

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Ústav pro životní prostředí**

Studijní program: Ekologie a ochrana životního prostředí  
Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Diplomová práce

**Metody odlišení fosilní a recentní organické hmoty v půdách  
výsypek**

*Methods for distinguishing fossil and recent organic matter in post mining soils*

**Bc. Olga Vindušková**

Školitel: **prof. Ing. Mgr. Jan Frouz, CSc.**

Srpen 2013

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejeté) informace) budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze, 16.8.2013

.....  
Olga Vindušková

Děkuji svému školiteli **prof. Ing. Mgr. Jan Frouz, CSc.** za trpělivost, cenné rady a podporu při bádání.

Děkuji **Ing. Anně Proháskové** a **Ing. Václavu Dvořáčkovi, Ph.D.** z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i., za vstřícnost, ochotu a odkrytí tajů infračervené spektroskopie.

Děkuji své **rodině, partnerovi a přátelům** za jejich trpělivost a podporu při studiu - vydržte!

Děkuji Grantové agentuře UK za finanční podporu (grant číslo 922513), bez níž by tato práce nemohla vzniknout.

## Abstrakt

Recentní půdní organická hmota (RPOH) má řadu nepostradatelných vlastností pro kvalitu půdy a životního prostředí. Půdy vznikající na výsypkách po těžbě nerostných surovin jsou charakteristické nízkým obsahem RPOH. Mohou však obsahovat nemalá množství fosilní organické hmoty (FPOH), ať už z uhlí, kerogenu či jiné fosilní složky nadloží. S rozvojem vegetace a přísunem organického materiálu do půdy RPOH přibývá, což zlepšuje kvalitu těchto půd. Pro dobré zhodnocení vývoje kvality těchto půd i pro posouzení sekvestračního potenciálu výsypek je důležité spolehlivé oddělení obsahu recentní a fosilní POH. Podíl recentního a fosilního uhlíku lze úspěšně stanovit pomocí radiokarbonové metody, jejíž finanční náročnost ale brání jejímu rutinnímu používání. Cílem této práce bylo pomocí radiokarbonové metody stanovit obsah a variabilitu fosilního uhlíku v půdách výsypek, zjistit jakou chybou jsou zatíženy metody stanovení POH a testovat potenciál blízké infračervené spektroskopie (NIRS) pro odlišení fosilního a recentního uhlíku.

Fosilní uhlík tvoří v půdách sokolovských výsypek minimálně 13 - 99 % celkového organického uhlíku, což odpovídá absolutním koncentracím 2 – 6 % C. Odečtení obsahu uhlíku z hlubšího horizontu (z hloubky 50 cm) od svrchního horizontu A přináší poměrně dobrý odhad obsahu recentního uhlíku ve svrchní vrstvě. Lze takto použít hodnoty z elementární analýzy, ze stanovení oxidovatelného uhlíku i ztráty žiháním při 550°. Použití těchto metod bez této korekce je nevhodné, jelikož všechny stanovují celkový obsah POH včetně té fosilní. Infračervenou spektrometrií lze kvantifikovat obsah recentního a fosilního uhlíku a to i zvlášť z uhlí a z kerogenu.

**Klíčová slova:** uhlí, kerogen, půdní organická hmota, uhlík, sekvestrace

### *Abstract*

*Soil organic matter (SOM) has many important effects on soil and ecosystem quality. Soils developing on post-mining sites are characteristic of low recent SOM, but can contain reasonable amounts of fossil SOM originating from coal, kerogen or other fossil component of the overburden. With time, as vegetation develops, SOM accumulates and improves overall quality of post-mining soils. To assess soil quality development and quantify sequestered carbon, a reliable method for distinguishing recent and fossil SOM is needed. The relative amounts of recent and fossil carbon can be successfully quantified by the radiocarbon method, but due to its high cost, its common application is unlikely. The aim of this study was to (1) quantify the amount and variability of fossil SOM in post-mining soils near*

*Sokolov, (2) compare different other SOM quantification methods to this reference, (3) test the potential of near infrared spectroscopy for recent and fossil carbon quantification. Fossil carbon accounts for 13 to 99 % of total organic carbon in studied soils, which is equivalent to 2 – 6% carbon content. Subtracting the carbon content of a deeper horizon (50 cm) from the content of A horizon provides a good estimate of recent carbon. This can be applied to carbon contents from dry combustion, wet dichromate oxidation and loss-on-ignition (500°C). It is unsuitable to use these methods without such subtraction because they measure total SOM content including the fossil component. Near infrared spectroscopy can be used to quantify recent and fossil carbon, moreover, coal and kerogen carbon can be quantified separately.*

***Keywords:*** coal, kerogen, soil organic matter, carbon, sequestration

# Obsah

Obsah.....	5
Seznam užívaných zkratek .....	6
1 Úvod.....	7
1.1 Cíle .....	8
1.2 Hypotézy .....	9
2 Půdní organická hmota.....	9
3 Specifika půdní organické hmoty na výsypkách.....	11
3.1 Půdní organická hmota sokolovských výsypek .....	12
3.2 Recentní půdní organická hmota (RPOH) .....	12
3.3 Uhlíčitany .....	16
4 Metody analýzy půdní organické hmoty.....	17
4.1 Metody kvantitativní analýzy obsahu POH a SOC .....	17
4.2 Metody kvalitativní analýzy POH.....	20
5 Empirická část.....	32
5.1 Metodika.....	32
5.2 Výsledky a diskuse.....	37
5.3 Porovnání metod .....	56
6 Závěry.....	59
7 Přílohy .....	67
7.1 Příloha 1 - Metodika odstranění uhličitánů před $^{14}\text{C}$ a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analýzou.....	67
7.2 Příloha 2 - Metodika stanovení ztráty žíháním .....	69
7.3 Příloha 3 - Metodika stanovení oxidovatelného uhlíku .....	71
7.4 Příloha 4 – Metodika infračervené spektrometrie .....	74
7.5 Příloha 5 - Matematické zpracování dat.....	78

## Seznam užívaných zkratek

$^{14}\text{C}$ -AMS –  $^{14}\text{C}$  hmotnostní spektrometrie

angl. - anglicky

C – uhlík

CN – elementární analýza uhlíku a dusíku

C<sub>rec</sub> – recentní uhlík

C<sub>jíl</sub> – uhlík obsažený v jílovém kerogenu

C<sub>tot</sub> – celkový obsah uhlíku

C<sub>uhli</sub> – uhlík obsažený v uhlí

C<sub>org</sub> – organický uhlík

F – fermentační horizont

FPOH – fosilní půdní organická hmota

IC – anorganický uhlík (inorganic carbon)

LGÚ – Laboratoř geologických ústavů

LOI – metoda ztráta žiháním (lost on ignition)

mj. – mimo jiné

NIRS – spektroskopie v blízké infračervené oblasti

OH - organická hmota

pMC – „percent modern carbon“ - aktivita  $^{14}\text{C}$  v porovnání se standardem

RPOH - recentní půdní organická hmota

SOC - půdní organický uhlík (soil organic carbon)

TIC – anorganický uhlík (inorganic carbon)

TC – celkový uhlík (total carbon)

TOC – celkový organický uhlík (total organic carbon)

ÚŽP – Ústav pro životní prostředí

WB – metoda Walkley-Black

# 1 Úvod

Půda má nezastupitelné produkční i mimoprodukční (ekologické) funkce v životním prostředí (Novák et al. 2010). Tyto funkce jsou z velké části umožněny díky recentní půdní organické hmotě (RPOH). Právě ona činí půdu úrodnější tím, že zadržuje živiny a zlepšuje půdní strukturu. Zvyšuje také infiltraci a retenci vody v půdě, zabraňuje zhutnění a erozi půdy. Ve své struktuře dokáže trvale vázat toxické látky a v neposlední řadě je nezaměnitelnou součástí koloběhu živin a zdrojem energie a živin pro půdní organismy (Simpson & Simpson 2012). RPOH tvoří navíc významnou zásobu uhlíku - globální koloběh uhlíku je významně narušován lidskými činnostmi jako jsou spalování fosilních paliv, odlesňování, přeměna přirozených půd na půdu zemědělskou atp. Všechny tyto činnosti buď přímo emitují CO<sub>2</sub> nebo omezují jeho akumulaci v ekosystémech (Vitousek et al. 1997). Jsou proto hledána taková opatření, která by naopak vedla k odebírání CO<sub>2</sub> z atmosféry (tzv. sekvestraci) (IPCC 2007).

Výsypky po těžbě nerostných surovin jsou charakteristické postupným rozvojem vegetace na půdách s absencí RPOH. S přísunem organického materiálu do půdy však POH přibývá a zlepšuje tak kvalitu těchto půd. Tento nárůst RPOH má také význam z hlediska sekvestračního – tzn. jde o propad CO<sub>2</sub> (Akala & Lal 2001; Karu et al. 2009). Pro objektivní zhodnocení vývoje kvality těchto půd i pro posouzení sekvestračního potenciálu výsypek je důležité spolehlivé stanovení obsahu RPOH. Běžně používané metody stanovení POH však neumožňují odlišit RPOH – vzniklou rozkladem biomasy v průběhu pedogeneze – a **fosilní** půdní organickou hmotu (FPOH), která se do výsypkových půd dostává jako příměs uhlí, nebo je např. jako kerogen součástí odtěženého nadloží. Tento fosilní uhlík nelze pochopitelně započítávat do sekvestrovaného uhlíku při uhlíkovém bilancování, protože by narušoval odhady množství nahromaděného uhlíku během moderní doby, a navíc ovlivňuje i posuzování kvality výsypkových půd, jelikož mu nelze přisuzovat tytéž účinky na kvalitu půdy jako uhlíku recentnímu. Sokolovské výsypky jsou jedinečnými experimentálními plochami pro studium rozvoje půdy a ekosystémů jako takových, jelikož jsou zde k dispozici plochy, které v různých obdobích vznikaly velmi podobným způsobem. Jejich různé stáří tak umožňuje pozorovat vývoj v čase (tzv. chronosekvenční přístup). Na plochách probíhá intenzivní výzkum (Sourkova et al. 2005; Frouz & Kalčík 2006; Frouz et al. 2009; Frouz et al. 2011; Abakumov et al. 2013). Rozlišení fosilní a recentní organické hmoty v půdách výsypek

je základním předpokladem pro plánování kvalitních studií zaměřených na vlastnosti POH a faktorů, které ovlivňují její dynamiku.

V některých studiích se fosilní organická hmota jako zdroj nepřesností vůbec neuvažuje (Ganjugunte et al. 2009), v některých autoři její vliv připouštějí, ale přesto jej nekvantifikují (Brown & Grant 2000; Lorenz & Lal 2007). V jiných studiích pak autoři přistupují k různým nepřímým odhadům pomocí referenčních hloubek, mladších ploch bez recentní organické hmoty či dopočítávání množství organické hmoty v čase nasypání pomocí lineární regrese mezi obsahem uhlíku v různě starých plochách a dobou od nasypání (Akala & Lal 2001; Reintam 2004; Sourkova et al. 2005; Shrestha & Lal 2010). Spolehlivost těchto odhadů je ale problematická, jelikož obsah recentní i fosilní organické hmoty může být značně variabilní jak v prostoru tak v čase (Lal et al. 2001). Na Sokolovsku obsahují různé vrstvy cyprisového souvrství 2.8 - 10.2 % fosilního uhlíku (Frouz et al. 2011), v půdách jeho obsah není znám, pouze odhadován pomocí obsahu C v hlubších vrstvách. Přitom i fosilní uhlík může být mikrobiálně rozkládán (Frouz et al. 2011), což použití výše uvedených přístupů ještě více komplikuje. Existuje několik málo zahraničních studií, v nichž autoři úspěšně měří podíl fosilního uhlíku pomocí radiokarbonové metody (Rumpel et al. 2003; Morgenroth et al. 2004). Ukazuje se, že tento podíl může být významný. Například v lužické těžební oblasti může fosilní uhlík původem z lignitu, popela a prašného aerosolu představovat 80 až 93 % organického uhlíku ve vrchních 5 centimetrech minerálního horizontu a 14 až 45 % organického uhlíku v nadložních horizontech, a to i po několika desítkách let od rekultivace (Rumpel et al. 2003; Fettweis et al. 2005). Podíl fosilního uhlíku značně kolísá i na estonských výsypkách po těžbě roponosné břidlice, činí zde v A horizontu 32 až 66 % (Karu et al. 2009). I když radiokarbonová metoda umožňuje spolehlivé stanovení podílu fosilního uhlíku, její nevýhodou je její vysoká finanční náročnost. Chybí všeobecně přijímaná a ekonomicky dostupná metoda stanovení fosilní uhlíku.

## **1.1 Cíle**

**Cíle** mé diplomové práce jsou:

- (1) zjistit, jaký je skutečný podíl recentní a fosilní organické hmoty půdách sokolovských výsypek pomocí radiokarbonové metody, určit jaká je jeho variabilita v závislosti na hloubce a stáří půdy, jaká je variabilita mezi plochami rekultivovanými a nerekultivovanými;
- (2) zjistit, jak velkou chybou jsou zatíženy nejčastěji používané metody stanovení POH – stanovení ztráty žíháním (LOI), stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox) a stanovení celkového obsahu uhlíku elementární analýzou (TC) – a navrhnout jejich optimalizaci;

(3) testovat potenciál infračervené spektrometrie pro odlišení fosilního a recentního uhlíku v půdách sokolovských výsypek, stanovit fosilní uhlík v umělých směsích materiálů se známým obsahem recentního nebo fosilního uhlíku a též ve vzorcích reálných půd datovaných radiokarbonovou metodou

(4) doporučit nejvhodnější postup pro situaci, kdy je fosilní organická hmota tvořena více různými komponenty s velmi odlišným chemickým složením.

## 1.2 Hypotézy

Hypotézy lze rozdělit na ty týkající se určení podílu recentního a fosilního uhlíku sokolovských výsypek a popsání jeho dynamiky v čase (cíl 1) na ty, které se týkají obecnějších metodických otázek oddělení recentního a fosilního uhlíku (cíle 2, 3 a 4).

**Pro studium půd sokolovských výsypek** byly formulovány tyto hypotézy:

1. Podíl fosilního uhlíku na celkovém uhlíku bude v půdním profilu stoupat.
2. V horizontu C bude většina uhlíku tvořena fosilním uhlíkem, ale v menší míře zde bude zastoupen i recentní uhlík vlivem vyluhování a bioturbace.
3. U mladých ploch bude celkové množství fosilního uhlíku srovnatelné ve všech vrstvách minerálního horizontu.
4. U starší plochy bude celkové množství fosilního uhlíku v půdním profilu stoupat v důsledku částečného rozkladu fosilní organické hmoty v povrchové vrstvě minerálního horizontu.
5. Celkové množství fosilního uhlíku se budou lišit mezi jednotlivými výsypkami vlivem různého složení sypaného materiálu.

**Pro studium metod stanovení POH** byly formulovány tyto hypotézy:

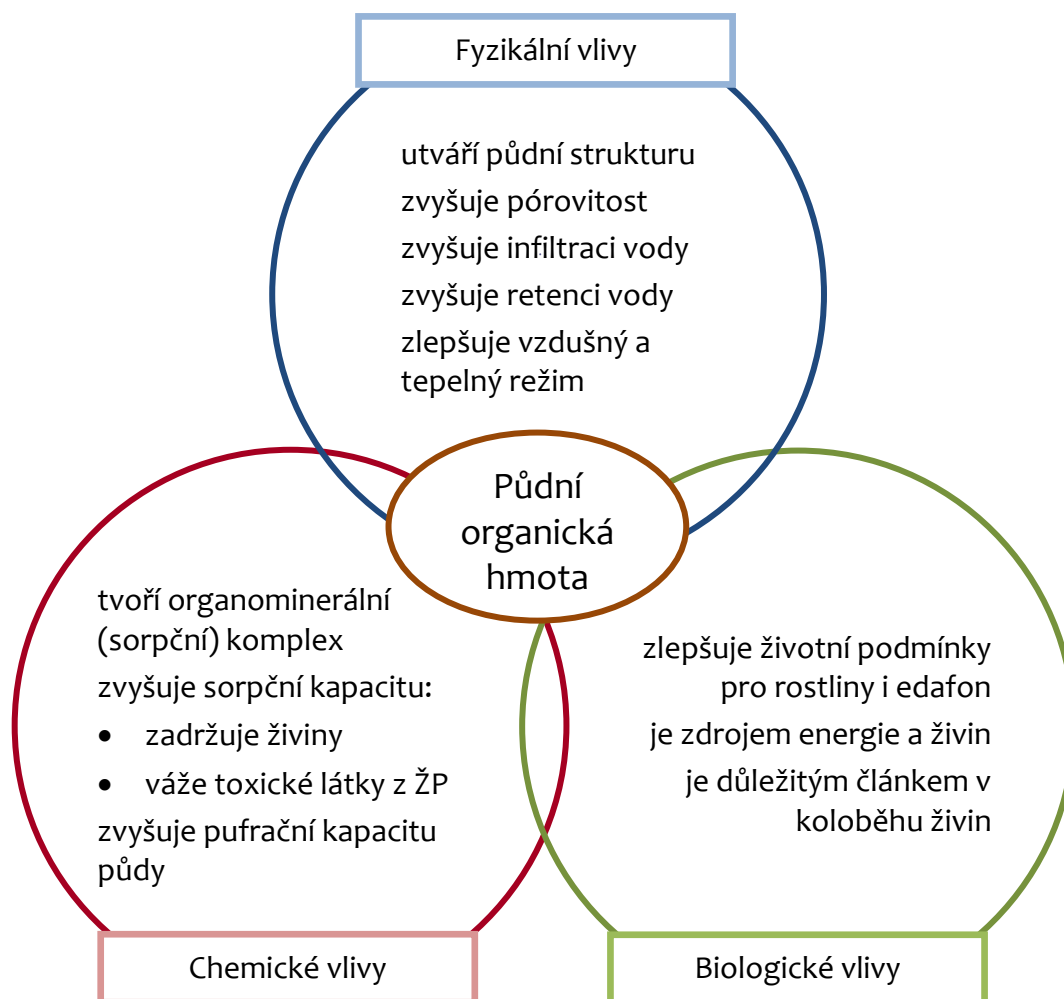
1. Fosilní organická hmota je směsí různých chemicky odlišných komponent. Její stanovení bude výrazně přesnější, bude-li použito specifických postupů pro jednotlivé komponenty.
3. Kombinací několika metod bude možno dosáhnout lepšího výsledku.
4. Infračervenou spektrometrií bude možné kvantifikovat obsah recentního a fosilního uhlíku a to i zvláště původem z kerogenu a z uhlí.

## 2 Půdní organická hmota

**Půdní organická hmota (POH)** je *soubor všech neživých organických látek, nacházejících se v půdě či na jejím povrchu*. Jedná se o složitou směs produktů rostlinného a mikrobiálního rozkladu (Simpson & Simpson 2012). Dle této definice sem patří jak recentní, tak fosilní organická hmota.

Recentní půdní organická hmota má nepostradatelný význam z hlediska kvality půdy a globálního koloběhu uhlíku.

**Kvalitu a úrodnost půdy** zlepšuje řadou mechanismů. Tyto vlivy lze pro přehlednost dělit na fyzikální, chemické a biologické, ale vzájemně spolu úzce souvisí (Obr.1) (Němeček et al. 1990; Sářka & Materna 2004; Simpson & Simpson 2012):



Obr. 1 Vlivy půdní organické hmoty na půdní vlastnosti – upraveno dle (Němeček et al. 1990; Sářka & Materna 2004; Simpson & Simpson 2012)

Vliv fosilní organické hmoty na kvalitu půdy není nijak dobře prozkoumán. Z jejich rozdílné chemické povahy lze ale předpokládat, že se odlišují i ve svých funkcích.

POH je také **důležitým zásobníkem uhlíku**. Globálně obsahuje asi dvakrát více uhlíku než atmosféra a představuje asi dvě třetiny terestriální zásoby uhlíku (Simpson & Simpson 2012).

Vlivem odlesňování, přeměny přirozených půd na půdu zemědělskou, urbanizace a těžby nerostných surovin je půda druhým největším antropogenním zdrojem emisí skleníkových

plynů (1,5 PgC.rok<sup>-1</sup>) hned po spalování fosilních paliv (5,3 PgC.rok<sup>-1</sup>) (Vitousek et al. 1997; IPCC 2007). Jednou z možných strategií snižování antropogenních emisí CO<sub>2</sub> je ochrana zásobníků uhlíku a podpora tzv. **sekvestrace**, tedy odebírání CO<sub>2</sub> z atmosféry a její ukládání do biomasy a RPOH (IPCC 2007).

### 3 Specifika půdní organické hmoty na výsypkách

**Výsypky** vznikají jako vedlejší produkt těžebního procesu. Při povrchové těžbě (u nás zejm. hnědého uhlí) je kvůli zpřístupnění ložiska v první fázi odtěženo vysoké množství nadložních hornin. Tento zpravidla nevyužitelný materiál je poté transportován buď na jiné místo dolu na tzv. **vnitřní** výsypku nebo mimo povrchový důl na tzv. **vnější** výsypku. Z organizačních důvodů se při těžbě nelze vyhnout tvorbě vnějších výsypek, i když znamenají kompletní destrukci původního území. Dá se očekávat, že s technickým a ekonomickým rozvojem budou těžena stále méně dostupná a méně kvalitní ložiska (v současné době považována za nebilanční) a na vnější výsypky bude tak ukládáno stále více materiálu (Štýs et al. 1981). Je proto nutné hledat nejvhodnější způsoby obnovy takto vznikajících území. Při **obnově** ekosystému na výsypce lze postupovat buď technickou cestou **rekultivace** nebo ponechat území přirozené obnově, tedy samovolnému zarůstání, tzv. **spontánní sukcesi**. Na vhodných substrátech může spontánní sukcesí dojít k relativně rychlému vzniku funkčních ekosystémů, které jsou srovnatelné s rekultivovanými plochami (Frouz et al. 2009). Spontánní sukcese je však málo predikovatelná, závislá mj. na kvalitě výsypkového substrátu a dalších podmínkách, proto je většinou preferována technicky řešená rekultivace, tedy terénní úpravy následované výsadbou rekultivačních porostů (Frouz et al. 2007).

Ať už se postupuje kterýmkoliv z uvedených způsobů, při svém vzniku jsou půdy charakteristické **absencí recentní organické hmoty**, jde prakticky o obnaženou matečnou horninu spíše než o půdu. Materiál je mechanicky částečně rozrušený v důsledku těžby a transportu. S postupným rozvojem vegetace na výsypce je odumírající biomasa přeměňována na POH a dochází tak k postupné **akumulaci** recentní organické hmoty a k tvorbě půdy. Přibývající OH je důležitým **indikátorem kvality půdy**, ideálním např. pro porovnání vývoje rekultivovaných a nerektivovaných ploch. Navíc, akumulací POH je **sekvestrován uhlík**. Řada studií tento potenciál vyzdvihuje a trendem je tento potenciál kvantifikovat (Akala a Lal 2001, Shukla a Lal 2005, Ussiri et al. 2006, Lorenz a Lal 2007, Amichev et al. 2008, Karu et al. 2009, Shrestha et al. 2009, Juwarkar et al. 2010).

Pro dobré zhodnocení kvality výsypkových půd i jejich sekvestračního potenciálu je žádoucí, aby byla k dispozici spolehlivá metoda stanovení obsahu půdní organické hmoty.

### ***Půdní organická hmota sokolovských výsypek***

Na sokolovských výsypkách stanovení POH komplikuje **fosilní organická hmota** ze dvou odlišných zdrojů – z uhlí a z kerogenu. **Uhlí** se sem dostává jako příměs z procesu těžby.

**Kerogen** je organická hmota rozptýlená ve struktuře cyprisových jílu, které tvoří zdejší nadloží. Běžné metody pro kvantifikaci obsahu POH nedokáží ani jednu ze složek fosilní organické hmoty odlišit od té recentní a dochází tak k jejímu značnému nadhodnocení.

Doposud nebyl podíl fosilní organické hmoty v půdách výsypek přímo změřen – jeho odhad byl jen odhadován pomocí obsahu celkové organické hmoty v hlubších vrstvách půdy (horizontu C), kde se nepředpokládá vliv uhlíku recentního. Tento odhad byl poté odečítán od obsahu v horizontu A a takto byl získáván odhad RPOH. Spolehlivost těchto odhadů je ale neznámá, jelikož obsah recentní i fosilní organické hmoty může být značně variabilní jak v prostoru tak v čase (Lal et al. 2001). Přitom i fosilní uhlík může být mikrobiálně rozkládán (Frouz et al. 2011), což použití výše uvedených přístupů ještě více komplikuje.

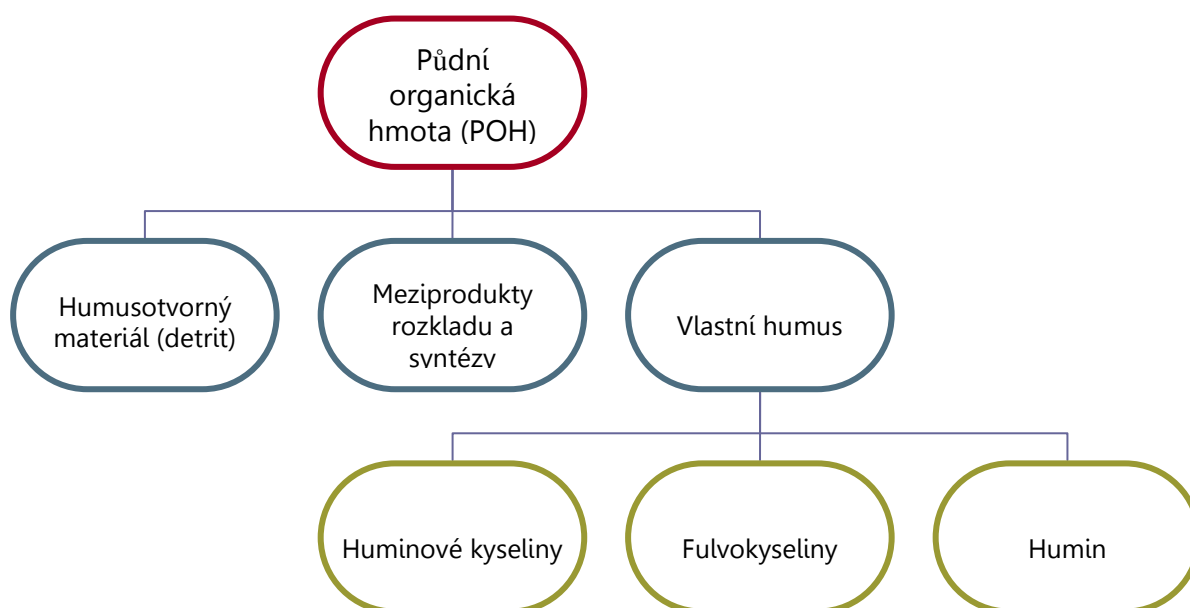
Podívejme se nyní blíže na charakteristické vlastnosti recentní a fosilní organické hmoty.

### ***3.1 Recentní půdní organická hmota (RPOH)***

I když jde jistě o složité kontinuum látek, lze RPOH modelově dělit na (Ledvina & Horáček 1997):

- (1) **humusotvorný materiál** – odumřelá biomasa bez známek přeměny – charakteristický pro nadložní horizont L (litter);
- (2) **meziprodukty rozkladu a syntézy** – vznikají přeměnou humusotvorného materiálu
- (3) **vlastní humus** – organická hmota prošlá humifikačními pochody.

**Vlastní humus** (huminové látky, humic substances) je směsí makromolekul, kterou lze fyzikálně-chemicky dělit na tři základní frakce: fulvokyseliny, huminové kyseliny a humin. Fulvokyseliny a huminové kyseliny jsou odděleny rozpouštěním v zásadě. Humin je naopak nerozpustný jak v kyselinách, tak v zásadách, tvoří nejstabilnější složku organické hmoty. Zatímco dříve převládal názor, že humin je tvořen převážně aromatickými strukturami, Song et al. (2011) jeho separací s následnou NMR analýzou zjistili, že je naopak tvořen zejména alifatickými strukturami, s hlavním podílem chemicky odolných mastných kyselin s dlouhými řetězci, vosky a kutikulární látky, s poměrně malým podílem ligninu.



Obr. 2 Schéma dělení půdní organické hmoty

Složení recentní POH je dáno zejména složením rostlinné organické hmoty.

**V rostlinné hmotě** se nachází látky hydrofilní (které převažují) a hydrofobní. Mezi **hydrofilní** látky patří zejména sacharidy (mono-, oligo-, polysacharidy – celulóza, škrob, chitin). V buněčných stěnách starších buněk je lignin (dřevovina). Jedná se o amorfni, aromatickou látku, jejíž, základní strukturni jednotkou je fenypropan, ale jeho původ a chemická stavba nejsou přesně známé. Důležité jsou také organické kyseliny (nejrozšířenější jsou olejová, linolová a linolenová, dále mléčná, glutamová, palmitová, stearová, askorbová, jablečná, mravenčí, oxalová, isocitronová apod.). Nenasycené mastné kyseliny jsou typické pro řasy. Stavebním materiálem jsou kromě polysacharidů také proteiny, ve kterých je vázán dusík. Dusík je obsažen také v aminech, amidech, purinech nukleoproteinech. Mezi **hydrofobní** (neboli lipidní) patří zejm. tuky, oleje, vosky (estery vyšších mastných kyselin a vyšších alifatických jednosytných alkoholů) a kutin (směs glycerosterů a vyšších mastných kyselin). U vosků vyšších rostlin najdeme převahu lichých n-alkanů nad sudými a současně spíše delší uhlíkaté řetězce (n-C27,n-C29,n-C31,n-C33) (Bouška 1977). Do skupiny lipidních látek patří řada sloučenin, které využívá organická geochemie jako biomarkery. Z látek tvořící rostlinnou hmotu jsou nejvíce odolné vůči rozkladu pryskyřice, vosky, suberin a kutin. Rozložitelnost látek vyjadřuje řada: monosacharidy, pektinové látky, škrob, hemicelulóza, celulóza, lignin, pryskyřice, vyšší mastné kyseliny, betulin a kutin, vosky a sporopolleniny (Bouška et al. 1980). Co se týče elementárního složení organické hmoty, nejdůležitějšími prvky jsou C, H, O a N. Elementární složení některých rostlinných částí uvádí Tab. 1.

Rozkladem rostlinné hmoty vzniká půdní OH, jejíž hlavní komponentou jsou huminové látky. Huminové látky jsou složité makromolekuly. Huminové kyseliny se liší od jiných fosilních komplexů organických hmot (kerogenu a mladších uhlí) svým elementárním složením (vyšším obsahem kyslíku) a vyšší přítomností karboxylových a fenolických skupin, které způsobují rozpustnost v alkáliích. Dále obsahují do cyklu zabudované i periferiální alifatické dusíkové atomy, chinonová seskupení a éterické kyslíkaté vazby. Bezvýznamná nemusí být ani přítomnost síry. Vyskytují se hlavně v půdách, sladkovodních i mořských sedimentech, rašelinách, břidlicích, lignitech a hnědých uhlích (Bouška 1977).

Tab. 1 Elementární složení recentní a fosilní organické hmoty

materiál	C	H	N	O	zdroj
rostlinná hmota					(Bouška 1977)
dřevovina	49 - 50	5.8 - 6.2	0.04 - 0.02	43 - 45	
celulóza	44.4	6.2	-	49.4	
lignin	63.1	5.9	-	31	
	80.3 -	13.1 -		0 -	
vosky	81.6	14.1	-	11.1	
huminové kyseliny	62-67%				(Bouška 1977)
jíl cyprisového souvrství	14.80	2.10	0.56	n/a	(Buryan 2010)
hnědé uhlí 1 (sloj Antonín)	62.8	n/a	n/a	n/a	(Mihaljevič et al.
hnědé uhlí 2 (sloj Antonín)	74.9	n/a	n/a	n/a	2009)

## 3.2 Fosilní půdní organická hmota (FPOH)

### 3.2.1 Uhlí

Uhlí je složitá směs různých organických sloučenin obsahujících C, H, N, S a O a také minerály jako jsou Ca, K nebo Si. Uhlí vzniká procesem prouhelnění z rostlinných zbytků bohatých na celulózu, hemicelulózu a lignin.

Obsah **vody** v uhlí kolísá ve velkých rozmezích a klesá se stupněm prouhelnění. U sokolovského uhlí se uvádí obsah vody 38-45% (Bouška 1977). Jde o vodu jak volně vázanou, tak zejména fyzikálně a chemicky vázanou na hořlavinu nebo na popeloviny (Bouška 1977).

**Dusík** je v uhlí obsažen téměř výhradně v heterocyklických (aromatických) sloučeninách. Celý proces prouhelnění vede chemicky k přeměně výchozího rostlinného materiálu v huminové látky přítomné v uhlí v koloidní formě. **Huminové látky** přítomné v uhlí se liší

od těch v rašelinách vyšším stupněm kondenzace a menším počtem postranních vazeb a funkčních skupin. Vznik aromatických řetězců v huminových kyselinách je možné přičíst jak přírodním fenolovým látkám, tak aromatizaci uhlovodíků. V humin. kyselinách je možné najít tyto aromatické struktury: benzen, naftalen, anthracen, furan, pyrrol, indol, pyridin, chinolin.

Dusík je v HK vázán jako: -NH<sub>2</sub>, -NH, -N-, -NH-, =N-

V ranném stádiu prouhelňování dochází k depolymerizaci a rozkladu celulozy a ligninu – zatímco recentní molekula celulózy obsahuje 2000-3000 glukosových jednotek, v miocenním uhlí pouze 40-3000. Lignin je stálý proti rozkladu mikroorganismů na rozdíl od celulózy a je aromatický. Hnědé uhlí oproti černému uhlí obsahuje hydroxylové a karboxylové skupiny (Bouška 1977).

V uhlí jsou zastoupeny tyto látky: (1) resiny, vosky a uhlovodíky (3-9 – 7.1%), (2) zbytky kutikul (0.65-10.,4%), (3) huminové látky 85.,5 – 95.45% (ulminy) – jejich zastoupení klesá se stupněm prouhelňování - v černých uhlích se nachází zřídka, v nich jsou přeměněny spíše na humin, (4) lignin (3 - 10%).

Od uhlí je třeba odlišovat tzv. charcoal nebo také char, který vzniká nedokonalým spálením rostlinné biomasy. Charovému uhlíku v půdách se věnuje poměrně více studií než běžnému uhlí. Charový uhlíku může v některých půdách zejména v místech pravidelných požárů významně přispívat k obsahu Corg. Dalšími zdroji charu je atmosférická depozice následující nedokonalé spalování fosilních paliv a také používání popílků z uhelných elektráren k úpravě půd (Rumpel 1998).

### 3.2.2 Kerogen

Kerogen je nerozpustná organická hmota rozptýlená v sedimentárních horninách. Tvoří více než 95 % veškeré organické hmoty uložené v sedimentech za dobu existence Země (Bouška et al. 1980). Kerogen rozptýlený v sokolovských jílech je výsledkem sedimentace organického materiálu na dně tercierních jezer. Tyto jíly nazývané též „cyprisové břidlice“ jsou světle hnědé, lístkovitě odlučné, tuhé, kožovité, často obsahují schránky skořepatců rodu *Cypris* a dalších fosilií. V organické hmotě lze rozlišit kolonie olejonosných řas *Botryococcus*, exiny navátých pylových zrn, spor a oblaněný plankton (Rojík et al. 2010). Ve stratigrafickém profilu cyprisového souvrství jsou střídavě uloženy vrstvy bohatší a chudší na kerogen (v rozsahu 2 – 18 % C) tak, jak se měnily kyslíkové poměry v třetihorním jezeře (anoxie -> nižší mineralizace -> více kerogenu) (Kříbek 1998). Bohatší vrstvy mají typicky menší mocnost (kolem 1 m) a střídají je mocnější vrstvy jílu chudších. Vrstvy bohatší

obsahují převážně **kerogen typu I** (řasového původu) v koncentracích 10 - 18% uhlíku (Kříbek 1998). Jedná se o tence laminované, tmavší jíly, kterým se přezdívá „knihy“ pro jejich charakteristickou strukturu a vzhled při zvětvávání. Vrstvy chudší obsahují **kerogen II typu** (smíšený původ) a obsah C v nich se pohybuje od 2 do 7 % (Kříbek 1998).

Chemicky je kerogen definován jako podíl organické hmoty sedimentů, který je nerozpustný v alkalických rozpouštědlech a běžných organických rozpouštědlech. V sedimentárních horninách dále najdeme bitumeny, které jsou však na rozdíl od kerogenu extrahovatelné organickými rozpouštědly. V břidlicích a vápencích kerogen tvoří 80 až 99% organické hmoty, zbytek představují bitumeny (Tissot & Welte 1978). Z hornin se kerogen dostává po rozpuštění anorganické složky v kyselinách (zejm. HF) (Bouška et al. 1980)



Obr. 3 Odběr vzorků cyprisových jílu s vysokým podílem kerogenu

### 3.3 Uhličitany

Pro cyprisové souvrství je charakteristická jemně rozptýlená příměs uhličitánů (5 – 22 %), především **sideritu**, méně pak **kalcitu**, **dolomitu** a **ankeritu** (Rojík et al. 2010).

Ve výsypkových půdách jsou uhličitany také přítomné (půdy šumí po přidání HCl). Jejich přesný obsah a podíl jednotlivých karbonátů zatím podrobněji studován nebyl.

Uhličitany komplikují stanovení POH, jelikož jsou zahrnuty do celkového obsahu uhlíku při CN analýze (Schumacher 2002). Rutinně se uhličitany v půdách sokolovských výsypek nekvantifikují, jelikož jejich obsah není významný. Stanovení uhličitánů není jednoduchý

úkol. Buď je zapotřebí speciální analyzátor, který měří množství uvolněného CO<sub>2</sub> po kontaktu vzorku s kyselinou, nebo je třeba před CN analýzou uhličitany ze vzorku odstranit **loužením v kyselině**. Kvůli zvýšení rozpustnosti uhličitánů je přitom doporučeno vzorek zahřívát. Pochopitelně je zde také riziko oxidace labilní organické hmoty, který nelze jednoduchým způsobem ověřit. Přehled metod používaných pro odstranění uhličitánů a jejich vliv na organickou hmotu shrnuje Brodie et al. (2011). Pro účely ÚŽP by připadala v úvahu kapslová metoda, při které se k naváženému vzorku v stříbrné kapsli před CN analýzou opakovaně přidává kyselina. Jelikož se ale jednotlivé karbonáty liší svou rozpustností, bylo by nejdříve potřeba znát podíl jednotlivých karbonátů v půdách, aby bylo možné zvolit vhodnou kyselinu o vhodné koncentraci a vhodnou teplotu zahřívání.

## 4 Metody analýzy půdní organické hmoty

Metody analýzy POH lze dělit na: (1) metody **kvantitativní** analýzy, kterými se stanovuje celkový obsah POH nebo půdního organického uhlíku (soil organic carbon, SOC), a na (2) metody **kvalitativní** analýzy POH, kterými lze zkoumat kvalitu POH (její chemickou strukturu a původ). Některé metody kvalitativní analýzy lze použít i ke kvantifikaci jednotlivých funkčních struktur či frakcí v půdě.

### 4.1 Metody kvantitativní analýzy obsahu POH a SOC

V této kapitole popíšu principy jednotlivých metod a zdroje jejich nejistoty ve vztahu k výsypkovým půdám. Předpokládá se, že všechny tři uvedené stanovují celkový obsah půdní organické hmoty, resp. uhlíku, tedy včetně toho fosilního.

#### 4.1.1 Stanovení ztráty žiháním (LOI)

Organická hmota v půdě se většinou stanovuje přes obsah uhlíku. Výjimku tvoří stanovení ztráty žiháním (loss on ignition, LOI), kterou stanovujeme obsah organické hmoty přímo. Její princip je jednoduchý – vysušená půda se žihá při určité teplotě a rozdíl její hmotnosti před a po žihání je považován za organickou hmotu:

$$LOI[\%] = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

kde  $m_1$  značí suchou hmotnost vzorku před žiháním a  $m_2$  hmotnost vzorku po žihání.

Obsah organické hmoty je poté převáděn na obsah organického uhlíku za předpokladu, že organická hmota obsahuje 58% uhlíku takto:

$$C_{org}(LOI)[\%] = LOI[\%] * 0.58$$

Teplota žíhání je dle normy pro zemědělské půdy (EN 15935) stanovena na 550°C, kdy se předpokládá maximální vyžíhání organické hmoty a minimální ztráta minerálního podílu půdy, ale v zahraniční literatuře lze najít aplikaci metody při teplotách od 350 až do 900°C (Schumacher 2002).

Tato metoda je sice velmi levná, ale přináší mnoho komplikací. Obecně se příliš nedoporučuje pro jílovité půdy, jelikož jíly mohou i po vysušení zadržovat strukturní vodu, která se uvolní až při žíhání a naruší tak stanovení. Podobně může vysoká teplota rozbít –OH skupiny ve struktuře jílových minerálů (Schumacher 2002). Dále se nedoporučuje překračovat teplotu 440°C, nad kterou dochází k rozkladu uhličitánů (Schumacher 2002).

Kromě toho lze předpokládat, že i kerogen a uhlí se při žíhání oxiduje a narušuje tak stanovení.



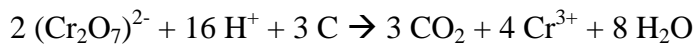
Obr. 4 Porcelánové kelímky se vzorky při stanovení ztráty žíháním. Vpravo muflová pec.

#### 4.1.2 Stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox)

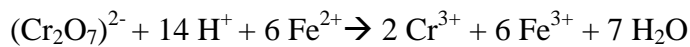
Plný název metody je: Stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox) titrací po oxidaci chromsírovou směsí (Zbiral 2002).

Principem metody je oxidace uhlíku vázaného v organické hmotě kyselinou chromovou v prostředí nadbytku kyseliny sírové za definovaných podmínek. Nespotřebovaná kyselina chromová se stanoví titrací roztokem Mohrovy soli.

Rovnice popisující děj při oxidaci:



Rovnice popisující děj při titraci:



V případech kdy hrozí interference iontů  $\text{Fe}^{3+}$ , je vhodné do chromsírové směsi přidávat také  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Schumacher 2002)

Na stejném principu funguje metoda Walkley-Black, která je používána v anglosaských zemích. Na rozdíl od stanovení oxidovatelného uhlíku není při WB metodě vzorek s chromsírovou směsí zahříván. Oxidace POH není proto kompletní, uvádí se že dosahuje účinnosti od 60 do 86 %, průměrně asi 76 %. Proto je nutné výsledek vynásobit korekční koeficientem, který je standardně 1.33 (Schumacher 2002).

Naopak pro východní země je tradiční Tjurinova metoda – při které trvá zahřívání 5 minut na bodu varu (Feiza et al. 2007). Metoda ustálená v České republice je nazývána také „modifikovanou Tjurinovou“ metodou. Srovnání Tjurinovy a Walkley Black provedli (Jankauskas et al. 2006)

#### **4.1.3 Stanovení celkového obsahu uhlíku (TC, CN) elementární analýzou**

Metoda je v literatuře zmiňována jako „elemental analysis“ nebo „dry combustion“.

Principem metody je kompletní spálení vzorku při teplotách okolo 1000 °C v proudu čistého kyslíku. Vznikající  $\text{CO}_2$  je detekován např. infračervenou spektrometrií nebo tepelnou konduktometrií (Schumacher 2002). Podobně je detekován také dusík, který je oxidován na oxidy dusíku a poté redukován na  $\text{N}_2$  a takto detekován v detektoru. Metoda se kalibruje standardy o známých obsazích uhlíku a dusíku.

Problémem této metody jsou již zmíněné uhličitany, které jsou také spáleny na  $\text{CO}_2$  spolu s celým vzorkem.

Potenciál kvalitativního ukazatele má poměr obsahu uhlíku a dusíku, tzv. C/N poměr. Řasy mají typicky C/N poměr mezi 4 a 10, zatímco cévnaté suchozemské rostliny větší než 20.

Tento rozdíl vyplývá z absence celulózy u řas. Tohoto jevu je využíváno např.

v limnologických studiích pro odlišení původu organické hmoty (Ostrom et al. 1998)

Pro půdy je typické snižování C/N poměru vlivem přeměny rostlinné biomasy na biomasu mikrobiální, která je charakteristická nižším C/N poměrem (zbylý uhlík je vyloučený respirací na  $\text{CO}_2$ ) (Ostrom et al. 1998; Simpson & Simpson 2012). V jezerních sedimentech je ale často C/N poměr zachován a s hloubkou se příliš nemění (Ostrom et al. 1998; Meyers 1994).

## 4.2 Metody kvalitativní analýzy POH

Pro studium chemického složení organické hmoty, jejích jednotlivých složek a struktur je používána řada metod. Přes její důležitý význam, zůstává velká část POH molekulárně nepopsána. Přehled těchto metod uvádí např. Simpsonová a Simpson (2012).

**<sup>13</sup>C CPMAS NMR spektroskopie** (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) je metoda často používaná pro charakterizaci POH. Z typického NMR spektra lze získat informaci o obsahu alkylových (0–50 ppm), O-alkylových (50–110 ppm), aromatických a fenolických (110–165 ppm), karboxylových a karbonylových (xxx) strukturách. Spektra lze i semikvantitativně vyhodnotit výpočtem poměru těchto složek. Výhodou metody je, že přináší informaci z celého půdního vzorku a není nutná téměř žádná úprava. Úprava vzorku spojená s nakoncentrováním obsahu organické hmoty může však zlepšit výsledek měření. NMR sokolovského kerogenu naměřili Kříbek et al. (1998). Nevýhodou je ale časová a finanční náročnost metody (Simpson & Simpson 2012; Rumpel et al. 1998; Rumpel et al. 2001).

Dalším přístupem k studiu organické hmoty je studium tzv. **biomarkerů**. Biomarkery jsou látky specifické pro některé typy organismů, ať už jako součásti jejich živé biomasy nebo jako jejich produkty rozkladu. Jsou to látky typicky chemicky odolné, takže setrvávají v sedimentech a jiných geomateriálech vzorcích po dlouhá geologická období. Zajímavou metodou je například studium izotopického složení specifických molekul používaný mj. při studiu jezerních sedimentů (Ostrom et al. 1998). Přehlednou review biomarkerů používaných v organické geochemii napsal Castaneda a Schouten (2011). Review využití biomarkerů při studii půdy napsali Simpsonová a Simpson (2012).

Některých biomarkerů se využívá i v **pyrolyzní chromatografii**. Např. González-Pérez et al. (2012) využili při studiu výsypkových půd bohatých na lignit pyrolyzní chromatografii a zkoumali přítomnost některých rostlinných biomarkerů (lipidů, isoprenoidů, methoxyfenolů a sacharidů) a lignitových biomarkerů (alkylnaftaleny, alkylbenzeny, PAU). Principem metody zkoumání produktů pyrolýzy na plynovém chromatografu (de la Rosa Arranz et al. 2009; Leinweber & Schulten 1999). V pedologii se metoda zatím tolik nevyužívá.

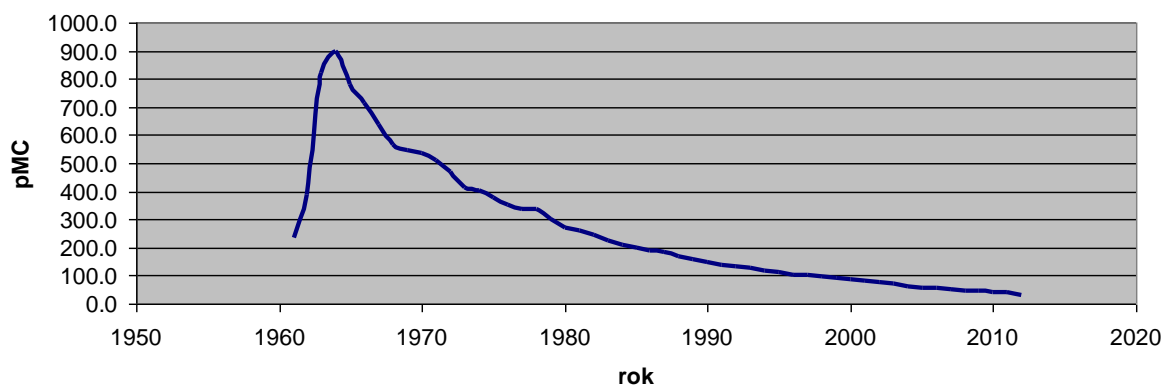
#### 4.2.1 Radiokarbonová metoda – 14C-AMS

Obsah recentního uhlíku lze nejpřesněji stanovit měřením radioaktivního izotopu  $^{14}\text{C}$  **hmotnostní spektrometrií** ( $^{14}\text{C}$ -AMS – Accelerator Mass Spectrometry). Tato metoda měří poměr stabilních izotopů uhlíku a radioaktivního izotopu  $^{14}\text{C}$ .

Principem metody je, že „stará“ organická hmota neobsahuje žádný podíl izotopu  $^{14}\text{C}$ , zatímco „nová“ ano. Vyplyvá to z poločasu rozpadu radioizotopu  $^{14}\text{C}$ , který činí 5730 let. Snadno si představíme, že ve staré organické hmotě se od doby jejího vzniku již všechny rozpadl. V 60. letech minulého století došlo vlivem jaderných testů k umělému zvýšení obsahu  $^{14}\text{C}$  v atmosféře a díky tomu je rozdíl mezi „starou a „novou“ organickou hmotou dobře zřetelný. Aktivita  $^{14}\text{C}$  se udává nejčastěji v jednotkách pMC („percent modern carbon“). Jedná se o relativní veličinu, která udává poměr obsahu  $^{14}\text{C}$  k určitému referenčnímu standardu  $^{14}\text{C}$  (NBS oxalic acid, Stuiver & Polach, 1977).

Obsah  $^{14}\text{C}$  v atmosféře se mění – nejvyšších koncentrací dosáhlo v 60. letech vlivem testování jaderných zbraní a od té doby poměrně rychle ubývá - v roce 2012 už obsah činil jen 31.5 pMC (Obr. 5)

**Vývoj obsahu  $^{14}\text{CO}_2$  v atmosféře**



Obr. 5 Vývoj obsahu  $^{14}\text{CO}_2$  v atmosféře. Sestaveno na základě dat z Levin a Kromer (2004) a Levin et al. (2013)

Podíl recentního uhlíku na celkovém obsahu uhlíku v půdní organické hmotě se spočítá podle následující rovnice (Karu et al. 2009; Morgenroth et al. 2004; Rumpel et al. 2003):

$$C_{\text{recent}} \% = \frac{\text{pMC}_{\text{TOC}}}{\text{pMC}_{\text{recent}}}$$

kde  $\text{pMC}_{\text{TOC}}$  je aktivita  $^{14}\text{C}$  naměřená ve vzorcích půd a  $\text{pMC}_{\text{recent}}$  je aktivita  $^{14}\text{C}$ , kterou předpokládáme v čisté recentní organice.

Uhlík se do organické hmoty dostává zabudováním atmosferického CO<sub>2</sub> do biomasy vegetace, a proto se při výpočtu předpokládá, že podíl <sup>14</sup>C v recentní organice odpovídá složení atmosféry v době zabudování uhlíku do biomasy (která je poté zdrojem uhlíku pro půdu).

#### 4.2.2 Poměr stabilních izotopů <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C

Jednou z dalších metod využívanou ke kvalitativní analýze organické hmoty je poměr stabilních izotopů uhlíku. V atmosféře se tyto izotopy vyskytují v ustáleném poměru (asi **98,9% <sup>12</sup>C, 1,1% <sup>13</sup>C**). Při fotosyntéze dochází k tzv. **frakcionaci**, tedy přednostním využití <sup>12</sup>C a to asi o 1 až 2%, díky tomu jsou živé organismy obohaceny lehčím izotopem. (Bouška 1977).

K vyjádření poměru <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C se udává relativní veličinou delta δ<sup>13</sup>C, kterou je vyjádřen relativní posun v poměru <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C vůči mezinárodnímu standardu Pee Dee Belemnitu (PDB), což je mořský karbonát (Ussiri & Lal 2008):

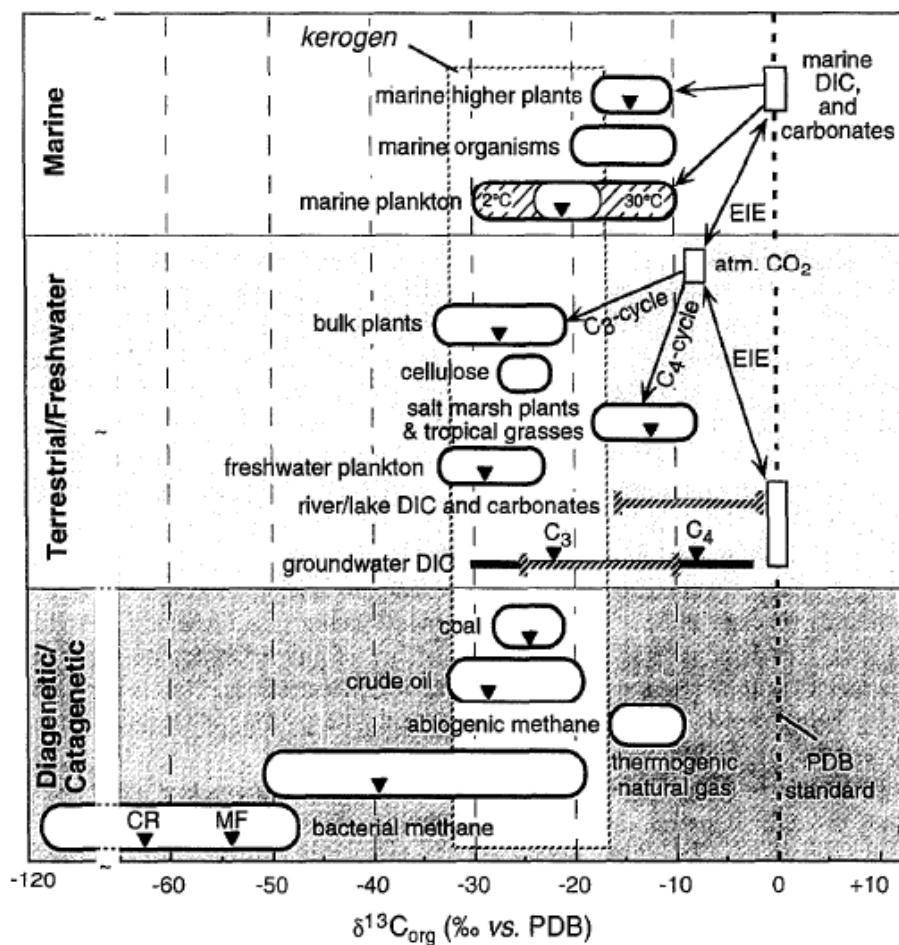
$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left( \frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{vzorek}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{PDB}}} - 1 \right) 1000$$

Čím je větší negativní hodnota, tím méně <sup>13</sup>C je ve vzorku v porovnání se standardem.

#### Recentní organická hmota

Pro studium recentní organické hmoty se využívá několika mechanismů. Ve frakcionaci při fotosyntéze existuje rozdíl mezi **C3 a C4 rostlinami**. Většina rostlin (C3 rostliny) vytváří izotopický posun asi -20 ‰, C4 rostliny vlivem jiného mechanismu fotosyntézy jen asi -7 ‰. V atmosféře je δ<sup>13</sup>C rovno asi -7 ‰. Výsledkem je, že organická hmota původem z C3 rostlin má δ<sup>13</sup>C asi -27 ‰, z C4 rostlin pak asi -14 ‰ (Meyers 1994).

Např. v rámci buňky je <sup>12</sup>C přednostně koncentrován **v lipidech**, takže lipidy, resp. n-alkany jako produkty jejich rozkladu mají oproti celkové organické hmotě nižší δ<sup>13</sup>C (s posunem v řádu 1.7 až 5.7‰). Jedná se o výsledek frakcionace při oxidaci pyruvátu na acetyl koenzym-A a hydrolýze thioesterové vazby, která váže acyl na bílkovinu během prodlužování (Ostrom et al. 1998). Navíc existuje rozdíl mezi **mořskou** biomasou a biomasou souše a stojatých vod. Pro mořské řasy je zdrojem uhlíku rozpuštěný biokarbonát, který má v moři δ<sup>13</sup>C cca 0 ‰. Pro rostliny na souši i řasy stojatých vod je zdrojem atmosféra (pCO<sub>2</sub> jeze bývá v rovnováze s atmosférou). Z tohoto důvodu je tak biomasa mořských řas izotopicky těžší (Meyers 1994).



Obr. 6 Typické rozsahy  $\delta^{13}\text{C}$  pro různé geomateriály a biomasu – převzato z (Whiticar 1996)

**Uhlí** mají distribuci  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  podobnou současným pozemským rostlinám a nemění se s jeho stupněm prouhelnění (Whiticar 1996). Má zpravidla hodnoty rozmezí od -21,1 do -26,7‰ a průměrně -23,7‰. (Bouška, 1977)

U **kerogenu** je izotopické složení závislé na zdroji organické hmoty. Kerogeny mořských sedimentů jsou tedy obecně izotopicky těžší než sladkovodní. Dále lze odlišit rozdíly mezi jednotlivými typy kerogenů dle klasifikace van Krevelena. Kerogen I. typu, který charakteristický řasovou sloužkou, má rozsah  $\delta^{13}\text{C}$  typický pro lipidovou složku (-35 až -25 ‰). Naopak Kerogen III typu je izotopicky spíše těžší, odpovídající rozsahu suchozemských rostlin. Kerogen typu II stojí někde ve středu mezi oběma typy. Jejich rozsahy se ale překrývají, takže podle izotopického složení nelze jasně odlišit jejich původ (Whiticar 1996). Stupeň přeměny kerogenu nemá na jeho izotopické složení větší vliv (Whiticar 1996; Tissot & Welte 1978). V průběhu diagenézy vzniká jako produkt bakteriálního anaerobního rozkladu methan, který je izotopicky lehčí ( $\delta^{13}\text{C} = -50$  až  $-112$  ‰) (Whiticar 1996), naproti tomu však

CO<sub>2</sub> produkovaný mikroorganismy je izotopicky těžší. Tyto procesy se většinou vyrovnají a staré sedimenty (kerogen) si zachovávají izotopické složení z doby jejich vzniku (Tissot & Welte 1978; Meyers 1994).

### 4.2.3 Infračervená spektroskopie (IRS), DRIFTS

Infračervená spektroskopie (též infračervená spektrometrie) je metodou, která na základě některých funkčních skupin dokáže odlišit různé chemické struktury ve vzorku a je možné je i kvantifikovat. Ještě nikdo zatím nevyzkoušel použít infračervenou spektrometrii ke stanovení recentního uhlíku v půdách obsahujících fosilní uhlí ze dvou různých zdrojů. Známa je pouze aplikace u půd s jedním zdrojem fosilní organiky (uhlí) (Rumpel et al. 2001).

### Definice a principy

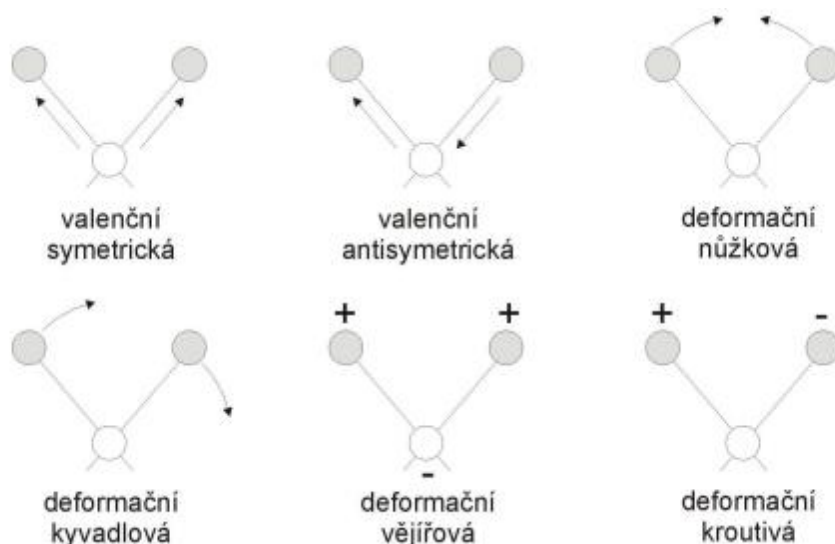
**Molekulová spektroskopie** využívá interakci hmoty se zářením. Energetické změny molekul pozměňují vlastnosti procházejícího či odražené záření. Zkoumáním tohoto záření můžeme pak charakterizovat analyzovanou látku.

Základní vztahy mezi energií (E), vlnovou délkou ( $\lambda$ ) a vlnočtem ( $\tilde{\nu}$ ) kvant elektromagnetického záření jsou pro připomenutí tyto:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$$

kde h je Planckova konstanta a c je rychlost světla ve vakuu.

**Spektrometrie v infračervené oblasti** (infrared spectroscopy, IRS) je metodou molekulové spektroskopie, která využívá oblast infračerveného záření. Energie fotonů infračerveného záření (1-60 kJ/mol) vyvolává změny **vibračního stavu** (lze si představit jako zvětšení amplitudy vibrace molekuly) či **rotačního stavu** molekuly (zrychlení rotace molekuly). Druhy vibrační pohybů znázorňuje Obr.7. Při **valenčních** pohybech (stretching) dochází ke změně délky meziatomové vzdálenosti. Při **deformačních** pohybech (bending) dochází ke změně úhlu mezi vazbami.



Obr. 5 Znáornění některých vibračních pohybů molekuly z pohledu klasické fyziky

Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým vyjádřením závislosti transmittance (T), reflektance (R) nebo absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Transmittance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje ( $I_0$ ). Reflektance je poměr odraženého záření ( $I_r$ ) k záření ze zdroje ( $I_0$ ). Absorbance se odvozuje z transmittance nebo reflektance jako dekadický logaritmus  $1/T$  nebo  $1/R$ .

IRS dále dělíme dle využívané oblasti vlnových délek, resp. vlnočtů na **NIRS** („near-infrared spectrometry, IČ spektrometrie v blízké infračervené oblasti, 800 - 2500 nm, resp.<sup>1</sup> 12500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) a **MIRS** (mid-infrared spectrometry, IČ spektrometrie ve střední infračervené oblasti, 2500 – 25 000 nm, resp. 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Hranice nejsou zcela ostré a jejich vymezení se v literatuře liší.

NIRS a MIRS se také liší v tom, jaké energetické přechody jsou při nich vyvolávány. Zatímco ve střední infračervené oblasti (MIR) hrají dominantní roli přechody fundamentální, v NIR oblasti jsou to přechody kombinační<sup>2</sup> a svrchní tóny<sup>1</sup> (overtony). Podrobněji o fyzice infračervené spektrometrie se lze dočíst například v (Kania 2010; Matějka 2013).

<sup>1</sup> Vlnovou délku  $\lambda$  a vlnočet  $\tilde{\nu}$  lze vzájemně převádět takto:

$$\lambda[\text{nm}] = \frac{10^7}{\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}]} \qquad \tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = \frac{10^7}{\lambda[\text{nm}]}$$

<sup>2</sup> Kombinační přechod je současná změna stavu několika vibračních modů (energie příslušného přechodu pak odpovídá součtu energií fundamentálních přechodů příslušných vibračních modů).

Kombinační přechody i svrchní tóny jsou významně méně pravděpodobné než přechody fundamentální, takže absorpce záření v NIR oblasti je při stejné tloušťce vzorku řádově slabší než v MIR oblasti. Jelikož možných kombinačních a svrchních přechodů je ale celá řada, dochází k jejich překryvům. NIR spektra tak oproti MIR spektrům poznáme podle širokých „slitých“ méně výrazných píků.

Z výše popsaných důvodů je interpretace NIR poměrně obtížná - přiřazení absorpčních pásů jednotlivým kombinačním přechodům a svrchním tonům vyžaduje předběžnou znalost měřené látky a i tak může být obtížná kdy se jedná o směs a v NIRu absorbuje řada organických a anorganických molekul (Stenberg et al. 2010). Běžně se tedy neprovádí kvalitativní analýza ve smyslu rozboru spekter směřující k identifikaci funkčních skupin v molekulách tak jak je obvyklé při interpretaci spekter v MIR oblasti (Matějka 2013). NIR spektra jsou naopak vhodná pro kvantitativní analýzu, při které je spektru přiřazena hodnota námi naměřené veličiny.

## **Druhy infračervených spektrometrů, DRIFTS**

Co se týče techniky měření, měřit lze buď zeslabení záření po průchodu vzorkem (transmisní měření) nebo po jeho odrazu od vzorku (reflexní techniky). Pro měření půd se nejčastěji používá **difúzní reflektance** (diffuse reflectance) patřící do reflexních technik. Jedná se o metodu vhodnou pro práškové vzorky. Díky heterogennímu povrchu prášku se záření odráží do všech různých směrů, odkud je sférickým zrcadlem posíláno na detektor.

Samotné měření na infračerveném spektrometru je poměrně rychlé, nedestruktivní a nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku. Minimalizuje se tak spotřeba chemikálií a zátěž pro životní prostředí. Pracnější a časově náročnější než samotné měření spekter je ale následná analýza naměřených dat.

Z NIR spektrometrů lze odlišit dva základní typy: disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry). Klasické **disperzní spektrometry**, které jsou vhodné pro UV-VIS oblast, ale již méně pro NIR, pracují na principu monochromátoru. Záření přicházející ze zdroje je upravováno na monochromátoru tak, aby poté vzorkem procházelo v jednu chvíli záření jen o jedné vlnové délce. Zbylé vlnové délky jsou na monochromátoru ztraceny. To vede poté k tomu, že detektor musí zachytit v jeden okamžik jen zlomek intenzity záření vycházejícího ze zdroje. U **FTIR spektrometrů** prochází záření ze zdroje

---

<sup>1</sup> Svrchní tón (overtón) je excitace daného vibračního modu do vyšší excitované hladiny. První overtón tak zhruba odpovídá dvojnásobku energie fundamentálního přechodu, druhý overtón trojnásobku, třetí čtyřnásobku. Pro přesnější popis je třeba uvažovat anharmonicitu vibračních modů (tzn. skutečný overtón je o něco menší než by odpovídalo pouhému součtu).

**interferometrem**, což je zařízení, které pohyblivým zrcadlem upravuje distribuci vlnových délek záření a tento modulovaný svazek posílá na vzorek. Na detektor tak dopadá vždy celý svazek záření. Výstupem z detektoru je tzv. **interferogram** zobrazující závislost intenzity záření na poloze zrcadla v interferometru. K převedení interferogramu na klasický spektrální záznam je potřeba matematická metoda Fourierovy transformace. Výhodou FTIR spektrometrů je vyšší rychlost měření, vyšší poměr signálu k šumu (signal-to-noise ratio) a poměrně vyšší intenzita záření dopadající na detektor. Téměř všechny moderní infračervené spektrometry jsou již FTIR spektrometry (Sasic & Ozaki 2010).

Pro spektroskopii difúzní reflektance s Fourierovou transformací se používá zkratka **DRIFTS** (diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy).

### **Princip kvantitativní analýzy, druhy kalibračních metod, úpravy spekter, validace**

Infračervená spektrometrie se hojně uplatňuje v kvantitativní analýze. Jak se postupuje? Nejdříve se vytvoří kalibrační model ze sady kalibračních vzorků, tzv. standardů. Tyto standardy jsou změřeny jinou laboratorní metodou (kupříkladu je stanoven celkový C) a zároveň jsou získána jejich NIR spektra. Spektra a jejich odpovídající laboratorní hodnoty se zadají počítačovému softwaru. Ten pak pomocí některého z chemometrických algoritmů (tzv. kalibračních metod) vytvoří kalibrační model, který dokáže z vlastností spektra předpovídat hodnotu sledované veličiny (např. obsah celkového C). Máme-li poté spektra dalších nezávislých vzorků, můžeme pomocí kalibračního modelu odhadnout jejich obsahy uhlíku, aniž bychom používali laboratorní metodu, která je finančně a časově náročnější.

Jaké jsou typy kalibračních metod? Jako základní kalibrační metoda se dříve využívala vícenásobná lineární regrese (MLR – „multiple linear regression“). S rozvojem softwaru se dnes nejvíce uplatňují dvě regresní metody, a to regrese hlavních komponent (PCR – „principal component regression“) a metoda částečných nejmenších čtverců (PLS(R) – „partial least squares (regression)“). Při použití těchto regresních metod se již nevyužívají pouze maximální absorbance ve vybraných pásech, vyhodnocují se celé úseky spektra. Cílem těchto metod je najít vztah (rovnici) mezi vícerozměrnou informací kalibračního souboru ( maticí hodnot absorbancí ve vybraných regionech) a koncentrací predikované veličiny ve vzorku (maticí hodnot zjištěnou jinou laboratorní metodou). Podrobněji tyto metody popisují např. Meloun a Militký (2002). Trendy v jejich modifikacích pro NIR popisují Stenberg et al. (2010).

V některých případech se spektra pro kalibrační modely spektra mohou předem **upravovat**, např. derivovat, vyhlazovat od šumu apod. Popis možných úprav spekter uvádí např. Andrés a Bona

(2005). Obvykle se postupuje tak, že se spektra podrobují různým úpravám v různých kombinacích a použije se nakonec ta, která vede k nejspěšnějšímu modelu (např. Michel et al. 2009). Novější softwary často samy nabízejí algoritmus pro výběr nejvhodnější úpravy spekter a pracují právě na tomto principu.

Jak ověříme je-li kalibrační model spolehlivý? Klíčovým krokem pro vytvoření robustního modelu je **validace**. Pro předběžné zhodnocení vhodnosti kalibračního modelu lze použít **křížovou validaci** (cross-validation). Při ní je vždy z kalibračního souboru vyjmuto  $n$  vzorků, kalibrační model je vytvořen pouze ze zbylých standardů a pro vyjmuté vzorky jsou dopočítány predikované hodnoty. Je-li vyjmut vždy jeden vzorek ( $n=1$ ), je tato křížová validace nazývána **plnou** křížovou validací („full“ či „leave-one-out“ crossvalidation). Při normální validaci lze rozdělit změřené vzorky na dva náhodné výběry pro kalibraci a validaci. Z kalibračního souboru je vytvořen model a pomocí něj je pro validační soubor provedena predikce sledované veličiny. Porovnáním predikované a skutečné hodnoty validačního souboru získáme představu o přesnosti modelu. Můžeme se poté vrátit k úpravě spekter, výběru spektrálních úseků či zkusit vyloučit některé odlehlé standardy a zkusit tak model vylepšit. Před zavedením do běžné praxe se ale modely opakovaně validují pomocí skutečně nezávislého validačního souboru. Ten lze získat jen samostatným odběrem a úpravou vzorku, provedeným případně i jiným člověkem, měřením v jiném čase atp. O konkrétních způsobech hodnocení kalibračního modelu pojednává Příloha 4.

Nevýhodou kvantitativní analýzy pomocí NIRu je množství kalibračních standardů, které metoda vyžaduje. Platí „čím více, tím lépe“ – v literatuře se téměř nesetkáme se soubory menšími než 100, provádí se studie na stovkách až tisících vzorcích (Ben-Dor et al. 1997; Stenberg et al. 2010; Michel et al. 2009).

### **Potenciál NIRS pro odlišení recentního a fosilního uhlíku**

Byla provedena celá řada aplikací NIRS na půdách. Vyčerpávající review o nich sepsali Stenberg et al. (2010). Nejčastěji jsou využívány kalibrace pro celkový a organický uhlík a obsah jílu. Žádná ze studií však přímo nezkoumá organický uhlík v přítomnosti dvou typů fosilního uhlíku různého původu tak, jak plánuji já. Jaké jsou předpoklady, aby byly různé uhlíky v sokolovských půdách predikovatelné NIREm? Měly by být vázány v odlišných sloučeninách a tyto sloučeniny by měly mít odlišné spektrální charakteristiky. Jaké sloučeniny a jejich charakteristické pásy by mohly být typické pro jednotlivé typy uhlíku?

## Recentní organika

Existuje celá řada studií v nichž je obsah recentního uhlíku dobře predikován IČ spektrometrií. Kombinační a svrchní přechody v NIRu související s organickou hmotou jsou výsledkem především NH, CH a CO skupin. Uvádí se, že nejdůležitější jsou pásy kolem 1100, 1600, 1700 až 1800, 2000, a 2200 až 2400 nm (Stenberg et al. 2010). Přehledný výčet charakteristických vlnových délek uvádí např. Ben-Dor et al. (1997) (Tab. 2). Podobný výčet charakteristických konstituentů půdy uvádí také Stenberg et al. (2010) (Tab 3).

Michel et al. (2009) provedli měření na umělých směsích půdy, různých druhů uhlí a polorozloženého jehličí. Půdu před přimícháním uhlí a jehličí zbavili recentního uhlíku žiháním při vysoké teplotě, aby tak znali přesné obsahy uhlíku původem z uhlí a z recentní organiky. V takovýchto směsích se jim podařilo kvantifikovat jak uhlík z uhlí, tak z jehličí. Jedná se o jedinou studii podobného typu s využitím NIR. Odlišení uhlí a recentní organiky se také podařilo Rumpelové et al. (2001), avšak ti použili MIRS.

Nutno podotknout, že ještě v žádné studii nebyl stanovován obsah recentního uhlíku v přítomnosti fosilního uhlíku původem z kerogenu.

Tab. 2 Vlnové délky charakteristické pro organickou hmotu – převzato z Ben-Dor et al. (1997) a Stenberg et al (2010)

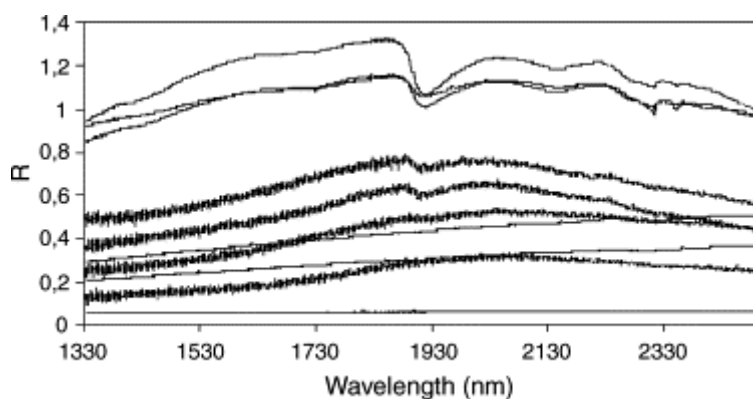
CGM Wavelength (nm)	Assignments <sup>a</sup>	Possible Components <sup>b</sup>
664		Chlorophyll pigment
1203		Oil/cellulose/wax
1358	OH in water	Cellulose/lignin/starch
1465	OH in water ( $\nu_2 + \nu_3$ ); CH <sub>2</sub>	Cellulose/lignin/starch/pectin
1582	OH in water (2 $\nu$ ); H-bonded OH group	Pectin/starch/cellulose
1669	2 $\nu$ aromatic C—H stretch	
1726	2 $\nu$ of aliphatic C—H stretch	Cellulose/lignin/starch/pectin/wax/humic acid
1761	2 $\nu$ of aliphatic C—H stretch	Cellulose/lignin/starch/pectin/wax/humic acid
1929	OH in water ( $\nu_1 + \nu_3$ ); 3 $\nu$ of —C=O and of —COOH, C=O of ketonic carbonyl, CONH <sub>2</sub>	Cellulose/lignin/glucan/starch/pectin/wax/humic acid
2068	3 $\nu$ of aromatic C=C, COO—hydrogen bond, C=O	Cellulose/glucan/pectin
2111	3 $\nu$ of aromatic C=C, COO—hydrogen bond, C=O	Cellulose/glucan/pectin
2169	3 $\nu$ of aromatic C=C	Starch/lignin/wax/tannins
2309	3 $\nu$ of aliphatic C—H, aromatic ring stretch	Humic acid/wax/starch
2347	3 $\nu$ of aliphatic C—H	Cellulose/lignin/glucan
2386	3 $\nu$ of COO—, CH <sub>3</sub>	Pectin/protein

Tab. 3 Vlnové délky charakteristické pro hlavní složky půdy – včetně fundamentálních vibrací ve střední infračervené oblasti

Organics	Fundamental (cm <sup>-1</sup> )	vis-NIR wavelength (nm)	vis-NIR Mode
Aromatics	ν <sub>1</sub> C-H 3030 cm <sup>-1</sup>	1650	2ν <sub>1</sub>
		1100	3ν <sub>1</sub>
		825	4ν <sub>1</sub>
Amine	δ N-H 1610 cm <sup>-1</sup> ν <sub>1</sub> N-H 3330 cm <sup>-1</sup>	2060	ν <sub>1</sub> δ
		1500	2ν <sub>1</sub>
		1000	3ν <sub>1</sub>
		751	4ν <sub>1</sub>
Alkyl asymmetric-symmetric doublet	ν <sub>3</sub> C-H 2930 cm <sup>-1</sup> ν <sub>1</sub> C-H 2850 cm <sup>-1</sup>	1706	2ν <sub>3</sub>
		1754	2ν <sub>1</sub>
		1138	3ν <sub>3</sub>
		1170	3ν <sub>1</sub>
		853	4ν <sub>3</sub>
		877	4ν <sub>1</sub>
Carboxylic acids	ν <sub>1</sub> C=O 1725 cm <sup>-1</sup>	1930	3ν <sub>1</sub>
		1449	4ν <sub>1</sub>
Amides	ν <sub>1</sub> C=O 1640 cm <sup>-1</sup>	2033 1524	3ν <sub>1</sub> 4ν <sub>1</sub>
Aliphatics	ν <sub>1</sub> C-H 1465 cm <sup>-1</sup>	2275	3ν <sub>1</sub>
		1706	4ν <sub>1</sub>
Methyls	ν <sub>1</sub> C-H 1445–1350 cm <sup>-1</sup>	2307–2469	3ν <sub>1</sub>
		1730–1852	4ν <sub>1</sub>
Phenolics	ν <sub>1</sub> C-OH 1275 cm <sup>-1</sup>	1961	4ν <sub>1</sub>
Polysaccharides	ν <sub>1</sub> C-O 1170 cm <sup>-1</sup>	2137	4ν <sub>1</sub>
Carbohydrates	ν <sub>1</sub> C-O 1050 cm <sup>-1</sup>	2381	4ν <sub>1</sub>

### Uhlí

NIR spectra uhlí jsou obecně nevýrazná. Charakteristické absorpční pásy lze nalézt u uhlí s nízkým stupněm prouhelnění a se zvyšujícím se prouhelněním jejich intenzita klesá (Obr. 6). Stejně klesá i celková reflektance uhlí. Charakteristické pásy 1400 a 1900 nm, nejvíce zřetelné u lignitů, souvisí s vodou (volnou, vázanou nebo adsorbovanou) (Andrés & Bona 2005). Jelikož hnědé uhlí ze Sokolovska má relativně nižší stupeň prouhelnění, lze očekávat, že jeho NIR spektrum bude mít tyto charakterické pásy.



Obr. 6 Infračervená spektra vybraných uhlí – směrem od shora dolů se zvyšuje stupeň prouhelnění (převzato z Andrés & Bona 2005).

V již zmíněné studii Michel et al. (2009) přimíchávali do půdy lignit, charcoal a anthracit a stanovovali obsah uhlíku v nich obsažený. Popisují, že nejdůležitější absorpční pás pro **lignit** je 2276 nm, který je místem dvou kombinačních přechodů, a to (1) valenční vibrace vazby O-H a C-O celulózy, a (2) valenční vibrace C-H a deformace CH<sub>2</sub> skupiny škrobu (indikuje přítomnost polysacharidů). Naopak pro **charcoal** je charakteristický pás 2340 nm, který souvisí s přítomností alifatických uhlovodíků /alkylové skupiny/. **Pro anthracit** uvádí tři vlnové délky: (1) 1400 nm – kombinační přechod C-H vazeb v CH<sub>2</sub> skupině (2) 1902 nm – druhý svrchní tón valenční vibrace C=O vazby v CO<sub>2</sub>H skupině, (3) 2198 nm – kombinační přechod valenční vibrace C-H a C=O v aromatické CHO skupině.

Hnědé uhlí ze Sokolovska je poměrně málo aromatické (Bouška 1977). Je tedy otázkou, zda budou aromatické skupiny v jeho spektru nějak zvlášť zřetelné.

### ***Kerogen***

NIR spectrum sokolovského kerogenu zatím nikdo nezměřil. Jeho MIR spektrum změřili Kříbek et al. (1998) - Tabulka 4 uvádí důležité fundamentální přechody typické pro kerogen popsané v jejich studii. K nim jsem v tabulce doplnila odpovídající přechody z oblasti NIR dle Tab. 3. Spektru kerogenu dominují pásy související s jeho alifaticitou. Alifatický charakter kerogenu v uvedené studii potvrdila i pyrolyzní chromatografie a NMR.

Tab. 4 Charakteristické fundamentální přechody kerogenu a jejich kombinační pásy

druh organické sloučeniny/funkční skupiny	fundamental (MIR) [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	vis NIR [ $\text{nm}$ ] <sup>b</sup>	vis NIR mode
alkylový asymetrický-symetrický dublet	v3 C-H 2930 $\text{cm}^{-1}$	1706	2v3
	v1 C-H 2850 $\text{cm}^{-1}$	1754	2v1
		1138	3v3
		1170	3v1
alifatické řetězce (deformační vibrace dCH <sub>2</sub> a CH <sub>3</sub> )	1465 $\text{cm}^{-1}$	2275	3v1
		1706	4v1
methyly	v1 C-H 1445-1350 $\text{cm}^{-1}$	2307-2469	3v1
		1730-1852	4v1

<sup>a</sup> získány z Křibek et al. (1998)

<sup>b</sup> odvozeny od fundamentálních přechodů dle Tab. Xx (Stenberg, 2010)

## 5 Empirická část

### 5.1 Metodika

Pro účely mé experimentální práce byla zvolena analýza půd a umělých modelových směsí. Podíl recentního a fosilního uhlíku v půdách byl stanoven pomocí radiokarbonové metody, směsi pak byly vytvářeny z materiálů, které s ohledem na svoji genezi a další okolnosti, obsahovali jen jeden z následujících zdrojů uhlíku: uhlí, kerogen a recentní organickou hmotu.

Vzorky **půd** byly vybrány tak, aby co nejvíce pokrývaly variabilitu ploch na Velké podkrušnohorské výsypce. Počet vzorků nemohl být velký kvůli finanční náročnosti radiokarbonové analýzy. Proto bylo kromě půd vytvořeno větší množství **umělých směsí** z modelových materiálů: jílu (obsahujících kerogen), uhlí a fermentační vrstvy (představující čistou recentní organiku). Modelové materiály byly rovněž zkoumány jednotlivými metodami. Díky jednoduchému stanovení obsahu celkového uhlíku v modelových materiálech jsme bez nutnosti radiokarbonové analýzy znali u modelových směsí obsah recentního i fosilního uhlíku, a to zvláště původem z uhlí a z kerogenu.

Pro porovnání s radiokarbonovou analýzou byly zvoleny ty metody, které se dosud běžně při studiu výsypkových půd používali, aby mohla být zpětně zhodnocena jejich vhodnost.

Z dosud nevyužitých metod s potenciálem odlišit recentní a fosilní organickou hmotu byla vybrána infračervená spektrometrie, protože má potenciál běžně aplikovatelné (tzn. finančně nenáročné) metody.

### 5.1.1 Odběr a příprava vzorků

Na jaře 2012 byly odebrány vzorky půd, fermentační vrstvy, jílu a uhlí.

Pro odběr půd byly na Velké podkrušnohorské výsypce vybrány 3 plochy rekultivované výsadbou olší a 4 nerektivované plochy s porosty spontánní sukcese (Tab. 5). Tyto dvě chronosekvence byly vybrány, jelikož jsou předmětem intenzivního výzkumu, umožní sledovat vývoj sekvestrovaného uhlíku v čase a vypoví o variabilitě v obsahu fosilního uhlíku mezi různými plochami. Na těchto plochách byly odebrány vzorky horizontu A (0-5 cm) a horizontu C z hloubky 40-50cm. Byly odebrány vždy směsné vzorky složené z dílčích vzorků tak, aby jejich celková hmotnost byla 2 kg. Vzorky byly zbaveny kořenů a živočichů.

Vzorky nebyly prosátý přes 2 mm síto, jelikož jejich jílovitá struktura s množstvím pevných agregátů neumožňuje prosátím oddělit skeletovitou a jemnou frakci půdy, čímž může dojít k podhodnocení obsahu recentní organické hmoty. Místo toho byl ručně oddělen a zvážen skelet nejílového původu (tvořil však u všech vzorků zanedbatelné množství) a jílové agregáty se zbytky jílového skeletu byly nadrceny. Takto homogenizované vzorky byly usušeny na vzduchu. Část každého vzorku (cca 200 g) pak byla namleta ručním elektrickým mlýnkem, aby prošla přes 2 mm síto. Část takto namletého vzorku (cca 50 g) byla namleta na kulovém mlýnu (Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů, PřF UK) a prosáta přes síto 0.125mm.

Dále byl na ploše II odebrán vzorek fermentačního horizontu (cca 2 kg) jako modelový materiál obsahující 100% recentní organickou hmotu. Vzorek byl zbaven kořenů, prosát přes 2 mm a usušen na vzduchu. Část vzorku (cca 50 g) byla homogenizována v třecí misce tak, aby prošla přes síto 0.125 mm.

Tab. 5 Výsypkové plochy, ze kterých byly odebrány vzorky půd - Velká podkrušnohorská výsypka

	Rekultivované			nerektivované			
	EMA	A1	A2	E	IV	II	V
rok nasypání/rekultivace	2002	1984	1975	2002	1993	1984	1961
věk (k roku 2012)	10	28	37	10	19	28	51

Dále byly v bývalém dole Marie odebrány dva vzorky nezvětralého jílu cyprisového souvrství tak, aby obsahovaly různá množství fosilního uhlíku (cca 5 a > 10%) - přičemž fosilní materiál nadložních jílu je tvořen zejména kerogenem - a dále vzorek uhlí. Tyto vzorky byly nadrceny, usušeny a namlety ručním elektrickým mlýnkem tak, aby prošly přes 2mm síto.

Popis vzorků je uveden v Tab. 6.

---

Tabulka č.6 Popis vzorků jílu a uhlí - Rojík (osobní sdělení)

---

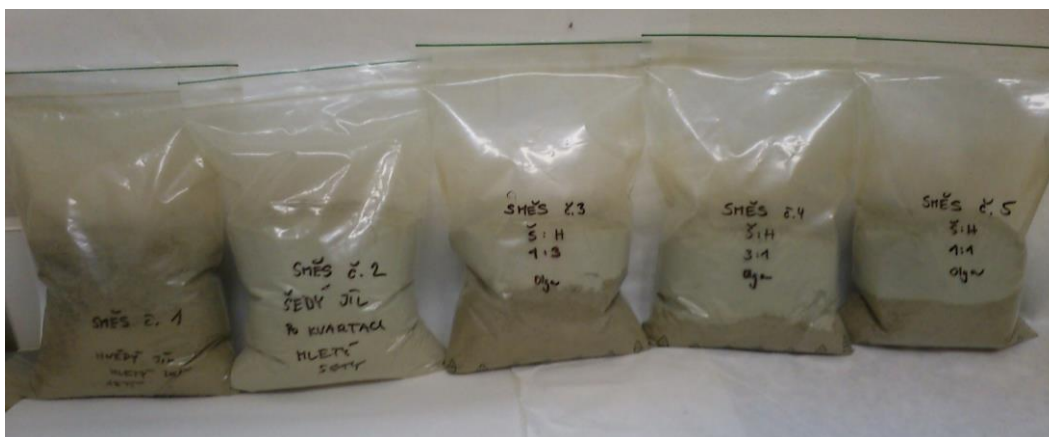
jíl 1 "šedý" jíl	cyprisové souvrství - strop spodní části souvrství - modrošedý kaolinitový jíl s malou příměsí sideritu a nízkým obsahem fosilní organické hmoty - býv. lom Marie poblíž průniku s lomem Jiří, N 50°11.836' E 012°40.199'
jíl 2 "hnědý" jíl	cyprisové souvrství - báze svrchní části souvrství - hnědošedý illit-kaolinitový jílovec s významnější příměsí sideritu a vyšším obsahem fosilní organické hmoty - stejná poloha
Uhlí	sokolovské souvrství - u stropu sloje Antonín - uhlí autochtonní, humitové, xylo-detritické s proužkem alochtonního jílovitého uhlí s úlomky polokoksu (2 cm) - býv. lom Marie poblíž vchodu do štolý k býv. hlubinné šachtě Marie

---

Jíly, uhlí a fermentační vrstva byly použity k vytvoření 125 směsí s různým podílem kerogenu, uhlí a recentního uhlíku.

Nejdříve bylo vytvořeno 5 jílových směsí namícháním šedého a hnědého jílu v poměru 1:0, 0:1, 1:3, 3:1, 1:1 (Obr. 7). Poté byly vytvořeny 30g směsi tak, že byly vzájemně namíchány fermentační vrstva a uhlí oba v 5 úrovních koncentrace (0.3, 0.6, 1.5, 3 g, což odpovídá relativním koncentracím 1, 2, 5, 10%) a do 30 g byla směs doplněna jednou z jílových směsí. Kombinací těchto 5 úrovní u 3 složek vzniklo  $5^3$ , tedy 125 směsí. Tento počet vzorků byl zvolen kvůli infračervené spektroskopie, která vyžaduje poměrně vysoké počty vzorků  $n > 60-100$  pro vytvoření robustních kalibrací.

Po prvním měření směsí na infračerveném spektrometru byly vzorky namlety na kulovém mlýně.



Obr. 7 Pět jílových směsí pro tvorbu umělých směsí jílu, uhlí a fermentační vrstvy

## 5.1.2 Laboratorní analýzy a zpracování dat

**Radiokarbonová analýza** a stanovení **poměru stabilních izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$**  vzorků půd a modelových materiálů byla provedena servisně v Center for Applied Isotope Studies, University of Georgia. Vzorky byly spáleny při  $900^\circ\text{C}$ , vzniklý  $\text{CO}_2$  byl katalyticky převeden na grafit (Vogel et al. 1984).  $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$  poměr grafitu byl změřen na urychlovačovém hmotnostním spektrometru (accelerator mass spectrometer – AMS). Po porovnání se standardem - oxalovou kyselinou I (NBS SRM 4990) byl vyjádřen jako pMC (Stuiver & Polach 1977).

Poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  byl měřen zvlášť na izotopovém hmotnostním spektrometru a po porovnání se standardem PDB vyjádřen jako  $\delta^{13}\text{C}$  (Craig 1957) s chybou menší než 0.1 ‰. Poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  byl stejnou metodou stanoven pro modelové materiály také na Katedře experimentální biologie rostlin, PřF JČÚ v Českých Budějovicích.

Před analýzou je nutné zbavit vzorky uhličitánů, což jsem provedla sama na ÚŽP dle protokolu uvedené laboratoře (Příloha 1).

**Stanovení ztráty žiháním** (loss-on-ignition, LOI) bylo provedeno žiháním vzorku při stanovené teplotě v muflové peci po dobu 5 hodin a vyjádřen jako úbytek hmotnosti vzorku v % (Heiri et al. 2001; Santisteban et al. 2004). Stanovení bylo nejdříve vyzkoušeno na vzorcích modelových materiálů při teplotách 250, 350, 450, 550, 650, 750 a  $850^\circ\text{C}$ . Půdy a vybraných 8 směsí byly žihány při teplotách nižších - 150, 200, 250, 350 a  $550^\circ\text{C}$ , jelikož se při žihání modelových materiálů prokázalo, že vhodná teplota bude ležet blízko  $250^\circ\text{C}$ . Byly vyvinuty korekční koeficienty pro úbytek porcelánových kelímků při sušení a při žihání. Postup je podrobně popsán v Příloze 2.

**Obsah oxidovatelného uhlíku** (Cox) byl stanoven v modelových materiálech a půdách po oxidaci vzorku dichromanem ve směsi s kyselinou sírovou a titrimetrickým stanovením úbytku dichromanu Mohrovou solí (Zbiral 2002). Postup je podrobně popsán v Příloze 3.

**Obsah celkového C a N** (TC, resp. TN) byl stanoven ve vzorcích půd a modelových materiálů ( $<0.125\text{ mm}$ ) na CHN analyzátoru EA 1108, Carlo Erba Instruments v Ústavu pro životní prostředí (ÚŽP), PřF UK. Vzorky byly v cínových kapslích spáleny při teplotě  $>1000^\circ\text{C}$  v proudu čistého kyslíku a kompletně převedeny na plynné produkty oxidace. Vzniklé  $\text{CO}_2$  a  $\text{NO}_x$  po převedení na  $\text{N}_2$  jsou v proudu helia dopraveny do tepelně vodivostním detektoru (TCD) a po porovnání s měřením standardů převedeny na %C %N (Schumacher 2002). Měření vzorku bylo provedeno nejdříve ve dvou opakováních. Poté bylo podle výsledků vybráno 6 vzorků na ověření normálního rozdělení dat a analyzováno znovu

v dalších 3 opakováních. Pro výběr vzorků na test normality byla stanovena tato kritéria: 1) minimum 2) maximum 3) medián z horizontů A 4) medián z horizontů C 5) nejbližší průměru z horizontů A 6) nejbližší průměru z horizontů C. U těchto šesti půd byl proveden Shapiro-Wilkův test normality.

Obsahy TC modelových materiálů byly poté použity pro výpočty obsahu uhlíku ve směsích. Byly vypočítány teoretické obsahy celkového uhlíku (C<sub>tot</sub>), recentního uhlíku (C<sub>rec</sub>), kerogenového uhlíku (C<sub>jil</sub>) a uhlíku z uhlí (C<sub>uhli</sub>).

Dále byly stanoven **obsah organického uhlíku rozdílem z celkového a anorganického uhlíku** (C<sub>org</sub> rozdílem TC-TIC) v Laboratořích geologických ústavů (LGÚ), PřF UK. Obsah TC zde byl stanoven na analyzátoru ELTRA CS 530 spalováním vzorku při cca 1350° v proudu O<sub>2</sub> s následnou infračervenou detekcí CO<sub>2</sub>. Obsah anorganického uhlíku (total inorganic carbon, TIC) byl stanoven na analyzátoru ELTRA CS 500 s TIC modulem, v kterém dochází v na topné desce k rozkladu vzorku kyselinou. Produkty rozkladu (CO<sub>2</sub>) jsou poté detekovány podobně jako u TC. Z této analýzy byly použity zejména relativní podíly C<sub>org</sub>/TC, pro korekci měření na ÚŽP a použití těchto hodnot

**Infračervená spektrometrie** byla provedena na dvou různých přístrojích v různém rozsahu vlnových délek. Modelové materiály, půdy a 125 směsí jsem naměřila ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., a to v oblasti 1000 - 2500 nm (NIRS, near infrared spectroscopy). Jednalo se o FT-NIR spektrofotometr Nicolet Antaris II (Thermo Electron Corporation, Madison, USA). Toto měření jsem provedla dvakrát – jednou na hrubě mletých půdách a směsích (<2mm), podruhé na jemně mletých vzorcích (<0.125mm), aby bylo možné porovnat, zda má jemnost mletí vliv na spektra.

Modelové materiály a půdy (<0.125mm) jsem naměřila navíc také v Centru pro studium dopadů globální změny klimatu, v.v.i. v oblasti 350-2500 nm (UV-VIS-NIRS) na polním spektrometru ASD/FieldSpec (ASD, Colorado, USA).

Díky tomu jsem mohla porovnat, zda měření v oblasti UV-VIS a nejbližšího NIRu (tj. 350-1000 nm) přináší o vzorcích nějaké zajímavé informace navíc. Podrobné technické detaily, postup obou měření a zvolené analýzy dat popisuje Příloha 4.

**Data byla statisticky zpracována v programu R verze 2.13.2.**

**Podrobnosti o matematickém zpracování dat uvádí Příloha 5. Popis zpracování infračervených spekter a kalibrací uvádí Příloha 4.**

## 5.2 Výsledky a diskuse

### 5.2.1 Radiokarbonová analýza (14C-AMS)

Tab. 7 uvádí relativní a absolutní obsahy recentního uhlíku, vypočtené na základě různých metod výpočtu pMCrecent. K porovnání s dalšími metodami byla vybrána **var. I**, jelikož poskytuje nejkonzervativnější odhad Crec. Jedná se tedy o minimální množství recentního uhlíku, které lze ve vzorcích odhadovat.

Dle **var. I fosilní uhlík** představuje v půdách 26 – 99 % celkového organického uhlíku (TOC). V A horizontech představuje 26 až 99 %, v C horizontech 93 až 99 % TOC. Absolutně je fosilní uhlík přítomen v celkovém rozsahu 2.1 – 6.0 %, z toho v A horizontech 2.6 – 5.6, v C horizontech 2.1 – 6.0 %

Pro obsah fosilního uhlíku je **var. I** ale maximální variantou. Dle jeho minimální varianty (**var. II**) představuje 13 – 99 % celkového organického uhlíku (TOC) v půdách. V A horizontech představuje 13 - 96 %, v C horizontech 86 až 99 % TOC. Absolutně je fosilní uhlík přítomen v rozsahu 0.9 – 6.0 %, v A horizontech 0.9 – 5.1, v C horizontech 2.0 – 6.0 %

Tab. 7 Výsledky <sup>14</sup>C analýzy vzorků půd a modelových materiálů. pMCTOC je aktivita 14C naměřená ve vzorcích, pMCrecent je referenční pMC recentní organické hmoty, Crec/TOC je vypočtený relativní podíl recentního uhlíku na obsahu organického uhlíku, Crec je vypočtený obsah recentního uhlíku ve vzorku, var.I-IV odpovídají odlišné metodě výpočtu pMCrecent viz. Metodika

kód vzorku	věk	pMCTO Csx	pMCrecent				Crec/TOC [%]				C rec [%]			
			var. I	var. II	var. III	var. IV	var. I	var. II	var. III	var. IV	var. I	var. II	var. III	var. IV
A1-A	28	48.390.16	115	104	65	72	42	74	68	47	<b>3.25</b>	<b>5.21</b>	<b>5.71</b>	<b>3.59</b>
A1-C	28	2.160.03	115	104	65	72	2	3	3	2	<b>0.08</b>	<b>0.13</b>	<b>0.14</b>	<b>0.09</b>
A2-A	37	74.520.22	115	104	86	92	65	87	81	72	<b>6.82</b>	<b>8.52</b>	<b>9.13</b>	<b>7.54</b>
A2-C	37	2.310.03	115	104	86	92	2	3	3	2	<b>0.08</b>	<b>0.10</b>	<b>0.11</b>	<b>0.09</b>
E-A	10	1.680.02	115	104	45	50	1	4	3	2	<b>0.07</b>	<b>0.16</b>	<b>0.18</b>	<b>0.08</b>
E-C	10	0.920.02	115	104	45	50	1	2	2	1	<b>0.04</b>	<b>0.10</b>	<b>0.11</b>	<b>0.05</b>
EMA-A	10	10.950.06	115	104	45	50	10	25	22	11	<b>0.27</b>	<b>0.63</b>	<b>0.70</b>	<b>0.30</b>
EMA-C	10	1.90.27	115	104	45	50	2	4	4	2	<b>0.04</b>	<b>0.09</b>	<b>0.11</b>	<b>0.05</b>
II-A	28	15.260.08	115	104	66	72	13	23	21	15	<b>0.85</b>	<b>1.36</b>	<b>1.48</b>	<b>0.94</b>
II-C	28	1.960.03	115	104	66	72	2	3	3	2	<b>0.04</b>	<b>0.07</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>
IV-A	19	45.910.16	115	104	54	60	40	85	77	44	<b>2.50</b>	<b>4.81</b>	<b>5.32</b>	<b>2.76</b>
IV-C	19	7.590.05	115	104	54	60	7	14	13	7	<b>0.13</b>	<b>0.26</b>	<b>0.29</b>	<b>0.15</b>
V-A	51	84.960.25	115	104	119	128	74	71	66	82	<b>9.67</b>	<b>8.70</b>	<b>9.32</b>	<b>10.69</b>
V-C	51	1.750.03	115	104	119	128	2	1	1	2	<b>0.09</b>	<b>0.08</b>	<b>0.09</b>	<b>0.10</b>
Š		3.770.04	115	104			3			4	<b>0.14</b>			<b>0.16</b>
H		0.590.02	115	104			1			1	<b>0.07</b>			<b>0.08</b>
F		1040.33	115	104			90			100	<b>34.40</b>			<b>38.04</b>
U		0.120.02	115	104			0			0	<b>0.05</b>			<b>0.06</b>

Ideálním způsobem výpočtu pMC recentní organiky je modelovat stáří organické hmoty pomocí některého z dynamických modelů organické hmoty (např. CENTURY nebo RotHC). Např. Rumpelová (2003) použila k tomuto účelu Rothamsted model, mohla tak rozdělit půdní uhlík do věkových skupin. Na druhou stranu však nedošla k nijak závratně odlišným číslům, než byl její odhad 110 pMC z dřívější studie (Rumpel et al. 1999).

## 5.2.2 Stanovení poměru stabilních izotopů $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Tab. 8 uvádí  $\delta^{13}\text{C}$  modelových materiálů naměřené ve dvou různých laboratořích.

Hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  fermentační vrstvy (-29.4 ‰) leží na spodní hranici hodnot uváděných pro C3 rostliny: -32 až -22 ‰ (průměr -27 ‰) (Boutton et al. 1998).  $\delta^{13}\text{C}$  uhlí (-26.9) leží na spodní hranici uváděné pro uhlí: od -21,1 do -26,7‰, průměrně -23,7‰. (Bouška, 1977)

Tab. 8 Poměry stabilních izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  modelových materiálů - měření ze dvou nezávislých laboratoří

	Georgia, USA $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	České Budějovice $\delta^{13}\text{C}$ [‰]
"šedý" jíl chudý na C	-27.8	-27.579
"hnědý" jíl bohatý na C	-32.4	-31.848
fermentační vrstva půdy	-29.4	-28.924
uhlí	-26.9	-26.060
přesnost	SD <0.1	SD = 0.151

U obou jílu najdeme méně  $^{13}\text{C}$  než v uhlí. Tento rozdíl souvisí s odlišným původem fosilních hmot. Lze ho dobře vysvětlit řasovým původem kerogenu – řasy mají oproti suchozemských rostlinám ve své struktuře více lipidů, jejichž biosyntéza je charakteristická přednostním zabudováním  $^{12}\text{C}$  (Ostrom et al. 1998).

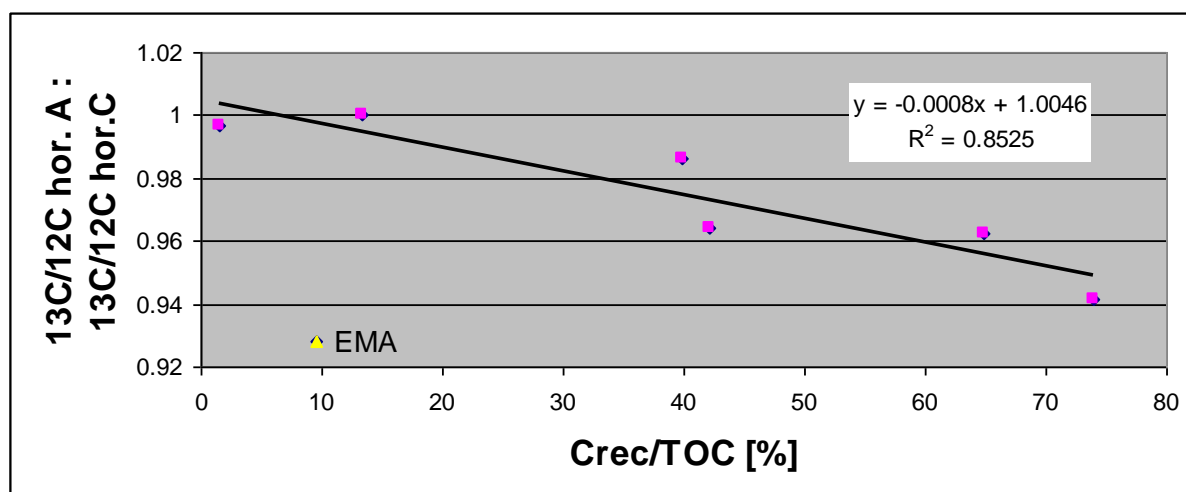
Zajímavý je však rozdíl hodnot mezi oběma jíly. Vyloučíme-li kontaminaci, mohlo by to být vysvětleno odlišnými sedimentačními podmínkami při vzniku těchto vrstev. Při biodegradaci dochází k přednostnímu rozbíjení vazeb  $^{12}\text{C}$ - $^{12}\text{C}$  spíše než  $^{13}\text{C}$ - $^{12}\text{C}$  (Tissot & Welte 1978). Oxidační podmínky, ve kterých pravděpodobně šedý jíl vznikl (Kříbek 1998), nahrávají vyšší biodegradaci – mohlo tak dojít k přednostnímu „vyštípání“ izotopů  $^{12}\text{C}$  a k nabohacení zbylé organické hmoty izotopem  $^{13}\text{C}$ . Naopak v anoxických podmínkách, anaerobní respirace organické hmoty produkuje izotopicky lehčí metan a  $\text{CO}_2$ , který může být vzestupným proudem transportován do povrchové vrstvy a znovu zabudován do biomasy fytoplanktonu. Dalším možným vysvětlením jsou odlišné poměry v nádrži v době vzniku sedimentu – je totiž známo že  $\delta^{13}\text{C}$  cyanobakterií, které mohli být hlavním zdrojem uhlíku pro vznik kerogenu se

mění podle toho, zda syntetizují při hladině nebo v hlubších vrstvách nádrže (Gu & Alexander 1996).

U půd (Tab 9) si povšimněme vzájemného poměru  $\delta^{13}\text{C}$  u horizontů A a C – pro jednotlivé půdy je horizont C vždy menší nebo roven hodnotě A horizontu (párový t-test;  $p=0.0119$ ). Hlubší vrstva je tedy vždy izotopicky stejná nebo lehčí. Závislost poměru horizontů A/C na relativním podílu Crec na TOC ukazuje Obr. 7. Vyloučením jedné odlehlé půdy (EMA) dostaneme  $R^2=0.85$ .

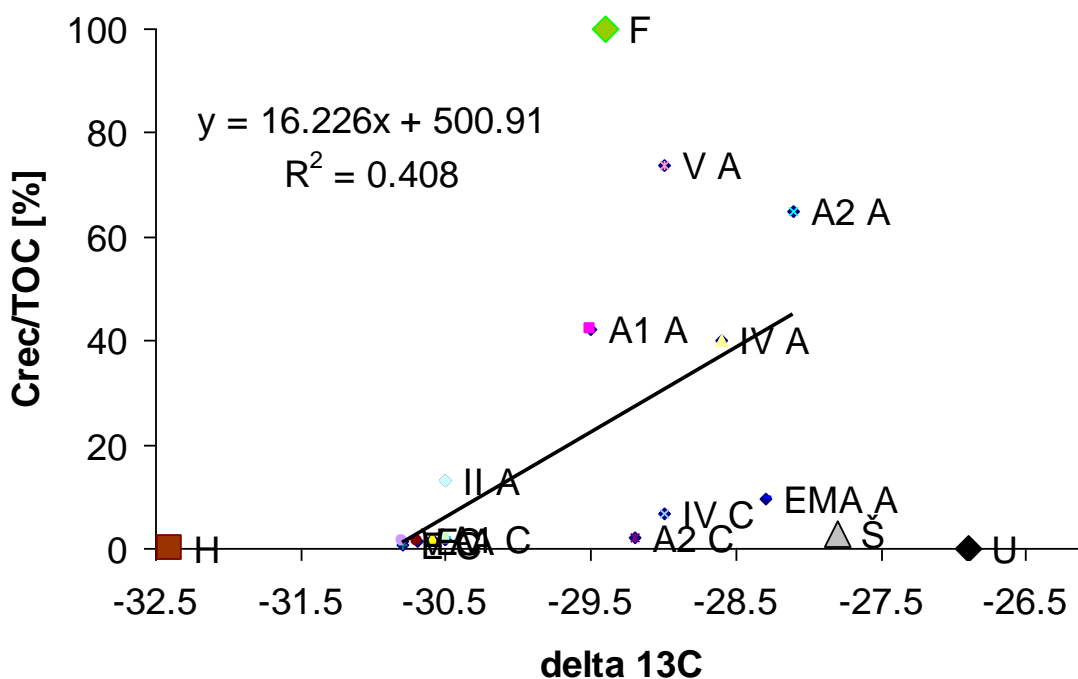
Tab. 9 Srovnání  $\delta^{13}\text{C}$  s relativním podílem recentního uhlíku na celkovém organickém uhlíku (Crec/TOC) a absolutních množstvích recentního uhlíku

site ID	horizont	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$	crec/TOC	Crec
A1	A	-29.5	42.08	3.25
A1	C	-30.6	1.88	0.08
A2	A	-28.1	64.80	6.82
A2	C	-29.2	2.01	0.08
E	A	-30.7	1.46	0.07
E	C	-30.8	0.80	0.04
EMA	A	-28.3	9.52	0.27
EMA	C	-30.5	1.65	0.04
II	A	-30.5	13.27	0.85
II	C	-30.5	1.70	0.04
IV	A	-28.6	39.92	2.50
IV	C	-29	6.60	0.13
V	A	-29	73.88	9.67
V	C	-30.8	1.52	0.09



Obr. 8 Závislost mezi poměrem  $\delta^{13}\text{C}$  horizontu A ku horizontu C a relativním podílem recentního uhlíku na obsahu organického uhlíku v půdách. Regresní přímka a parametry ukazují regresi po vyloučení jedné odlehlé půdy

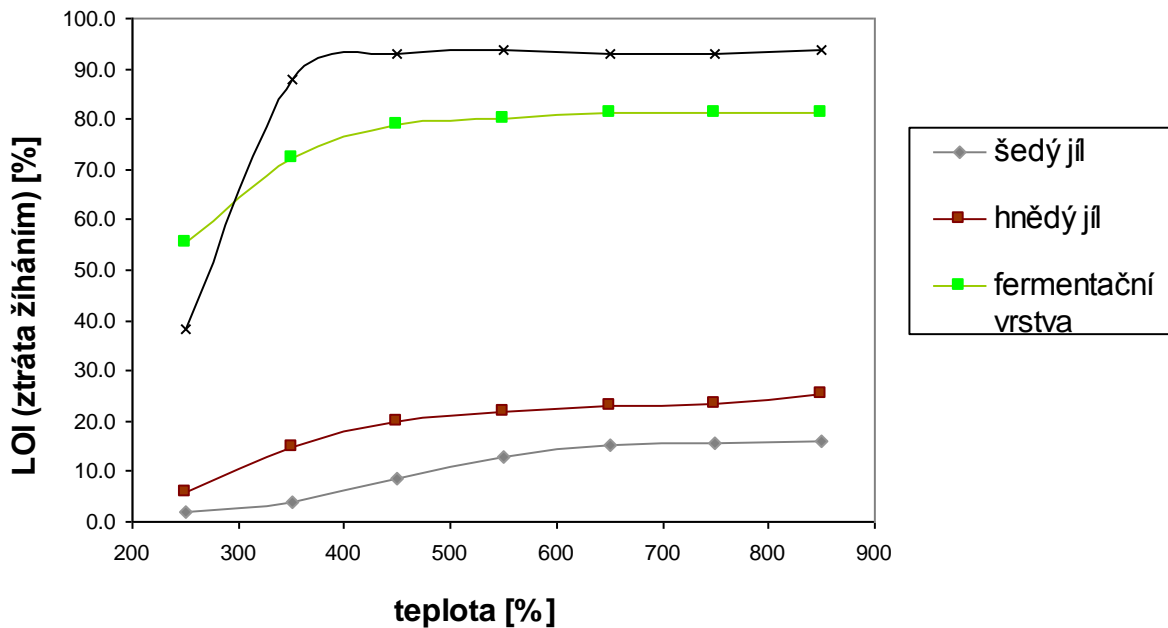
Ussiri a Lal (2008) navrhli, že by k určení obsahu Crec, resp. Cuhlí ve výsypkových půdách mohlo být využito  $\delta^{13}\text{C}$ . Vyšel jim ale opačný trend než nám (Obr. 8) – nejnižší hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  měla svrchní vrstva a s hloubkou byly vrstvy izotopicky těžší. V jejich studii však fosilní složkou bylo pouze uhlí.  $\delta^{13}\text{C}$  dobře korelovalo s obsahem uhlí stanoveným radiokarbonovou metodou ( $R^2=0.84$ ) – a rovněž radiokarbonové věky rostly s hloubkou. Uhlí v jejich studii mělo  $\delta^{13}\text{C} = -24.2$ , zatímco vrchní vrstva bez obsahu uhlí kolem  $-26.6$ . Není tedy divu, že uhlí /resp. hloubka/ přispívalo k růstu  $\delta^{13}\text{C}$ . Obrácená a méně výrazná závislost v našem případě odpovídají rozdílnému  $\delta^{13}\text{C}$  u rozdílných jílu, jak bylo ukázáno na modelových materiálech. Zřejmě má ale většina kerogenu spíše nižší  $\delta^{13}\text{C}$  než recentní organika – odtud závislost v Obr. 9.



Obr. 9 Srovnání relativního obsahu recentního uhlíku (Crec/TOC) a  $\delta^{13}\text{C}$  u půd a modelových materiálů. Jednotlivé body odpovídají vzorkům půd z odpovídajících horizontu A nebo C, fermentační vrstva (F), šedý jíl (Š), hnědý jíl (H), uhlí (U)

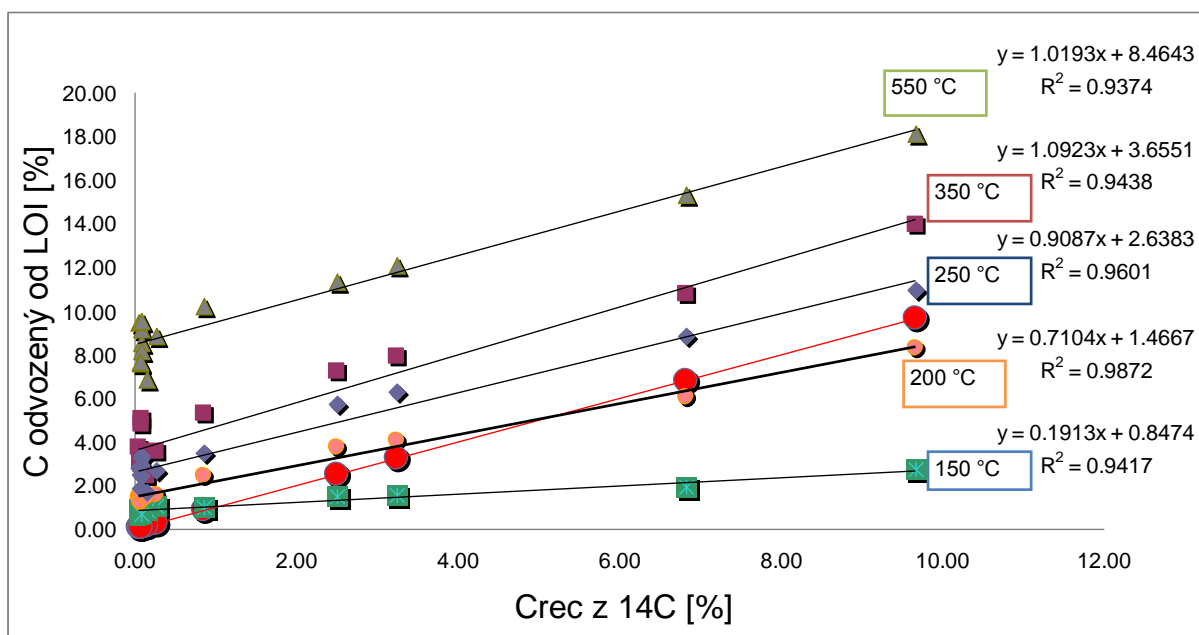
### 5.2.3 Stanovení ztráty žiháním (LOI)

Ze žihání **modelových materiálů** (Obr.10) vyplynulo, že jíly i uhlí při standardní teplotě LOI ( $550^\circ\text{C}$ ) rovněž podléhají úbytku. Ztráta žiháním ( $550^\circ\text{C}$ ) šedého jílu, hnědého jílu, fermentační vrstvy a uhlí je 12.9, 22, 80.1 a 93.6 %.



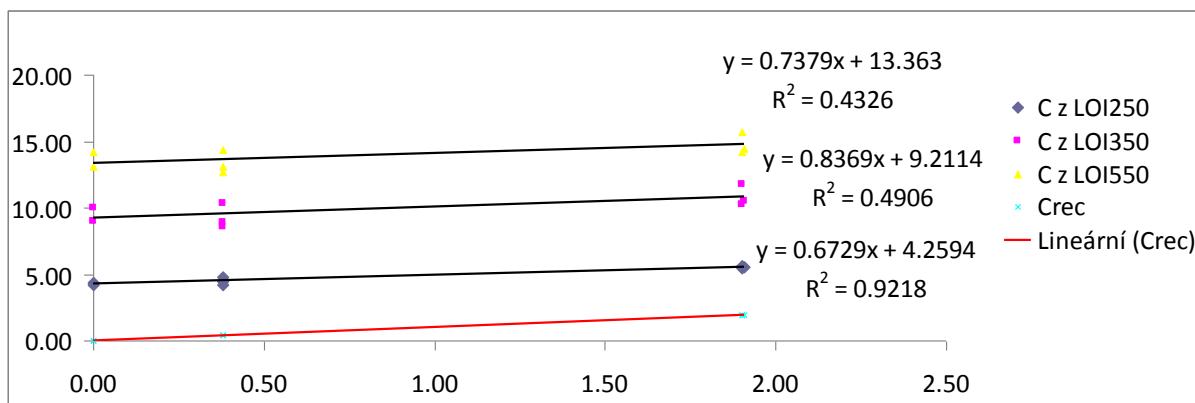
Obr. 10 Ztráta žiháním pro modelové materiály závisí na teplotě žihání

Při žihání **půd** při 550°C a přepočtu na obsah uhlíku koeficientem 1.724 (Schumacher 2002) dochází k nadhodnocení obsahu recentního uhlíku o více než 8 hmotnostních % (Obr. 11). Nejvíce se referenčním hodnotám blíží teplota 250°C. Při této teplotě jsou však nadhodnoceny vzorky s nízkým obsahem recentního uhlíku a podhodnoceny vzorky s vyšším obsahem recentního uhlíku.



Obr. 11 Půdy - srovnání obsahu uhlíku odvozeného ze ztráty žihání s referenčním radiokarbonovým stanovením pro různé teploty žihání

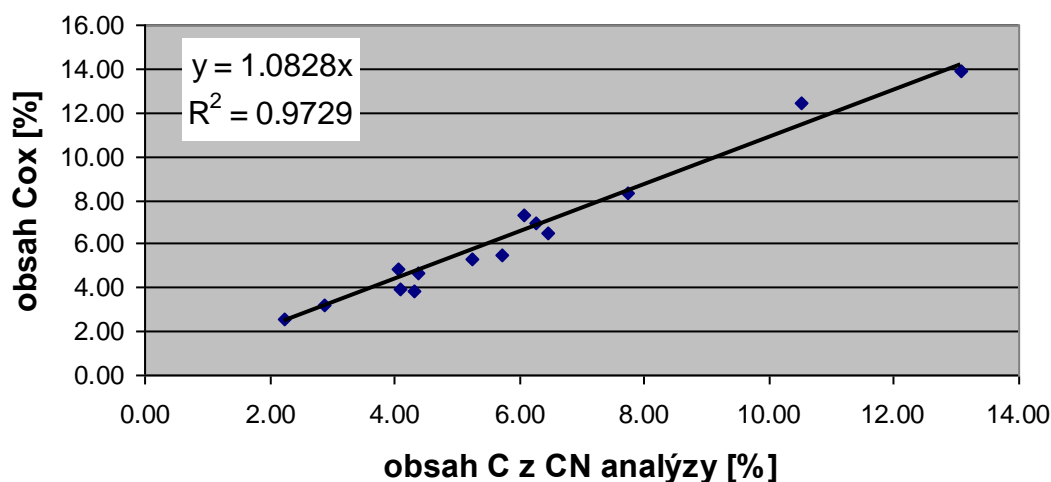
Oproti půdám byly v **umělých směsích** dosaženy poměrně nižší shody s referenčními obsahy recentního uhlíku (Obr. 12). Jelikož byly vybrány záměrně směsi pouze z hnědého jílu a s celým spektrem obsahu uhlí, je tato fosilní složka zdrojem variability stanovení. Možná je to tedy efekt toho, že se uhlí, resp. kerogenová FPOH v půdě vyskytuje spíše v nižších koncentracích než bylo zvoleno pro tvorbu směsí.



Obr. 12 Umělé směsi - srovnání obsahu uhlíku odvozeného ze ztráty žíhání s referenčním obsahem recentního uhlíku získaného z podílu fermentační vrstvy ve směsi

#### 5.2.4 Stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox)

**Oxidovatelný uhlík (Cox)** dobře koreluje s obsahem uhlíku z elementární analýzy (TC), ale Cox je vždy **vyšší** – průměrně o 0.44 (párový t-test;  $p=0.0209$ , 95% CI 0.08 - 0.81) a odpovídá asi 108% TC z CN analýzy (Obr. 13). To je opačný poměr než uvádí studie Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (Srnková et al. 2009) pro zemědělské půdy. Cox v jejich studii odpovídal jen 84% TC. Podobně Feiza et al. (2007) popisují o něco menší hodnoty Cox oproti TC (94.8 %) a pro porovnání citují i dvě starší ruské studie (Belchikova 1975; Orlov & Grishina 1981 in Feiza et al. 2007) uvádějící taktéž 85-90% výtěžnost Cox v porovnání s TC. Pravdou je, že ale ve Feizově studii je v metodice Tjurinovy metody předepsán jen pětiminutový var (oproti našim 45 min), takže by nebylo překvapivé, kdyby naše metoda měla větší výtěžnost. Důvod rozdílu oproti české studii Srnkové et al. (2009) zůstává ale záhadou.



Obr. 13 Srovnání stanovení oxidovatelného uhlíku s celkovým uhlíkem (TC) z elementární CN analýzy

### 5.2.5 Obsah celkového C (TC) a N (TN) a Corg rozdílem TC-TIC

U vybraných šesti půd byla potvrzena normalita celkových obsahů TC (Tab. 10). Lze předpokládat, že TC všech půd má normální rozdělení a můžeme tedy k testování rozdílů používat parametrické testy.

Tabulka č. 10 Shapiro-Wilkův test normality pro TC (celkový obsah uhlíku) u vybraných šesti vzorků půd (n=3)

kritérium výběru	minimum	maximum	medián hor. A	medián hor. C	nejblíže průměru hor. A	nejblíže průměru hor. C
kód půdy	IV C	V A	II A	EMA C	IV A	V C
průměr	2.75	14.89	7.25	4.93	7.34	6.76
výběrová SD	0.05	0.15	0.06	0.10	0.05	0.03
p (Shapiro-Wilk)	0.41	0.85	0.90	0.67	0.19	0.64

Obsahy C a N půd a modelových materiálů jsou uvedeny v Tab. 11.

Průměrný obsah C v půdách činí 5.93 %, v A horizontu 7.45 % a v C horizontu 4.41%.

Potvrdil se rozdílný obsah fosilního uhlíku ve zvolených jílech. Zajímavé je, že se oba jíly liší nejen obsahem uhlíku, ale také C:N poměrem. V sedimentech může být rozdíl v C:N poměru výsledkem různých zdrojů sedimentární organické hmoty (Ostrom et al. 1998). Řasová složka by měla C:N poměr snižovat (Ostrom et al. 1998), to ale dobře zřetelné pouze u šedého jílu. Vysoký C:N poměr hnědého jílu zůstává nevysvětlený, zvláště vezmeme-li v úvahu že v jeho kreogen I typu by měla být řasová složka ještě více zastoupená (Kříbek 1998).

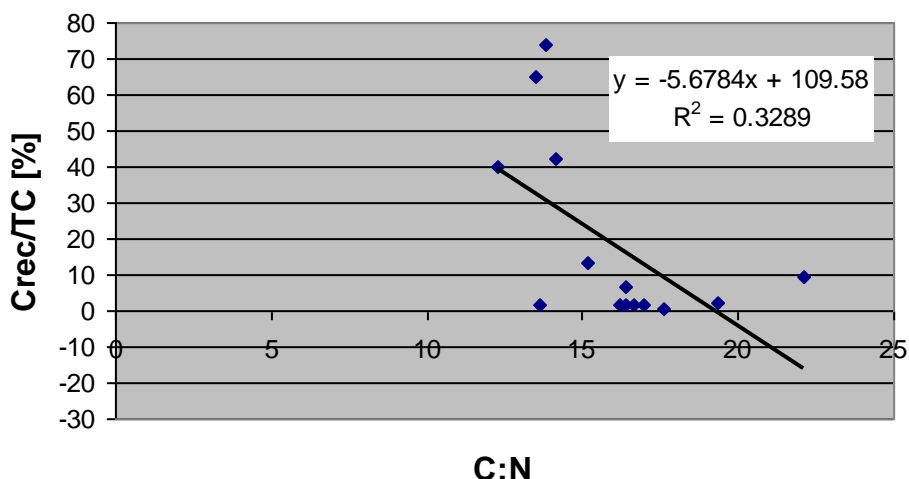
Závěrem tedy je, že v případě C:N poměru „není kerogen jako kerogen“ a nelze tedy v našem případě očekávat, že by C:N poměr mohl být vhodným prediktorem recentního uhlíku. To by bylo pravděpodobně možné, pokud by jediným zdrojem fosilního uhlíku bylo uhlí, jako je tomu na jiných výsypkách po těžbě uhlí (Ussiri a Lal, 2008). Uhlí má C:N výrazně vyšší než recentní organika, takže by se dalo očekávat, že C:N poměr bude proporcionální k jeho obsahu, což potvrdili Ussiri a Lala (2008) na umělých směsích půdy a uhlí.

Existuje ne příliš úzká negativní korelace mezi C:N poměrem a relativním podílem C<sub>rec</sub> na celkovém uhlíku (Obr. 14). Při vyloučení C horizontů lze získat o něco lepší korelaci (graf není uveden,  $y = -5.3267x + 116.63$ ;  $R^2 = 0.3757$ ).

Tab. 11 Výsledky CN analýzy před a po odstranění uhličitánů a stanovení C<sub>org</sub> rozdílem TC-TIC. s<sub>x</sub> je výběrová směrodatná odchylka (n=2)

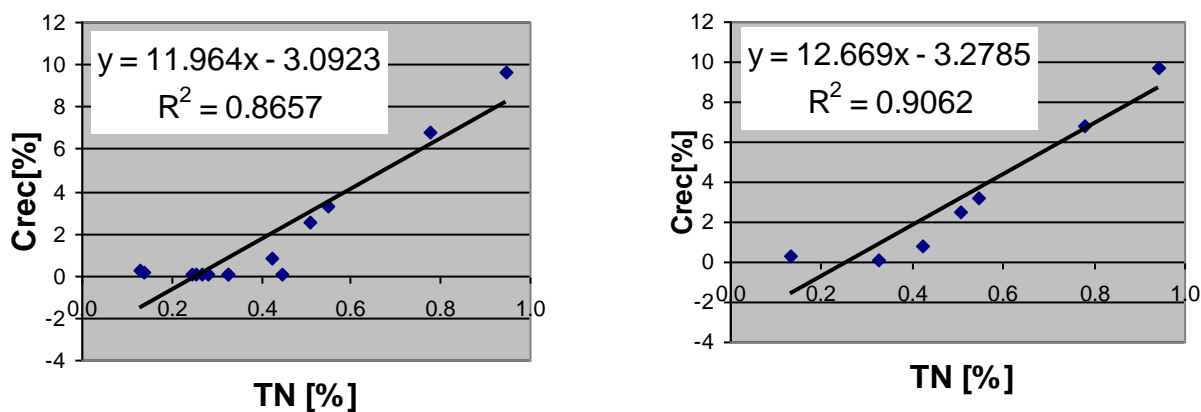
půdy	ÚŽP Benátská											LGÚ Albertov TC-TIC <sup>1</sup>				
	CN analýza před odstraněním uhličitánů						CN analýza po odstranění uhličitánů					TC [%]	TIC [%]	C <sub>org</sub> [%]		
	TC [%]	s <sub>x</sub>	TN [%]	s <sub>x</sub>	C:N	s <sub>x</sub>	TC [%]	s <sub>x</sub>	TN [%]	s <sub>x</sub>	C:N				s <sub>x</sub>	
A1-A	<b>7.72</b>	0.05	<b>0.55</b>	0.05	<b>14.14</b>	0.50	<b>8.58</b>	0.04	<b>0.53</b>	0.00	<b>16.29</b>	0.01	<b>9.09</b>	<b>0.00</b>	<b>9.09</b>	
A1-C	<b>4.37</b>	0.07	<b>0.27</b>	0.03	<b>16.37</b>	0.31	<b>6.70</b>	0.00	<b>0.30</b>	0.14	<b>22.65</b>	2.90	<b>6.62</b>	<b>0.08</b>	<b>6.54</b>	
A2-A	<b>10.52</b>	0.06	<b>0.78</b>	0.01	<b>13.52</b>	0.07	<b>11.83</b>	0.00	<b>0.72</b>	0.04	<b>16.49</b>	0.31	<b>12.6</b>	<b>0.00</b>	<b>12.6</b>	
A2-C	<b>4.09</b>	0.00	<b>0.21</b>	0.00	<b>19.33</b>	0.02	<b>4.07</b>	0.03	<b>0.15</b>	0.31	<b>26.82</b>	2.40	<b>4.71</b>	<b>0.22</b>	<b>4.50</b>	
E-A	<b>5.25</b>	0.01	<b>0.33</b>	0.03	<b>16.20</b>	0.30	<b>5.59</b>	0.05	<b>0.37</b>	0.01	<b>15.10</b>	0.68	<b>6.23</b>	<b>0.45</b>	<b>5.78</b>	
E-C	<b>5.71</b>	0.05	<b>0.33</b>	0.03	<b>17.60</b>	0.35	<b>6.22</b>	0.06	<b>0.40</b>	0.40	<b>15.58</b>	0.84	<b>6.84</b>	<b>0.44</b>	<b>6.40</b>	
EMA-A	<b>2.87</b>	0.04	<b>0.13</b>	0.01	<b>22.09</b>	0.08	<b>3.91</b>	0.02	<b>0.14</b>	0.01	<b>28.88</b>	0.88	<b>4.13</b>	<b>0.02</b>	<b>4.11</b>	
EMA-C	<b>4.33</b>	0.06	<b>0.26</b>	0.01	<b>16.96</b>	0.13	<b>4.08</b>	0.05	<b>0.27</b>	0.15	<b>15.74</b>	4.10	<b>4.95</b>	<b>2.12</b>	<b>2.83</b>	
II-A	<b>6.44</b>	0.02	<b>0.42</b>	0.02	<b>15.18</b>	0.22	<b>7.12</b>	0.08	<b>0.42</b>	0.02	<b>16.83</b>	1.58	<b>7.29</b>	<b>0.06</b>	<b>7.23</b>	
II-C	<b>4.08</b>	0.03	<b>0.25</b>	0.01	<b>16.62</b>	0.08	<b>4.19</b>	0.04	<b>0.32</b>	0.00	<b>13.04</b>	0.21	<b>4.98</b>	<b>1.82</b>	<b>3.17</b>	
IV-A	<b>6.26</b>	0.02	<b>0.51</b>	0.01	<b>12.31</b>	0.09	<b>7.61</b>	0.01	<b>0.51</b>	0.00	<b>14.99</b>	1.71	<b>7.82</b>	<b>0.00</b>	<b>7.82</b>	
IV-C	<b>2.25</b>	0.02	<b>0.14</b>	0.00	<b>16.41</b>	0.01	<b>2.74</b>	0.00	<b>0.10</b>	0.20	<b>28.48</b>	2.36	<b>2.78</b>	<b>0.26</b>	<b>2.51</b>	
V-A	<b>13.09</b>	0.06	<b>0.94</b>	0.00	<b>13.85</b>	0.03	<b>13.40</b>	0.22	<b>0.85</b>	0.03	<b>15.80</b>	0.84	<b>14.4</b>	<b>0.00</b>	<b>14.4</b>	
V-C	<b>6.06</b>	1.68	<b>0.44</b>	0.12	<b>13.63</b>	0.22	<b>8.00</b>	0.00	<b>0.47</b>	0.06	<b>17.15</b>	0.11	<b>7.53</b>	<b>0.15</b>	<b>7.38</b>	
<b>modelové materiály</b>																
F	<b>38.04</b>	0.30	<b>1.84</b>	0.12	<b>20.73</b>	1.24	n/a		n/a		n/a		<b>39.6</b>	<b>0</b>	<b>39.6</b>	
H	<b>13.70</b>	0.12	<b>0.57</b>	0.02	<b>23.93</b>	0.89	n/a		n/a		n/a		<b>13.3</b>	<b>0.01</b>	<b>13.3</b>	
Š	<b>4.31</b>	0.02	<b>0.35</b>	0.01	<b>12.30</b>	0.46	n/a		n/a		n/a		<b>4.63</b>	<b>0.51</b>	<b>4.12</b>	
U	<b>51.56</b>	1.80	<b>0.80</b>	0.13	<b>65.69</b>	8.58	n/a		n/a		n/a		<b>62.4</b>	<b>0</b>	<b>62.4</b>	

<sup>1</sup> Analýza provedena pouze v 1 opakování.



Obr. 14 Vztah mezi C:N poměrem a podílem recentního uhlíku na celkovém uhlíku (Crec/TC)

Celkový obsah recentního uhlíku v půdách koreluje s celkovým obsahem dusíku (Obr. 15a). Ještě těsnější je vztah pro A horizonty samotné při vyloučení C horizontů (Obr. 15b). Tento trend odpovídá poměrně nižšímu obsahu dusíku v jílech a uhlí oproti fermentační vrstvě (Tab. 11).



Obr. 15 Vztah mezi obsahem recentního uhlíku (Crec) z radiokarbonu a obsahem celkového dusíku z elementární analýzy (TN): a) pro všechny vzorky půd b) pouze pro A horizonty

Zajímalo nás, jaká je přesnost metody odhadu recentního uhlíku, která byla používána dosud – tedy **odečtení horizontu C od horizontu A**. Regresní koeficienty jsou uvedeny v Tab.11. Pokud v případech, kdy odečtením získáme zápornou hodnotu tuto hodnotu nahradíme nulou

(„TC nezáporné“), získáme poměrně dobrý odhad obsahu recentního uhlíku ( $R^2=0.85$ ).

Dalšího zpřesnění ( $R^2=0.87$ ) by bylo možné dosáhnout dosazením tohoto odhadu do následující regresní rovnice:  $C_{rec} = 1.13 * TC_{nezáporné} - 0.21$

Podobný výpočet s použitím Cox ukázal, že i on může sloužit k odhadu s podobnou přesností.

Tab. 11 Regresní parametry pro porovnání odhadů uhlíku odečtením C horizontu od horizontu A. „nezáporné“ znamená, že případně záporné hodnoty vzniklé odečtením byly nahrazeny nulou

x	lin.regrese	R2
TC	$y=x$	0.81
	$y=1.03x-0.23$	0.82
TC nezáporné	$y=x$	<b>0.85</b>
	$y=1,13x - 0,21$	0.87
Cox	$y=x$	0.78
	$y=0.94x+0.16$	0.79
Cox nezáporné	$y=x$	<b>0.85</b>
	$y=1.22x-0.69$	0.88

## 5.2.6 Infračervená spektrometrie

Všechny vytvořené kalibrační modely vykazují výborné statistické parametry (Tab. 12).

Každý model je hodnocen na dvou úrovních: (1) kalibrace a 2) křížová validace. Jeho vlastnosti pak vyjadřuje příslušný korelační koeficient (R, resp. RCV) a standardní chyba korelace (RMSEC), resp. křížové validace (RMSECV). Z těchto parametrů je zřejmá vysoká úroveň všech modelů. Nutno ale podotknout, že při zařazení půd do kalibrace byla většina z nich označena softwarem jako spektrální outliery, tedy spektra výrazně odlišná od průměrného spektra. Spektrální outliery se při korektním modelování zpravidla z kalibrace vylučují. My jsme se snažili maximum půd v kalibraci ponechat. I s těmito „jinými“ spektry se ale algoritmus dobře vyrovnal. Z parametrů je zřejmé, že jemně mletí v některých případech vylepšuje model, ale v některých případech ne.

Z porovnání spekter hrubě a jemně mletých vzorků lze vidět, že jemně mleté vzorky mají nižší absorpance (data nejsou ukázána). To je známý efekt menší zrnitosti na NIR spektra (Stenberg et al. 2010) a souvisí s tím, že menší částice vytváří kompaktnější povrch a odrazí více záření, zatímco větší částice propustí více záření do svých pórů a dochází tak k větší absorpci (Hapke 1993). Na kalibraci ale jemnost mletí nemá významný vliv.

Tab. 12 Parametry kalibračních modelů založených buď pouze na směsích (n=125) nebo směsích s půdami (n=125+14)

znak	mletí	rozsah znaku	soubor	region [nm]	kalibrace			křížová validace		
					R	RMSEC	ignorované	RCV	RMSECV	faktory
C <sub>tot</sub>	hrubé	4,31 - 19,92 %	směsi	1315 - 2455	0.998	0.23	0	0.998	0.24	7
C <sub>tot</sub>	jemné	4,31 - 19,92 %	směsi	1315 - 2455	0.993	0.41	0	0.991	0.492	5
C <sub>tot</sub>	hrubé	2,25 - 19,92 %	směsi+půdy	1315 - 2455	0.996	0.32	2 půdy	0.997	0.31	8
C <sub>tot</sub>	jemné	2,25 - 19,92 %	směsi+půdy	1315 - 2455	0.992	0.51	1	0.986	0.66	7
C <sub>rec</sub>	hrubé	0 - 3,81 %	směsi	1315 - 2455	0.990	0.10	0	0.996	0.13	8
C <sub>rec</sub>	jemné	0 - 3,81 %	směsi	1315 - 2455	0.998	0.08	1	0.991	0.18	9
C <sub>rec</sub>	hrubé	0 - 9,67 % reálný do 3,81 %	směsi+půdy	1937 - 2494	0.998	0.10	2 půdy	0.982	0.31	7
C <sub>rec</sub>	jemné	0 - 9,67 % reálný do 3,81 %	směsi+půdy		0.986	0.26	1 směs	0.972	0.37	8
C <sub>jil</sub>	hrubé	3,44 - 13,70 %	směsi	1686 - 2455	0.999	0.13	0	0.999	0.169	8
C <sub>jil</sub>	jemné	3,44 - 13,70 %	směsi		0.999	0.10	5	0.993	0.345	5
C <sub>uhli</sub>	hrubé	0 - 5,16 %	směsi	1315 - 2455	0.995	0.18	1	0.991	0.25	8
C <sub>uhli</sub>	jemné	0 - 5,16 %	směsi		0.994	0.21	3	0.989	0.28	8

Skutečnou otázkou zájmu ale bylo, jak dobře by modely předpovídali obsahy jednotlivých uhlíků v půdách. O tom přímo parametry v Tab. 12 nevypovídají, jelikož jsou do jejich výpočtu zahrnuty zejména směsi. Ty jsou navíc v početní převaze a tak mohou nadhodnocovat přesnost modelů. Zajímalo nás, jak se bude lišit predikce pro půdy, použijeme-li model vytvořený pouze ze směsí a model, do něhož byly zahrnuty i půdy. Pro tento účel byly pomocí modelů ze směsí dopočítány predikce pro půdy a z těchto vypočítány koeficienty úspěšnosti EF a RPD. Dále byly z křížové validace modelů s půdami vyjmuty predikce pouze pro půdy a z těchto dopočítány koeficienty EF a RSC. U modelů vytvořených z půd jsme navíc zkoumali vliv vyloučení odlehlých půd z kalibrace. Pro Cuhli a Cjil nebylo možné tyto výpočty provést, jelikož neznáme referenční obsahy těchto uhlíků v půdách. Vypočtené parametry pro **C<sub>tot</sub>** a **C<sub>rec</sub>** uvádí Tab. 13. Modely postavené pouze na směsích při predikci půd ztroskotaly. O to zajímavější je, že zařazení poměrně malého množství půd do kalibrace vylepšilo její vlastnosti natolik, že po vyloučení těch nejvýraznějších outlierů dokázala přinést velmi uspokojivé výsledky.

Tabulka č. 13 Srovnání úspěšnosti modelů pro predikci půd.(a) s neupravenými hodnotami predikcemi (b) s upravenými hodnotami predikce (záporné hodnoty nahrazen nulou) (125) označuje model pouze ze směsí, (139) model se zahrnutím všech půd, (139-x) model s vyloučením x odlehlých půd. RMSEV = střední chyba validace, EF = úspěšnost modelování, RPD = reziduální odchylka predikce, RSC = reziduální odchylka predikce z křížové validace

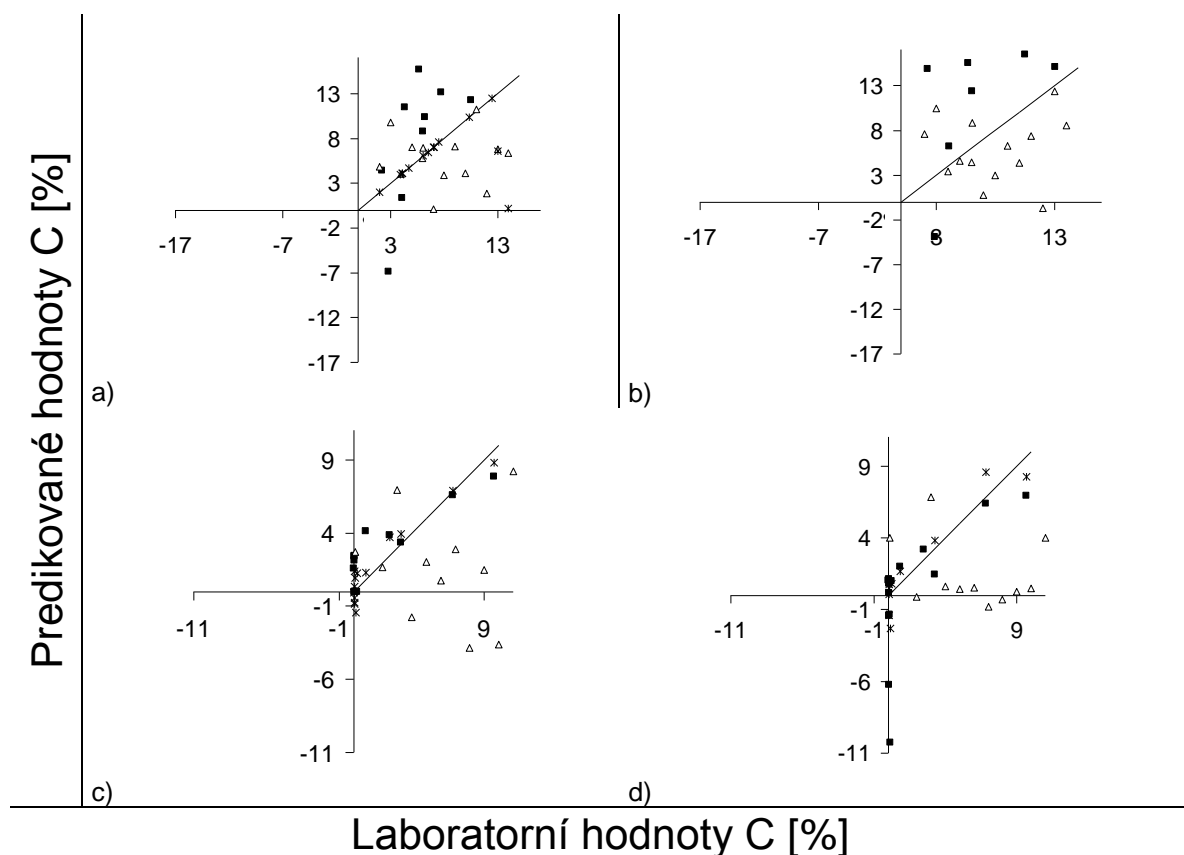
<b>a)</b>		RMSEV								kódy ignorovaných půd	
znak	mletí	125	139	139-x	EF (125)	EF (139)	EF (139-x)	RPD (125)	RSC (139)	x	
<b>C<sub>tot</sub></b>	hrubé	9.45	1.09	0.80	10.24	0.85	0.92	0.30	2.57	2	5.7
<b>C<sub>tot</sub></b>	jemné	12.79	1.63	n/a	19.61	0.67	n/a	0.22	1.73	3	žádné
<b>C<sub>rec</sub></b>	hrubé	2.05	1.97	0.87	0.49	0.53	0.92	1.40	1.46	2	7.13
<b>C<sub>rec</sub></b>	jemné	3.88	0.69	n/a	-0.81	0.94	n/a	0.74	4.15	4	žádné

<b>b)</b>		RMSEV								kódy ignorovaných půd	
znak	mletí	125	139	139-x	EF (125)	EF (139)	EF (139-x)	RPD (125)	RSC (139)	x	
<b>C<sub>tot</sub></b>	hrubé	9.45	1.09	0.80	10.24	0.85	0.92	0.30	2.57	2	5.7
<b>C<sub>tot</sub></b>	jemné	12.68	1.55	n/a	19.27	0.70	n/a	0.22	1.82	3	žádné
<b>C<sub>rec</sub></b>	hrubé	1.54	1.24	0.67	0.71	0.81	0.95	1.87	2.32	2	7.13
<b>C<sub>rec</sub></b>	jemné	2.03	0.58	n/a	0.50	0.96	n/a	1.42	4.93	4	žádné

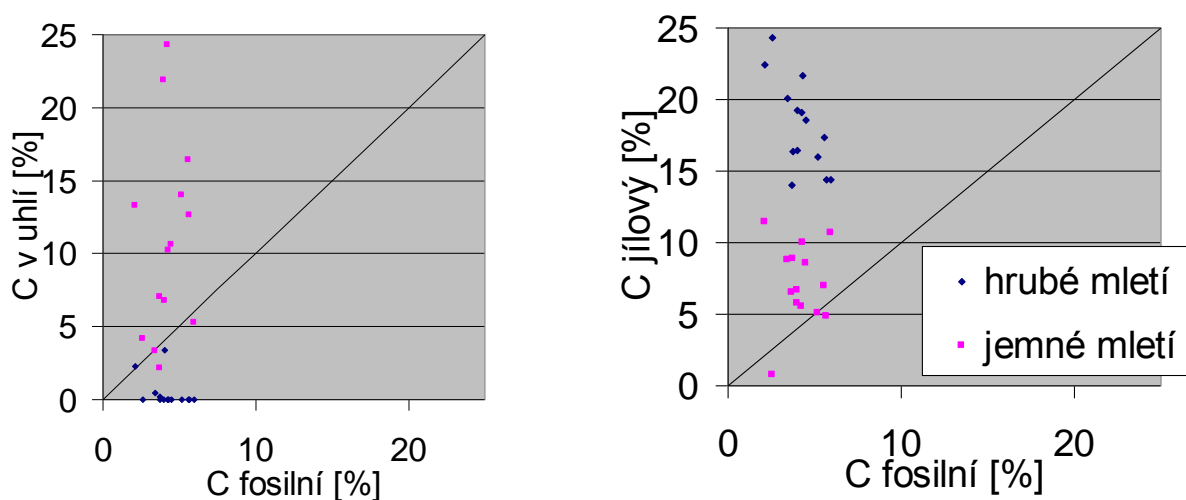
Za úspěšnou lze obecně považovat predikci s EF větším než 0.90, za uspokojivé se považuje EF větší než 0.70 (Bornemann et al. 2008; Michel et al. 2009). **Dle EF jsou tedy všechny modely založené na půdách úspěšné**, dva z nich jsou uspokojivé i bez vyloučení outlierů. **Dle RPD/RSC** také vítězí modely se zahrnutím půd a vyloučením outlierů. Jelikož je RSC obdobou RPD, může s ním být srovnáváno a hodnoceno dle podobných kritérií. Pomocí RPD lze hodnotit úspěšnost predikčního modelu takto (Williams 2004): 0 až 2.3 velmi slabý (very poor); 2.4 až 3.0 slabý (poor); 3.1 až 4.9 dostačující ; 5.0 až 6.4 dobrý; 6.5 až 8.0 velmi dobrý; 8.1+ výborný. Chang et al. (2001) dokonce uvádí, že i  $RPD > 2$  může být postačující - s touto podmínkou, že regresní směrnice se významně neliší od 1 a  $R^2$  je vyšší než 0.80. Model pro Crec-jemné mletí tyto podmínky splňuje ( $k=1.0167$ ,  $R^2=0.88$ ). Navíc, Michel et al. (2009) uvádí pro RSC tato kritéria:  $>2$  úspěšný model,  $>1.4$  uspokojivý model,  $<1.4$  neúspěšný. Lze tedy s čistým svědomím uzavřít, že **i dle RPD/RSC jsou modely po vyloučení outlierů také úspěšné a i před jejich vyloučením jsou již částečně uspokojivé**. Z obou parametrů je zřejmé, že **hrubé mletí vede k o něco lepším výsledkům**.

Pro představu uvádím též grafické znázornění predikcí použitých do výpočtů parametrů EF a RSC (Obr. 16).



Obr. 16 Srovnání predikovaných a laboratorních hodnot pomocí NIR spektrometrie – a) Ctot hrubé mletí b) C tot jemné mletí c) Crec hrubé mletí d) Ctot jemné mletí

Pro **C uhlí** a **Cjil** jsem alespoň provedla predikce pro půdy s použitím odpovídajících modelů založených na směsích. Abych zjistila, zda jsou predikce do určité míry reálné, porovnála jsem je s odhadem celkového **fosilního uhlíku** v půdě. Tento odhad jsem získala odečtením Crec (z radiokarbonu) od TC (z CN analýzy). Srovnání znázorňuje Obr. 17. V grafech je vyznačená přímka  $y=x$ ; reálné jsou odhady ležící v blízkosti nebo pod touto přímkou. Vidíme, že v případě **Cuhlí** přináší reálné odhady jen **hrubé mletí**. U **Cjil** dochází u obou modelů k značnému **nadhodnocení**.



Obr. 17 Srovnání predikovaných hodnot pro Cuhlí a Cjil s obsahem fosilního uhlíku

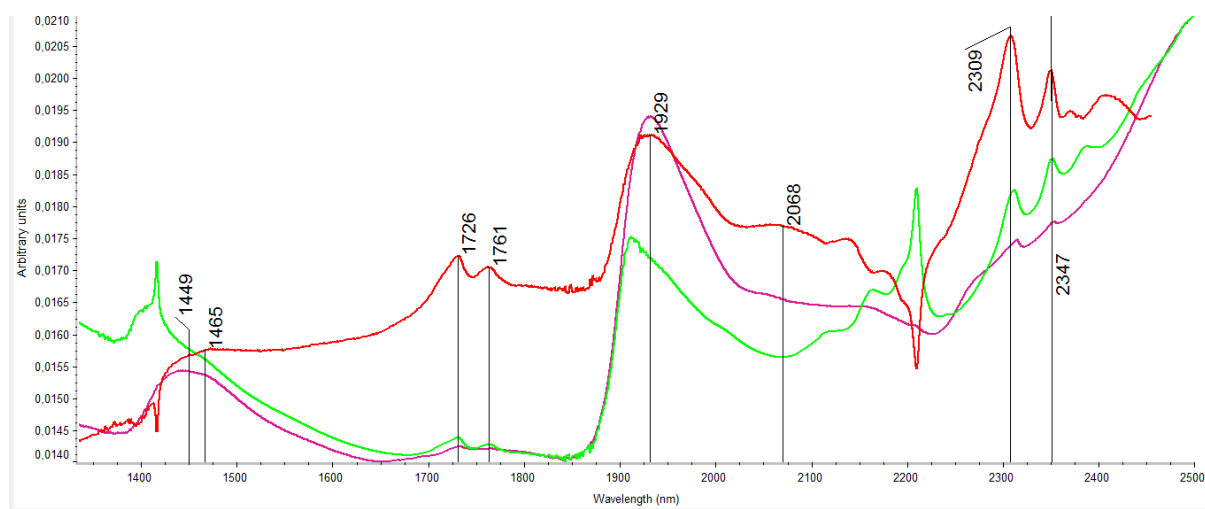
Přes výborné parametry mají některé modely (Crec, Cuhlí) zhoršenou distribuci dat kalibračního souboru. Nepokrývají rovnoměrně celý rozsah kalibračního rozsahu (tvoří určité shluky). Je to dáno tím, že většinu standardů tvoří umělé směsi se stupňovitými obsahy fermentační vrstvy a uhlí. S touto shlukovitostí se setkáme i u jiných studií založených na umělých směsích (Michel et al. 2009). Rutinně by sice modely nešly používat, ale svědčí o dobrém potenciálu metody.

### Interpretace spekter

Při validaci kalibračního modelu je žádoucí ověřit, zda úseky spektra, které algoritmus využívá pro kalibraci, lze připsat nějakým reálným funkčním skupinám, které souvisí s predikovanou veličinou (Ben Dor, osobní sdělení). Postupuje se nejčastěji interpretací grafu zátěží (tzv. loading spektra) prvního faktoru. Pokud má graf zátěží maxima v absorpčních páslech charakteristických i pro čistou komponentu (např. uhlí), jedná se o potvrzení, že model má logickou konstrukci (Meloun & Militký 2002, str. 313). Pro interpretaci jsem zvolila

porovnání grafu zátěží s průměrným spektrem kalibračního souboru a spektrem samotného modelového materiálu.

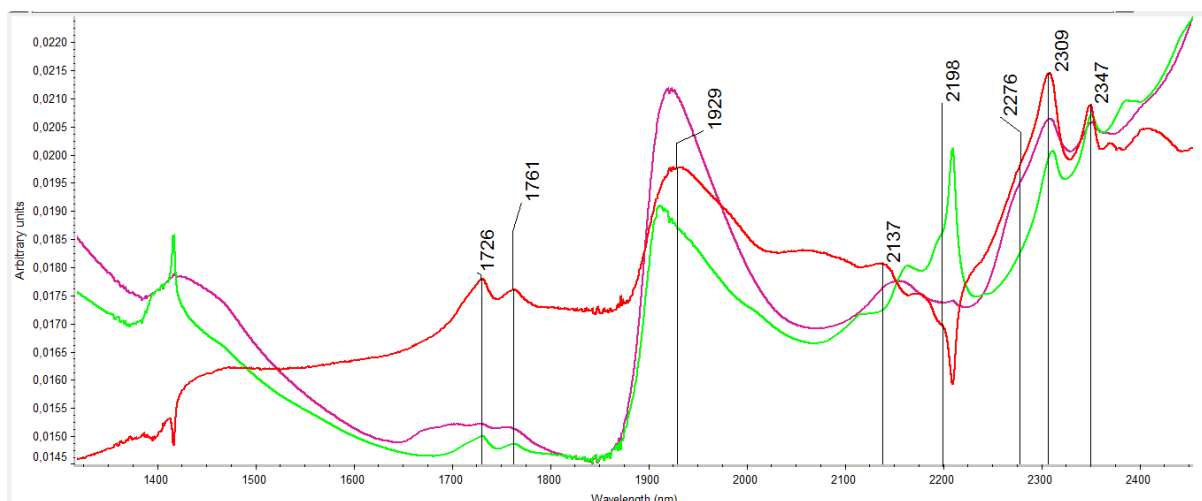
Pro kalibraci Crec znázorňuje nejdůležitější pásy Obr. 18. Dublet kolem 1700 nm (1726 a 1761) a kolem 2300 nm (2309 a 2347 nm) představuje různé kombinační a svrchní přechody C-H vazby přítomné v různých organických sloučeninách např. celulóze, ligninu, škrobu, pektinu, vosku a huminových kyselinách. Silný pás kolem 1929 nm souvisí s vodou, ale také s  $-\text{COOH}$  a  $-\text{C}=\text{O}$  skupinami. Pás kolem 2068 zase souvisí s aromatickým  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{COO-H}$  vazbou a  $\text{C}=\text{O}$ . Pásky kolem 1400 nm jsou charakteristické pro vodu a  $\text{CH}_2$  skupinu (1465 nm) a dále pro karboxylové kyseliny (1449) (Tab. 2) (Ben-Dor et al. 1997).



Obr. 18 Graf zátěží pro recentní uhlík (Crec). Červeně je vyznačen graf zátěží, zeleně průměrné spektrum a fialově spektrum čisté recentní organické hmoty z fermentační vrstvy

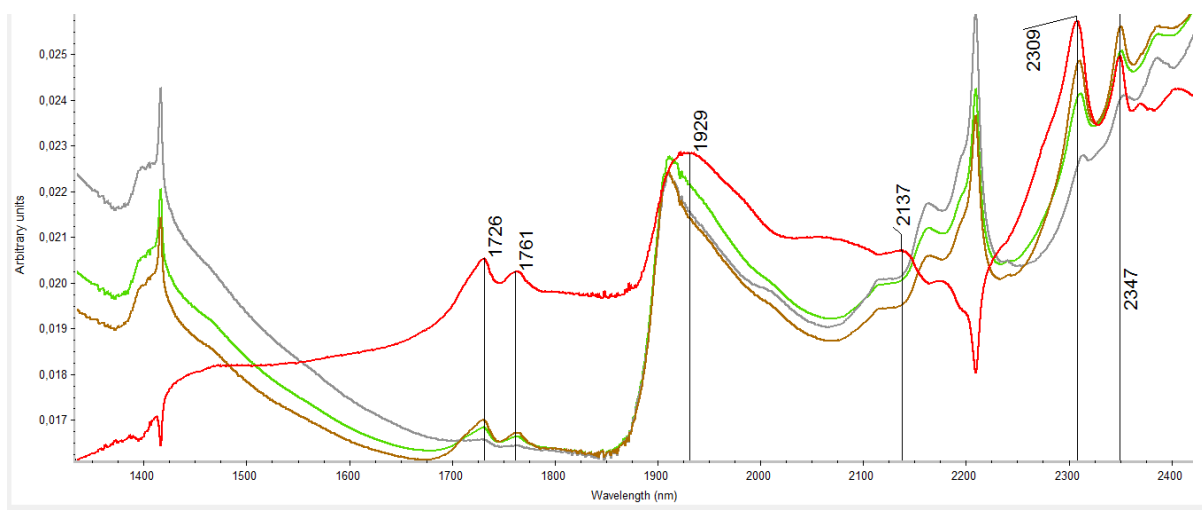
V případě uhlí (Obr. 19) hraje nejdůležitější roli absorpční pás kolem 1900, což je pás charakteristický pro vodu ( $\text{OH v}_1 + \text{v}_2$ ) (Andrés & Bona 2005) a dále pro vazbu  $-\text{C}=\text{O}$  v karboxylové skupině ( $-\text{COOH}$ ) a ketonech  $\text{CONH}_2$  (Tab. 2) (Ben-Dor et al. 1997).

Důležitost tohoto pásu pro kalibraci C z uhlí uvádí i Michel et al. (2009). Důležitou skupinou jsou dále pásy alifatického uhlíku: 1726, 1761, 2309 a 2347 nm. V pásu 2309 nm, který je z alifatických nejvýraznější, absorbují také vibrace aromatického kruhu. Lze rozeznat i vliv absorpce v 2276 nm, který byl ve studii Michela et al. (2009) charakteristický pro lignit. Autoři jej připisují vlivu polysacharidů. Menší vliv polysacharidů u našeho uhlí odpovídá jeho vyššímu stupni přeměny v porovnání s lignitem.



Obr. 19 Graf zátěží pro uhlík z uhlí (Cuhl). Červeně je vyznačen graf zátěží, zeleně průměrné spektrum a fialově spektrum čistého uhlí

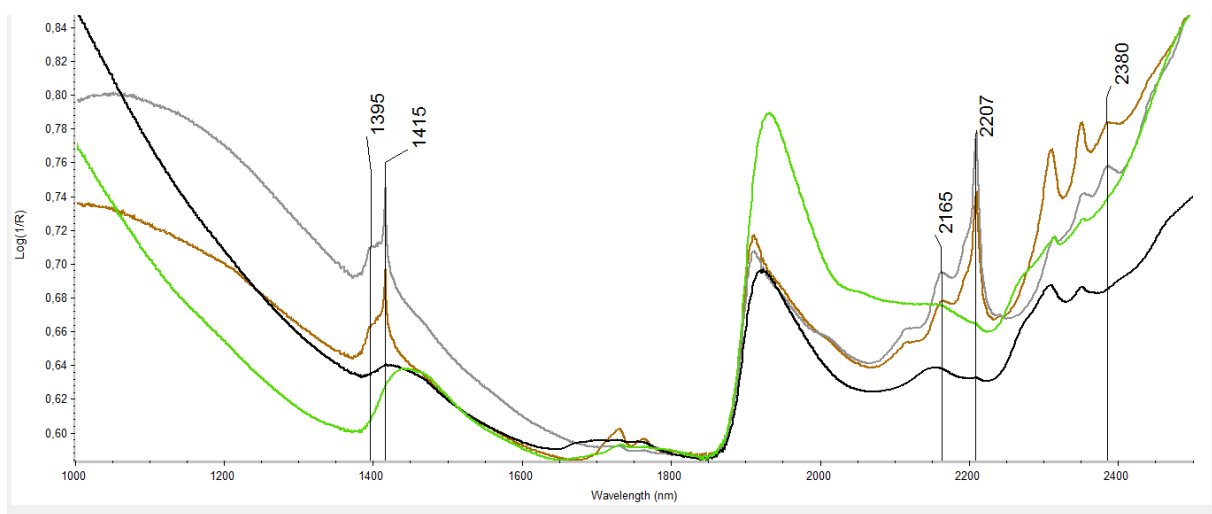
U kalibrace kerogenového uhlíku (Cjil) vidíme opět podobné absorpční pásy obecně typické pro organickou hmotu. Povšimněme si ale dvou regionů – 1726-1761 a 2309-2347 nm. Obě přísluší vibracím alifaticky vázaného uhlíku (Tab. 4). V porovnání se spektry šedého a hnědého jílu lze i pouhým okem dobře rozeznat, že šedý jíl – méně bohatý na kerogen – má v těchto regionech méně výrazné absorpce než jíl hnědý. Z grafu zátěží dále vidíme, že si model správně „nevšímá“ absorpčních pásů jílových minerálů.



Obr. 20 Graf zátěží pro uhlík z jílu (Cjil). Červeně je vyznačen graf zátěží, zeleně průměrné spektrum, hnědě spektrum hnědého a šedě spektrum šedého jílu.

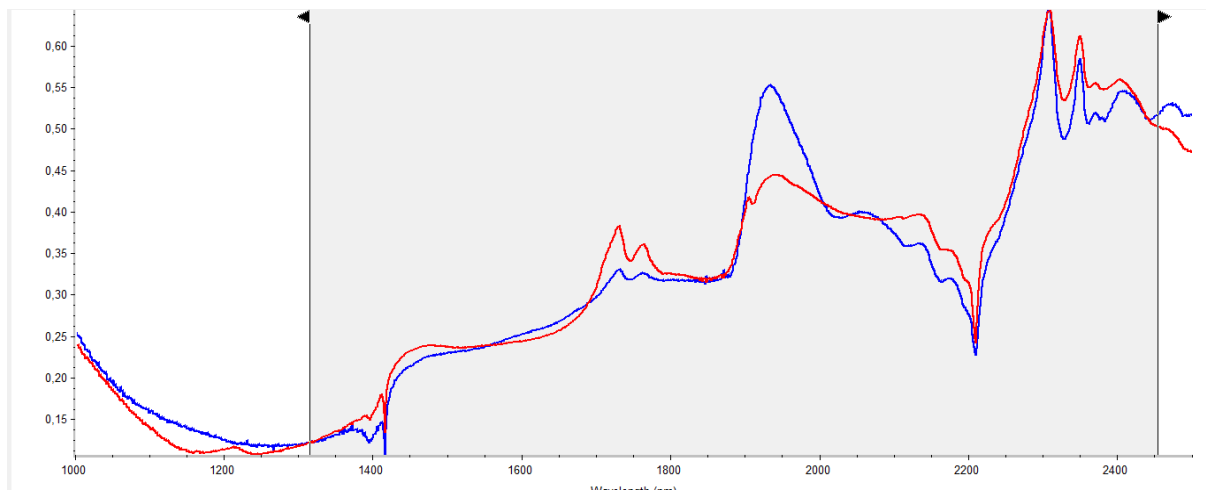
Pro jejich porovnání uvádím celá spektra všech 4 modelových materiálů doplněná o charakteristické pásy kaolinitu a karbonátu (Obr. 21). Jílové minerály mají v infračervené

oblasti výrazné absorpce, zejména vlivem O-H, H<sub>2</sub>O a CO<sub>3</sub>. U obou našich jíílů vidíme výrazné absorpce typické pro kaolinit – dva dublety (párové píky) blízko 1400 a 2200 nm. Pásky okolo 1400 (1395 a 1415 nm) jsou svrchními tóny valenční vibrace O-H poblíž 2778 nm. Pásky okolo 2200 (2165 and 2207 nm) jsou kombinacemi deformační vibrace Al-OH plus O-H valenční vibrace (Stenberg et al. 2010). Na spektrech najdeme jediný charakteristický pás pro karbonáty – 2380 nm (třetí svrchní přechod 3v1 –CO<sub>3</sub>) (Ben-Dor & Banin 1990). Z dalších pásků uváděných v literatuře již nejsou zřetelné žádné (2160 nm, 1990 nm and 1870 nm) (Stenberg et al. 2010).

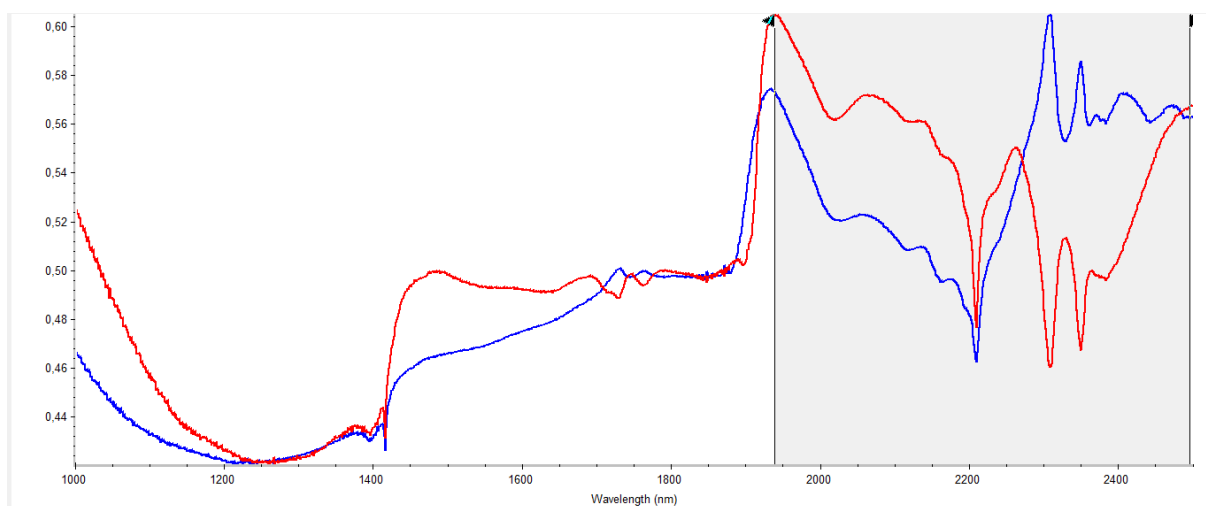


Obr. 21 NIR spektra modelových materiálů – fermentační vrstva (zeleně), uhlí (černě), šedý jííl (šedě), hnědý jííl (hnědě). Vyznačeny jsou charakteristické absorpční pásky kaolinitu a karbonátu.

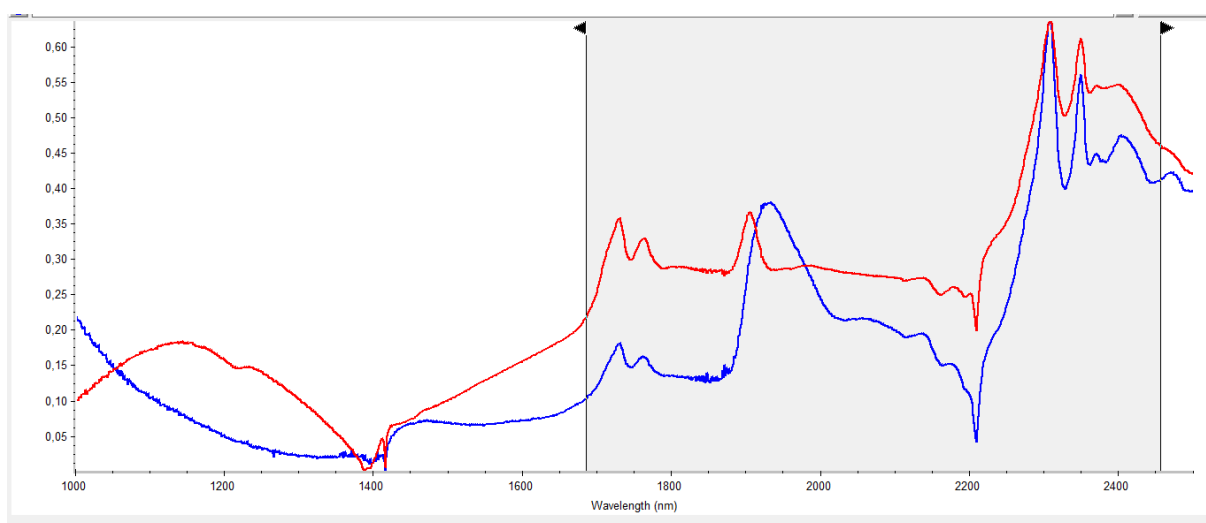
Obrázky 22-25 znázorňují korelační a variační spektra pro Ctot, Crec, Cjíl a Cuhli a regiony, které byly vybrány do kalibrace pro hrubě mleté vzorky. Při pokusech cíleně vybrat užší regiony bylo možné někdy dostat lepší základní parametry kalibrace, většinou to ale zhoršilo predikci pro půdy nebo to nemělo významný vliv.



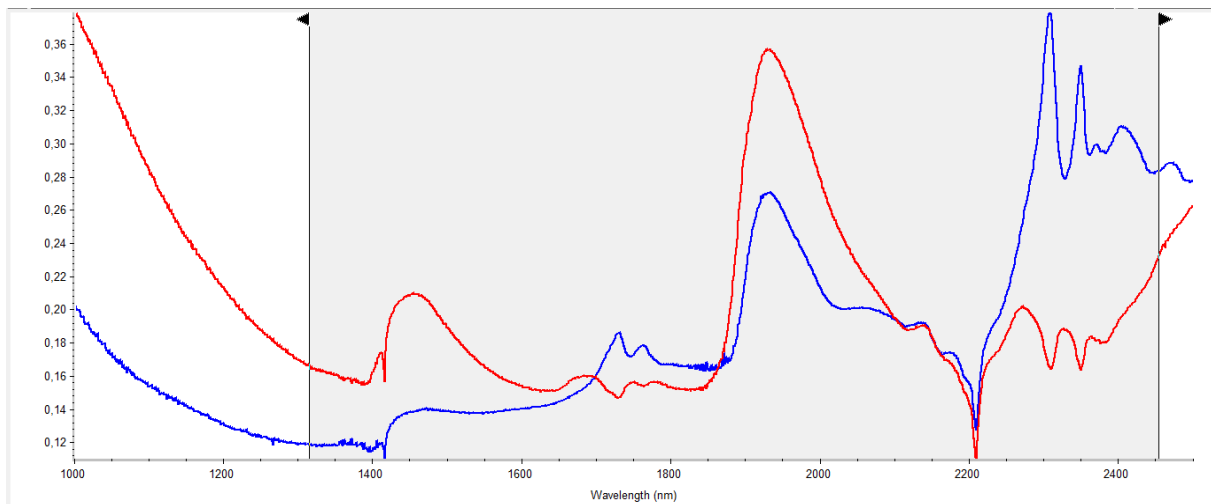
Obr. 22 Korelační spektrum pro Ctot (červeně). Modře je vyznačeno varianční (rozptylové) spektrum



Obr. 22 Korelační spektrum pro Crec (červeně). Modře je vyznačeno varianční (rozptylové) spektrum

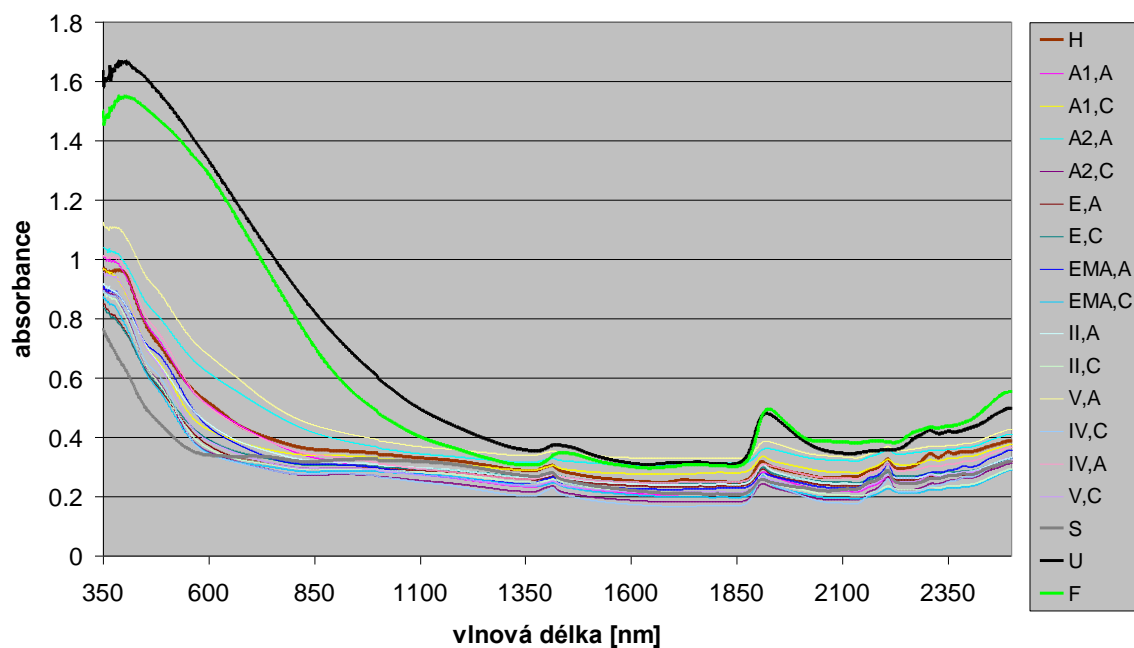


Obr. 24 Korelační spektrum pro Cjil (červeně). Modře je vyznačeno varianční (rozptylové) spektrum



Obr. 25 Korelační spektrum pro Cjil (červeně). Modře je vyznačeno varianční (rozptylové) spektrum

Modelové materiály a půdy (<0.125mm) jsem naměřila také v oblasti **VIS-NIR** (350 – 2500 nm) (Obr. 26). Tentokrát jsem neprováděla kvantitativní analýzu, jelikož počet samotných půd nestačí na kvalitní kalibraci. Na spektrech si povšimněme nově získaného regionu 350-1000 nm. V tomto regionu se výrazně liší tvar spektra fermentační vrstvy a uhlí od ostatních spekter. Mají výraznější absorpci a kolem 500 nm konkávní tvar. Naopak nejnižší leží spektra šedého jílu a spolu s hnědým jílem je v tomto regionu křivka konvexní. Pravděpodobně by bylo možné nalézt korelaci mezi druhou derivací vybraného úseku a obsahem organické hmoty. I když uhlí vykazuje podobný tvar jako fermentační vrstva, mohl by tímto být odlišen vliv kerogenového uhlíku. Kolem 850 nm se zase spektra liší svým sklonem. Opět se výrazně odlišují fermentační vrstva a uhlí od obou jílu. Tohoto si všimli Ben Dor et al. (1997), když analyzovali spektra postupně se rozkládající organické hmoty – zjistili, že nejlépe s obsahem uhlíku korelují první derivace vybraných úseků vis-NIRu.



Obr. 26 Infračervená spektra půd a modelových materiálů naměřena na přístroji VIS-NIR.

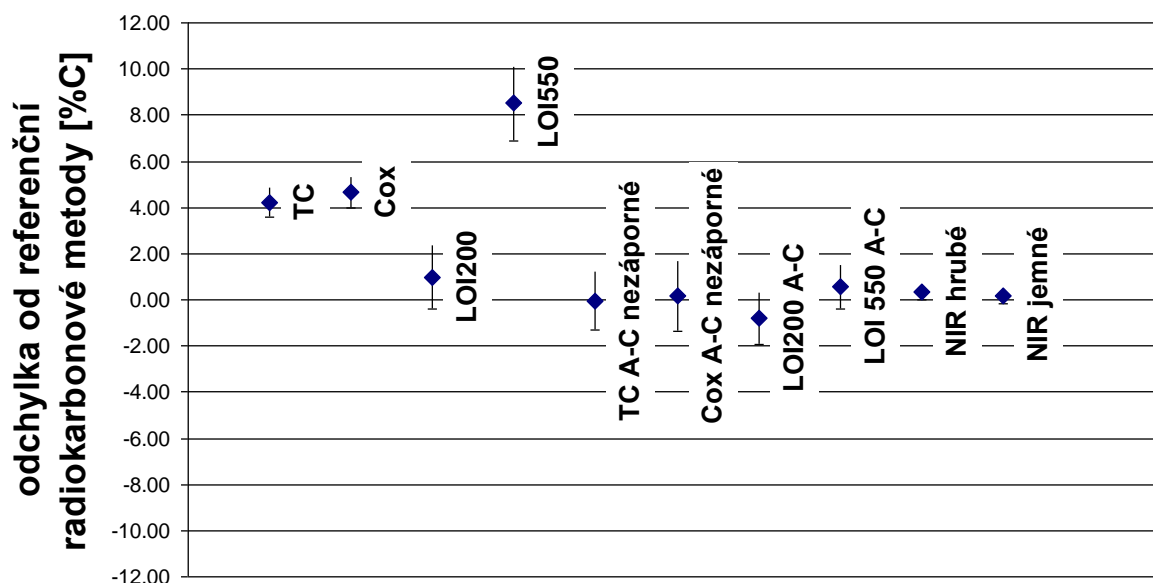
### 5.2.7 Porovnání metod

Srovnání jednotlivých metod uvádí Tabulka xx. Kromě absolutních hodnot získaných jednotlivými metodami obsahuje tabulka také srovnávací statistiku. Dvě skupiny regresních parametrů jsou interpretovatelné takto – dle první skupiny regresí lze usuzovat na úzkost korelace mezi testovanými metodami a radiokarbonovým stanovením ale až po určitém přepočtu pomocí uvedených regresních parametrů. Nejvyšší korelace vykazují **infračervená spektroskopie** a překvapivě úzké korelace má také **ztráta žiháním po odečtení hlubší vrstvy**. Parametr  $a$  (směrnici) lze pak interpretovat jako míru proporcionální odchylky (hodnoty  $a > 1$  značí, že daná metoda nadhodnocuje vyšší obsahy uhlíku a podhodnocuje nižší. Naopak směrnice menší než jedna indikuje nadhodnocení chudších půd. Parametr  $b$  lze interpretovat jako konstantní složku chyby ( $b < 0$  značí podhodnocení,  $b > 0$  stále nadhodnocení).

Důležitější je ale druhá skupina parametrů (kde  $a = 1$ ,  $b = 0$ ), která naznačuje **jak vysoce je metoda srovnatelná s radiokarbonovou referencí** bez nutnosti dalších přepočtů. RSE této skupiny parametru pak odpovídá **střední chybě** uvedené metody vůči referenci. Při korektním šíření nejistoty by měla tato chyba být zahrnuta do laboratorní chyby nebo být alespoň brána v úvahu při testování rozdílů takto získaných průměrů.

V porovnání první skupiny parametrů dopadla infračervená spektroskopie (při hrubém mletí  $R^2=0.96$ ,  $RSE=0.73$ ,  $R^2=0.94$  při jemném mletí, obě se střední chybou pod 0.80), překvapivě přesné je také stanovení pomocí ztráty žihání při teplotě 550°C po odečtení horizontu C. Poměrně dobře vychází i odečtení horizontu C v případě elementární analýzy (TC) a stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox).

U metod TC, Cox a LOI bez odečtení horizontu C si všimněme parametru „bias“ neboli systematické odchylky. Udává průměr rozdílů mezi hodnotami získané porovnávanou metodou a metodou referenční. U všech z těchto tří metod je bias statisticky významný, tedy potvrzuje se, že tyto metody bez odečtení C horizontu nelze použít pro stanovení recentního uhlíku. Interval spolehlivosti pro bias vypovídá o tom, kde se s 95% pravděpodobností nachází rozdíl mezi testovanou a referenční metodou. Bias s jeho intervaly spolehlivosti je graficky zpracován v obr. 27. Naopak nejmenší bias mají metody založené na odečtu C horizontu. Tento přístup ovšem vyžaduje v terénu odebrat spolu s povrchovým horizontem A také vzorek z hloubky, což je časově a fyzicky náročné. Z metod, které toto nevyžadují dopadly nejlépe infračervená spektroskopie a stanovení ztráty žiháním při 200 °C.



Obr. 27 Srovnání průměrných odchylek testovaných metod od referenčního stanovení radiokarbonovou metodou. Chybové úsečky představují 95% interval spolehlivosti TC - elementární stanovení celkového uhlíku, Cox – stanovení oxidovatelného uhlíku, LOI200, LOI550 – ztráta žiháním při teplotě 200°C, resp. 550°C, A-C – korekce hodnoty pro A horizont odečtením hroizontu C, NIR – infračervená spektrometrie pro různá mletí

Tab.14 Srovnání obsahu uhlíku [%] stanovených jednotlivými metodami pro 14 půd sokolovských výsypek v porovnání s radiokarbonovou metodou (Crec 14C). TC - elementární stanovení celkového uhlíku, Cox – stanovení oxidovatelného uhlíku, LOI200, LOI550 – ztráta žiháním při teplotě 200°C, resp. 550°C, převedena koeficientem 1.724 na obsah uhlíku, A-C – korekce hodnoty pro A horizont odečtením hroizontu C, NIRS – infračervená spektrometrie vzorků hrubě, resp. jemně mletých

kód půdy	Crec 14C	TC	Cox	LOI 200°C	LOI 550°C	TC A-C	Cox A-C	LOI 200°C A-C	LOI 550°C A-C	NIRS hrubé	NIRS jemné
A1-A	<b>3.25</b>	7.72	8.29	4.04	12.11	3.35	3.59	2.40	3.55	3.95	3.99
A1-C	<b>0.08</b>	4.37	4.70	1.63	8.56					1.38	0.00
A2-A	<b>6.82</b>	10.52	12.46	6.03	15.32	6.43	8.50	4.85	7.17	6.90	6.86
A2-C	<b>0.08</b>	4.09	3.96	1.17	8.14					0.34	0.63
E-A	<b>0.07</b>	5.25	5.30	1.58	9.14	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.44
E-C	<b>0.04</b>	5.71	5.52	1.45	9.48					0.00	0.51
EMA-A	<b>0.27</b>	2.87	3.16	1.59	8.88	0.00	0.00	0.23	1.25	1.27	0.00
EMA-C	<b>0.04</b>	4.33	3.83	1.36	7.62					0.00	0.00
II-A	<b>0.85</b>	6.44	6.46	2.44	10.19	2.37	1.57	1.17	2.53	1.28	0.27
II-C	<b>0.04</b>	4.08	4.89	1.28	7.66					0.00	0.47
IV-A	<b>2.50</b>	6.26	6.91	8.30	18.13	4.01	4.33	2.28	4.48	3.70	3.98
IV-C	<b>0.13</b>	2.25	2.58	1.43	6.87					0.00	0.00
V-A	<b>9.67</b>	13.09	13.90	3.71	11.35	7.03	6.60	6.70	8.60	8.83	8.79
V-C	<b>0.09</b>	6.06	7.30	1.59	9.53					0.93	0.00
y=a*Crec14C +b											
a		0.91	1.03	0.43	0.60	0.72	0.80	2.54	3.94	0.92	0.95
b		4.38	4.62	1.95	9.19	0.90	0.84	0.67	0.82	0.47	0.23
R2		0.86	0.87	0.36	0.33	0.88	0.80	0.97	0.93	0.96	0.96
RSE		1.13	1.26	1.78	2.69	1.06	1.61	0.43	0.90	0.58	0.59
p		1.60E-06	1.39E-06	2.36E-02	3.23E-02	1.79E-03	6.86E-03	3.73E-05	4.61E-04	8.14E-10	7.42E-10
regrese 2											
a		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R2		-1.39	-1.28	-0.51	-7.67	<b>0.90</b>	<b>0.89</b>	<b>0.83</b>	<b>0.95</b>	<b>0.94</b>	<b>0.96</b>
RSE		4.71	5.20	2.73	9.65	1.54	1.81	1.64	1.35	0.73	0.63
bias		<b>4.22</b>	<b>4.67</b>	0.98	<b>8.50</b>	-0.03	0.17	-0.81	0.59	0.33	0.14
dolní 95% CI		3.58	3.97	-0.42	6.86	-1.33	-1.35	-1.94	-0.38	-0.02	-0.20
horní 95% CI		4.87	5.37	2.38	10.15	1.26	1.68	0.32	1.56	0.68	0.48
				ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns

## 6 Závěry

*Cíl 1: zjistit, jaký je skutečný podíl recentní a fosilní organické hmoty v půdách sokolovských výsypek pomocí radiokarbonové metody, určit jaká je jeho variabilita v závislosti na hloubce a stáří půdy, jaká je variabilita mezi plochami rekultivovanými a nerektivovanými.*

- Radiokarbonovou metodou bylo zjištěno, že fosilní uhlík tvoří v půdách sokolovských výsypek minimálně 13 - 99 % celkového organického uhlíku, což odpovídá absolutním koncentracím 2 – 6 % C.
- Podíl fosilního uhlíku na celkovém uhlíku v půdním profilu stoupá – v A horizontech představuje 13 - 96 %, v C horizontech 86 až 99 % celkového organického uhlíku.
- V C horizontu představuje většinu fosilní uhlík, v menší míře je však i zde zastoupen recentní uhlík, a to minimálně 1-7 % celkového organického uhlíku. Jeho původ je nejasný; může být dán zčásti nejistotou výpočtu a zčásti způsoben vyluhováním a bioturbací.
- Již u nejmladších (10letých) ploch je v A horizontu více recentního uhlíku než v horizontu C, tento rozdíl ale není ještě výrazný (v řádech 0.01 - 0.1 % C)
- U starší plochy je nejvyšší rozdíl mezi absolutním množstvím fosilního uhlíku (v horizontu C je asi o 2.5% více C). Tento rozdíl může být způsobený částečným rozkladem fosilní organické hmoty v povrchové vrstvě minerálního horizontu.
- Celková množství fosilního uhlíku se mezi jednotlivými výsypkami liší, pravděpodobně vlivem různého složení sypaného materiálu s odlišným podílem fosilní organické hmoty.

*Cíl 2: zjistit, jak velkou chybou jsou zatíženy nejčastěji používané metody stanovení POH – stanovení ztráty žiháním (LOI), stanovení oxidovatelného uhlíku (Cox) a stanovení celkového obsahu uhlíku elementární analýzou (TC) – a navrhnout jejich optimalizaci.*

- Odečtení celkového uhlíku z hlubšího horizontu C (z hloubky 50 cm) od svrchního horizontu A přináší poměrně dobrý odhad obsahu recentního uhlíku ve svrchní vrstvě. Lze takto použít jak hodnoty z elementární analýzy, tak ze stanovení oxidovatelného uhlíku a ztráty žiháním při 550°C. Doporučuji nepoužívat v publikacích tyto hodnoty bez odečtení hlubší vrstvy nebo alespoň uvádět, že hodnoty jsou silně ovlivněny

fosilním uhlíkem se zmíněnou variabilitou. Doporučuji přistupovat k získaným datům s vědomím nejistot popsanych v této práci.

- Z metod, které nevyžadují náročný odběr a zpracování vzorku ze dvou hloubek (hor. A a C) je nejvhodnější ztráta žiháním při 200°C.

*Cíl 3: testovat potenciál infračervené spektrometrie pro odlišení fosilního a recentního uhlíku v půdách sokolovských výsypek, stanovit fosilní uhlík v umělých směsích materiálů se známým obsahem recentního nebo fosilního uhlíku a též ve vzorcích reálných půd datovaných radiokarbonovou metodou.*

- Infračervená spektrometrie má dobrý potenciál pro odlišení fosilního a recentního uhlíku v půdách sokolovských výsypek. Před rutinní aplikací je ale nutné postavit kalibraci a validaci na větším počtu půd s rovnoměrnou distribucí vstupních dat. Jelikož stanovení většího počtu vzorků radiokarbonovou metodou není finančně reálné, je třeba hledat ještě jiný, třetí přístup, pomocí kterého by bylo možné IČ spektrometrii kalibrovat.
- Doporučuji do případného dalšího měření zahrnout region VIS-NIR (800-1000 nm), který by mohl přispět k rozšíření možností kalibrace.

*Cíl 4: doporučit nejvhodnější postup pro situaci, kdy je fosilní organická hmota tvořena více různými komponenty s velmi odlišným chemickým složením.*

- Bylo ukázáno že nespecifickým postupem /odečtení horizontu C/ lze dosáhnout poměrně dobrého odhadu recentní organické hmoty, přesto je třeba dále pátrat mezi metodami kvalitativní analýzy po těch, které by mohly sloužit pro studium chemické struktury, funkce a dynamiky půdní organické hmoty výsypek. Takovými metodami by mohly být např. <sup>13</sup>C NMR, pyrolyzní chromatografie či studium biomarkerů známých z organické geochemie nebo paleolimnologie.

## 7 Zdroje

- Abakumov, E.V. et al., 2013. Humus accumulation, humification, and humic acid composition in soils of two post-mining chronosequences after coal mining. *Journal of Soils and Sediments*, 13(3), pp.491–500.
- Akala, V.A. & Lal, R., 2001. Soil organic carbon pools and sequestration rates in reclaimed minesoils in Ohio. *Journal of Environmental Quality*, 30(6), pp.2098–2104.
- Andrés, J.M. & Bona, M.T., 2005. Analysis of coal by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 535(1-2), pp.123–132.
- Ben-Dor, E. & Banin, A., 1990. Near-Infrared Reflectance Analysis of Carbonate Concentration in Soils. *Applied Spectroscopy*, 44(6), pp.1064–1069.
- Ben-Dor, E., Inbar, Y. & Chen, Y., 1997. The reflectance spectra of organic matter in the visible near-infrared and short wave infrared region (400–2500 nm) during a controlled decomposition process. *Remote Sensing of Environment*, 61(1), pp.1–15.
- Bornemann, L. et al., 2008. Rapid assessment of black carbon in soil organic matter using mid-infrared spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 39(11), pp.1537–1544.
- Bouška, V. et al., 1980. *Geochemie*, Praha: Academia.
- Bouška, V., 1977. *Geochemie uhlí*, Praha: Academia.
- Boutton, T.W. et al., 1998.  $\delta^{13}\text{C}$  values of soil organic carbon and their use in documenting vegetation change in a subtropical savanna ecosystem. *Geoderma*, 82(1-3), pp.5–41.
- Brodie, C.R. et al., 2011. Evidence for bias in C and N concentrations and  $[\delta^{13}\text{C}]$  composition of terrestrial and aquatic organic materials due to pre-analysis acid preparation methods. *Chemical Geology*.
- Brown, G.M.C. & Grant, C.D., 2000. Nutrient status of pasture ecosystems established on rehabilitated overburden and topsoil sites in the Hunter Valley, New South Wales. *Australian Journal of Soil Research*, 38(2), pp.479–491.
- Buryan, P., 2010. Kapalné produkty bitumenů cyprisových jílu. *Paliva*, 1, pp.13–20.
- Castañeda, I.S. & Schouten, S., 2011. A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Science Reviews*, 30(21-22), pp.2851–2891.
- Craig, H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12(1-2), pp.133–149.
- Dvorščík, P., 2012. *Biomasa vegetace různě starých rekultivovaných a nerektivovaných výsypek*. Univerzita Karlova v Praze.

- EN, Č., 15935. *Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady - Stanovení ztráty žiháním*,
- Feiza, V. et al., 2007. Soil use and management impact on surface runoff and SOM/SOC content on hilly landscape of Lithuania. *Off-site impacts of soil erosion and sediment transport*.
- Fettweis, U., Bens, O. & Huttel, R.F., 2005. Accumulation and properties of soil organic carbon at reclaimed sites in the Lusatian lignite mining district afforested with *Pinus* sp. *Geoderma*, 129(1-2), pp.81–91.
- Frouz, J. et al., 2009. Carbon storage in post-mining forest soil, the role of tree biomass and soil bioturbation. *Biogeochemistry*, 94(2), pp.111–121.
- Frouz, J. et al., 2011. Deep, subsurface microflora after excavation respiration and biomass and its potential role in degradation of fossil organic matter. *Folia microbiologica*, 56(5), pp.389–96.
- Frouz, J. et al., 2007. Tvorba nové krajiny na Sokolovsku právní nástupce a. s. Sokolovská uhelná, ed. , p.26.
- Frouz, J. & Kalčík, J., 2006. Accumulation of soil organic carbon in relation to other soil characteristic during spontaneous succession in non reclaimed colliery spoil heaps after brown coal mining near Sokolov (the Czech republic). *Ekológia* , 25(4), pp.388–397.
- Ganjugunte, G.K. et al., 2009. Accumulation and composition of total organic carbon in reclaimed coal mine lands. *Land Degradation & Development*, 20(2), pp.156–175.
- González-Pérez, J.A. et al., 2012. Evolution of organic matter in lignite-containing sediments revealed by analytical pyrolysis (Py–GC–MS). *Organic Geochemistry*, 53(null), pp.119–130.
- Gu, B. & Alexander, V., 1996. Stable Carbon Isotope Evidence for Atmospheric CO<sub>2</sub> Uptake by Cyanobacterial Surface Scums in a Eutrophic Lake. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), pp.1803–4.
- Hapke, B., 1993. *Theory of Reflectance and Emittance Spectroscopy*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Heiri, O., Lotter, A. & Lemcke, G., 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology*, 25(1), pp.101–110.
- Hendl, J., 2004. Porovnání metod měření a Blandův-Altmanův graf. In *Přehled statistických metod zpracování dat - Analýza a metaanalýza dat*. Praha: Portál, pp. 283–291.
- Chang, C.-W. et al., 2001. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy-Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 65(2), pp.480–490.

- Chatterjee, S. & Hadi, A.S., 1988. *Sensitivity Analysis in Linear Regression*, New York: Wiley.
- IPCC, 2007. Climate change: the physical science basis S. Solomon et al., eds. *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, p.996.
- Jankauskas, B. et al., 2006. A comparative study of analytical methodologies to determine the soil organic matter content of Lithuanian Eutric Albeluvisols. *Geoderma*, 136(3-4), pp.763–773.
- Kania, P., 2010. Infračervená spektrometrie. In *Návody k Laboratoři analytické chemie I*. Praha: VŠCHT, pp. 1–41.
- Karu, H. et al., 2009. Carbon sequestration in a chronosequence of Scots pine stands in a reclaimed opencast oil shale mine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 39(8), pp.1507–1517.
- Kramer, C. et al., 2010. Recent (<4 year old) leaf litter is not a major source of microbial carbon in a temperate forest mineral soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(7), pp.1028–1037.
- Kříbek, B., 1998. Geochemistry of Miocene lacustrine sediments from the Sokolov Coal Basin (Czech Republic). *International Journal of Coal Geology*, 37(3-4), pp.207–233.
- De la Rosa Arranz, J.M. et al., 2009. Structural properties of non-combustion-derived refractory organic matter which interfere with BC quantification. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85(1-2), pp.399–407.
- Lal, R., Kimble, J.M. & Stewart, B.A., 2001. Importance of soil bulk density and methods of its measurement. In R. Lal et al., eds. *Assessment Methods for Soil Carbon*. CRC Press, pp. 31–44.
- Ledvina, R. & Horáček, J., 1997. *Agrotechnické požadavky na zemědělské stroje - (část půdoznalství)*, České Budějovice: Jihočeská univerzita - zemědělská fakulta.
- Leinweber, P. & Schulten, H.-R., 1999. Advances in analytical pyrolysis of soil organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49(1-2), pp.359–383.
- Levin, I. & Kromer, B., 2004. The tropospheric (CO<sub>2</sub>)-C-14 level in mid-latitudes of the Northern Hemisphere (1959-2003). , 46(3), pp.1261–1272.
- Levin, I., Kromer, B. & Hammer, S., 2013. Atmospheric  $\Delta 14 \text{ CO}_2$  trend in Western European background air from 2000 to 2012. *Tellus B*, 65.
- Loague, K. & Green, R.E., 1991. Statistical and graphical methods for evaluating solute transport models: Overview and application. *Journal of Contaminant Hydrology*, 7(1-2), pp.51–73.

- Lorenz, K. & Lal, R., 2007. Stabilization of organic carbon in chemically separated pools in reclaimed coal mine soils in Ohio. *Geoderma*, 141(3-4), pp.294–301.
- Matějka, P., 2013. Spektrometrie v blízké infračervené oblasti. In *Návody k Laboratoři analytické chemie II*. Praha: VŠCHT, pp. 1–12.
- Meloun, M. & Militký, J., 2002. *Kompendium statistického zpracování dat*, Praha: Academia.
- Meyers, P.A., 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology*, 114(3-4), pp.289–302.
- Mihaljevič, M. et al., 2009. Isotopic composition of lead in Czech coals. *International Journal of Coal Geology*, 78(1), pp.38–46.
- Michel, K. et al., 2009. Use of near- and mid-infrared spectroscopy to distinguish carbon and nitrogen originating from char and forest-floor material in soils. *Journal Of Plant Nutrition And Soil Science*, 172(1), pp.63–70.
- Morgenroth, G. et al., 2004. C-14 measurement of soil in post-mining landscapes. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 223, pp.568–572.
- Němeček, J., Smolíková, L. & Kutílek, M., 1990. *Pedologie a paleopedologie*, Praha: Academia.
- Novák, P., Vopravil, J. & Lagová, J., 2010. Assessment of the soil quality as a complex of productive and environmental soil function potentials. *Soil and Water Research*, 5(3), pp.113–119.
- Ostrom, P.H. et al., 1998. Changes in the trophic state of Lake Erie: discordance between molecular  $\delta^{13}\text{C}$  and bulk  $\delta^{13}\text{C}$  sedimentary records. *Chemical Geology*, 152(1-2), pp.163–179.
- Reintam, L., 2004. Rehabilitated quarry detritus as parent material for current pedogenesis. *Oil Shale*, 21(3), pp.183–193.
- Rojík, P. et al., 2010. Sokolovská pánev. In *Terciérní pánve a ložiska hnědé uhlí České republiky*. pp. 138–205.
- Rumpel, C. et al., 2001. Quantification of carbon derived from lignite in soils using mid-infrared spectroscopy and partial least squares. *Organic Geochemistry*, 32(6), pp.831–839.
- Rumpel, C. et al., 2003. Quantification of lignite- and vegetation-derived soil carbon using C-14 activity measurements in a forested chronosequence. *Geoderma*, 112(1-2), pp.155–166.
- Rumpel, C. et al., 1998. Types and chemical composition of organic matter in reforested lignite-rich mine soils. *Geoderma*, 86(1-2), pp.123–142.

- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I. & Hüttl, R., 1999. Organic matter composition and degree of humification in lignite-rich mine soils under a chronosequence of pine. *Plant and Soil*, 213(1), pp.161–168.
- Sáňka, M. & Materna, J., 2004. Indikátory kvality zemědělských a lesních půd ČR. *edice PLANETA 2004*, XII(11).
- Santisteban, J.I. et al., 2004. Loss on ignition: a qualitative or quantitative method for organic matter and carbonate mineral content in sediments? *Journal of Paleolimnology*, 32(3), pp.287–299.
- Sasic, S. & Ozaki, Y., 2010. *Raman, infrared, and near-infrared chemical imaging*, Hoboken, NJ, USA: Wiley.
- Shrestha, R.K. & Lal, R., 2010. Carbon and nitrogen pools in reclaimed land under forest and pasture ecosystems in Ohio, USA. *Geoderma*, 157(3-4), pp.196–205.
- Schumacher, B.A., 2002. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments.
- Simpson, M.J. & Simpson, A.J., 2012. The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents. *Journal of chemical ecology*, 38(6), pp.768–84.
- Song, G. et al., 2011. Isolation and fractionation of soil humin using alkaline urea and dimethylsulphoxide plus sulphuric acid. *Die Naturwissenschaften*, 98(1), pp.7–13.
- Sourkova, M., Frouz, J. & Santruckova, H., 2005. Accumulation of carbon, nitrogen and phosphorus during soil formation on alder spoil heaps after brown-coal mining, near Sokolov (Czech Republic). *Geoderma*, 124(1-2), pp.203–214.
- Srnková, J. et al., 2009. Porovnání výsledků stanovení obsahu uhlíku a dusíku v půdních vzorcích různými metodami stanovení. *Bulletin - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský - Národní referenční laboratoř*, 13(1), pp.1–10.
- Stenberg, B. et al., 2010. Chapter Five – Visible and Near Infrared Spectroscopy in Soil Science. *Advances in Agronomy*, 107, pp.163–215.
- Stuiver, M. & Polach, H., 1977. Reporting of C-14 data - discussion. , 19(3), pp.355–363.
- Štýs, S. et al., 1981. *Rekultivace území postižených těžbou nerostných surovin*, Praha: SNTL Nakladatelství technické literatury.
- Thomsen, I.K. et al., 2009. Assessing soil carbon lability by near infrared spectroscopy and NaOCl oxidation. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), pp.2170–2177.
- Tissot, B. & Welte, D., 1978. Kerogen: Composition and Classification. In *Petroleum Formation and Occurrence*. pp. 123–147.

- Ussiri, D.A.N. & Lal, R., 2008. Method for determining coal carbon in the reclaimed minesoils contaminated with coal. *Soil Science Society of America Journal*, 72(1), pp.231–237.
- Vasques, G.M., Grunwald, S. & Sickman, J.O., 2009. Modeling of Soil Organic Carbon Fractions Using Visible–Near-Infrared Spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, 73(1), p.176.
- Vitousek, P.M. et al., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325), pp.494–499.
- Vogel, J.S. et al., 1984. Performance of catalytically condensed carbon for use in accelerator mass spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 5(2), pp.289–293.
- Whiticar, M.J., 1996. Stable isotope geochemistry of coals, humic kerogens and related natural gases. *International Journal of Coal Geology*, 32(1-4), pp.191–215.
- Williams, P., 2004. Implementation of Near-Infrared Technology. In P. Williams & K. Norris, eds. *Near Infrared Technology in the Agriculture and Food Industries*. St. Paul, MN: Am. Cereal Assoc. Cereal Chem., pp. 145–169.
- Zbiral, J., 2002. *Analýza půd III: jednotné pracovní postupy*, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Laboratorní odbor.

## 8 Přílohy

### ***Příloha 1 - Metodika odstranění uhličitánů před $^{14}\text{C}$ a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analýzou***

Vzorky před  $^{14}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  analýzou je třeba zbavit uhličitánů.

Uhličitán (většinou Ca ale i další – Mg, Fe aj.) reaguje s kyselinou chlorovodíkovou takto:



Jelikož na ÚŽP se tento postup běžně neprovádí, postupovala jsem dle návodu z Center for Applied Isotope Studies, University of Georgia (Alexander Cherkinsky, osobní sdělení).

Postup jsem prováděla vždy na 4 vzorcích najednou - kvůli počtu dostupných filtračních setů i omezené kapacitě je obsluhovat.

Z jemně namletých vzorků bylo naváženo asi 5 g vzorku do 250 ml šroubovacích sklenic a přidáno 150 ml 1 M HCl (poměr 1:30<sup>1</sup>). Vzorky byly dobře promíchány a za občasných promíchání na magnetickém míchadle byly zahřívány na topné desce na teplotu 80°C. Při této teplotě byly udržovány 1 hod. pH roztoku je po tomto ošetření blízké 1. Poté byly vzorky ponechány vychladnout přes noc. Následně byly vzorky zfiltrány ve vakuovém filtračním zařízení. K filtraci je třeba použít filtry ze skleněných vláken, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku uhlíkem z běžného filtračního papíru. Na doporučení CAIS byly použity filtry značky Whatman, 934-AH, průměr 55 mm, katalogové číslo 1827 055.

Po zfiltrování byl ještě vzorek na filtru promyt 100 ml deionizované vody. Poté byly vzorky smyty deionizovanou vodou z filtru do 250 ml kádinky, doplněny 250 ml deionizované vody a zamíchány na magnetickém míchadle. Po odstátí byly vzorky znovu filtrovány. Postup byl opakován do té doby, než filtrát dosáhl pH vyšší než 5, zpravidla 5-10x.

Poté byl vzorek z filtru smyt na Petriho misku a sušen 12 hodin při teplotě 80°C. Poté byl vzorek v třecí misce znovu namlet a na závěr sušen v Petriho misce ještě dalších 8 hodin.

---

<sup>1</sup> Poměr 1:30 platí pro půdy s běžným obsahem uhličitánů. V případě půdy bohatších na karbonáty je potřeba zvýšit poměr nebo začít přidáním několika kapek koncentrované HCl.



Obr. 28 Zahřívání vzorku s 1 M HCl při teplotě 80°C při odstraňování uhličitánů



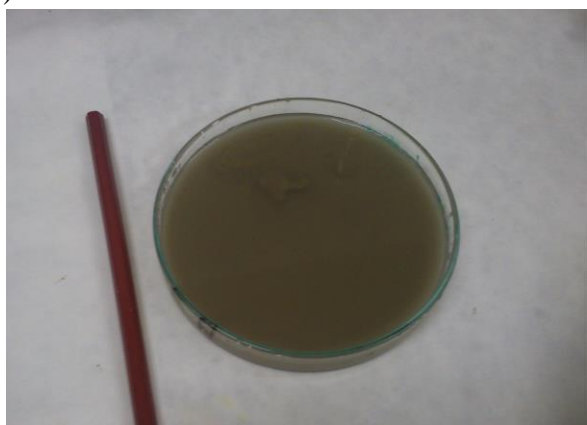
Obr. 29 Vakuová filtrace při odstraňování uhličitánů



a)



b)



c)



d)

Obr. 30 Poslední krok odstraňování uhličitánů – a) filtrační koláč b) smytí vzorku z filtru do Petriho misky c) vzorek před sušením d) vzorek po 12 h sušení

## **Příloha 2 - Metodika stanovení ztráty žiháním**

Modelové materiály a půdy byly žihány po prosátí přes 2 mm síto, vždy  $n=4$ .

**Vzorky modelových materiálů** (jílu, uhlí a fermentační vrstva) byly žihány postupně při teplotách 250, 350, 450, 550, 650, 750 a 850°C s jednou vstupní navázkou podle následujícího postupu: Do zváženého porcelánového kelímku bylo naváženo vždy asi 2 g, zapsána hmotnost kelímku i se vzorkem a vzorky sušeny při 60°C do konstantní hmotnosti (12 hod). Po dosušení byly vzorky ihned znovu zváženy a umístěny do muflové pece, kde byly žihány na teplotu 250 °C. Po žihání byly v peci ponechány vychladnout na teplotu cca 60° a poté vyjmuty z pece a ihned váženy. Poté byly vráceny do pece a žihány při teplotě 350°C. Po vyžihání byly opět zváženy, opět vráceny do pece, a tak dále až do teploty 850°C.

**Vzorky půd a umělých směsí** byly před žiháním sušeny při teplotě 80°C, jelikož při této teplotě byly zahřívány a sušeny vzorky také při přípravě na radiokarbonovou analýzu (viz Příloha 1). Půdy a směsi byly žihány při teplotách 150,200,250,350 a 550°C podle

následujícího postupu: Do zváženého porcelánového kelímku bylo naváženo vždy asi 2 g, zapsána hmotnost kelímku i se vzorkem a vzorky sušeny při 80°C do konstantní hmotnosti (12 hod). Po dosušení byly vzorky ihned znovu zváženy a umístěny do muflové pece, kde byly žihány na stanovenou teplotu. Po žihání byly v peci ponechány vychladnout na teplotu cca 80° a poté vyjmuty z pece a ihned váženy. Pro každou teplotu byl celý postup opakován.

Pozn. 1 Ověřila jsem, že obecně doporučované chladnutí v eksikátoru přinášelo různorodé přírůstky v hmotnosti vzorku zřejmě v důsledku různých vlhkostí vzduchu v laboratoři, jejichž vlivu se nelze při otvírání eksikátoru ubránit, proto byl použit postup s vážením „za tepla“ raději než za studena.

Pozn. 2 Jelikož je pro výpočet ztráty žiháním nutné znát hmotnost porcelánového kelímku před žiháním a z povahy postupu je možné změřit samotný kelímek pouze před sušením a ne po něm, zabývala jsem se otázkou, zda samotný kelímek při sušení neztrácí nějakou hmotnost. Pro tento účel jsem usušila všechny kelímky používané při měření (n=48) popsáním způsobem a zvažila je před a po sušení. Ve znaménkovém testu (data neměla normální rozdělení) se potvrdilo, že kelímky váží méně po sušení než před ním. Podobně jsem také žihala prázdné kelímky při všech použitých teplotách a vyvinula pro ně korekční koeficienty, které je možné použít při dodržení postupu popsání pro půdy a směsi. Koeficient pro každou teplotu sušení nebo žihání byl spočítán vždy jako průměrný relativní úbytek kelímku:

$$\bar{k} = \frac{\sum \frac{kel\_pred - kel\_po}{kel\_pred}}{n}$$

a hmotnost kelímku po sušení nebo žihání byla potom odhadnuta takto:

$$kel\_po = kel\_pred \times (1 - \bar{k})$$

S použitím koeficientů pak vzorec pro výpočet ztráty žiháním vypadal takto:

$$LOI\% = \frac{(kel\_vz\_po\_sus - (kel\_pred\_sus * (1 - k_{sus}))) - (kel\_vz\_po\_zih - kel\_pred\_sus * (1 - k_{zih}))}{kel\_vz\_po\_sus - (kel\_pred\_sus * (1 - k_{sus}))} * 100$$

kel\_pred\_sus ... kelímek před sušením

kel\_vz\_pred\_sus ... kelímek se vzorkem před sušením

kel\_vz\_po\_sus ... kelímek se vzorkem po sušení

kel\_vz\_po\_zih ... kelímeček se vzorkem po žihání

kel\_po\_zih ... kelímeček po žihání

ksus...korekční koeficient sušení

kzih...korekční koeficient žihání

**Pozn. 3** Je známo, že muflová pec žihá nerovnoměrně (nejvíce ve středu, nejméně na okrajích) (Heiri et al. 2001) a navíc během vážení za tepla mohou kelímky při chladnutí nabývat na hmotnosti. Abych tyto vlivy minimalizovala, použila jsem rozmístění kelímků znázorněné na Obr. 31.



Obr. 31 Rozmístění kelímků v sušárně a muflové peci pro 4 vzorky při 4 opakování – barvou jsou odlišeny jednotlivé vzorky

### **Příloha 3 - Metodika stanovení oxidovatelného uhlíku**

Byla použita upravená metodika dle Zbírala (2002).

Do 50 ml Erlenmayerových baněk byl navážen vzorek vždy ve více opakováních – nejdříve bylo provedeno orientační stanovení pro různé navážky (materiály 4 opakování z rozmezí 0.04 – 0.001 g, půdy ve 2 opakování z rozmezí 0.02-0.005 g ). Pro druhé (přesné) stanovení byla zvolena taková navážka, která vedla při orientačním stanovení ke spotřebě při titraci okolo 4-6 ml, kdy je dobře detekovatelný barevný přechod, ale nedochází k plýtvání s chemikáliemi. Poté bylo do baněk přidáno 10 ml chromsírové směsi pomocí dávkovače a opatrně promícháno krouživými pohyby tak, aby vzorek nepřilnul na stěny. Zároveň byla do 3 prázdných Erlen. baněk také přidáno 10 ml, aby posloužily jako BLANK vzorky.

Všechny vzorky včetně blanků byly vloženy na tácu do sušárny přehřáté na 130°C a poté sušeny 45 min při teplotě 125°C. Po dosušení byly baňky vyndány a ponechány vychladnout.

Po vychladnutí byly vzorky ztitrovány roztokem Mohrovy soli s ferroin indikátorem do barevné změny přes zelenou do oranžova a spotřeby byly zaznamenány.

Při titraci byl také stanoven faktor Mohrovy soli – do 3 kádinek bylo napipetováno 1 ml roztoku dvojchromanu draselného a 2.5 ml kys. sírové a doplněno 20 ml destilované vody.

Tyto roztoky byly poté titrovány Mohrovou solí s ferroin indikátorem. Spotřeby byly zaznamenány a jejich průměr byl použit pro výpočet faktoru Mohrovy soli.

### Příprava chemikálií

**Dichroman draselný** ( $c=0.067\text{ M}$ ) – do kádinky navážit 19.615 g dichromanu draselného a přilít cca 300 ml dest. vody, rozpustit (případně použít míchadlo), nalít roztok do 1 l odměrné baňky a doplnit po rysku – dá se skladovat

**Chromsírová směs** ( $c((\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-})=0,008\text{ M}$ ) – do velké Erlenmayerovy baňky (např. 3 l) nalít 500 ml kys. sírové, ponořit baňku do studené vody, přilít 200 ml kys. fosforečné a chladit studenou vodou. Po zchladnutí přilít 100 ml roztoku dichromanu draselného a opět chladit. – dá se skladovat

**Mohrova sůl** ( $c(\text{Fe}^{2+})=0.051\text{ M}$ ) – navážit do kádinky 20 g síranu železnato-amonného  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ , dolít cca 300 ml destilky a 20 ml kys. sírové (ta pomůže rozpustit síran). Síran rozpustit a roztok přelít do 1 l odměrné baňky a doplnit po rysku. – nemůže se skladovat, vydrží cca 2-3 dny v tmavé láhvi.

vzorec pro výpočet obsahu oxidovatelného C (%)

$$C_{ox} = \frac{(V_1 - V_2) * f * 0.0153}{m}$$

$V_1$  – průměrná spotřeba roztoku Mohrovy soli v ml při titraci BLANKU

$V_2$  – spotřeba roztoku Mohrovy soli v ml při titraci vzorku

$f$  – faktor Mohrovy soli ( $f = 8/\text{průměrná spotřeba Mohrovy soli pro stanovení faktoru}$ )

0.0153 – koeficient zvolený za předpokladu, že 1 ml 0.051 M odměrného roztoku Mohrovy soli odpovídá 0,153 mg  $\text{C}_{ox}$  (Pozn. 2)

$m$  – navážka vzorku v g

Pozn.1 Odlišnosti od Zbiralovy metodiky (2002)

1) Je použita nižší koncentrace  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  v chromsírové směsi (Zbiral předepisuje  $c=0.067\text{ M}$ ), což vede k úspoře chemikálií a redukci vzniklého nebezpečného odpadu.

- 2) Vzorky nejsou po oxidaci v peci ředěny destilovanou vodou, což také snižuje objem nebezpečného odpadu.
- 3) Je použita nižší koncentrace Mohrovy soli (Zbiral předepisuje  $c=0.1$  M).
- 4) Z důvodu odlišné koncentrace Mohrovy soli je použit jiný koeficient pro výpočet Cox (Zbiral předepisuje 0.03).

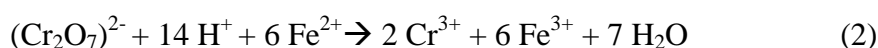
### Pozn. 2 Odvození koeficientu pro výpočet Cox

Nyní vysvětlím odvození koeficientu pro výpočet Cox v několika krocích. Stejně jako u jiných podobných stechiometrických výpočtů je třeba uvažovat stechiometrické koeficienty v chemických rovnicích 1 a 2 a odvozovat na základě látkových množství.

Rovnice popisující děj při oxidaci:



Rovnice popisující děj při titraci:



#### 1. Jaké je látkové množství Mohrovy soli (resp. $\text{Fe}^{2+}$ ) v 1 ml?

$$n(\text{Fe}^{2+}) = c_{\text{real}} * V = c_{\text{teor}} * f * V = 0.051 * f * 0.001$$

2. Jakému látkovému množství dichromanu odpovídá toto látkové množství Mohrovy soli?

na 1 mol dichromanu je potřeba 6 molů Mohrovy soli (rovnice 2)

na x mol dichromanu je potřeba  $0.051 * f * 0.001$  molů Mohrovy soli

$$x = \frac{0.051 * f * 0.001}{6}$$

#### 3. Kolik gramů Cox je zoxidováno tímto látkovým množstvím dichromanu?

1 mol dichromanu zoxiduje  $3/2$  moly Cox (rovnice 1), což odpovídá  $3/2 * \text{Ar}(\text{C}) = 3/2 * 12 = 18$  g Cox

$0.05 * f * 0.001 / 6$  molů dichromanu zoxiduje x g C

$$x = \frac{0.051 * f * 0.001 * 18}{6}$$

#### 4. Kolik gramů Cox bylo zoxidováno, je-li spotřebováno $V_1 - V_2$ ml Mohrovy soli?

$$m(\text{Cox}) = (V_1 - V_2) * \frac{0.051 * f * 0.001 * 18}{6} = (V_1 - V_2) * 0.000153 * f$$

#### 5. Jaký je hmotnostní zlomek (%) Cox ve vzorku?

$$w(\%) = \frac{m(\text{Cox})}{m} * 100 = \frac{(V_1 - V_2) * 0.000153 * f}{m} * 100 = \frac{(V_1 - V_2) * 0.0153 * f}{m}$$



Obr. 32 Stanovení oxidovatelného uhlíku – oxidace chromsírovou směsí za zvýšené teploty a následná titrace roztokem Mohrovy soli

#### ***Příloha 4 – Metodika infračervené spektrometrie***

**Měření NIRS ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i.**

Spektra byla naměřena v oblasti  $10\,000 - 4000\text{ cm}^{-1}$  (což odpovídá 1000-2500 nm) s rozlišením  $2\text{ cm}^{-1}$ . Přibližně 30 g vzorku bylo měřeno v otočné kyvetě o průměru 5 cm a snímáno ve 64 opakování, těchto 64 dílčích scanů bylo zprůměrováno do finálního spektra softwarem Omnic 7.2 (Nicolet Co., Madison, USA). Spektra byla převedena na absorbanci  $A = \log[1/\text{reflektance}]$ . Takto byly naměřeny modelové materiály, 125 směsí a 14 půd. Vzorky byly po prvním měření namlety na kulovém mlýně a poté změřeny znovu. Dále byla spektra zpracována v programu TQ Analyst (Nicolet Co., Madison, USA). Při kalibraci se postupuje tak, že jsou vybrána kalibrační spektra a doplní se k nim známá hodnota predikované veličiny naměřená v laboratoři.

Byly vytvořeny predikční modely pro následující veličiny: celkový obsah uhlíku (C<sub>tot</sub>), obsah recentního uhlíku (C<sub>rec</sub>), obsah uhlíku v uhlí (C<sub>uhli</sub>) a obsah uhlíku v kerogenu (C<sub>jil</sub>).

U **směsí** byly obsahy C<sub>tot</sub> vypočteny jako součet C<sub>rec</sub>+C<sub>uhli</sub>+C<sub>jil</sub>. Recentní uhlík (C<sub>rec</sub>), uhlík obsažený v uhlí (C<sub>uhli</sub>) a v kerogenu (C<sub>jil</sub>) byl vypočten z obsahu celkového C (TC) ve fermentační vrstvě, resp. v uhlí a jílu.

U **půd** byly pro C<sub>tot</sub> použity celkové obsahy uhlíku (TC) zjištěné elementární analýzou na ÚŽP. C<sub>rec</sub> byl vypočítán na základě 14C analýzy. C<sub>uhli</sub> a C<sub>jil</sub> u půdy nelze laboratorně zjistit, proto u těchto veličin nebyly půdy zahrnuty do kalibrace.

Vzniklo celkem **12 kalibračních modelů** lišících se predikovanou veličinou (C<sub>tot</sub>/C<sub>rec</sub>/C<sub>uhli</sub>/ C<sub>jil</sub>), počtem vzorků zahrnutých do kalibrace (125 směsí/125 směsí+ 14 půd) a jemností mletí (hrubé - 2 mm/ jemné - 0.125 mm). U C<sub>uhli</sub> a C<sub>jil</sub> nemohly být do kalibrace zahrnuty půdy, jelikož jejich obsahy nejsou laboratorně zjistitelné, u těchto veličin byla kalibrace vytvořena pouze ze směsí.

**Regiony** zahrnuté do kalibrace byly zvoleny částečně z doporučení softwaru TQ Analyst, z části na základě korelačního a variančního spektra. Korelační spektrum znázorňuje, jak příslušný úsek koreluje s koncentrací kalibrované veličiny. Varianční spektrum znázorňuje, jaká je v příslušném úseku variabilita spekter kalibračního souboru. Do kalibrací je žádoucí zahrnout vlnové délky, kde mají obě spektra maxima (tj. absorbance zde má vysokou korelaci i rozptyl)

Jako **odlehlá** byla z kalibrace vyloučena ta spektra, jejichž rezidua (rozdíl mezi laboratorní a predikovanou hodnotou) byla výrazně vyšší než zbytek vzorků (Michel et al. 2009).

Konkrétně byla použita studentizovaná rezidua, což jsou rezidua vydělená odhadem jejich směrodatné odchylky (Chatterjee & Hadi 1988).

Software TQ Analyst automaticky vypočítá následující **parametry charakterizující kalibrační model**: R, R<sub>cv</sub>, RMSEC, RMSECV. Pro zhodnocení modelů a porovnání s jinými studii byly dále vypočítány koeficienty RPD, EF a RSC z predikcí pro půdy. Do výpočtů byly zahrnuty i půdy vyloučené z kalibrace jako odlehlé, aby nedošlo k nadhodnocení přesnosti modelů. RPD, EF a RSC byly vypočítány ve dvou variantách: (1) z hrubých dat získaných z modelu, (2) z dat upravených tak, že záporné predikční hodnoty byly nahrazeny nulou, aby bylo možné porovnat NIR s ostatními metodami.

Níže je uveden výpočet a charakteristika jednotlivých parametrů.

### **Korelační koeficient (R)**

$$R = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

kde  $s_{xy}$  je kovariance naměřených ( $x$ ) a predikovaných ( $y$ ) hodnot a  $s_x$ ,  $s_y$  jsou jejich směrodatné odchylky, takže vzorec lze dále rozepsat takto:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

kde  $x_i$ , resp.  $y_i$ , je  $i$ -tá naměřená, resp. predikovaná hodnota, a  $\bar{x}$ , resp.  $\bar{y}$  jsou průměrné hodnoty všech naměřených, resp. predikovaných hodnot.

### **Korelační koeficient křížové validace (Rcv, correlation coefficient of cross-validation)**

je obdobou korelačního koeficientu  $R$  - s tím rozdílem, že je vždy  $x_i$  vyjmuta z kalibračního souboru a  $y_i$  se vypočte z modelu vytvořeného bez  $x_i$ .

**Standardní chyba kalibrace (RMSEC, root mean square error of calibration, někdy též jen SEC)** se vypočítá jako odmocnina ze střední kvadratické chyby kalibrace podle vzorce:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{n}}$$

**Standardní chyba křížové validace (RMSECV, root mean square error of cross-validation)** se počítá obdobně jako RMSEC, ale podobně jako u  $R_{cv}$  je vždy  $x_i$  vyjmuta z kalibračního souboru a kalibrační model je tedy vytvořen bez něj.

**Standardní chyba validace (RMSEV, root mean square error of validation, někdy též SEP)** je obdobou RMSEC, s tím rozdílem, že je vybrán validační soubor, který se nepodílí na vzniku kalibračního modelu a pro tato spektra jsou modelem dopočítána  $y_i$  a porovnává s  $x_i$ . Tento výpočet byl potřeba pro výpočet RPD.

### **Reziduální odchylka predikce (RPD, residual predictive deviation)<sup>1</sup>**

Počítá se dle Williamse (1987) jako poměr směrodatné odchylky laboratorních hodnot validačního souboru ( $s_x$ ) k standardní chybě validace (RMSEV):

$$RPD = \frac{s_x(v)}{RMSEV}$$

Lze se setkat i s tímto jemně odlišným způsobem výpočtu RPD (Vasques et al. 2009):

$$RPD = \frac{s_x(v)}{SEP_v} \quad SEP = RMSEV \sqrt{n/(n-1)}$$

<sup>1</sup> Plný název se mezi studii liší - lze se setkat i s názvem „relative percent deviation“ (Bornemann et al. 2008), relative predictive determinant (Thomsen et al. 2009).

Pomocí RPD lze hodnotit úspěšnost predikčního modelu takto (Williams 2004):

0 až 2.3 velmi slabý (very poor); 2.4 až 3.0 slabý (poor); 3.1 až 4.9 slušný; 5.0 až 6.4 dobrý; 6.5 až 8.0 velmi dobrý; 8.1+ výborný.

RPD je poměrně často používáno (Vasques et al. 2009; Michel et al. 2009; Bornemann et al. 2008).

**Účinnost modelování (EF, modelling efficiency)** je relativní odchylka predikovaných dat v poměru k variabilitě laboratorních dat (Loague & Green 1991):

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 - \sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Čím méně variabilní jsou data (mají menší rozptyl), tím přesnější musí být predikce (a nižší RMSE), aby byl model účinný. Čím blíže je hodnota EF 1, tím je model lepší. Za úspěšnou lze považovat predikci s EF větším než 0.90, uspokojivé EF je větší než 0.70 (Bornemann et al. 2008; Michel et al. 2009).

Pro porovnání modelů vytvořených pouze ze směsi a těch modelů, do nichž byly zahrnuty i půdy, popřípadě s vyloučením odlehlých spekter, byl EF vypočten takto:

- 1) pro modely, kdy půdy nejsou zahrnuty do kalibrace

$$EF = \frac{[sd.vyberu^2 \times (n-1)] - \sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{[sd.vyberu^2 \times (n-1)]}$$

kde n=14 (půdy)

- 2) pro modely, kdy jsou půdy zahrnuty do kalibrace všechny

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 - \sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

kde hodnoty  $y_i$  byly získány z plné křížové validace, n=14

- 3) pro modely, kdy jsou do kalibrace zahrnuté jen některé půdy, jelikož část je jich vyloučena jako odlehlé – stejný vzorec jen  $y_i$  jsou pro půdy zahrnuté do kalibrace získány z křížové validace a pro půdy, které byly vyloučeny, jsou dopočítány vytvořeným modelem

**Poměr směrodatné odchytky laboratorních hodnot k standardní chybě křížové validace (RSC, ratio of standard deviation of the laboratory results to standard error of cross-validation)** (Chang et al. 2001) je obdobou RPD, s tím rozdílem, že je použita směrodatná odchytky všech laboratorních hodnot a střední chyba křížové validace.

Úspěšné modely mají RSC větší než 2, uspokojivé větší než 1.4 a neúspěšné menší než 1.4 (Michel et al. 2009).

### **Měření UV-VIS-NIRS v Centru pro studium dopadů globální změny klimatu, v.v.i.**

Spektra byla naměřena v oblasti 350 - 2500 nm s rozlišením 1 nm. Použitý spektrometr Fieldspec měří přímo pouze množství dopadajícího světla, dodávaný software pro kalibraci a převod na reflektanci používá lambertiánský bílý kalibrační spektralon. Spektra byla převedena na absorbanci  $A = \log[1/\text{reflektance}]$  a dále interpretována pouze kvalitativně v programu Excel.

## **Příloha 5 - Matematické zpracování dat**

Data byla statisticky zpracována v programu R verze 2.13.2.

Pokud není řečeno jinak, směrodatnou odchytkou se míní **výběrová** směrodatná odchytky počítaná dle vzorce:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Před použitím parameterických testů byl pro ověření normality dat použit **Shapiro-Wilkův** test ( $p > 0.05$ ). Při párovém t-testu bylo testováno normální rozdělení rozdílů.

### **Srovnání metod**

Pro závěrečné porovnání jednotlivých metod stanovení recentního uhlíku s radiokarbonovou referenční metodou byly vypočteny tyto ukazatele (Hendl 2004):

#### **1. Výpočet parametrů regresní přímky ( $R^2$ , parametry a, b, RSE)**

Regresní vztah má tvar:

$$Y \text{ (testovaná metoda)} = a * X \text{ (referenční metoda)} + b$$

Rozptýlenost bodů kolem této přímky charakterizuje **směrodatná chyba odhadu při regresi**  $s_{y,x}$  (též residual standard error, **RSE**):

$$RSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Kde  $\hat{y}_i$  jsou hodnoty predikované regresí,  $y_i$  jsou hodnoty naměřené testovanou metodou, a  $n-2$  jsou stupně volnosti reziduálních hodnot.

Poměr vysvětlené variability k celkové variabilitě hodnot Y (testované metody) vyjadřuje **koeficient determinace  $R^2$** :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

kde  $\bar{y}$  je průměrná hodnota naměřené veličiny

2. Současně byly vypočítány parametry RSE a  $R^2$  pro případ, kdy  $a=1$  a  $b=0$  což odpovídá hypotéze, že testovaná metoda je identicky přesná s referenční metodou.

3. **Párový t-test** pro přezkoušení přítomnosti systematické odchylky mezi metodami

Průměrný rozdíl mezi metodami je je uváděn jako **systematická odchylka** (angl. **bias**) s 95% intervalem spolehlivosti. Dále je uvedena jeho statistická významnost na hladině 0. Záporný bias značí, že hodnoty naměřené testované metodou jsou statisticky významně nižší než hodnoty referenční. Pro kladný bias platí opak.

## Výpočet obsahu recentního uhlíku na základě 14C analýzy

**Obsah recentního uhlíku  $C_{rec}$**  v půdách byl vypočítán podle následující rovnice:

$$C_{rec} [\%] = C_{org} * C_{recent} \%$$

kde  $C_{org}$  značí celkový obsah organického uhlíku a  $C_{recent} \%$  je podíl recentního uhlíku na celkovém obsahu organického uhlíku v půdě.

**Organický uhlík  $C_{org}$**  byl vypočten takto:

$$C_{org} = TC_{\dot{U}\dot{Z}P} * \frac{C_{org, LG\dot{U}}}{TC_{LG\dot{U}}}$$

tedy vynásobením celkového obsahu uhlíku naměřeného na ÚŽP ( $TC_{\dot{U}\dot{Z}P}$ ) relativním podílem organického uhlíku ( $C_{org, LG\dot{U}}$ ) na uhlíku celkovém ( $TC_{LG\dot{U}}$ ), který byl naměřen v Laboratořích geologických ústavů.

**Podíl recentního uhlíku na celkovém obsahu organického uhlíku  $C_{recent}\%$**  se spočítá podle následující rovnice (Karu et al. 2009; Morgenroth et al. 2004; Rumpel et al. 2003):

$$C_{recent}\% = \frac{pMC_{TOC}}{pMC_{recent}}$$

kde  $pMC_{TOC}$  je aktivita  $^{14}C$  naměřená ve vzorcích půd a  $pMC_{recent}$  je aktivita  $^{14}C$ , kterou předpokládáme v čisté recentní organice.

Pro výpočet  $pMC_{recent}$  jsem použila následující čtyři varianty.

**V první variantě** jsem převzala hodnotu 115  $pMC$  doporučenou jako vhodnou průměrnou hodnotu pro moderní lesní ekosystémy – doporučenou Rumpelovou et al. (1999), použitou také Morgenrothem et al. (2004).

**V druhé variantě** jsem použila hodnotu  $pMC$  změřenou v námi odebrané fermentační vrstvě (tj. 104  $pMC$ ). Uvažujeme-li, že fermentační vrstva představuje nejmladší frakci půdní organiky, lze předpokládat, že  $pMC$  celkové půdní organiky bude pravděpodobně o něco vyšší. Na druhou stranu, uvažujeme-li, že nezanedbatelnou roli budou hrát vstupy uhlíky přes jemné kořeny bylin a dřevin (pod úrovní fermentační vrstvy) a předpokládáme-li, že se budou rychleji rozkládat než opad - je možné, že  $pMC$  celkové organiky může být ovlivňováno „novějším“ uhlíkem s nižším  $pMC$ . Vyvážením těchto dvou procesů může být  $pMC$  fermentační vrstvy vhodným odhadem  $pMC$  celkové organiky.

**Ve třetí variantě** jsem vypočítala  $pMC_{recent}$  pro každou výsypkovou plochu zvlášť, s ohledem na její věk. Postup jsem převzala od Karu et al. (2009).  $pMC$  výsypkové plochy se vypočítá takto:

$$pMC_{recent} = \sum_{j=k}^{n-1} (litter\%_j \times pMC_{atm}_j)$$

Kde  $litter\%_j$  představuje relativní podíl vstupu uhlíku do půdy v roce  $j$ , a  $pMC_{atm}_j$  představuje  $pMC$  v atmosféře v roce  $j$ ,  $n$  je rok vzorkování a  $k$  je rok rekultivace nebo nasypání výsypky.

Data o  $pMC$  v atmosféře jsem získala jako průměrné letní koncentrace  $^{14}CO_2$  v atmosféře v období od nasypání nejstarší výsypky (tzn. od roku 1961) do roku 2012, kdy byly odebrány vzorky. Pro roky 1961-1976 jsem použila jediná dostupná data ze stanice Vermunt, pro roky 1977 až 2003 jsem použila koncentrace ze stanice Schauinsland - tak, jak to doporučují autoři dat (Levin & Kromer 2004). Pro roky 2004 až 2012 jsem použila data z téže stanice publikované v Levin et al. (2013). Použila jsem vždy průměr z období od května do srpna, tak jak je doporučeno tamtéž.

Pro výpočet relativních podílů vstupu uhlíku jsem stejně jako Karu předpokládala že vstupy uhlíku v jednotlivých letech jsou úměrně množství celkové biomasy na výsypce. Použila jsem data z diplomové práce Petra Dvorščíka (2012), který pomocí destruktivní analýzy biomasy na chronosekvenci výsypek navrhl regresní modely pro vývoj biomasy v závislosti na věku výsypky, a to zvlášť pro rekultivované a nerektivované plochy.

Použila jsem následující funkci s parametry uvedenými v Tab. 15.

$$celkova\_biomasa\_v\_roce\_j = s \times (1 - e^{-b \times j^2})$$

Tab. 15 Parametry a koeficienty determinace rovnice pro model vývoje celkové biomasy v čase, odvozené z destruktivní analýzy, dle Dvorščíka (2012, str. 31)

	S	B	R2
nerektivované plochy	260.8094	0.000432	
rektivované plochy	263.4438	0.000318	

Litter%<sub>j</sub> jsem poté vypočítala jako relativní podíl celkové biomasy z roku j k celkové biomase za všechny roky:

$$litter \% j = \frac{celková\_biomasa\_v\_roce\_j}{\sum_{j=k}^{n-1} celkova\_biomasa\_v\_roce\_j}$$

Ve **čtvrté variantě** jsem upravila třetí variantu tak, že jsem do výpočtu pMC nezahrnula poslední dva roky před odběrem vzorku. Lze totiž předpokládat, že čerstvý opad neovlivňuje významně obsah uhlíku v půdě (Kramer et al. 2010). Naopak ponechají-li se poslední roky ve výpočtu, poměrně silně ho ovlivní, jelikož biomasa je zde nejvyšší a pMC naopak v posledních letech prudce klesá.