

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

*Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 745*

*ISSN 1213-418X*

**Vojtěch Enev**

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

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

**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

ZKRÁCENÁ VERZE HABILITAČNÍ PRÁCE  
V OBORU FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BRNO 2022

**KLÍČOVÁ SLOVA**

přírodní organická hmota; huminové látky; humifikace; půdní pomocné látky; kompost

**KEYWORDS**

natural organic matter; humic substances; humification; auxiliary soil substances; compost

**MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE**

Kompletní verze habilitační práce je uložena na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

© Vojtěch Enev, 2022

ISBN 978-80-214-6125-3

ISSN 1213-418X

# OBSAH

<b>1</b>	<b>CURRICULUM VITAE A PŘEDSTAVENÍ AUTORA .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>PRAEFATIO .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>METODY IZOLACE A FRAKCIONACE HUMINOVÝCH LÁTEK .....</b>	<b>10</b>
4.1	Standardní postup izolace HL dle společnosti IHSS .....	10
4.2	Frakcionace organické hmoty a huminových látek .....	12
4.2.1	<i>Extrakce lipidických složek lignitu.....</i>	<i>12</i>
4.2.2	<i>Sekvenční frakcionace HK dle polarity org. rozpouštědla .....</i>	<i>14</i>
<b>5</b>	<b>ASPEKTY ENVIRONMENTÁLNÍHO VYUŽITÍ KAUSTOBIOLITŮ .....</b>	<b>16</b>
5.1	Neenergetické využití lignitu .....	17
5.1.1	<i>Jihomoravský lignit jako půdní pomocná látka.....</i>	<i>17</i>
5.1.2	<i>Vodou extrahovatelné frakce OM lignitu.....</i>	<i>19</i>
5.1.3	<i>Lignit – bohatý zdroj huminových kyselin .....</i>	<i>21</i>
<b>6</b>	<b>STUDIUM OM HUMIFIKOVANÝCH BIOODPADŮ .....</b>	<b>22</b>
6.1	Přírodní kompost jako vhodná půdní pomocná látka pro další její transformaci v půdě .....	23
6.2	HK jako indikátor zralosti vermikompostů – biologický a fyzikálně-chemický pohled.....	25
<b>7</b>	<b>ORGANICKÁ HMOTA HNĚDÉHO UHLÍ – LIGNITU.....</b>	<b>28</b>
7.1	Pyrolyzní techniky při studiu organické hmoty jihomoravského lignitu .....	29
<b>8</b>	<b>ANTROPOGENNÍ PŮDNÍ POMOCNÉ LÁTKY A PŮDNÍ KONDICIONÉRY – LIGNOHUMÁTY .....</b>	<b>32</b>
8.1	Difuzní techniky v oblasti studia supramolekulárního uspořádání DOM.....	33
<b>9</b>	<b>PÁR SLOV ZÁVĚREM .....</b>	<b>36</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCE.....</b>	<b>37</b>

# 1 CURRICULUM VITAE A PŘEDSTAVENÍ AUTORA



Narodil jsem se v roce 1986 v Brně, ve kterém žiji dodnes. Po absolvování Střední průmyslové školy chemické v Brně jsem se ocitl na pomyslné křižovatce svého dalšího směřování, zda si zvolit studium na Lékařské fakultě MUNI, anebo pokračovat ve studiu chemického oboru. Dozajista mé další rozhodnutí bylo ovlivněno prací týkající se Středoškolské odborné činnosti, kdy jsem v roce 2005–2006 na zdejší Fakultě chemické VUT v Brně vypracovával svoji středoškolskou odbornou práci pod vedením prof. Ing. Martina Weitera, Ph.D. a doc. Mgr. Martina Valy, Ph.D. na téma fotovoltaických organických solárních článků. Jinými slovy, po této prvotní zkušenosti s akademickým prostředím byla Fakulta chemická VUT v Brně jasná volba, i když koketerie s myšlenkou Lékařské fakulty mě zcela opustila až ve druhém ročníku bakalářského studijního programu po zdárném absolvování předmětů Fyzikální chemie I & II, jejichž vyučujícími byli prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc a dnes již emeritní profesor Ústavu fyzikální a spotřební chemie prof. Ing. Ladislav Omelka, DrSc. Od této chvíle se stala fyzikální chemie moji průvodkyní v mém studijním, vědeckém a pedagogickém snažení. Po absolvování Magisterského studijního programu jsem v roce 2009 pokračoval ve studiu Fyzikální chemie na doktorském studijním programu, kdy jsem v roce 2015 obhájil svoji disertační práci na téma: „Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek“.

Moje vědecko-akademická práce na Ústavu fyzikální a spotřební chemie začala již v průběhu mého doktorského studia, kdy jsem se stal nejprve vyučujícím předmětu Praktika z instrumentální a strukturní analýzy a následně i Praktik z fyzikální chemie I & II. Již v této době jsem úzce spolupracoval s průmyslovým odvětvím, a to zejména s firmou AMAGRO s.r.o, která má ve své díce zejména výrobu půdních pomocných látek a půdních kondicionérů. V rámci každoročně pořádaných konferencí české sekce pro výzkum huminových látek IHSS se podařily navázat značné spolupráce s dalšími akademickými ústavami, z nichž nejvýznamnějšími jsou Česká zemědělská univerzita v Praze a Mendelova univerzita v Brně. V této etapě mého vědecko-pedagogického působení jsem dále prohluboval svůj zájem o studium a faktického využití fyzikálně-chemických zákonitostí pro různé materiálové aplikace a oblasti, ze kterých vzešlo mnoho odborných publikací týkajících se nanomateriálů, biodegradabilních polymerů na bázi polyhydroxyalkanoátů, ligninu a dlaších.

Důležitým mezníkem pro můj další vědecký rozvoj byl rok 2016, kdy jsem se podílel na realizaci a podpoře projektu GAČR 16-12477S: „Hydrogely s integrovanými hydrofobními nanodoménami – struktura, transportní a uvolňovací vlastnosti“. Z této spolupráce vzešly mé dva prvoautorské články, které se fundamentálně zabývají studiem jednotlivých subpopulací vody v přibravených hydrogelech polysacharid-

tenzid. Nicméně je zapotřebí říci, že v rámci tohoto výzkumného projektu byla na Fakultě chemické VUT v Brně odstartována „éra“ využívající měření časově rozlišených infračervených spekter, které našly své uplatnění i v jiných materiálových oborech jako jsou např. polyestery mikrobiálního původu.

I když je můj vědecký „background“ zejména spjat s výzkumem huminových látek resp. nativní organické hmoty, tak v rámci stále probíhajícího projektu GAČR 20-28208Y: „Studium vlivu aplikace biouhlu na charakter půdní organické hmoty – od multidisciplinární metodiky po interpretaci na molekulární úrovni“ se můj vědecký obzor rozšířil o tuto velmi zajímavou a dnes stále více zkoumanou antropogenní půdní pomocnou látku PPL.

Na tuto projektovou angažovanost bych navázal projektem TH02030073 TAČR: „Revitalizace zemědělské půdy v oblastech ČR ohrožených suchem“, z jehož řešení vzešly nejen dvě certifikované metodiky, ale rovněž byl tento projekt oceněn cenou TAČR 2022 v kategorii společnost.

V současné době se na Fakultě chemické podílím na garantování a výuce několika odborných předmětů, na jejichž zavedení a inovaci jsem se podílel. V neposlední řadě jsem vyučujícím i praktického cvičení z Instrumentální a strukturální analýzy, který je pod záštitou Ústavu chemie potravin a biotechnologií. V rámci inovovaného předmětu: Úvodu do chemie přírodních materiálů, ale i dalších, se snažím posluchačům zjevit multidisciplinaritu oboru Fyzikální chemie, která je neoddělitelnou součástí mnohých vědních oborů, jako jsou biopolymery, biologické pochody spojené s imunitní odezvou organismu, interakce elektromagnetického záření s hmotou, technologické výroby látek biologického původu atd.

## 2 PRAEFATIO

Předložená habilitační práce představuje můj osobní pohled na problematiku přírodní organické hmoty, a to zejména z hlediska její *geneze, struktury a biologických aspektů* v průběhu tzv. *humifikace*. V plné verzi této habilitační práce uvidíme nejen můj osobní pohled na současný stav tohoto vědního oboru, ale i mnohé cesty, kterými se tato vědní disciplína vydávala během svého „života“. Nicméně pevně věřím, že pozornému čtenáři vyvstane na mysli, jakými vědními proudy jsem byl během svého studia huminové chemie nejvíce ovlivněn, přičemž je nutno zdůraznit, že právě obor Fyzikální chemie se stal jistým nástrojem k mému faktickému a dá se říci, že v určitých momentech i kritickým pohledem na tyto přírodní sloučeniny, jež se neustále nacházejí v dynamickém procesu svého vzniku, či jsou neoddělitelně spjaty s živými ekosystémy, které na ně působí. Dále se pokusím o náčrt subjektivního pohledu vyplývajícího z osobního přístupu v oblasti studia těchto *biokoloidních* sloučenin, které v současnosti ve vědeckých kruzích čelí názorové pluralitě nejen o jejich faktické struktuře (polymerní × supramolekulární model), ba dokonce i jejich existenci<sup>1</sup>. V tomto kontextu je očividné, že úloha fyzikální chemie hraje významnou a nezastupitelnou roli, jak tyto organické sloučeniny experimentálně „uchopit“, a to zejména, tak, aby nedocházelo jejich vnesení do oblasti patologické vědy. V tomto ohledu nám může být vzorem „těžká váha“ fyzikální chemie Irving Langmuir (\*1881–†1957).

Pro mnoho chemiků zabývajících se oborem studia přírodní organické hmoty a jejich podmožinou huminových látek by jistým kodexem měla být myšlenka, že se ve své podstatě dotýkají živé přírody, ačkoliv jsou tyto sloučeniny již transformovány v procesu humifikace, v tomto kontextu lépe řečeno tlení. Přestože by se na první pohled mohlo zdát, že jsem zde zmínil protimluv, tak opak je pravdou, pokud si uvědomíme, jakých úloh jsou tyto sloučeniny schopny plnit v nejrůznějších ekosystémech, a to převážně v interakci s živými organismy (viry, bakterie, plísňe, houby, nižší a vyšší rostliny atd.).

Pokud bych měl představit metodologický přístup vycházející z fyzikálně-chemického konceptu, jež je pomyslnou kostrou mého výzkumu, tak by se převážně jednalo o následující myšlenkový řetízek složený z nutnosti úvahy nad následujícími aspekty: (i) porozumění termodynamickým dějům, které jsou hybateli nejen jejich interaktivity resp. reaktivity, ale jsou hlavními koordinátory jejich strukturní architektury v nejrůznějších prostředích, kterými jsou tyto sloučeniny vystaveny; (ii) vztahové interakce a z ní vyplývající role v environmentálním a ekologickém fungování systému; (iii) a v neposlední řadě i jejich dynamika geneze a biodostupnosti v přírodním prostředí. Co se týče navržení experimentálního designu, jež byl využíván v mnoha předložených studiích, tak byl z velké části konzistentní, a to bez ohledu studovaného systému, ale vždy s hlavním zřetelem na jistou experimentální robustnost. Jinými slovy, výše zmíněný experimentální přístup je synergií nejen metod strukturní analýzy, ale i pokročilých metod interpretace zahrnujících dekonvoluce spekter, multikomponentální analýzu aj. Na druhou stranu jsou využívány i ty, které můžeme zařadit mezi tzv. rutinní, jako jsou metody termické analýzy, jakož i původně vyvinuté metody frakcionace a upravené

---

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

metody izolace, tak aby byly použitelné pro co nejširší řadu přírodních matric s ohledem na jejich antropogenní původ. Dále jsem měl snahu o posun těchto výsledků k aplikovanému výzkumu, který by byl reprezentován aplikačním a funkčním potenciálem těchto materiálů. V tomto kontextu lze zmínit studie struktury huminových látek různého původu s dynamikou procesu humifikace, dekompozičními testy organické hmoty a jejich simulace v reálném prostředí, jakož i analýzy komerčních půdních pomocných látek na bázi lignosulfonanů.

Dále bych rád na tomto místě zmínil, že moje jistá „obratnost“ v oblastech instrumentálních technik, jako jsou termické, spektrometrické a v neposlední řadě i metody řízené „lyofilizace“ resp. sušení mrazem mě dávají celou řadu příležitostí se zapojit do dalších oblastí materiálového a aplikačního studia, jako jsou polysacharidové hydrogely, biodegradabilní polymery na bázi polyhydroxyalkanoátů, nanomateriály aj.

Pokud bych měl charakterizovat dvěma výstižnými slovy svoji pedagogicko-vědeckou „osobní“ vlastnost, tak by to byla s největší pravděpodobností pečlivost, zvědavost a nedočkavost. Tyto a věřím, že dobré vlastnosti asi nejvíce vyplývají na povrch, když jsem přítomen v laboratořích se svými studenty (bakaláři a diplomanty) a se zaujetím koukám na jejich experimentální počínání. Je to asi dáno tím, že celou řadu experimentů jsem si doposud neměl čas osobně „osahat“, a tak s jistým napětím pozoruji, zda se dílčí experimentální kroky povedou. Pro lepší představu uvedu např. přípravu pleťového krému vlivem fázové inverze resp. metodou přidavku vnější fáze k vnitřní.



### 3 ÚVOD

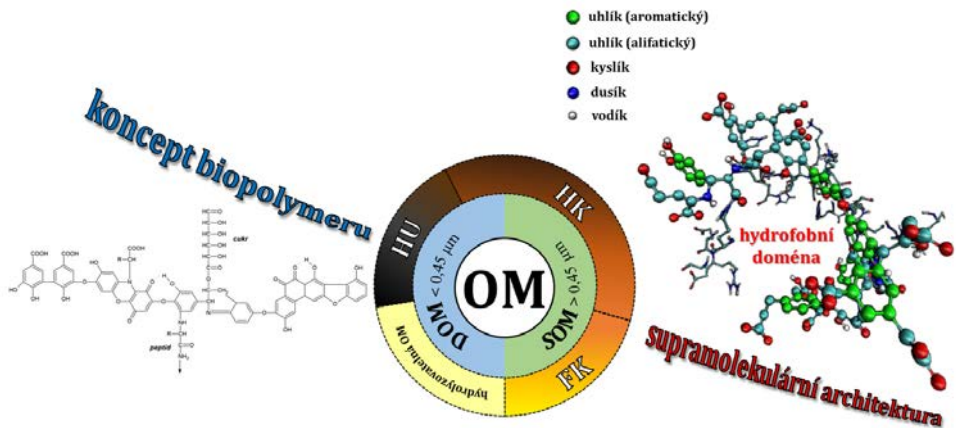
Aniž bychom si to dnes uvědomovali, tak lidská bytost tj. člověk explicitně vychází z termínů označujících půdu či zemi. Příímý odkaz můžeme nalézt v knize Genesis, která pojednává o mytickém příběhu stvoření světa, kde první bytost Adam je eponymem člověka. Hebrejské slovo *Ādām* etymologicky souvisí s výrazem pro hlínu *‘ādāmāh*, a tudíž je příímým 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 příímým 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.

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 můžou 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 prekursorzy a mechanismy v daných cestách převažují. Tyto cesty jsou známé jako teorie *ligninová*, *polyfenolová* a *kondenzace sacharidů s aminy* [1–8]. V nedávné době byla publikována tzv. *polyketidová teorie*, jež je ve své podstatě příímým 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* [9–11], 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 Waalovy 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* [12, 13].

Na tomto místě se nabízí otázka, jakým způsobem lze tuto úvodní část autoreferátu 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 nejrozumnějších 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 nemluví.



**Obrázek 1:** Rozdělení organické hmoty OM a biopolymerní versus supramolekulární konceptu struktury huminových látek.

# 4 METODY IZOLACE A FRAKCIONACE HUMINOVÝCH LÁTEK

## 4.1 Standardní postup izolace HL dle společnosti IHSS

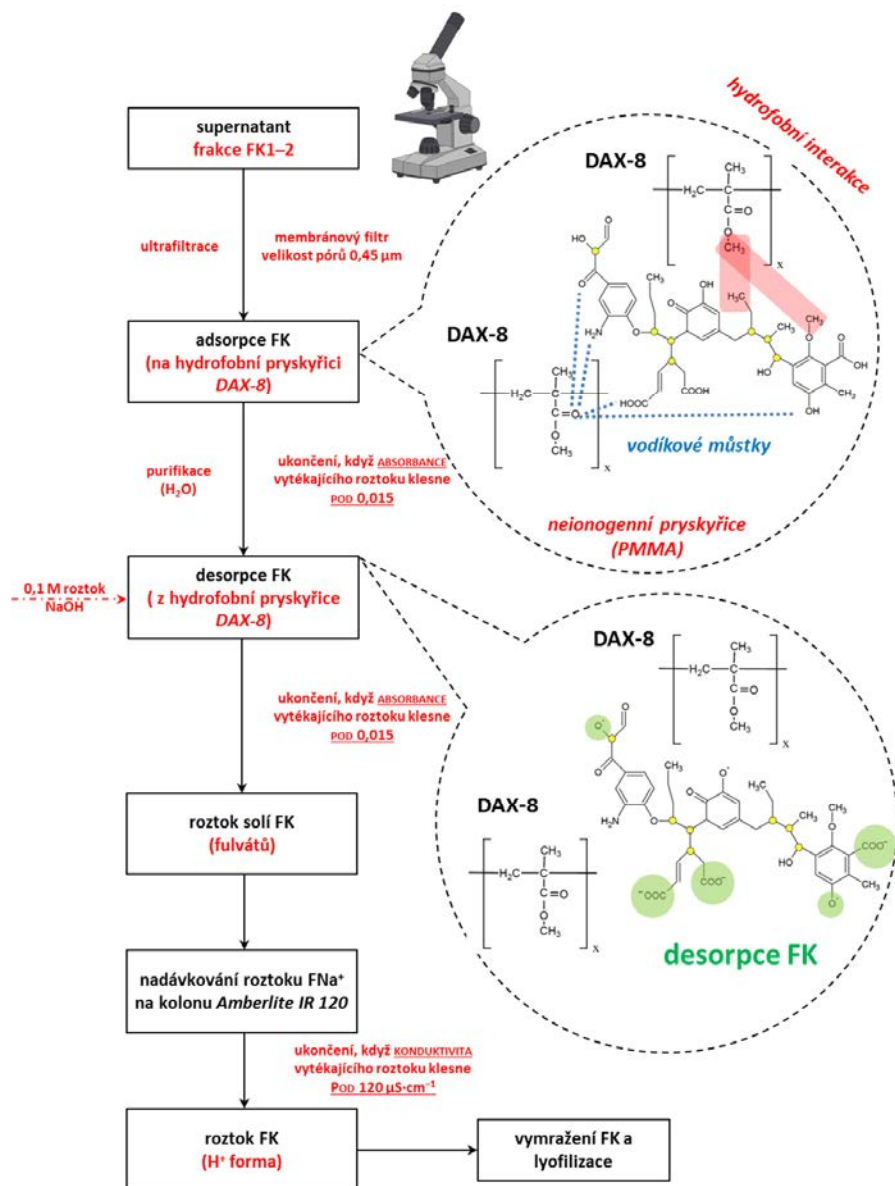
Jednotlivé frakce HL mohou být rozděleny do tří základních kategorií na základě jejich rozpustnosti resp. nerozpustnosti v alkalickém či kyselém prostředí. Této fundamentální vlastnosti je s výhodou využíváno při izolaci a následné frakcionaci těchto biokoloidních sloučenin. V dnešní době je publikována 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.) [14–17].

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. 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>2, 3</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

<sup>2</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>3</sup> 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.

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.



**Obrázek 2:** Postup a princip izolace fulvinových kyselin dle společnosti IHSS.

Pro lepší ilustraci lze uvést, že obsah nespalitelného podílu nepřevýšil u izolovaných HK limitní hodnotu 3,1 hm. %. V porovnání se standardy HK 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>3</sup>.

## 4.2 Frakcionace organické hmoty a huminových látek

### 4.2.1 Extrakce lipidických složek lignitu

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* [18, 19].

Pro samotnou extrakci lipidických složek OM bylo vybráno sedm zástupců hnědého uhlí, které se lišily zeměpisným původem uhelných pánví<sup>4</sup>. Blíže se jednalo o vzorky lignitu pocházejících z oblastí střední a jihovýchodní Evropy.

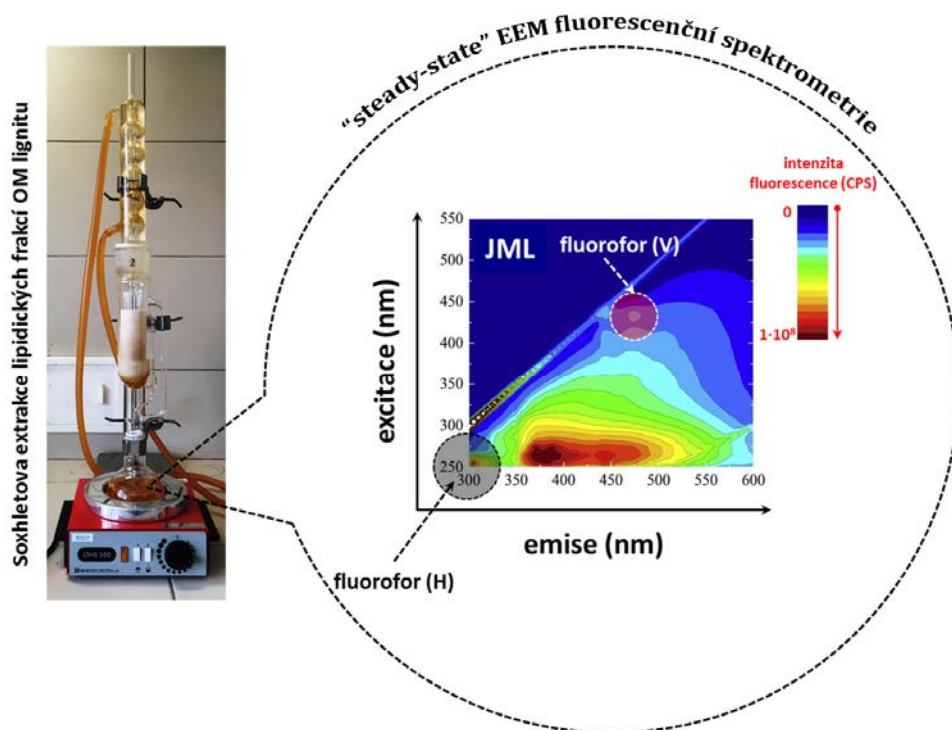
Jednotlivé lipidické frakce byly extrahovány pomocí Soxhletovy aparatury za použití chloroformu jakož to vhodného organického rozpouštědla. Jak je doloženo mnohými instrumentálními technikami použitými v této studii, tak extrahované bitumeny měly převážně alifatický charakter s minoritními příspěvky aromatických sloučenin

---

<sup>4</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. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.02.008>.

substituovanými kyslík obsahujícími funkčními skupinami, jako jsou karboxyly, hydroxyly včetně fenolických -OH skupin, estery, ethery, případně i konjugované karbonyly. Strukturální parametr reprezentovaný poměrem intenzit absorpčních pásů odpovídajících asymetrickým valenčním vibracím C-H vazeb v methylových a methylenových funkčních skupinách se ukázal jako velmi senzitivní kritérium k posouzení rozvětvenosti resp. linearity lipidických řetězců.

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 spoluplytvářejících 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 dozajista vliv i intramolekulární stavy přenosu náboje v rámci tak složitého luminiscenčního systému.



**Obrázek 3:** Fluorescenční EEM spektrum lipidické frakce JML rozšiřující rodinu doposud známých fluoroforů přírodní OM.

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.

#### 4.2.2 Sekvenční frakcionace HK dle polarity org. rozpouštědla

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 [12–13]. 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 hydrolyze 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 habilitační teze můžeme podat důkaz o šetrném extrakčním postupu, který lze využít k významnému snížení molekulární heterogenity HK<sup>5</sup>.

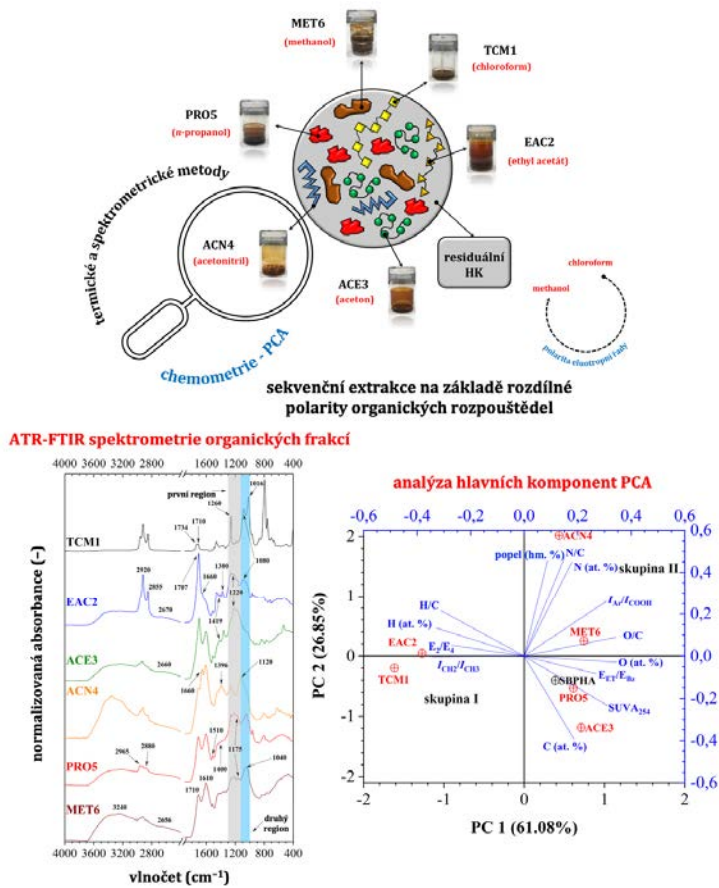
Metodický přístup, který byl použit v této odborné práci lze rozdělit na dvě hlavní cesty: (i) vhodné zvolení resp. definice použité eluotroponí řady organických rozpouštědel; (ii) následně byly vytipovány vhodné instrumentální techniky strukturní a kompoziční analýzy.

Vzorek rašelinové HK byl podroben sekvenční frakcionaci za použití eluotroponí řady organických rozpouštědel se vzrůstající polaritou tzn.: trichlormethan (TCM) < ethylacetát (EAC) < aceton (ACE) < acetonitril (ACN) < *n*-propanol (PRO) < methanol (MET). Výtěžky extrakce jednotlivých organických frakcí se pohybovaly poměrně v širokém rozmezí, avšak nejvyšší extrakční účinnosti bylo dosaženo v případě acetonu a *n*-propanolu. Tímto extrakčním postupem, který nikterak neatakuje kovalentní vazby mezi jednotlivými stavebními kameny spoluvytvářejícími supramolekulární asociáty HK,

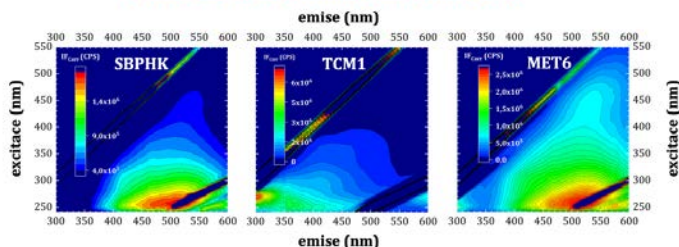
---

<sup>5</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.

jako jsou residua ligninu, celulózy, hemi-celulózy a dalších biopolymerů, bylo celkově extrahováno 57 hm. % výchozí organické hmoty rašeliništní HK. 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.



#### „steady-state“ fluorescenční spektrometrie (EEM)



**Obrázek 4:** Schématické znázornění extrakce organických frakcí HK na základě rozdílné polarity eluotropní řady použitých organických rozpouštědel.



V této souvislosti se ukázalo, že nepostradatelným ukazatelem manifestujícím aromaticitu a střední molekulovou hmotnost  $\bar{M}_r$ , a to nejen extrahovaných organických frakcí, ale i původní a residuální HK je specifická hodnota parametru  $SUVA_{254}$ . Jinými slovy, absorpční parametr  $SUVA_{254}$  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  $^{13}C$  NMR spekter a z nich vypočtený index aromaticity.

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 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.

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.

## 5 ASPEKTY ENVIRONMENTÁLNÍHO VYUŽITÍ KAUSTOBIOLITŮ

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 neoddělitelně spjata s půdní organickou hmotou. K odražení těchto negativních vlivů by mohla přispět aplikace lignitu či oxyhumolitu, jakožto vhodného půdního kondicionéru<sup>6, 7, 8</sup>.

## 5.1 Neenergetické využití lignitu

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 [20], které tvoří samostatnou skupinu tzv. půdních pomocných látek (PPL).

### 5.1.1 Jihomoravský lignit jako půdní pomocná látka

Půda a její základní vlastnost – úrodnost, významným způsobem ovlivňuje tzv. bonitu zemědělské produkce i její kvalitu, včetně chemického složení rostlin resp. polních plodin. Pedologicko-agronomické vlastnosti půdy významnou měrou ovlivňují růst a vývoj rostlin zvláště pak, ve stresových podmínkách např. při deficitu srážek.

Vysoký obsah vody, jinými slovy relativně vysoká schopnost její pohltivosti je pro mladá uhlí typickou fyzikálně-chemickou vlastností, a to díky poměrně vysokému obsahu hydrofilních funkčních skupin, jako jsou ty, které převážně obsahují kyslík.

Hlavní úlohou aplikovaného lignitu bylo zvýšit obsah půdní organické hmoty a podporovat tak její přirozenou tvorbu. Loužením ve vodném prostředí, fyzikální dekompozicí svých částic (povětrnostními podmínkami), anebo vlivem půdních mikroorganismů a rostlinných exudátů může lignit dodávat organickou hmotu půdě, jež je na tuto komponentu chudou, a mluvíme tak o půdách, které jsou postiženy enormním suchem.

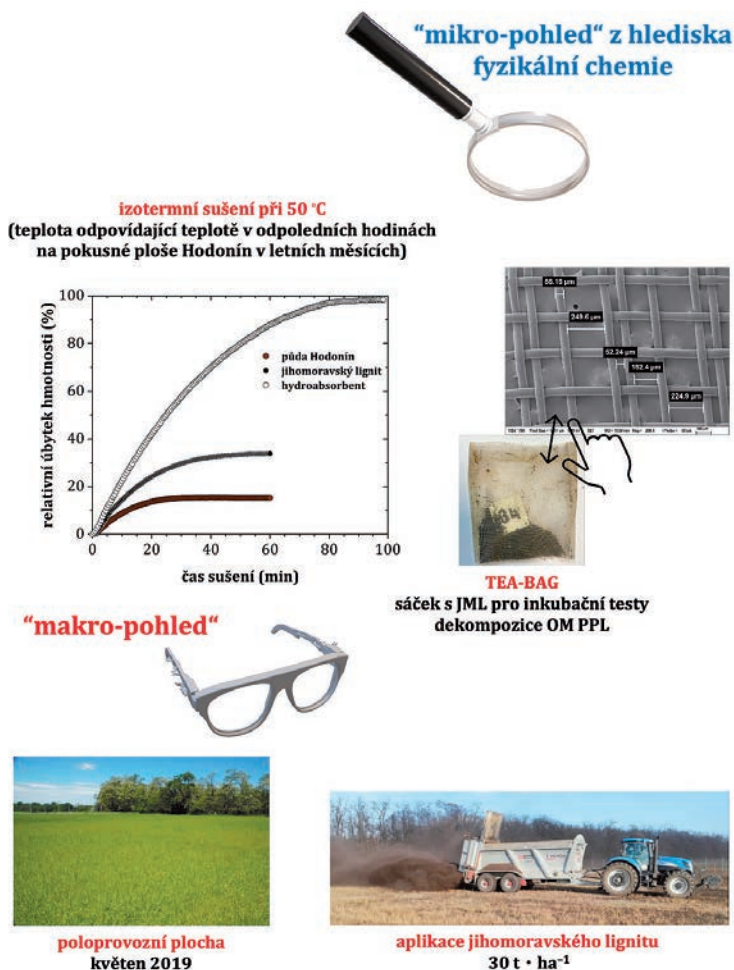
Jihomoravský lignit vykazoval přibližně třikrát vyšší nasákavost v porovnání se silně dezertifikovanou půdou. Konkrétně může být nasákavost lignitu v deionizované vodě vyjádřena hodnotou 88 %, jež je vztažena k původní suché hmotnosti, přičemž tato hodnota za použití vodovodní vody činila 62 %. Nasákavost půdy byla pouze 28 % resp. 21 %. Dále vzorek lignitu vykazoval dvakrát delší dobu sušení resp. ztrátu veškerých typů vod v porovnání se vzorkem půdy. Tento „sušící“ experiment byl realizován za izotermních podmínek, kdy teplota během celého experimentu byla 50 °C.

<sup>6</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>7</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>8</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.

Dlouhodobé inkubační testy inspirované metodikou využití čajových sáčků [21] jasně dokázaly, že stabilita lignitu je v půdním prostředí do jisté míry vysoká, avšak drobné úbytky hmotnosti v dekompozičním procesu jsou na základě kvalitativního a „semikvantitativního“ vyhodnocení infračervených spekter spjaty převážně s dekompozicí tzv. fytomasy tzn. *residuů ligninu, celulózy* a v omezené míře i *hemicelulóz*. Jinými slovy, strukturně složitá organická hmota lignitu se v průběhu její dekompozice stává strukturně jednodušší a rovněž i bio-dostupnější pro půdní ekosystém. Aplikaci resp. pozitivní efekt lignitu ve spojitosti s použitým superabsorbentem na bázi akrylátového polymeru byl manifestující zvláště v hodnotících kritériích, jako je polní vzcházivost semene, růst a následný vývoj rostliny (trav a jetelovin), a v neposlední řadě i odolnost vůči stresovým podmínkám (sucho, výskyt chorob a škůdců).



**Obrázek 5:** Lignit jako PPL pro zlepšení vitality extenzivně využívaných ploch v suchem ohrožených oblastech.

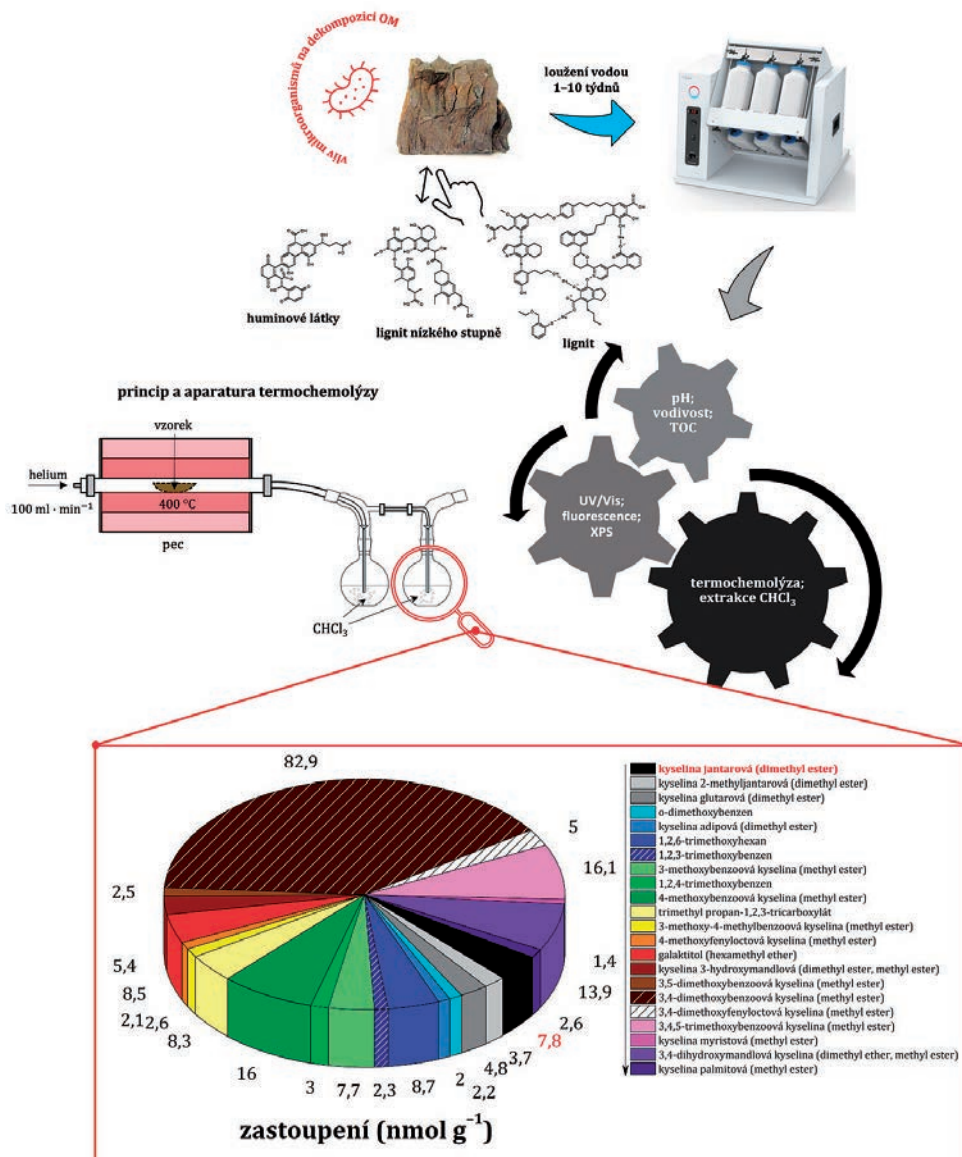
Podpora humifikačního procesu v půdách postižených suchem je především dána schopností lignitu zlepšovat mnohé fyzikální, chemické a v neposlední řadě i biologické vlastnosti půdy. Z fyzikálně-chemického pohledu se jedná o tvorbu tzv. půdních agregátů, jejichž primární vlastností je významně podpořit 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.

### 5.1.2 Vodou extrahovatelné frakce OM lignitu

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<sup>8</sup>. 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 [22–24]. 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 doméně 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 hlavní části 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 potenciální environmentální či toxické riziko, a to v případě aplikace lignitu, jako vhodného půdního kondicionéru.



**Obrázek 6:** Studium vodou extrahovatelné organické hmoty jihomoravského lignitu.

### 5.1.3 Lignit – bohatý zdroj huminových kyselin

Další odborná práce vzešla z potřeby komplexního přístupu při charakterizaci huminových kyselin (HK) izolovaných z lignitů pocházejících z rozličných evropských pánví<sup>9</sup>. 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) [25, 26]. 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 strukturálních 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  $\bar{M}_r$  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 cm<sup>-1</sup>, který lze jednoznačně přiřadit valenční vibraci Si–O vazeb v silikátech, jako je kaolinit a dickit, které mají převážně Al<sup>3+</sup> 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 (á) – *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

<sup>9</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.

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 materiálu 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.

## 6 STUDIUM OM HUMIFIKOVANÝCH BIOODPADŮ

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 celulózařského průmyslu, dále bychom mohli do této kategorie zařadit odpady pocházející z kožedělného a papírenského průmyslu, tak jako i odpady čistírenských a vodárenských kalů [27–30]. 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<sup>10</sup>. Na tomto místě je nutné říci, že právě pyrolyzní zpracování čistírenských a vodárenských kalů je velmi dobrou alternativou zpracování těchto environmentálně rizikových odpadů.

## 6.1 Přírodní kompost jako vhodná půdní pomocná látka pro další její transformaci v půdě

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.

Design této studie<sup>11</sup> spočíval ve střednědobém sledování vlivu aplikace kompostu na strukturní a chemické vlastnosti půdních HK izolovaných z Černoze 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.

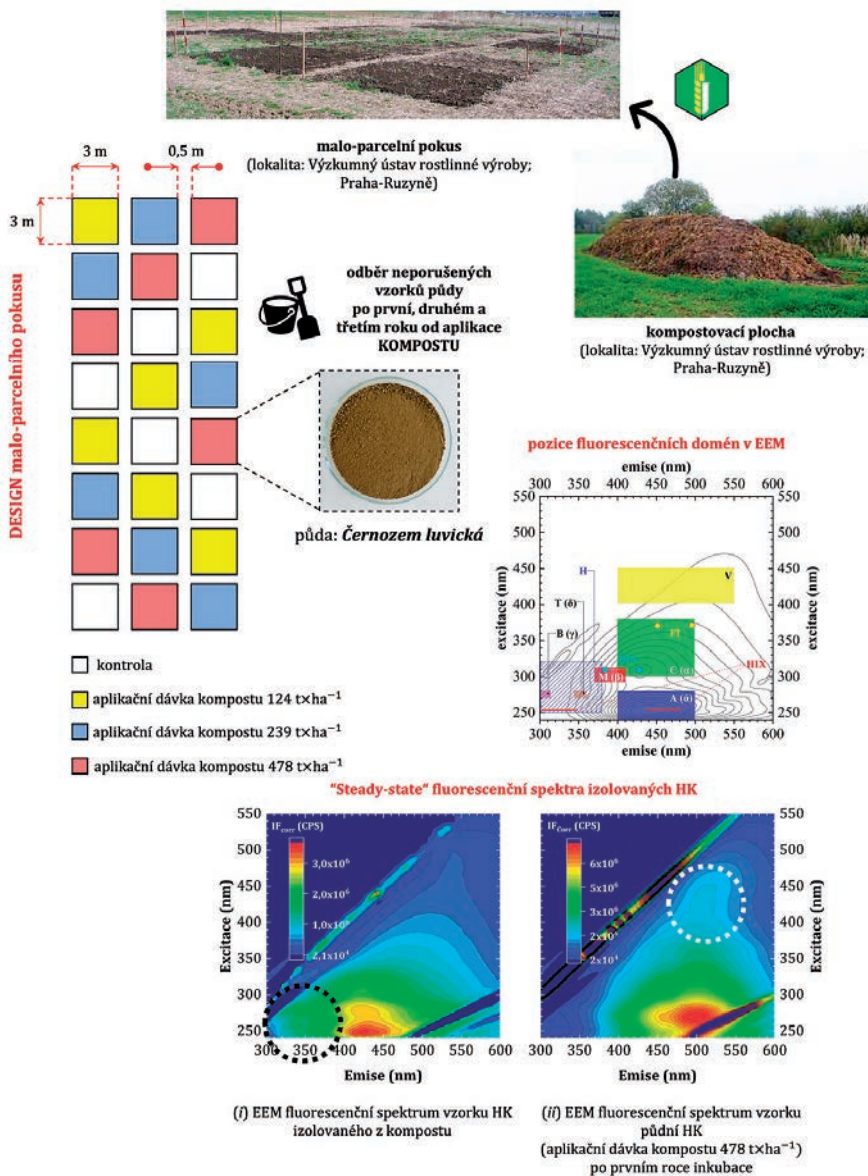
Nicméně, co bylo v této studii zajímavé, je, že v důsledku aplikovaného kompostu byly půdní HK charakterizovány vyšším obsahem reaktivních funkčních skupin, jako jsou karboxylové, -OH fenolické, etherové a alkoholové, které plní nezastupitelnou úlohu při výživě rostlin a půdních mikroorganismů. Jelikož 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.

---

<sup>10</sup> Kalina, M.; Sovová, Š.; Hajzler, J.; Kubíková, L.; Trudičová, M.; Smilek, J.; **Enev, V.** Biochar Texture - A Parameter Influencing Physicochemical Properties, Morphology, and Agronomical Potential. *Agronomy* **2022**, *12*, 1–16.

<sup>11</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.





**Obrázek 7:** Dekompozice a následná re-kompozice organické hmoty kompostu v půdním prostředí.

Dále bylo zjištěno, že po aplikaci a následné inkubaci kompostu jsou půdní HK signifikantně charakterizovány vyšším stupněm aromaticity a střední molekulové hmotnosti  $\bar{M}_r$ , o čemž nejen vypovídají vypočtené absorpční koeficienty a fluorescenční indexy, ale i absorpční pásy lokalizované při 1510 cm<sup>-1</sup>, 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 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ). 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.

Jednoznačně se ukázalo, jako nezastupitelnou úlohu mají termické a spektrometrické techniky při studiu a charakterizaci HK, které jsou v dynamickém procesu humifikace předmětem neustálých strukturních, chemických a morfologických změn.

## 6.2 HK jako indikátor zralosti vermikompostů – biologický a fyzikálně-chemický pohled

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* [31–33]. 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 fytotoxických 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<sup>12</sup>“ 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 matici OM.

Za účelem studia a kvalitativní charakterizace těchto biokoloidních sloučenin byly vybrány jak termické a spektrometrické instrumentální techniky, tak i metody mikrobiologické analýzy.

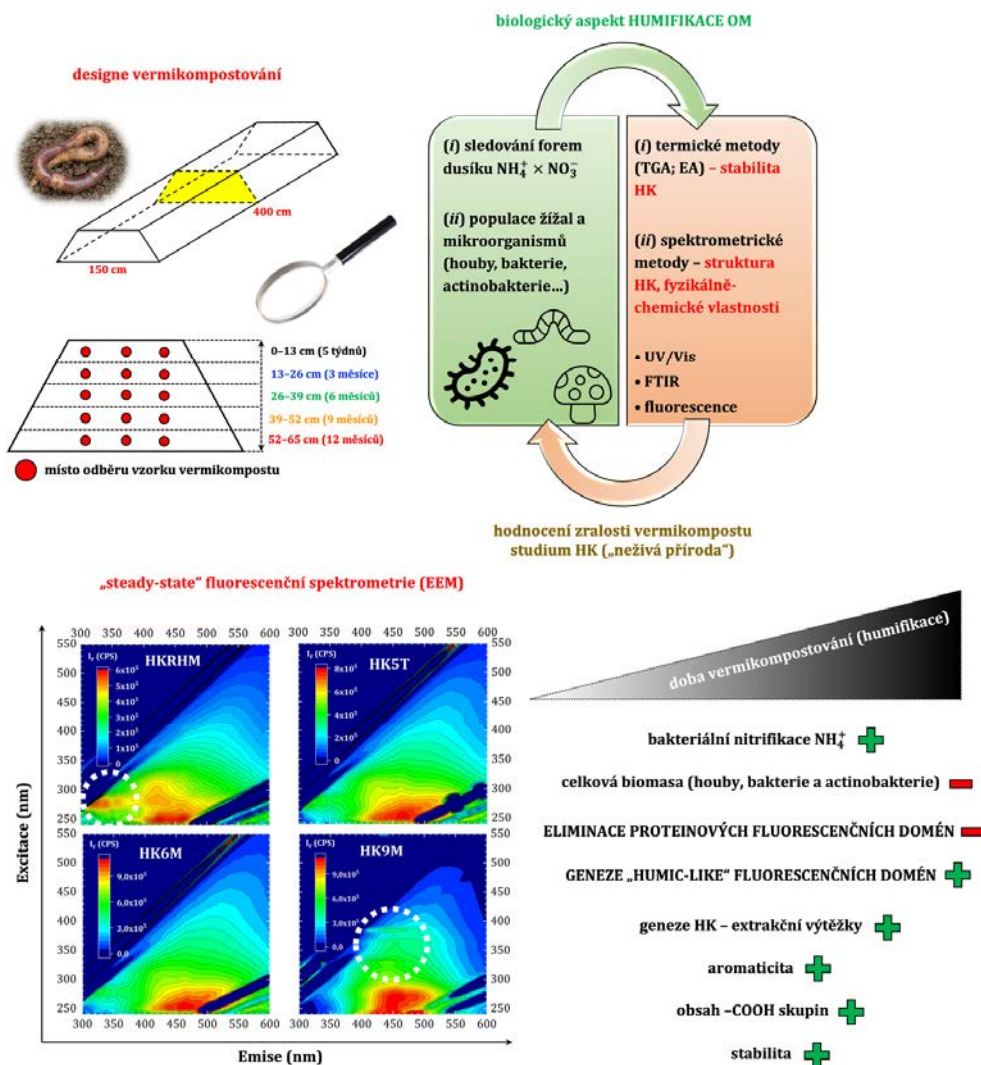
Extrakční výtěžky HK jasně poukazují na velmi rychlou dynamiku jejich geneze v průběhu vermikompostování koňského hnoje, jelikož již v prvotní fázi kompostování tzn. po pěti týdnech se jejich obsah zvýšil takřka dvojnásobně. Nicméně si můžeme povšimnout, že tento trend byl v dalších fázích vermikompostovacího 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 aromatičtější 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

---

<sup>12</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.

hmotnosti  $\bar{M}_r$  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 neposlední řadě i polysacharidům.



**Obrázek 8:** Biologické a fyzikálně-chemické aspekty vermikompostování OM koňské mrvy.

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 jistotou 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.

## 7 ORGANICKÁ HMOTA HNĚDÉHO UHLÍ – LIGNITU

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 [34–37]. 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 z pravidla 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 [38]. 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.

## 7.1 Pyrolyzní techniky při studiu organické hmoty jihomoravského lignitu

Hlavní myšlenkou této práce<sup>13</sup> bylo prozkoumat degradační mechanismy probíhající v průběhu pyrolýzy OM lignitu a na základě identifikovaných produktů se pokusit o celkové zhodnocení jednotlivých stovebních jednotek, které by podaly jasné informace o původní organické hmotě tohoto kaustobiolitu. Jelikož, základní průměrné složení hnědého 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.

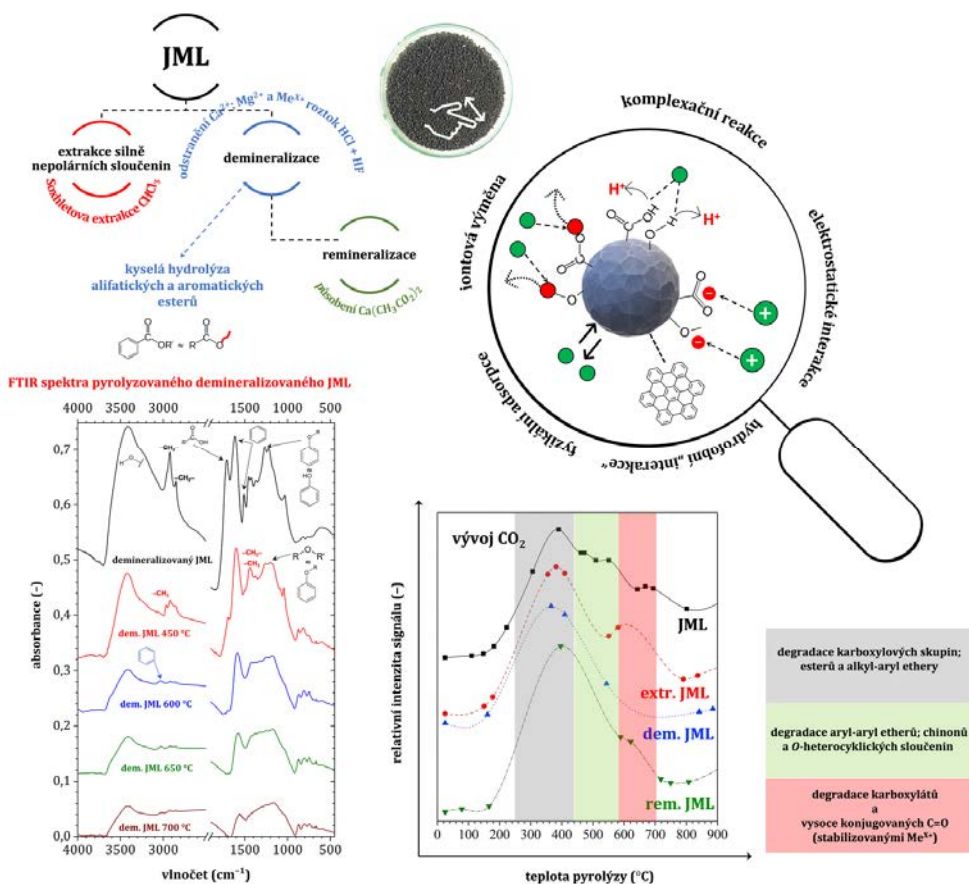
Demineralizace JML byla realizována pomocí směsného roztoku HCl a HF, v důsledku, čehož došlo k významnému snížení obsahu anorganických sloučenin až na polovinu původní hodnoty. Tato purifikační procedura přispěla k jednoznačné interpretaci absorpčních pásů v oblasti tzv. *fingerprintu* (otisku prstu), kde nastává absorpce nejen funkčních skupin a stovebních jednotek organických sloučenin, ale i výše zmíněných anorganických látek, jako je kaolinit, montmorillonit, amorfní a krystalický  $\text{SiO}_2$ , 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  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  při

<sup>13</sup> Doskočil, L.; **Enev, V.**; Grasset, L.; Wasserbauer, J. The characterization of South Moravian lignite in its natural and treated forms using thermal degradation methods. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2017**, *128*, 83–91.

termogravimetrické analýze spojené s FTIR detekcí (TG/FTIR). V tomto kontextu můžeme říci, že v případě studia nejen nativních kaustobolitů, 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.

Termochemolyza organické hmoty JML derivatizované pomocí tetramethylamonium hydroxidu poukázala na bimodální charakter distribuce lineárních nasycených mastných kyselin ( $C_{12}$ – $C_{34}$ ), přičemž nejvyšší obsah byl detekován v případě kyseliny palmitové ( $n$ - $C_{16}$ ) a montanové ( $n$ - $C_{28}$ ). Soubor identifikovaných mastných kyselin s celkovým počtem uhlíku  $\geq 20$  poukazuje na převážně rostlinný původ OM lignitu. Naproti tomu, mastné kyseliny s nižšími počty atomů uhlíku tzn.  $< C_{20}$  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*).



**Obrázek 9:** Metody studia chemicky modifikovaného substrátu JML za použití pyrolyzních technik.

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 plynných 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.



## 8 ANTROPOGENNÍ PŮDNÍ POMOCNÉ LÁTKY A PŮDNÍ KONDICIONÉRY – LIGNOHUMÁTY

V současnosti se do popředí vědeckého zájmu stále více dostává využití odpadního produktu *lignosulfonanu* [39], 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 [40–42].

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, karboxylové, 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 reaktoru* atd. a v neposlední řadě i s původním druhem použité suroviny, jako je měkké a tvrdé dřevo.

## 8.1 Difuzní techniky v oblasti studia supramolekulárního uspořádání DOM

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 [43]:

$$c_{x,t} = \frac{1}{2} c_0 \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{D_h t}}; \quad (1)$$

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:

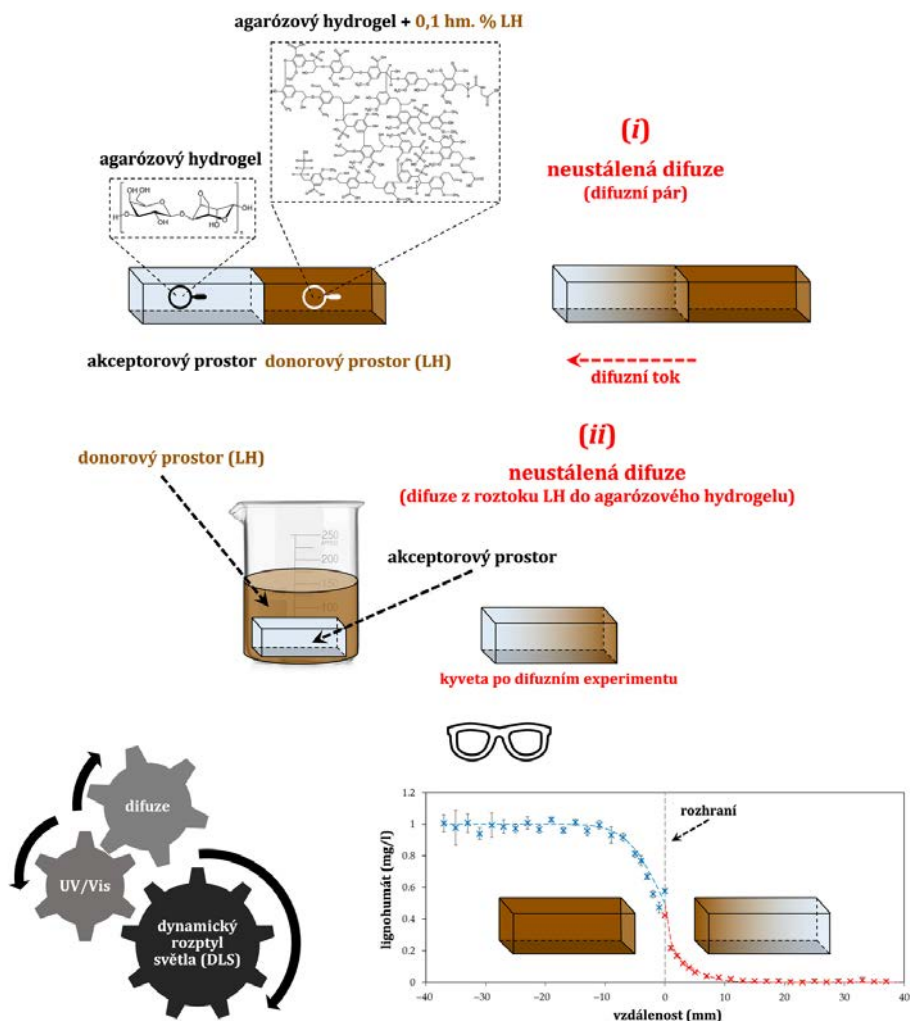
$$m_t = c_0 \sqrt{\frac{D_h t}{\pi}}. \quad (2)$$

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 páru. 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  $\sim -40$  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,

kteře 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.



**Obrázek 10:** Difuzní experimenty difuzního páru a difuze z roztoku LH do agarózového hydrogelu.

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 hromadí 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.

## 9 PÁR SLOV ZÁVĚREM

Hlavním cílem této habilitační práce bylo podat čtenáři jasné důkazy o nezastupitelné úloze fyzikální chemie, která se stala jednou z hlavních hybatelek dosavadního vědění, jakož i neotřelých myšlenek a pohledů v oblastech, jež jsou neodmyslitelně spjaty s tzv. přírodní organickou hmotou. Jinými slovy bychom mohli říci, že právě tato hmota je jistým spojovníkem mezi živou a neživou přírodou na naší planetě Zemi.

V jednotlivých subkapitolách této habilitační práce jsem se pokusil o co nejširší představení daného vědního oboru, kde jsou čtenáři předloženy myšlenky dosavadního vědění, nicméně lze v těchto odstavcích nalézt i celou řadu konkrétních výzev, které v sobě nesou jistý potenciál k dalšímu vědeckému zájmu či experimentálnímu rozpracování. Jinými slovy můžeme říci, že dílčí úspěchy v poznání organické hmoty nevedou tak k ochladnutí vědeckého zájmu, ba naopak jsou pomyslnými klíči, které otevírají další možnosti a směry budoucího bádání.

Při psaní této habilitační práce jsem se mnohokrát ve své kanceláři ocitl ve stavu úplného ticha a samoty – nikým nerušen. V těchto chvílích, jak správně formulovat jednotlivé věty a odstavce této práce, mi velmi často vytanuly na mysli vzpomínky, které jsou datovány od bakalářského studia až doposud.

V této souvislosti bych rád poděkoval všem mým pedagogickým a vědeckým mentorům, kolegům a v neposlední řadě i ne méně studentům. Všichni tito jmenovaní se podíleli na formaci mé akademické osobnosti na zdejší fakultě, a to zejména, že jsem mohl být ovlivněn jejich zkušenostmi, znalostmi, otevřeným osobním přístupem, pílí a nadšením pro vědu.

## 10 REFERENCE

- [1] Stevenson, F.J. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions, 1<sup>st</sup> ed.; John Wiley: New York, NY, USA, 1994, pp. 512.
- [2] 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).
- [3] 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).
- [4] Gieseking, J.E. Soil Components, Volume 1, Organic Components, 1<sup>st</sup> ed.; Springer-Verlag, New York, Inc. 1975, pp. 535.
- [5] 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.
- [6] Waksman, S.A. Humus. Origin, chemical composition and importance in nature, 1<sup>st</sup> ed.; The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1936, pp. 494.
- [7] 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>.
- [8] 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>.
- [9] Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* **2001**, *166*, 810–832.
- [10] 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).
- [11] Wershaw, R.L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.* **1999**, *164*, 803–813. <https://doi.org/10.1097/00010694-199911000-00004>.
- [12] 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>.
- [13] 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>.
- [14] 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.
- [15] 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>.
- [16] 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>.
- [17] 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>.
- [18] Lesueur, D. The colloidal structure of bitumen: Consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145*, 42–82. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.08.011>.
- [19] Životić, D.; Wehner, H.; Cvetković, O.; Jovančičević, B.; Gržetić, I.; Scheeder, G.; Simić, V. Petrological, organic geochemical and geochemical characteristics of coal from the Soko mine, Serbia. *Int. J. Coal Geol.* **2008**, *73*, 285–306. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2007.07.001>.

- [20] Ciarkowska, K.; Sołek-Podwika, K.; Filipiek-Mazur, B.; Tabak, M. Comparative effects of lignite-derived humic acids and FYM on soil properties and vegetable yield. *Geoderma*. **2017**, *303*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.05.022>.
- [21] Keuskamp, L.A.; Dingemans, B.J.J.; Lehtinen, T.; Sarneel, J.M.; Hefting, M.M. Tea Bag Index: A novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods Ecol. Evol.* **2013**, *4*, 1070–1075. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12097>.
- [22] Berrueta, L.A.; Fernandez, L.A.; Vicente, F. Fluorescence study of the solubilization of benzo [a] pyrene: Application to its detection in coal washing waters. *Anal. Chim. Acta.* **1991**, *243*, 115–119. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)82548-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)82548-9).
- [23] Nanny, M.A.; Ratasuk, N. Characterization and comparison of hydrophobic neutral and hydrophobic acid dissolved organic carbon isolated from three municipal landfill leachates. *Water Res.* **2002**, *36*, 1572–1584. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00359-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00359-1).
- [24] Fabiańska, M.J.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2012.11.008>.
- [25] Das, T.; Saikia, B.K.; Baruah, B.P.; 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*, 468–474. <https://doi.org/10.1007/s12594-015-0334-0>.
- [26] Fong, S.S.; Seng, L.; Majri, N.B.; Mat, H.B. A comparative evaluation on the oxidative approaches for extraction of humic acids from low rank coal of Mukah, Sarawak. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 34–40.
- [27] Pedra, F.; Plaza, C.; Fernández, J.M.; García-Gil, J.C.; Polo, A. 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 Manag.* **2008**, *28*, 2183–2191. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.09.031>.
- [28] Aguiar, N.O.; Olivares, F.L.; Novotny, E.H.; Dobbss, L.B.; Balmori, D.M.; Santos-Júnior, L.G.; Canellas, L.P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil.* **2013**, *362*, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5>.
- [29] Adani, F.; Genevini, P.; Ricca, G.; Tambone, F.; Montoneri, E. Modification of soil humic matter after 4 years of compost application. *Waste Manag.* **2007**, *27*, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.04.004>.
- [30] Romero, E.; Plaza, C.; Senesi, N.; Nogales, R.; Polo, A. Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma*, **2007**, *139*, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.03.009>.
- [31] Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A.; Rufete, B.; Paredes, C. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.003>.
- [32] Garg, V.K.; Chand, S.; Chhillar, A.; Yadav, A. Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2005**, *3*, 51–59.
- [33] Jeong, K.H.; Kim, J.K.; Ravindran, B.; Lee, D.J.; Wong, J.W.C.; Selvam, A.; Kwag, J.H. Evaluation of pilot-scale in-vessel composting for Hanwoo manure management. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 201–206.
- [34] Doskočil, L.; Pekař, M. Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Process. Technol.* **2012**, *101*, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.02.010>.
- [35] Hassani, A.; Vafaei, F.; Karaca, S.; Khataee, A.R. Adsorption of a cationic dye from aqueous solution using Turkish lignite: kinetic, isotherm, thermodynamic studies and neural network modeling. *J Ind. Eng. Chem.* **2014**, *20*, 2615–2624. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.10.049>.
- [36] Chassapis, K.; Roulia, M.; Tsigirigi, D. Chemistry of metal-humic complexes contained in Megalopolis lignite and potential application in modern organomineral fertilization. *Int. J. Coal Geol.* **2009**, *78*, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2009.03.004>.
- [37] Doskočil, L.; Grasset, L.; Válková, D.; Pekař, M. Hydrogen peroxide oxidation of humic acids and lignite. *Fuel*, **2014**, *134*, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.011>.
- [38] Kögel-Knabner, I. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Org. Geochem.*, **2000**, *31*, 609–625. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00042-5).

- [39] 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>.
- [40] 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. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0611-6>.
- [41] 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*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0469-x>
- [42] Enev, V.; Pospíšilová, L.; Klučáková, M.; Liptaj, T.; Doskočil, L. Spectral characterization of selected natural humic substances. *Soil Water Res.* **2014**, *9*, 9–17. <https://doi.org/10.17221/39/2013-SWR>.
- [43] 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. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008>



## ABSTRAKT

Habilitační práce představuje autorův pohled na fyzikální chemii jako na klíčový chemický obor studia přírodní organické hmoty resp. huminových látek, které se nacházejí v neustálé dynamické interakci s rozličnými přírodními ekosystémy.

V úvodní části habilitační práce autor představuje svůj osobní pohled na současný stav chemie humusu v kontextu historického vývoje, který přednostně vychází z dosavadních poznatků celosvětového výzkumu. Fyzikální chemie jako samostatný vědní obor v sobě nese bezbřehý potenciál k utváření nových myšlenek a cest, které by vedly k obohacení tohoto vědního oboru.

Dále autor předkládá svůj subjektivní pohled na hlavní výzvy, kterým v současnosti chemie humusu čelí, i určité disharmonie, které stále panují, i tak v elementárních oblastech, jako je strukturní „architektura“ huminových sloučenin.

Druhá část habilitační práce pak shrnuje vlastní přínos autora k rozvoji současného stavu poznání v této vědní disciplíně. Tato část je tematicky a logicky rozdělena do dvou autonomních sekcí, které jsou doplněny o jednotlivá „intermezza“, která ve své podstatě shrnují autorův pohled v oblasti fyzikální chemie huminových sloučenin, aplikace fyzikální chemie v oblastech geneze, humifikačního procesu, supramolekulárního pojetí struktury, fyzikálně-chemických vlastností, mikrobiologie a v neposlední řadě i výzkumu a vývoji půdních pomocných látek na bázi HL/přírodní OM.

Pomyslnou Ariadninou nití habilitační práce je snaha o seznámení čtenáře s dosud diskutovanými či nevyjasněnými otázkami, které jsou autorovým hnacím motorem při studiu těchto biokoloidních sloučenin. V autorově vědecké práci můžete vidět různá témata zájmu – základní fyzikálně-chemický pohled, jež je zaměřen na moderní nástroje chemie, zákony termodynamiky a kolloidní chemie, přičemž nelze neodhlédnout od oblastí, jakou představuje supramolekulární pojetí HL, biologický aspekt humifikace a osobitá metodologie, jež se významně opírá o nástroje moderních spektrometrických metod.

## ABSTRACT

The habilitation thesis presents the author's view of physical chemistry as a key chemical discipline for the study of natural organic matter and humic substances, which are found in constant dynamic interaction with different natural ecosystems.

In the introductory part of the original habilitation thesis, the author presents his personal perspective on the current state of the humus chemistry, in the context of historical milestones, which are inextricably linked to scientific knowledge of the worldwide research to date. In his opinion, the physical chemistry as an independent scientific tool has potential contributed to the formation of new ideas and ways, which would lead to the enrichment of this scientific field.

Furthermore, the author presents a subjective view of the main challenges that humus chemistry currently faces, as well as the disharmony which still prevails in such elementary area as a structural "architecture" of humic substances.

The second part of the habilitation work then summarized the author's own contribution to the development of the state of knowledge in the scientific discipline. This part is thematically and logically divided into two sections, which are supplemented by individual "intermezzo" that summarized the author's scientific view in the field of physical chemistry of humic substances, the application of physical chemistry in the field of genesis, humification process, supramolecular architecture, physicochemical properties and microbiology, and in research and development of auxiliary soil substances (ASS) based on HS/raw NOM.

The imaginary Ariadne's thread of this habilitation thesis is effort on acquainting the reader with the still debated or unclarified questions, which are the author's driving force in the study of these biocolloid substances. In the author's scientific work you can see different research topics – a fundamental physicochemical view, focused on the modern tools of chemistry, laws of thermodynamics and colloidal chemistry, supramolecular architecture, biological aspect of humification, and distinctive methodology based on physicochemical and modern spectroscopic methods.