pokud se zaměříme na výše zmíněnou první oblast je nadmíru jasné, že sušení resp. dehydratace vzorku probíhá ve dvou samostatných krocích, z nichž první je lokalizován ihned při zahájení experimentu, zatímco druhý krok dehydratace dominantně manifestuje, když se teplota ohřevu blíží teplotě varu vody (~ 100°C). Nicméně, již tyto „makroskopické“ údaje jasně dokládají, že ve vzorcích se nalézají minimálně dva typy vody, a to volně vázaná voda odpovídající subpopulaci multimerů a silněji vázaná hydratační voda, jež je odpařována při vyšších teplotách TGA.

Při porovnání izotermických termogramů jednotlivých vzorků lze nalézt několik drobných, ale znatelných diferencí. Z příslušných termogramů jasně vyplývá, že hydrogely připravené vždy za použití vyšší koncentrace surfaktantu jsou v první periodě dehydratace charakterizovány nižší rychlostí sušení, avšak později se příslušné křivky kříží, kdy dynamika sušení je naopak rychlejší v případě vzorků, jejichž gelace byla realizována nižšími počátečními koncentracemi tenzidů. Jinými slovy, pokud je při formaci hydrogelu použita vyšší koncentrace síťovacího činidla, je velmi pravděpodobné, že při procesu gelace je upřednostňován vznik hustěji zesíťované hydrogelové sítě s majoritním zastoupením silněji vázané hydratační vody. V případě hydrogelů síťovaných dodecylsulfátem sodným si v jejich izotermických termogramech nelze nepovšimnout náhlé změny v rychlosti jejich dehydratace. Obvykle je tato změna přičítána faktické změně v mechanismu dehydratace.

Absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnočtů 3700–3100 cm<sup>-1</sup> ve skutečnosti představuje tzv. konvoluční obálku, ve které se projevují jednotlivé valenční vibrace OH vazeb různých subpopulací vody, přesněji řečeno tzv. multimerům, tetramerům a pentamerům. Je dobře známo, že zvýšení frekvence valenční vibrace OH vazeb je indikátorem snížení stupně přítomných vodíkových vazeb. Z vypočtených hodnot  $\Delta\nu$  a středních poloh absorpčního pásu lze usoudit, že tyto hodnotící kritéria mohou významně korelovat s hustotou síťování hydrogelové matrice. Ukázkou nám může být hydrogel síťovaný pomocí surfaktantu SDS, kde lze v případě vyšší koncentrace tohoto tenzidu použitého ke gelaci zaznamenat evidentní červený posun příslušného absorpčního pásu. Naproti tomu, v případě vzorků D3 a D4 byl tento posun v absorpčních spektrech méně výrazný, nicméně i iniciační koncentrace tenzidu STS byla v těchto případech nižší.

Výsledky časově rozlišené infračervené spektrometrie jasně dokládají, že dehydratace vzorků hydrogelů může být jasně monitorována, přičemž jednotlivé fáze a konec sušení



může být snadno identifikováno. Na druhou stranu lze pro přesné určení jednotlivých fází dehydratace použít dvoudimenzionální projekci specifických absorpčních pásů připadajících O–H a C–O–C valenčním vibracím (při  $3350\text{ cm}^{-1}$  a  $1158\text{ cm}^{-1}$ ) v závislosti na době sušení. U všech studovaných vzorků byl počáteční dehydratační krok doprovázen rychlým poklesem intenzity absorpčního pásu souvisejícího s vodou. Naproti tomu, časový průběh intenzity absorpčního pásu odpovídajícího sušině resp. glykosidickým vazbám byl víceméně inverzní projekcí pásu předcházejícího. Druhá fáze dehydratace je doprovázena mnohem menšími změnami v průběhu pozorovaných křivek. Jak je z časově rozlišených záznamů vidět, tak po druhé fázi dehydratace následuje závěrečné sušení, které je charakterizováno kontinuálním odstraňováním disperzního prostředí tj. vody z hydrogelové matrice.

Obecně můžeme říci, že hlavní kvalitativní znaky nalezené v experimentálních výsledcích časově rozlišené IR spektrometrie a termogravimetrické analýzy jsou navzájem v dobré shodě. Obě tyto instrumentální techniky jasně a konzistentně dokládají, že dehydratace probíhá v několika oddělených krocích, které jsou v případě hydrogelů síťovaných pomocí STS méně výrazné. Avšak, při pečlivém srovnání dosažených výsledků obou instrumentálních technik vyplynulo několik protichůdných rysů. Například, výsledky FTIR spektrometrie naznačují, že hydrogel síťovaný za použití nižší koncentrace SDS se vyznačoval nižší rychlostí sušení v porovnání se svým protějškem. Toto zjištění je v rozporu s výsledky pořízenými pomocí TG analýzy tzn. silněji zesíťované hydrogely mají i významně vyšší obsah silně vázané vody. Tato nekonzistence může být vysvětlena následujícími skutečnostmi: (i) zásadní rozdíl experimentálního uspořádání obou technik; (ii) vlastnosti sušící atmosféry (vzduch, dusík a laboratorní atmosféra) vyplývající z jejich relativní vlhkosti atd.

Obecně, objemová voda tvořící disperzní prostředí v hydrogelových systémech je schopna vytvářet až čtyři vodíkové vazby, což má za následek tvorbu různých strukturních motivů, jako jsou volné (multimerní) a síťové (vázané) subpopulační klastry. V této souvislosti lze obvykle rozlišit tři základní subpopulace: (i) absorpční pás při  $3250\text{ cm}^{-1}$  odpovídá molekulám vody, které mezi sebou navzájem vytvářejí lineární síť vodíkových vazeb (můstků) prostorově uspořádaných do tzv. tetraedricky koordinovaných pentamerů (kvazi-krystalická voda); (ii) absorpční pás lokalizovaný v blízkosti vlnočtu  $3400\text{ cm}^{-1}$  je připisán méně organizovaným klastrům, jako jsou deformované tetramery a pentamery (voda podobná pevné látce). Tyto strukturní motivy se vyznačují nelineárními anebo částečně porušenými vodíkovými vazbami. Výše zmíněné subpopulace vody můžeme souhrnně označit termínem tzv. síťové vody. Naproti tomu, (iii) absorpční pás lokalizovaný při nejvyšších vlnočtech tzn.  $3560\text{ cm}^{-1}$  je zpravidla připisován molekulám vody s vysoce narušenou sítí vodíkových vazeb tzv. kapalná (volná) voda.

Z časového vývoje relativních ploch, které odpovídají jednotlivým subpopulacím molekulární vody lze vidět, že v průběhu dehydratace hydrogelových systémů dochází k mírnému nárůstu strukturované vody. Blíže se jedná o ty subpopulační klastry, které jsou terminologicky označovány jako kvazi-krystalická a pevná voda. Jejich zvýšení je rovněž doprovázeno zjevným poklesem absorpčního pásu odpovídajícího molekulám vody s eminentně narušenou sítí vodíkových vazeb tzn. volné vody. Nicméně je v této souvislosti zapotřebí zdůraznit, že relativní plocha dekonvoluovaných pásů není rovna

relativnímu obsahu, jelikož nad molekulární struktury resp. klastry stabilizované vodíkovými můstky vždy vykazují zvýšenou intenzitu příslušných absorpčních pásem. Jinými slovy, absolutní obsah nejméně strukturované vody bude ve skutečnosti výrazně vyšší ve srovnání s procentuálními hodnotami příslušných absorpčních pásem, které byly získány pomocí Lorentzovy profilové funkce. Relativní pokles absorpčního pásu odpovídajícího subpopulacím volně vázané vody se v průběhu dehydratace všech studovaných hydrogelů snížil takřka o 50 %. Dále z experimentálních výsledků vyplynulo, že k nejvyšším ztrátám volně vázané vody dochází v první fázi dehydratace resp. sušení. Tento sušící proces probíhal v časovém rozmezí 0–60 minut, nicméně v případě vzorků síťovaných surfaktantem STS byla tato sušící fáze výrazně delší. Poměrně zajímavým zjištěním v této studii bylo, že relativní obsah multimerních subpopulací je na začátku dehydratace všech DEAE-dextranových hydrogelů velmi podobný. Tento výsledek nás vedl k závěru, že jednotlivá zastoupení síťotvorných či kapalných subpopulací vody je primárně řízeno příslušným polysacharidem tzn. DEAE-dextranem než hustotou a povahou příčných vazeb v hydrogelové matici.

U všech studovaných vzorků docházelo v průběhu dehydratace k významnému posunu jejich absorpčních pásem souvisejících se síťovanými vodními klastry k vyšším vlnovým resp. frekvencím (red-shift). Naproti tomu, poloha absorpčních pásem multimerní vody zůstávala prakticky nezměněna. Tyto výsledky naznačují, že během fáze nadměrné dehydratace dochází ve struktuře síťových klastrů k progresivnímu narušení vodíkových vazeb. Zdá se, že postupná destrukce vodíkových vazeb je v přímé souvislosti s postupným nárůstem molekulární vody, jež je přednostně spjata s hydratační vrstvou polysacharidu, ve které jsou molekuly vody hůře přístupné pro síťotvorné interakce. Tento závěr je obecně ve velmi dobré shodě s experimentálními výsledky, které poukazují na schopnost dalších polysacharidů, jako je hyaluronan, chitosan, fytoglykogen atd. vytvářet silné hydratační interakce lokalizované v blízkosti biopolymerního řetězce (tzn. voda s vysokou hustotou).

Tato studie jasně ukázala, že infračervená spektrometrie a její technika časově-rozlišeného měření je velmi účinná pro studium specifických subpopulací molekulární vody v koloidních systémech, jejichž typickými představiteli jsou tzv. hydrogelové systémy či hydrogely. Na druhé straně se ukázalo, že termogravimetrie má v této souvislosti své nezastupitelné místo, které můžeme bezpochyby spatřit ve schopnosti interpretace získaných kvantitativních dat, včetně těch, kterými jsme schopni blíže studovat kinetické aspekty související s procesy dehydratace resp. sušení hydrogelových systémů.