

# Ekstrakcija organske faze tla

---

Milovan, Grazia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:063296>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Grazia Milovan

**EKSTRAKCIJA ORGANSKE FAZE TLA**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Grazia Milovan

**EKSTRAKCIJA ORGANSKE FAZE TLA**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: doc.dr.sc. Mirna Petković Didović, dipl.ing.kemije

Diplomski rad obranjen je dana 30.09.2022. u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof. Dalibor Broznić, dipl.sanit.ing.

2. izv.prof. Marin Tota, mr.ph.

3. doc.dr.sc. Mirna Petković Didović, dipl.ing.kemije

Rad ima 51 stranicu, 21 sliku, 6 tablica, 39 literaturnih navoda.

## **ZAHVALE**

*Ponajprije, želim se zahvaliti mentorici doc.dr.sc. Mirni Petković Didović na ukazanom povjerenju i neizmjernom trudu da mi učini temu što zanimljivijom i pristupačnijom. Hvala joj na strpljenu i prenesenom teorijskom i praktičnom znanju te osmišljavanju raznih načina kojima smo brže i jednostavnije došle do željenih rezultata.*

*Nadalje, htjela bih se zahvaliti izv. prof. dr. sc. Daliboru Brozniću na svim ustupljenim materijalima i pomoći pri eksperimentalnom dijelu. Veliko hvala Univerzi v Ljubljani – Biotehniška fakulteta (Jure Žigonu, PhD) i Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (mr.sc. Sandra Marinac) na pomoći pri izradi praktičnog dijela diplomskog rada.*

*Također, želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na vjeri u mene i podršci kroz cijelo moje obrazovanje. I za kraj, ogromno hvala mojoj kćerkici Kelly i njenom tati Eriku koji su me strpljivo čekali doma dok ne završim studij u drugom gradu.*

## SADRŽAJ

SAŽETAK.....	1
SUMMARY .....	2
1. UVOD .....	3
1.1. Sastav organske tvari tla .....	3
1.2. Funkcije organske tvari tla .....	5
1.3. Antropogeni utjecaj na organsku tvar tla.....	6
1.4. Ekstrakcija organske tvari tla – nedostaci .....	8
1.5. Ekstrakcija organske tvari tla – metoda Kononove i Bjeličikove .....	11
1.6. Ekstrakcija organske tvari tla – metoda po Ellenbrocku .....	12
1.7. Liofilizacija.....	12
1.8. Mineralna faza tla .....	13
1.9. FTIR tehnike analize tla .....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci.....	17
3.1.3. Kemikalije.....	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Određivanje sastava SOM-a po metodi Kononove i Bjelčikove .....	18
3.2.2. Ekstrakcija SOM-a u po radu Ellerbrock-u [17].....	22
3.3.3. Određivanje sadržaja SOM-a u tlu bikromatnom metodom .....	23
3.3.4. Elementarna analiza .....	25
3.3.5. ATR-FTIR spektroskopija .....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Rezultati ekstrakcije i spaljivanja .....	27

4.2.	Sadržaj organske faze u tlima .....	28
4.3.	Sastav organske faze: elementarna analiza.....	29
4.4.	Sastav organske faze: ATR-FTIR spektri.....	30
4.3.1.	Glavna obilježja FTIR spektara uzoraka tla.....	30
4.3.2.	FTIR spektri mineralne faze tla .....	33
4.3.3.	FTIR spektri cjelovitih uzoraka tla .....	34
4.3.4.	FTIR spektri alkalnih ekstrakata .....	36
4.5.	Rasprava .....	41
5.	ZAKLJUČAK .....	43
6.	LITERATURA .....	44
	PRILOZI.....	48
	ŽIVOTOPIS .....	50

## SAŽETAK

Alkalna ekstrakcija organske faze tla postupak je star gotovo 150 godina. Unatoč tome što je osnovno načelo uvijek isto, postoje brojne metode alkalne ekstrakcije, koje se međusobno razlikuju po jednoj ili više varijabli.

U ovom su istraživanju korištena tri tla s različitih lokacija – Slavonska crnica (SC), Bukva Zlobin (BZ) i Plasa Bor (PB). Tla su podvrgnuta alkalnoj ekstrakciji organske faze tla na tri načina. Načini se međusobno razlikuju po vrsti kiseline (sumporna i klorovodična) koja je korištena za zakiseljavanje i krajnjem pH do kojeg se zakiseljavalo (pH 7 odnosno pH 2). Kemijski sastav alkalnih ekstrakata ispitan je novijom metodom FTIR spektrometrije, tj. metodom prigušene totalne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed spectroscopy*, ATR-FTIR), kako bi se utvrdilo utječe li – i na koji način – promjena varijabli tijekom ekstrakcije na kemijski sastav alkalnih ekstrakata. Analiza je upotpunjena ATR-FTIR analizom organske faze cjelovitih tala, analizom mineralne faze, elementarnom (CHN) analizom, te spektrofotometrijskim određivanjem količine organske faze. Dodatni cilj rada bio je utvrditi praktičnost i primjenjivost ATR-FTIR spektrometrije za kemijsku analizu tla.

Rezultati su pokazali da odabir kiseline (sumporna/klorovodična) ne utječe na kemijski sastav alkalnih ekstrakata, dok krajnji pH zakiseljavanja jest utjecajan čimbenik. Ekstrakcijom pri pH 7, ekstrakti su sadržavali značajne količine mineralne faze. U ekstraktima dobivenima ekstrakcijom pri pH 2, količina mineralne faze smanjila se, ali je i dalje bila prisutna. ATR-FTIR spektri mineralne faze bili su skladu s prethodno određenim teksturalnim sastavom tala, i pokazali su se nužnima za točnu analizu ATR-FTIR spektara ekstrakata i cjelovitih uzoraka tla. Analizom spektara ekstrakata utvrđeno je da je kemijski sastav organske faze PB i BZ tla gotovo identičan, s huminskim kiselinama kao dominantnom komponentom. Ekstrakti SC tla sadržavali su veći udio fulvinskih kiselina. Ovakvi rezultati pokazuju da ATR-FTIR tehnika, u svom osnovnom obliku, može na brz, jednostavan i jeftin način dati korisne informacije o kvalitativnoj analizi tla, ali za kvantitativnu, detaljnu i preciznu analizu nužno ju je upotpuniti drugim komplementarnim tehnikama.

**Ključne riječi:** organska tvar tla (SOM), ekstrakcija, prigušena totalna refleksija (ATR-FTIR)



## **SUMMARY**

Alkaline extraction of soil organic matter (SOM) is an ancient procedure, almost 150 years old. Despite the fact that the basic principle remains unaltered, there are multiple methods of alkaline extraction differing among themselves in one or more variables.

In this research, we used three soils from different locations, onto which we employed three different methods of alkaline extraction. The methods differ in acids used for acidification (sulphuric vs. hydrochloric) and the final pH down to which the acidification was performed (pH 7 vs. pH 2). Chemical composition of the extracts was analysed by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), in order to establish whether – and how – the changes in extraction variables affect the chemical composition of alkaline extracts. The analysis is supplemented by ATR-FTIR analysis of the pristine soil samples, mineral phase analysis, elemental (CHN) analysis, and by spectrophotometric determination of SOM quantity. The additional goal of the study was to examine the practicality and usefulness of ATR-FTIR technique in soil analysis.

The results showed that the choice of acid does not influence the chemical composition of the extracts, while the final acidification pH does. The extracts obtained by pH7-extraction contained significant amounts of mineral phase. In extracts obtained by pH2-extraction, the amount of mineral phase diminished, but it was still present. ATR-FTIR spectra showed good correlation with previously determined textural analysis of soils, and they proved to be very useful for accurate analysis of extracts' spectra. The analysis of extracts' spectra showed that the chemical composition of PB's and BZ's extracts are virtually identical, containing predominantly humic acids. On the other hand, SC extracts contained higher amount of fulvic acids. These results demonstrate that ATR-FTIR, in its basic form, can provide useful information for qualitative soil analysis in a fast, simple and affordable manner, but for quantitative, detailed and precise analysis, it should be supplemented with other complementary techniques.

**Key words:** soil organic matter (SOM), extraction, attenuated total reflectance (ATR-FTIR)

# 1. UVOD

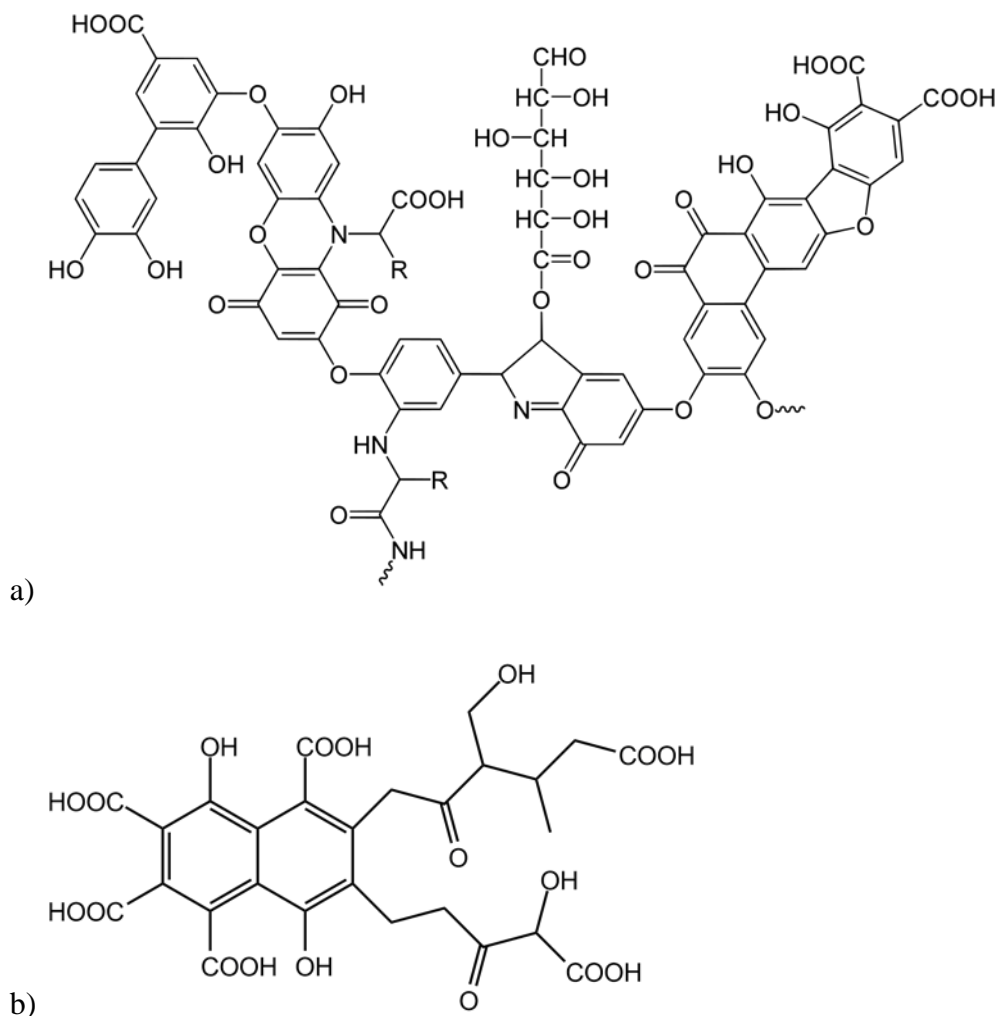
## 1.1. Sastav organske tvari tla

Dugogodišnja teorija ukazuje da je organska tvar tla (engl. *soil organic matter*, SOM) sastavljena od inherentno stabilnih i kemijski jedinstvenih spojeva. Rana istraživanja temeljena na metodi ekstrakcije pretpostavljala su da proces "humifikacije" stvara nekooperativne (otporne na raspadanje) i velike "humusne tvari" koje čine većinu "humusa" tla. Ta teorija je opovrgnuta pojavom dokaza koji ne podržavaju stvaranje velikih molekula i postojanih "humusnih tvari" u tlu. Dakle, organska tvar tla je beskonačnost organskih spojeva koji se progresivno raspadaju. Tradicionalni koncepti "humifikacije" ograničavaju promatranja organske tvari tla na njenu topljivost u alkalnim ekstraktima, za razliku od emergentnog pogleda na organsku tvar temeljenog na topljivosti u vodi i njezinoj dostupnosti mikroorganizmima. Biološki, fizikalni i kemijski procesi transformacije pretvaraju mrtvi biljni materijal u organske produkte koji su sposobni formirati bliske veze s mineralima tla, što otežava proučavanje prirode organske tvari tla [1].

Poznato je da organsku tvar tla čine krupnije čestice i koloidne čestice, koje se dijele na humus i humusne tvari. Humus je produkt nepotpunog razlaganja biljnih i životinjskih ostataka pri čemu se oni djelomično mineraliziraju, a djelomično humificiraju. Proces mineralizacije podrazumijeva razlaganje organske tvari sve do početnih mineralnih tvari koje mobilizacijom postaju dostupni biljkama za daljnji rast i razvoj, dok je humifikacija proces stvaranja humusa iz djelomično razložene svježije organske tvari pod utjecajem različitih mikroorganizama [2].

Humusne tvari dijele se na nespecifične i specifične. Nespecifične humusne tvari čine 10 – 15 % ukupne količine humusa i sastoje se od bjelančevina, aminokiselina, ugljikohidrata, poliuronskih kiselina, aminosaharida, polifenola, vitamina, antibiotika, smola i lignina. Specifične humusne tvari obuhvaćaju 80 – 95 % humusnih tvari i predstavljaju visokomolekularni kompleksni produkt humifikacije [3]. Dijele se na 3 podskupine:

- 1) Huminske kiseline – kompleksne kiseline koje sadrže ione koji omogućuju nastanak kelatiziranih spojeva pomoću kojih omogućavaju i reguliraju biodostupnost metalnih iona u zoni rasta biljke. Topljive su i tamne su boje.



**Slika 1.** Općenita struktura a) huminskih kiselina i b) fulvinskih kiselina.

- 2) Fulvinske kiseline – vrsta humusnih kiselina, niske molekulske mase, kiselije i topljivije od huminskih, žućkasto do crvenkaste boje.

Huminske i fulvinske kiseline pretvaraju organske spojeve u oblik koji je biljci najprihvatljiviji i najlakši za preuzimanje iz supstrata. Omogućuju i bolje zadržavanje vode, a dodatno umanjuju ili onemogućuju nastanak toksičnih tvari u području rasta biljke.

- 3) Humini – reducirani anhidridi huminskih kiselina, crne su boje i nisu topljivi. Za svojstva i procese u tlu su inertni.

Upravo zbog prisutnosti velikog konjugiranog sustava kao glavne sastavnice cjelokupne kemijske strukture, crnije tlo općenito znači tlo bogato organskom fazom.

## 1.2. Funkcije organske tvari tla

Organska tvar tla najvažniji je pokazatelj kvalitete tla. Njezin udio uobičajeno je niži od 5 %, ali je od iznimne važnosti kako za tlo, tako i za cijeli život na Zemlji [4]. SOM je vrlo značajan za:

- sekvestraciju ugljikovog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) iz atmosfere,
- puferska svojstva tla,
- redukciju erozije i zbijanja tla,
- regulaciju klime,
- regulaciju poplava,
- kruženje nutrijenata,
- život brojnih organizama,
- uklanjanje zagađivala i pročišćavanje vode.

Također, važan je izvor hrane, goriva, građevinskog materijala i farmaceutika. Razmjena hranjivih tvari, energije i ugljika između organske tvari tla, okoliša tla, vodenih sustava i atmosfere važna je za poljoprivrednu produktivnost, kvalitetu vode i klimu. Organska tvar tla sadrži više organskog ugljika (3500 ppm – 4800 ppm) nego ukupna globalna vegetacija (420 ppm – 620 ppm) i atmosfera (829 ppm) zajedno. Iz tog razloga, otpuštanje i pretvaranje u ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) ili metan ( $\text{CH}_4$ ) čak i malog udjela ugljika sadržanog u organskoj tvari tla može uzrokovati kvantitativno relevantne varijacije u atmosferskim koncentracijama ovih stakleničkih plinova. Štoviše, organska tvar zadržava hranjive tvari kao i zagađivače u tlu, što poboljšava rast biljaka i štiti kvalitetu vode. Tlo je također važan izvor organske tvari u vodenim ekosustavima i odgovorno je za polovicu recikliranja ugljika u atmosferi [1].

Postoje tri glavna načina sekvestracije atmosferskog  $\text{CO}_2$ . Jedan od tih tri načina jesu oceani. Što je naizgled odlično rješenje jer su ogromni i ima ih puno, točnije čine oko 70 % Zemljine površine. Također, vrlo su i uspješni u ovome „zadatku“. Međutim, problem je taj da time dolazi do njihovog zakiseljavanja, odnosno nastajanja karbonatne kiseline koja, naravno, negativno utječe na živi svijet u njima koji je prilagođen na točno određeni pH. Promjena pH dovodi do sve manjeg broja školjkaša, mekušaca i koralja koji se, osim po broju, smanjuju i građom. Dakle, oceani su odličan medij za otklanjanje ugljikovog dioksida iz atmosfere, ali dovode do daljnjeg problema koji opet zahtjeva rješavanje.

Poznato je da su biljke iznimno dobre u ovom „zadatku“ jer fotosintezom iz ugljikovog dioksida i vode pomoću svjetlosne energije i klorofila stvaraju organske tvari i istodobno otpuštaju kisik u atmosferu. Međutim, sve veća deforestacija (namjerno krčenja šuma radi prenamjene u druge svrhe) značajno smanjuje udio ugljikovog dioksida koji iz atmosfere može biti uklonjen na ovaj način.

Tlo je svuda oko nas i – osim što ima iznimnu moć sekvestracije CO<sub>2</sub> – tlo ga vrlo dobro i iskorištava, stvaranjem organske tvari. Za razliku od oceana, tlo je u „win-win“ situaciji te bi se njemu trebalo posvetiti s puno većom pažnjom od one koju trenutno ima. U prilog tome ide i činjenica da bi povećanjem organske faze za samo 1 % tlo moglo upiti 10 000 kg ugljikovog dioksida i 170 000 litara vode po hektaru zemlje, čime bi se spriječio problem suša i poplava.

### 1.3. Antropogeni utjecaj na organsku tvar tla

Čovjek, kao i na sve ostalo na kugli zemaljskoj, ima veliki utjecaj i na tlo, konkretnije na samu organsku tvar. Nažalost, većinom je taj utjecaj negativan. Svojim nepromišljenim aktivnostima i načinom poljoprivrede uzrokovao je, i dalje uzrokuje razgradnju, odnosno smanjenje organske tvari tla.

#### *Negativni učinci*

Dugačak je niz nepovoljnih radnji koje dovode do osiromašenja tla, a najutjecajnije aktivnosti su neadekvatna obrada tla (plug, oranje), deforestacija, spaljivanje žetvenih ostataka, masovna uporaba pesticida i umjetnih gnojiva te sve veći uzgoj iste kulture koja raste u određeno doba godine, a u preostalom periodu tlo je ostavljeno nezasađeno. Sve navedene radnje dovele su do smanjenja broja i vrsta mikroorganizama u tlu bez čije aktivnosti izostaje stvaranje humusa kao i održivi razvoj [5].

Povezano s tim, tlo umjesto da „uzima“ ugljikov dioksid, on ga ispušta i time povećava njegovu koncentraciju u atmosferi čime doprinosi globalnom zatopljenju, upravo suprotno njegovoj istinskoj prirodi.

Obrada tla podrazumijeva oranje na 25 – 35 cm dubine, gdje se upravo nalazi organska tvar tla koja se ovim postupkom uvelike narušava. Dolazi do brže dekompozicije zbog povećanog

unos kisika (aeracije) i sadržaja vode u tlo te povišene temperature [6]. Evidentno je da se na ovaj način gubi plodnost tla, a stručnjaci upozoravaju da – nastavimo li s trenutnom praksom – ostaje nam još svega 60-ak žetvenih godina [7].

Sječe šuma i preoravanje prirodnih travnjaka dovode do najvećeg gubitka organske tvari tla čime uvelike opada bioraznolikost i aktivnosti u tlu.

Osiromašenju tla doprinose i zamjene uzgoja višegodišnjih kultura jednogodišnjim, kao i uzgoj u monokulturi umjesto u plodoredu. Na taj način dolazi do pojave predatorskih vrsta koje se zbog narušene biološke raznolikosti lakše nastanjuju u području korijena biljaka.

Ostavljanje tla „golim“ smatra se „odmorom“ za tlo nakon završenog proizvodnog ciklusa određene poljoprivredne kulture. Međutim, ovakva praksa je iznimno štetna jer dolazi do rasta korova, a bez biljaka tlo gubi vodu, ugljikov dioksid i nutrijente [5].

#### *Pozitivni učinci*

Čovjek na tlo i povećanje organske faze može itekako utjecati.

Prvi korak k tome je reducirana obrada tla ili totalni izostanak iste. Ovakav način poljoprivrede ima za osnovni cilj održavanje zdravlja poljoprivrednog zemljišta, smanjenje uporabe pesticida i mineralnih gnojiva, poboljšanje bioraznolikosti, smanjenje proizvodnih troškova i povećanje prinosa. Tehnologija direktne sjetve zahtjeva dugotrajno planiranje, više znanja i suradnje, kao i specijalizirane sijačice.

Postupak malčiranja podrazumijeva prekrivanje zemljišta organskim pokrovnim materijalima u cilju zaštite tla od atmosferskih utjecaja. Tlo pod pokrivačem duže akumulira vlažnost, zadržava mrvičastu strukturu, ostaje toplije, ali i štiti zemljište od pregrijavanja (temperatura je uravnotežena). Također, sprječava eroziju, rast i razvoj korova, smanjuje slijeganje tla i stvaranje pokorice.

Uz uporabu organske gnojidbe, komposta, stajnjaka i plodoreda, od velike pomoći za tlo je i zelena gnojidba (sideracija), odnosno planirano unošenje nadzemne zelene mase različitih biljnih kultura uzgojenih upravo za tu namjenu. Njome se znatno poboljšavaju sva svojstva tla (fizikalna, kemijska i biološka).

Ovakvim načinom proizvodnje smanjuje se upotreba fosilnih goriva kao i ulaznih troškova, povećava se profit poslovanja i pridonosi se očuvanju okoliša tako što je tlo sačuvano za buduće generacije. Jedini „problem“ je što je, od početka do uspješne prakse potpunog izbacivanja pluga, dugotrajan proces. Mnogi ne shvaćaju da je mikroorganizmima i glistama u tlu potrebno vrijeme za izgradnju kvalitetnog i plodnog tla. Ukoliko dođe do zbijanja tla moguće je koristiti dodatne biološke i precizno planirane mehaničke mjere (obrada teškom tanjuračem ili prorahljivačem) koje dovode do minimalne uznemirenosti tla kojom se ne narušava podzemna fauna.

Primjer jedne veće reducirane obrade tla je Ukrajina gdje prosječni prinosi bez uporabe pluga dosežu 9 tona pšenice, 7 tona ječma, 4, 5 tona uljane repice te 3,7 tona soje.

#### 1.4. Ekstrakcija organske tvari tla – nedostaci

Istraživanje organske tvari u tlu je vrlo zahtjevno jer su organski spojevi pomiješani s mineralima u tlu i često se na njih vežu. U obradivom tlu organska tvar, kao što je već navedeno, obično čini manje od 5 % i povijesno se mogla raspoznati samo po tamnoj boji. Prije nego što su napredne spektroskopske metode postale dostupne početkom 1990-ih, istraživanje organske tvari u tlu zahtijevalo je odvajanje organske faze od mineralne kroz postupak ekstrakcije. Najučinkovitiji od ovih postupaka odvajanja u smislu ekstrahirane mase je ekstrakcija lužinom, koja datira iz izvješća objavljenog 1786. Iako je ekstrakcija nepotpuna, selektivna i sklona stvaranju artefakata, postupak je postao široko prihvaćen, a njegovi produkti univerzalno prihvaćeni kao eksperimentalne zamjene za organsku tvar tla. Zabrinutost da alkalni pripravci nisu prikladni predstavnici organske tvari tla pojavila se još 1888., a 50 godina kasnije predloženo je da se „humusna“ nomenklatura treba odbaciti jer se izraz odnosi samo na materijal dobiven posebnim postupkom. Nažalost, te su zabrinutosti odbačene, a ne opovrgnute.

Među tisućama publikacija o „humusnim tvarima“, niti jedna neovisno ne potvrđuje – na primjer, izravnim spektroskopskim promatranjem – da su „humusne tvari“ ekstrahirane lužinama zapravo komponente organske tvari koje postoje odvojeno u okolišu tla. Među najjačim argumentima u korist odbacivanja pojma „humusnih tvari“ je nepostojanje bilo kakvog dogovora unutar šire znanstvene zajednice o tome kako se takvi materijali definiraju. „Humusne tvari“ mogu se opisati u znanostima o tlu na tri različita načina: a) strogo

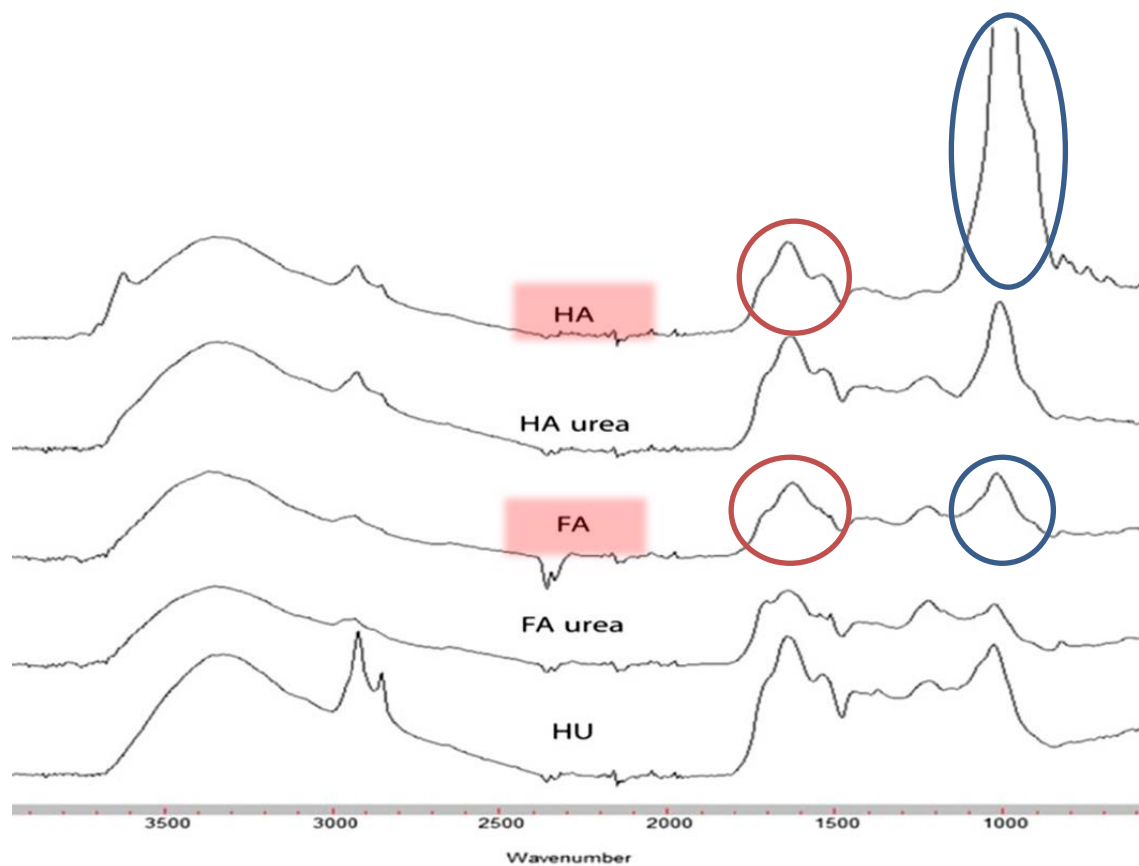
operativno, prema onome što se može ekstrahirati alkalnom otopinom, s daljnjim potkategorijama „huminskih“ i „fulvinskih“ kiselina kao i „humina“ koji se ne može ekstrahirati; b) kao postojeća tvar koja nije samo operativni konstrukt; c) kao kombinacija to dvoje. Različite istraživačke zajednice koriste isti rječnik s vrlo različitim konotacijama, do te mjere da su kontradiktorne: u znanosti o tlu, smatra se da „humusne tvari“ imaju velike molekularne mase; u znanostima o okolišu karakteriziraju ih kao male fragmente; a klasični udžbenik vodene geokemije opisuje ih kao spojeve promjenjive mase i sastava. Ova su se gledišta tijekom vremena razvila, tako da sada nije očito što izraz „humusne tvari“ želi prenijeti osim ako nije eksplicitno definiran. Unatoč ovoj nesigurnosti i novom uvidu iz modernih spektroskopskih tehnika, produkti alkalne ekstrakcije i dalje se tretiraju kao fizički postojeći entiteti, s istraživačkim pokušajima usmjerenim na usklađivanje teorije s ponašanjem i svojstvima komponenata tla koje su definirana isključivo topljivošću pri alkalnom pH. Iz navedenih razloga, ekstrakte dobivene u ovom istraživanju nazivamo „alkalni ekstrakti“, umjesto „organska faza tla“ tj. SOM.

Otkako je prvi put korištena prije više od 200 godina, tehnika alkalne ekstrakcije prošla je kroz mnoga poboljšanja, ali osnovni princip ostao je identičan. U svojoj modernoj verziji, postupak uključuje dodatak otopine natrijevog hidroksida do vrlo visokog pH (~13) u uzorak tla. Pri ovom pH, većina funkcionalnih skupina koje sadrže kisik u organskoj tvari je ionizirana, čineći organske spojeve koji sadrže takve skupine puno topljivijima u vodi.

Nakon dodavanja protona otopljenim organskim materijalima, taloži se tamna krutina koja se obično naziva huminskim kiselinama. Organska tvar koja ostaje topiva nakon ponovnog zakiseljavanja naziva se fulvinskim kiselinama. ATR-FTIR spektroskopija u mogućnosti je razlikovati ove dvije frakcije, ponajprije po iznimno izraženoj vrpici pri  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  u slučaju huminskih kiselina, dok je kod fulvinskih kiselina ta vrpca sličnog intenziteta kao vrpca pri  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  (Slika 2) [8].

Značajan udio organske tvari koji ne reagira na tretman, bilo zbog nedostatka funkcionalnih skupina koje se mogu ionizirati ili zato što je bio zaštićen od oštrog alkalnog tretmana mineralnom zaštitom, naziva se humin. Ovaj postupak u više koraka stvorio je potrebu za razlikovanjem nekoliko kategorija onoga što čini organsku tvar tla. Te se kategorije uvelike razlikuju među autorima. Konceptualni problem s definiranjem huminskih tvari postupkom ekstrakcije je trostruk:





**Slika 2.** ATR-FTIR huminskih kiselina (HA) i fulvinskih kiselina (FA). Preuzeto i preuređeno iz rada [8]

- 1) Ekstrakcija je uvijek nepotpuna, ostavljajući 50 – 70 % organske tvari neekstrahiranom, što se zatim definira kao netopljiva frakcija tj. humin. To isključuje upotrebu huminskih i fulvinskih kiselina koje se mogu ekstrahirati kao prvi predstavnici ukupne organske tvari tla. Alkalna otopina će također izdvojiti dijelove frakcija tla koji nisu namijenjeni za uključivanje u humusne tvari, kao što je živa biomasa, jednostavne i prepoznatljive biomolekule (često uključene kao nehumusne tvari unutar humusa), otopljene organske tvar ili neraspadnuto lišće i korijenje (izolirano kao čestice). Često je nejasno kako se ove zasebno procijenjene frakcije trebaju razlikovati od neekstrahiranih humina (koji su dio huminskih tvari). Zbroj humusnih i nehumusnih tvari definiran je kao humus, termin koji se ponekad smatra sinonimom za organsku tvar tla.
- 2) Oštar alkalni tretman pri pH 13 ionizira spojeve koji se nikada ne bi disocirali unutar šireg pH raspona tla (pH 3,5 do pH 8,5), dajući rezultirajućim huminskim i fulvinskim

frakcijama karakter visoko selektivnih pripravaka pretjerane kemijske reaktivnosti, a ne pravih izolata.

- 3) Razvoj ove metode ekstrakcije prethodio je teoriji, dovodeći znanstvenike u iskušenje da razviju objašnjenja za sintezu materijala koji nalikuju operativno ekstrahiranim humusnim tvarima, umjesto da razviju razumijevanje prirode svih organskih tvari u tlu. Tijekom vremena, ovaj pokušaj da se mehanički objasni nastanak operativno definiranih huminskih tvari također je doveo do njihove definicije kao produkata sinteze bez poveznice s alkalnom ekstrakcijom [1].

#### 1.5. Ekstrakcija organske tvari tla – metoda Kononove i Bjeličkove

U ovom istraživanju korišteno je određivanje sastava SOM-a po uhodanoj metodi Kononove i Bjeličkove [9], koja se koristi od 1960-tih. Prema toj metodi, iz uzoraka tala prvo trebaju biti uklonjeni svi korijenčiči i ostali biljni ostatci; zatim se uzorak drobi u tarioniku s tučkom i prosije kod sito s promjerom pora 1 mm. Ukoliko se radi o zaslanjenim tlima, prisutni su kloridi te se prethodno uzorci tla ispiru postupkom dekantiranja, a destiliranoj vodi dodaje su nekoliko kapi razrijeđene  $H_2SO_4$ . Nakon ispiranja uzorak se suši na zraku pri sobnoj temperaturi.

Za ekstrakciju organske faze tla smjesom natrijeva pirofosfata ( $Na_4P_2O_7 \times 10 H_2O$ ) i natrijevog hidroksida (NaOH) uzimaju se određene odvage tala, 2 – 20 g ovisno o procijenjenoj količini humusa, koje se zatim miješaju s otopinom natrijevog pirofosfata i natrijevog hidroksida. Nakon miješanja, suspenzija se ostavlja u mirovanju 16 – 18 sati, nakon čega se filtrira, a hvata se filtrat.

Za određivanje ukupnog SOM-a, uzima se određeni volumen filtrata, ovisno o boji (svjetlini) filtrata, koji se potom zakiseljava razrijeđenom sulfatnom kiselinom. U metodi se navodi da zakiseljavanjem do pH 7, nakon čega se otopina ostavlja da ispari do suha, dobiveni suhi talog predstavlja ekstrakt ukupnog SOM-a, tj. i huminske i fulvinske frakcije.

Za ekstrakciju huminskih kiselina, uzima se veći volumen filtrata (i do 50 mL, ovisno o svjetlini), i zakiseljava koncentriranom sumpornom kiselinom do pojave mutnoće i taloga, odnosno do pH 2. Sadržaj se grije pola sata na 80 °C i ostavlja se u čaši do idućeg dana kako bi se huminske kiseline u potpunosti istaložile, nakon čega se suspenzija filtrira, a hvata se

talog. Talog se ispiri do prestanka pojave žute boje u filtratu. U metodi se navodi da se na talog dobiven na ovaj način predstavlja ekstrakt samo huminskih kiselina.

#### 1.6. Ekstrakcija organske tvari tla – metoda po Ellenbrocku

Zbog utvrđivanja utječu li određene promjene u postupku ekstrakcije utječu (i ako da, kako) na kemijski sastav ekstrakata, korištena je i procedura opisana u radu Ellenbrock i Gerke [9]. Uz alkalnu ekstrakciju, u njihovom je istraživanju SOM ekstrahiran i samo vrućom vodom. Za alkalnu ekstrakciju korišten je samo natrijev pirofosfat (bez NaOH) i miješanje u trajanju 6 sati pri sobnoj temperaturi. Čvrsti ostaci odvojeni su kao i u prethodnoj metodi. Filtrat se u ovoj metodi zakiseljava s HCl (a ne s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) do pH 2. Precipitacija je smatra završenom nakon 12 sati, a supernatant se odvaja od taloga centrifugiranjem na 1400 okr/min tijekom pola sata. Ekstrakti se ispiru od soli i suše smrzavanjem tj. liofilizacijom.

U ovom je radu ispitana i optimizirana metoda dobivanja mineralne faze tla. Utvrđeno je da je optimalni način žarenje uzoraka tijekom 8 sati na 430 °C. Žarenje pri višim temperaturama dovele bi do promjene mineralnih struktura koje bi modificirale FTIR spektre i smanjile pouzdanost rezultata.

#### 1.7. Liofilizacija

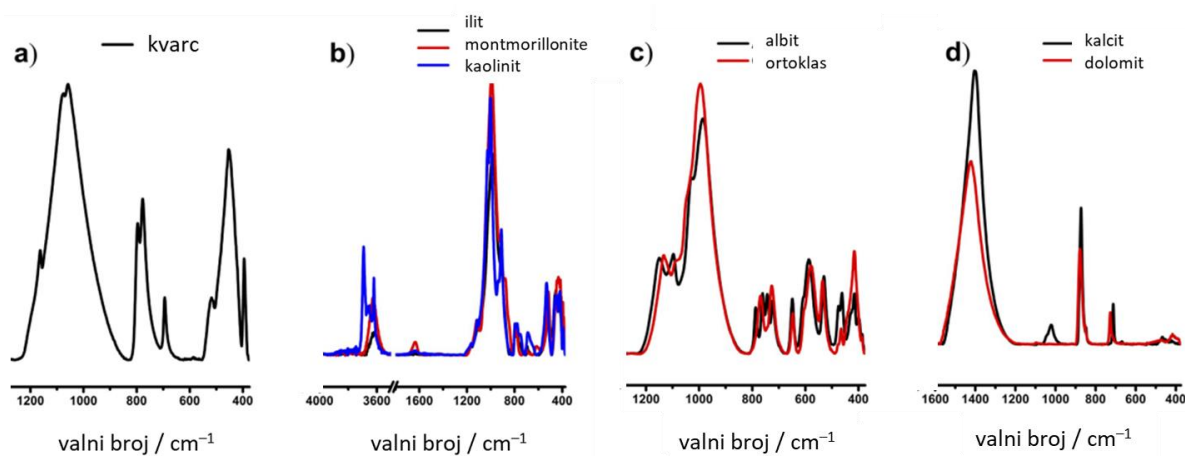
Liofilizacija je postupak sušenja u smrznutom stanju. Ova se tehnika primjenjuje za sušenje materijala osjetljivog na toplinu. Njenim korištenjem čuvaju se biološki aktivni sastojci, strukture proteina ili pak žive mikrobne stanice. Željeni materijal najprije se ohladi na temperaturu između -10 °C i -40 °C. Nakon toga, u visokom vakuumu, voda se uklanja sublimacijom. Temperatura sušenja povećava se proporcionalno sa sublimacijom, odnosno sa smanjenjem udjela vode te na kraju postiže temperaturu najviše 30 °C do 40 °C. Primjenom zaštitnih sredstava poput saharoze, polivinilpirolidona, glicerina i laktoze sprječavaju se moguća oštećenja pri smrzavanju ili sušenju. Prehrambeni proizvodi se pakiraju u vakuum ambalažu i dugotrajni su. Mikrobne kulture se pakiraju u staklene ampule i čuvaju pri 4 °C te se mogu koristiti za kultivaciju nekoliko godina.

U ovom su istraživanju uzorci liofilizirani kako bi se dobili što pouzdaniji FTIR spektri, zbog osjetljivosti sastojaka SOM-a na toplinu.

## 1.8. Mineralna faza tla

Mineralna (anorganska) faza tla čini oko 45 % ukupne mase tla (oko 25 % je voda, 25 % je zrak, a oko 5 % je SOM) [10]. Sastav mineralne (anorganske) faza tla drastično varira od tla do tla, i priopćava se tzv. teksturnom analizom. Glavne sastavnice su:

- krupni i sitni pijesak, po kemijskom sastavu kvarc,  $\text{SiO}_2$ ;
- glina – minerali sastavljeni od pravilno naslaganih slojeva koji isto sadržavaju Si–O veze, te –OH skupine na površini slojeva; najzastupljenije glinae u tlu su kaolinit, montmorilonit i ilit;
- minerale iz feldspat skupine, od kojih su u tlu najzastupljeniji albit i ortoklas;
- minerale kalcitne skupine, prvenstveno kalcit,  $\text{CaCO}_3$ .



**Slika 3.** ATR-FTIR spektri glavnih komponenti mineralne faze tla. a) kvarc iz pijeska, b) najzastupljenije vrste glina; c) najzastupljenije vrste feldspata; d) minerali kalcitne skupine. Preuzeto i preuređeno iz ref. [11].

ATR-FTIR spektroskopija pokazala se korisnom za razlikovanje pojedinih sastavnica mineralne faze tla. Reprezentativni primjeri spektara prikazani su na Slici 3. Uočljivo je da se najintenzivnija vrpca kvarca nalazi pri  $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ , kod glina je dominantna oštra vrpca pri  $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ , kod feldspata široka vrpca koja se proteže od  $1200 \text{ cm}^{-1}$  do  $900 \text{ cm}^{-1}$ , a kod kalcita pri  $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ .

## 1.9. FTIR tehnike analize tla

Uzorci tla mogu se analizirati FTIR spektroskopijom korištenjem različitih metoda, od kojih su najuobičajenije transmisijska metoda, spektroskopija infracrvene Fourierove transformacije

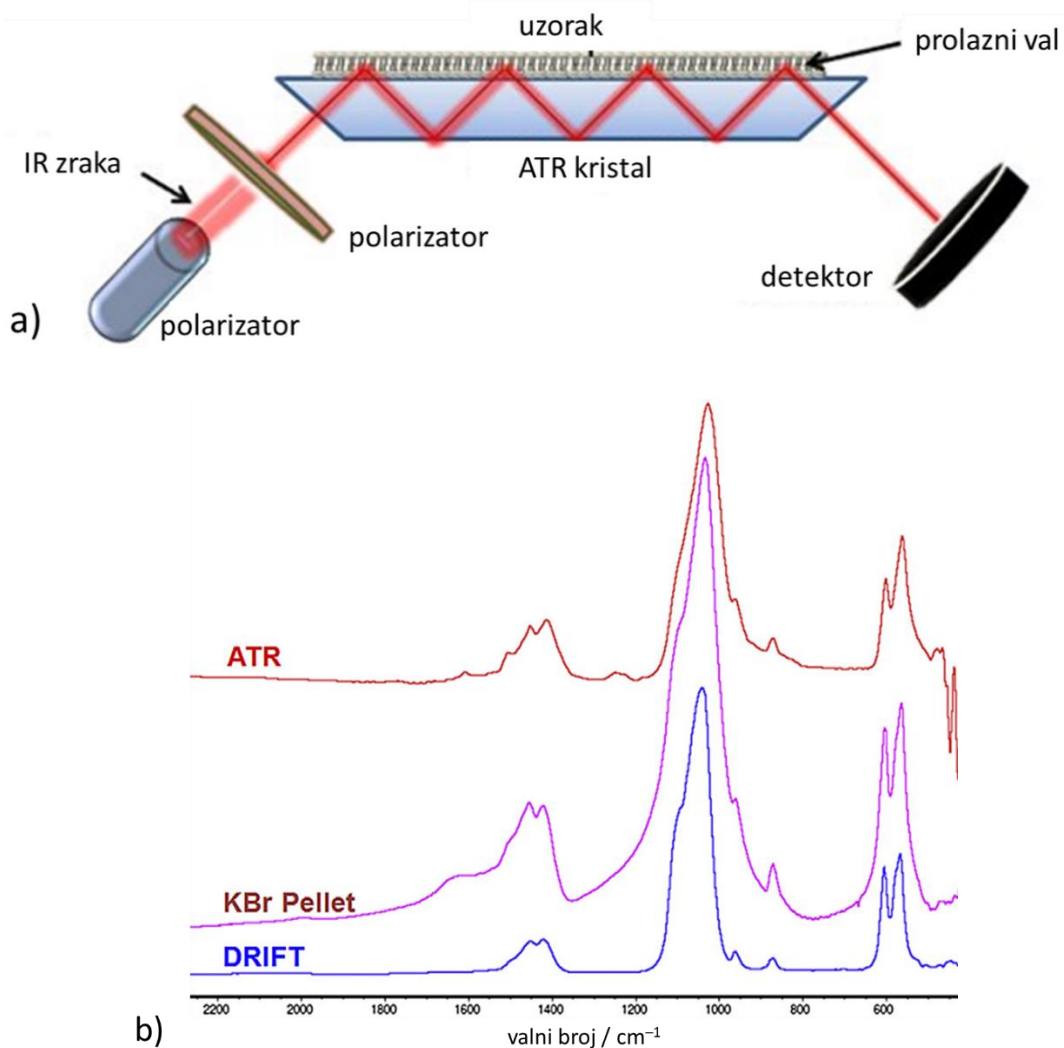
difuzne refleksije (DRIFTS) i prigušena ukupne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed spectroscopy*, ATR-FTIR) [12].

Različiti načini dobivanja FTIR spektra nude komplementarne metode za procjenu komponenti i procesa u tlu. Transmisijska spektroskopija bila je prva metoda korištena za prikupljanje FTIR spektara mineralnih i organskih komponenti tla. Ekstrakti tla (npr. SOM koji se može ekstrahirati s NaOH) ili suspenzije suše se na infracrvenim (IR) prozorima (npr. ZnSe, Ge) prije analize dok se kruti uzorci poput tla ili frakcija SOM-a melju, miješaju i razrjeđuju s kalijevim bromidom (KBr; 0,5 % – 3 % uzorka), prešaju u pelete i suše prije analize. Transmisija daje nagomilane rezultate IR mjerenja jer zraka nailazi na sve dijelove uzorka, što je u suprotnosti s drugim metodama prikupljanja kao što je ATR. Transmisijska spektroskopija danas se koristi rjeđe zbog rada na pripremi uzorka i artefakata (zavaravajuća ili zbunjujuća izmjena podataka ili opažanja, obično u eksperimentalnoj znanosti, koja je posljedica nedostataka u tehnici ili opremi) koji se mogu unijeti nakon isušivanja peleta. Manje radno-intenzivne metode stekle su prednost.

Jedna takva metoda je DRIFTS, koja uključuje minimalnu pripremu uzorka (npr. sušenje i mljevenje). Uzorke tla treba ravnomjerno i fino samljeti (< 900  $\mu\text{m}$ ) kako bi se izbjegli artefakti i dodatno homogeniziranje uzoraka. U nemljevenim uzorcima mogu se pojaviti artefakti zbog grubljih veličina čestica koje učinkovitije hvataju svjetlost od sitnijih čestica što može povećati IR raspršenje. To može rezultirati većom apsorbancijom i pomaknutom osnovnom linijom, promijenjenom širinom vrha i nelinearnom apsorbancijom. Stoga se DRIFTS može izvesti na nerazrijeđenim „urednim“ uzorcima tla ili korištenjem KBr razrjeđenja uzoraka tla (2 % – 10 % uzorka). Prikladnost KBr razrjeđenja procjenjuje se empirijski kako bi se utvrdilo je li spektralna kvaliteta poboljšana ili kao nužnost kada su dostupni samo mali volumeni uzorka.

Najnovija FTIR tehnika za analizu tla je infracrvena spektroskopija prigušene ukupne refleksije Fourierove transformacije (ATR-FTIR). Jedinствена je po tome što nudi *in situ* proučavanje uzoraka tla, bilo cjelovito, bilo zasebno mineralne faza, SOM-a, bakterija, te drugih uzoraka u prisutnosti vode. ATR-FTIR spektri daju informacije o funkcionalnim skupinama u blizini površine elementa za unutarnju refleksiju, tj. ATR kristala (Slika 4a), do dubine od ~1  $\mu\text{m}$ . Dubina prodora zrake u uzorak ovisi o valnoj duljini zrake, upadnom kutu i omjeru refrakcijskih indeksa ATR kristala i uzorka, što je opisano Harrickovom aproksimacijom [13].

Ključna prednost ATR-FTIR u odnosu na druge FTIR metode prikupljanja i analitičke tehnike općenito je mogućnost prikupljanja točnih spektara uzoraka u prisutnosti vode. Voda snažno apsorbira u srednjem IR području gdje se također javlja apsorbancija komponenata tla čime se ograničava primjena transmisijske i DRIFTS analize na osušene uzorke. Istraživanja su pokazala klasične IR metode, temeljene na miješanju i izradi peleta s KBr, nisu pogodne ni za ispitivanje mineralne faze [14]. Važno je napomenuti da položaji vrpce ostaju nepromijenjeni bez obzira na odabir metode, što je pokazano primjerom na Slici 4b [15].



**Slika 4.** a) Shematski prikaz rada ATR-FTIR spektrometra. b) Usporedba spektara dobivenih klasičnom FTIR metodom (KBr pelete), DRIFT metodom i ATR-FTIR metodom. Preuzeto iz ref. [15]

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječu li, i na koji način, različiti načini ekstrakcije SOM-a na kemijski sastav SOM-a tj. alkalnih ekstrakata, putem tri načina ekstrakcije na tri različita tla, uz ATR-FTIR spektroskopiju kao metodu analize kemijskog sastava.

Drugi cilj bio je ispitati primjenjivost, preciznost i praktičnost ATR-FTIR spektroskopije za ovu svrhu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju korištena su tri uzorka zemlje: Slavonska crnica (SC), Plasa Bor (PB) i Bukva Zlobin (BZ). Uzorkovanje je napravljeno za potrebe prethodne studije [16], tako da je površinski sloj tla bio prvotno odstranjen, a zatim je iskopano pet rupa dubine 30 cm na krajevima i u sredini parcela. Kako bi uzorkovanje bilo reprezentativno, svih pet uzorka istog tla je homogenizirano, odnosno sjedinjeno u jednu cjelinu. Nadalje, uzorci su sušeni u prostoriji zaštićenoj od atmosferskog utjecaja te su iz njih uklonjeni svi korjenčići, biljni ostaci i kamenčići. Uzorci su zatim drobljeni tučkom u tarioniku i prosijani kroz sito s promjerom pora 1 mm te čuvani u plastičnim posudama s poklopcem. Uzorcima je određena aktivna (aktualna), supstitucijska (izmjenjiva) i hidrolitička kiselost, koje su zbog izravne povezanosti sa strukturom SOM-a dane u Tablici 1.

IR spektri sadrže karakteristične vrpce funkcionalnih skupina kako organske faze tla, tako i anorganske faze (silikati, karbonati, gline). Za pravilnu interpretaciju spektara zato je nužno znati teksturni sastav tla, prikazan u Tablici 2.

**Tablica 1.** Aktivna (aktualna), supstitucijska (izmjenjiva) i hidrolitička kiselost uzoraka tla (podaci iz ref. [16])

uzorak	aktivna kiselost	supstitucijska kiselost	hidrolitička kiselost / $\text{cmol kg}^{-1}$
PB	$6,39 \pm 0,05$	$6,11 \pm 0,06$	11,20
BZ	$6,29 \pm 0,06$	$6,09 \pm 0,06$	11,42
SC	$6,34 \pm 0,06$	$6,04 \pm 0,08$	27,78

**Tablica 2.** Teksturni sastav uzoraka tla.

Uzorak	krupni pijesak / %	prah / %	glina / %	sitni pijesak / %
PB	14,85	10,69	26,77	47,69
BZ	14,86	10,68	22,16	52,30
SC	1,53	31,37	47,85	19,24



### 3.1.2. Instrumenti

- tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka
- analitička vaga OHAUS Explorer, Nänikon, Švicarska
- pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU
- centrifuga Rottina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Njemačka
- spektrofotometar, UV-VIS Spectroquant® Pharo 100, Merck, Darmstadt, Njemačka
- leco 628 CHNS analizator
- električni grijač
- pješčana kupelj
- eksikator
- sušionik
- liofilizator
- peć za spaljivanje
- FT-IR, Spectrum Two, PerkinElmer Inc., Waltham, SAD

### 3.1.3. Kemikalije

- superčista voda
- natrijev hidroksid p.a., (NaOH), 0,1 M, Kemika-Zagreb, Hrvatska
- natrijev pirofosfat p.a., ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,1 M, Kemika-Zagreb, Hrvatska
- sumporna kiselina p.a., ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $w = 95 \% - 97 \%$ , Kemika-Zagreb, Hrvatska
- klorovodična kiselina p.a., (HCl), 1 M, Kemika-Zagreb, Hrvatska
- kalijev bikromat p.a., ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), Kemika-Zagreb, Hrvatska
- dehidrirana glukoza ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), Merck, Darmstadt, Njemačka

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje sastava SOM-a po metodi Kononove i Bjelčikove

Metoda opisana u poglavlju 1.5 prilagođena je potrebama rada, kako slijedi.

Uzorci tala uzetih za ovo istraživanje bili su prethodno pripremljeni [16]. Radi bolje učinkovitosti ekstrakcije, ponovljen je postupak drobljenja i prosijavanja zemlje (kroz sito

pora 200  $\mu\text{m}$ ), a zatim je u male plastične posudice stavljeno po nekoliko grama svakog uzorka tla spremno za slanje na ATR-FTIR analizu. Nakon toga je u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL na tehničkoj vagi izvagano po 20 grama svakog uzorka. U papirnatim lađicama odvagano je 13,37 grama natrijevog pirofosfata ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ ) i 1,20 grama natrijevog hidroksida te ubačeno u tikvicu od 500 mL gdje je prethodno natočeno 300 mL svježje superčiste vode. Tikvica je stavljena na električni grijač i sadržaj je miješan staklenim štapićem u svrhu što bržeg otapanja.

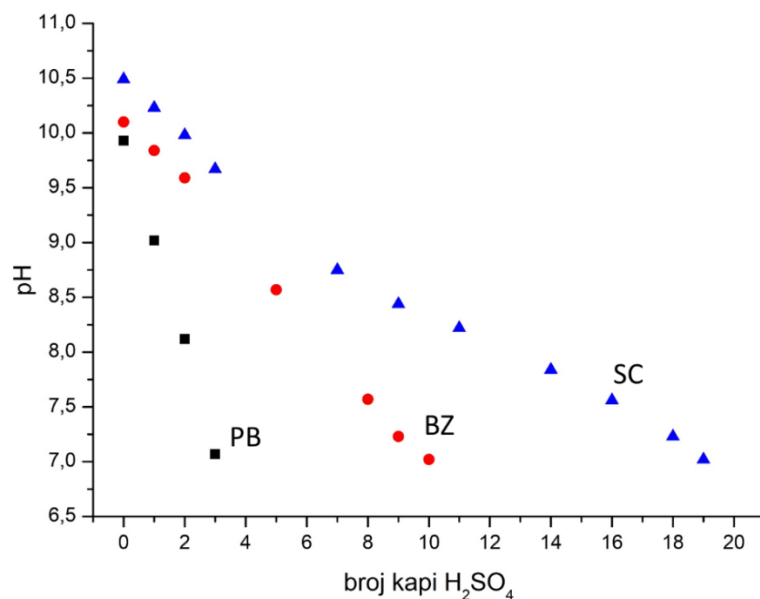
U svaki uzorak tla uliveno je 100 mL pripremljene otopine. Sadržaj u tikvicama dobro je promiješan, tikvice su prekrivene parafilmom i ostavljene do idućeg dana (minimalno 16 sati). Primijećeno je da je uzorak SC (slavonska crnica) najfinije granulacije i najbolje topljiv, dok uzorak PB (plasa bor) posjeduje najgrublju granulaciju i najmanje je topljiva.

Nakon toga suspenzije su ponovo promiješane i procijeđene preko sterilne gaze i staklenog lijevka. Filtrati, sakupljeni u staklenim čašama, prebačeni su u epruvete za centrifugiranje te su centrifugirani na 1400 okr/min, 10 minuta na 20 °C. Supernatanti su zatim filtrirani preko Büchnerovog lijevka uz pomoć vakuum pumpe i kvalitativnog filter papira. Tako dobiveni filtrati su spremni za daljnju analizu.

U daljnjoj analizi korištene su otopine sumporne kiseline koncentracija 0,025 M, 0,5 M i 2 M, dobivene razrjeđivanjem 95 %-tne kiseline ( $\rho = 1,83 \text{ kg/L}$ ) u odmjernim tikvicama od 100 mL.

Svi filtrati bili su tamne boje te je uzeto po 5 mL svakog u čašicu od 30 mL i dodano je kap po kap 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sve do sniženja pH vrijednosti na ~7.

U nastavku je navedeno koliko je kapi bilo potrebno kojem tlu da se postigne pH ~7 (Slika 5).

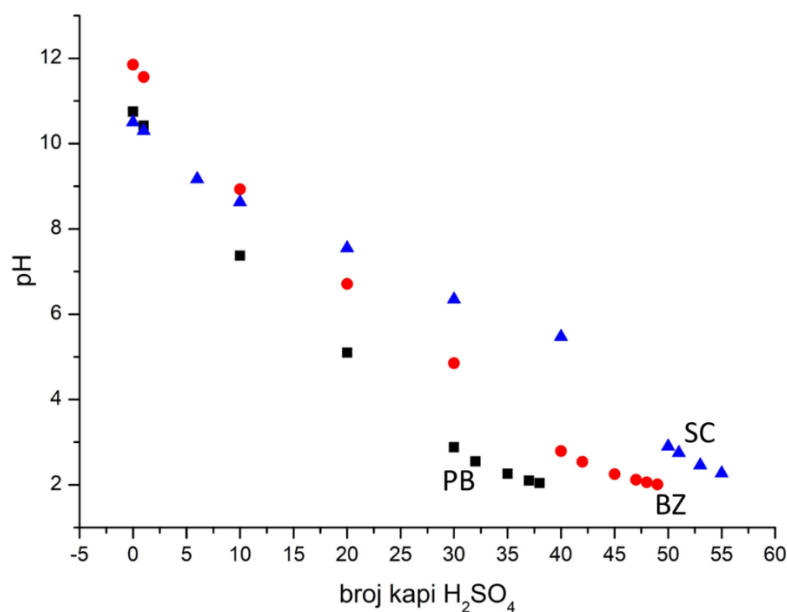


**Slika 5.** Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(aq) za ekstrakciju pri pH 7. Uzorak PB predstavlja plasa bor tlo, BZ bukva zlobin tlo, a SC slavonsku crnicu.

Nakon postignutog željenog sniženja pH sadržaj je prebačen u petrijeve zdjelice i stavljen na pješčanu kupelj da ispari do suha. Kada je proces završio (masa petrijevki sa sadržajem je konstantne mase zadnjih 2 do 3 mjerenja) zdjelice su prekrivene parafilmom i stavljene u eksikator kako bi sadržaj bio zaštićen od vanjskih utjecaja. Zatim je sadržaj s petrijevki ostrugan u male plastične posudice, začepljen poklopcem i spreman za slanje na ATR-FTIR.

Dio sadržaja, ~15 mg prenesen je u porculanske lončice i odnesen je na Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, gdje je sadržaj spaljivan osam sati na 430 °C. Dobiveni pepeo također je poslan na ATR-FTIR analizu.

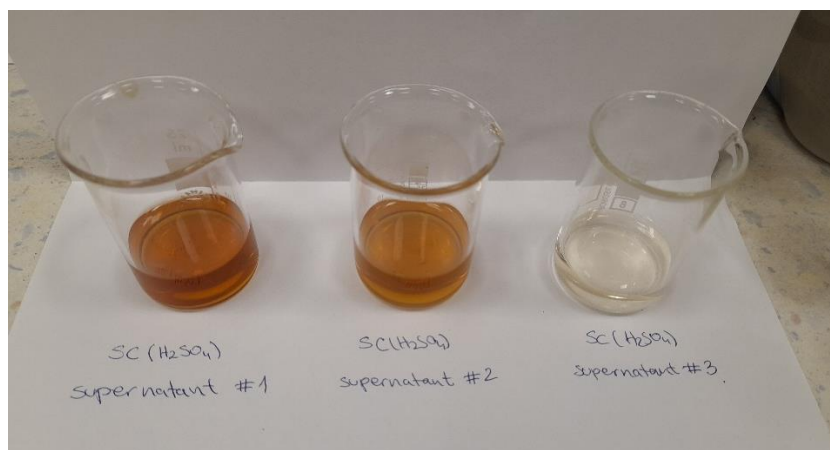
Nadalje, od istih filtrata uzeto je po 20 mL – 25 mL u čaše od 100 mL i dokapavana je 2 M sumporna kiselina do pH ~2 (Slika 6).



**Slika 6.** Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(aq) za ekstrakciju pri pH 2. Uzorak PB predstavlja plasa bor tlo, BZ bukva zlobin tlo, a SC slavonsku crnicu.

Nakon toga sadržaj je grijan na pješčanoj kupelji 30 minuta na 80 °C. Došlo je do pojave taloga te je sadržaj ostavljen u čaši do idućeg dana u svrhu potpunog taloženja huminskih kiselina.

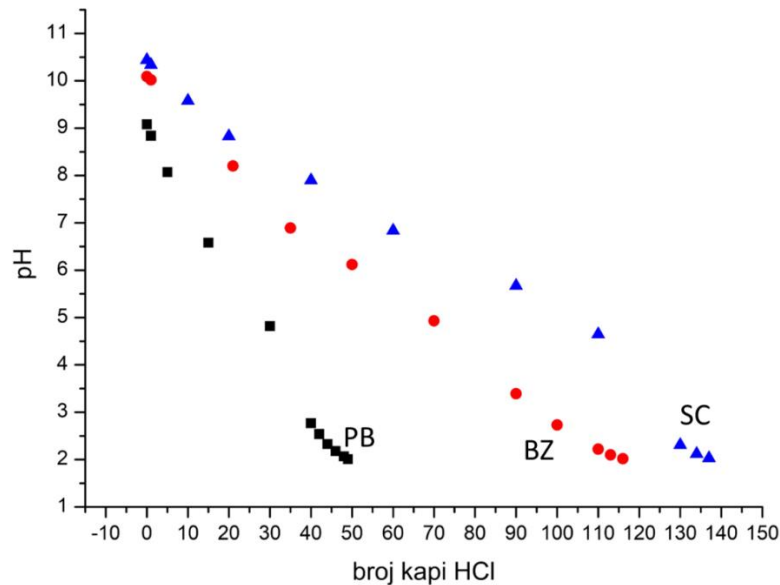
Sljedećeg radnog dana supernatanti su dekantirani, a talozi su ispirani s 0,025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i preneseni u epruvete te stavljeni u centrifugu na 1400 okr/min, 30 minuta na 20 °C. Supernatant je odstranjen kapaljkom te je postupak ispiranja ponavljan sve do prestanka pojave žute boje u filtratu (Slika 7). Uzorci ispiranih taloga su zatim spakirani za liofilizaciju (u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije) te nakon toga poslani na ATR-FTIR analizu.



**Slika 7.** Boje supernatanata uzorka nakon ispiranja 0,025 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.2.2. Ekstrakcija SOM-a u po radu Ellerbrock-u [17]

Kao i u prethodnoj metodi, uzeto je 20 mL – 25 mL filtrata i dokapavana je 1 M klorovodična kiselina do sniženja pH ~2 (Slika 8).



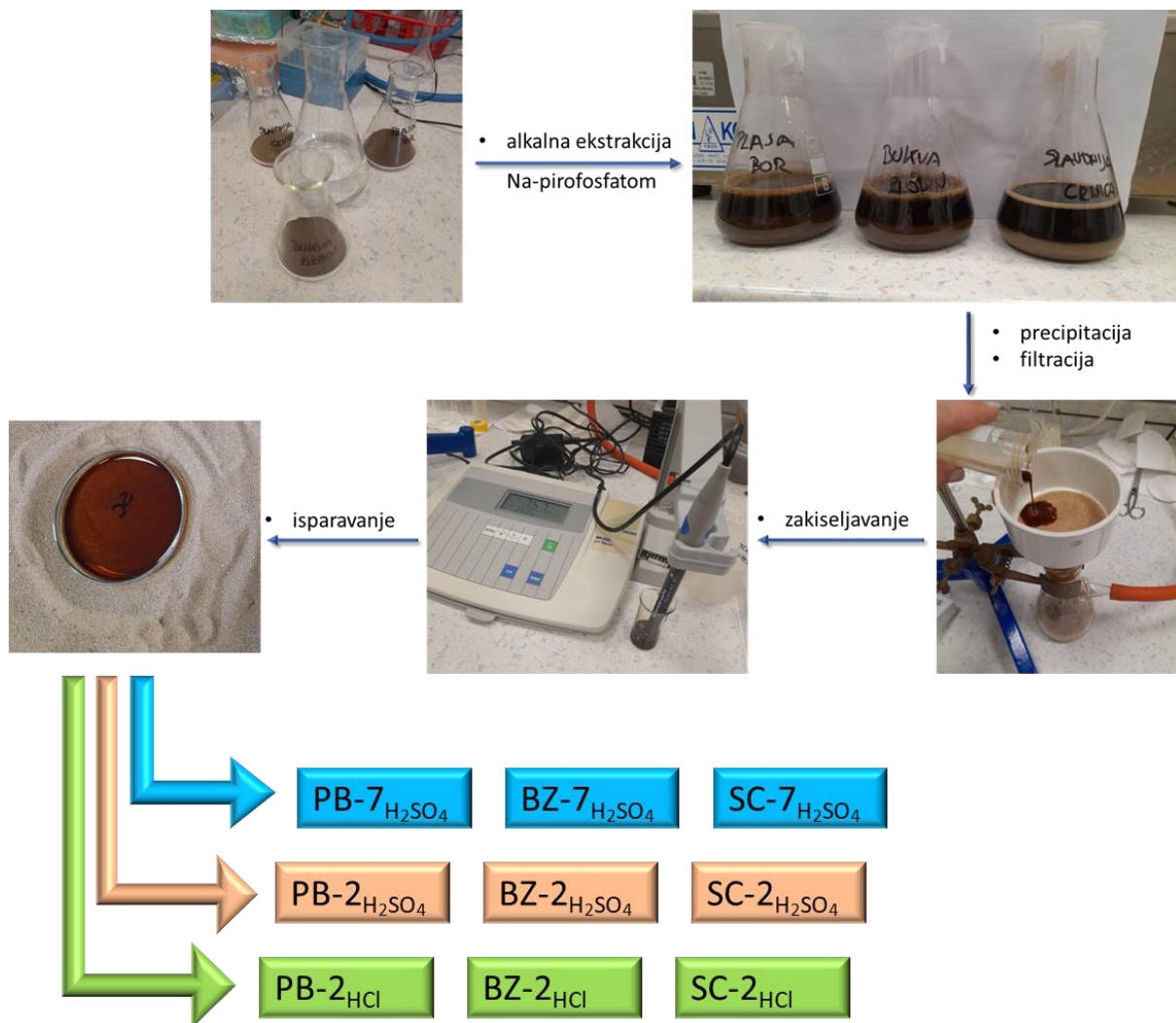
**Slika 8.** Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s HCl(aq) za ekstrakciju pri pH 2. Uzorak PB predstavlja plasa bor tlo, BZ bukva zlobin tlo, a SC slavonsku crnicu.

Precipitacija je završena nakon 12 sati, a tekuća frakcija je odvojena od istaloženog centrifugiranjem na 1400 okr/min tijekom 30 minuta na 20 °C. Ekstrakti su isprani od soli superčistom vodom i osušeni smrzavanjem (liofilizacijom) te također poslani na ATR-FTIR.

Sažeti shematski prikaz tri načina ekstrakcije SOM-a prikazan je na Slici 9.

Uz 9 uzoraka ekstrakata SOM-a, navedenih na Slici 9, u ovom su istraživanju analizirani i

- uzorci cjelovitih tala: PB-tlo, BZ-tlo i SC-tlo
- uzorci dobiveni žarenjem ekstrakta dobivenog pri pH 7 tijekom 8 h na 430 °C: PB-pepeo, BZ-pepeo i SC-pepeo



**Slika 9.** Skraćeni shematski prikaz tri načina ekstrakcije organske faze korištenih u istraživanju i sustav označavanja uzoraka. PB, BZ i SC oznake su uzoraka Plasa Bor, Bukva Zlobin, odnosno Slavonška Crnica; broj označava krajnju pH vrijednost kod zakiseljavanja tijekom ekstrakcije, a formula pokraj broja kiselinu korištenu za zakiseljavanje.

### 3.3.3. Određivanje sadržaja SOM-a u tlu bikromatnom metodom

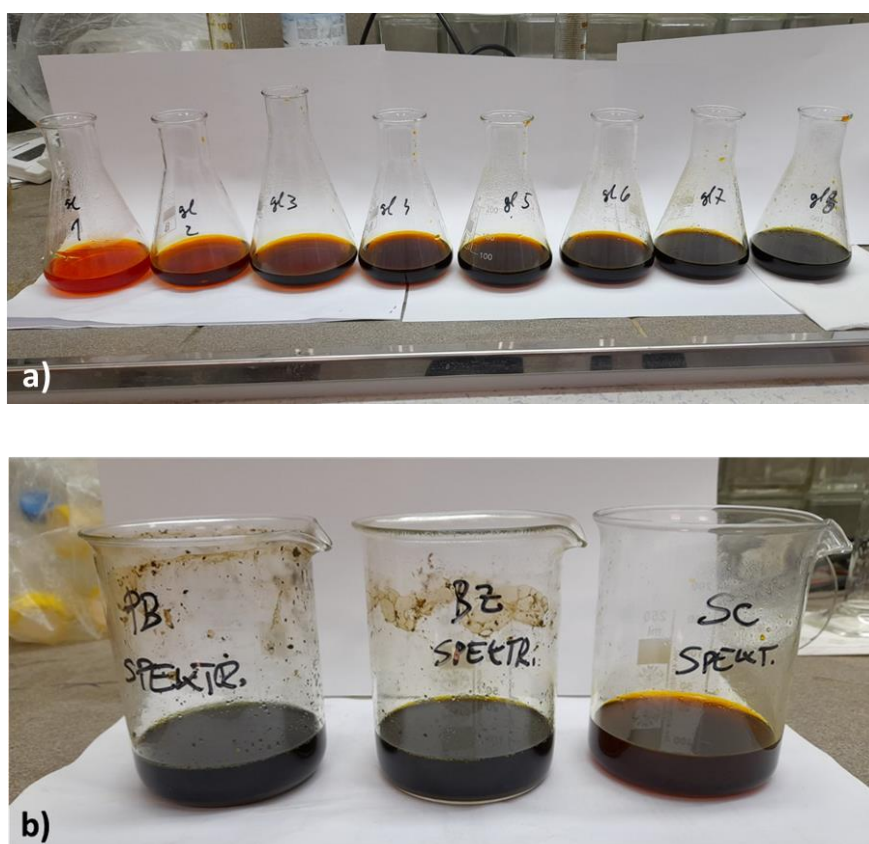
Ova metoda predstavlja mokro spaljivanje organske tvari tla kalijevim bikromatom. Otopina narančaste boje ( $\text{Cr}^{6+}$ ) prelazi u zelenu ( $\text{Cr}^{3+}$ ) što se koristi za spektrofotometrijsko određivanje količine SOM-a.

Na tehničkoj vagi odvagano je po 1 g uzoraka tala u laboratorijskim čašama od 250 mL. Osnovni standard je pripremljen tako što je izvagano 10 g dehidrirane glukoze te je ona prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je nadopunjena do oznake superčistom vodom. Zatim je određena količina osnovnog standarda odpipetirana u seriju Erlenmeyerovih tikvica.

U svaki standard i uzorak uliveno je po 30 mL 0,33 M otopine  $K_2Cr_2O_7$  i 20 mL koncentrirane  $H_2SO_4$ . Dobivene vruće otopine stavljene su u sušionik na 100 °C tijekom 90 minuta nakon čega su izvađene i ostavljene da se ohlade. Ohlađeni uzorci i standardi preliveni su s 80 mL superčiste vode i ostavljeni su stajati 24 sata nakon čega su spektrofotometrijski izmjereni na 585 nm.

**Tablica 3.** Standardne otopine glukoze za izradu kalibracijskog pravca.

Broj	V(standarda) / mL	Maseni udio org. C/%	Maseni udio SOM/ %
1	0,0	0,0	0,0
2	0,1	0,4	0,69
3	0,2	0,8	1,38
4	0,3	1,2	2,07
5	0,4	1,6	2,76
6	0,5	2,0	3,44
7	1,0	4,0	6,88
8	2,0	8,0	13,76



**Slika 10.** a) Standardi (otopina glukoze) nakon dodatka  $K_2Cr_2O_7$  i  $H_2SO_4$ ; b) uzorci tla nakon dodatka  $K_2Cr_2O_7$  i  $H_2SO_4$

**Tablica 4.** Ocjena humoznosti tla prema klasifikaciji po Gračaninu [18].

Maseni udio SOM / %	Ocjena humoznosti
< 1	Vrlo slabo humozno
1 – 3	Slabo humozno
3 – 5	Dosta humozno
5 – 10	Jako humozno
> 10	Vrlo jako humozno

#### 3.3.4. Elementarna analiza

Suhi uzorci tla podvrgnuti su elementarnoj analizi kako bi se mogli usporediti kemijski sastavi uzoraka tla i olakšati interpretacija IR spektara. Maseni udio ugljika, vodika i dušika određen je CHNS analizatorom (Leco 628 CHNS analizator), metodom određivanja ugljika (C), vodika (H), dušika (N) instrumentalnom metodom (ISO 21663:2020). Omjeri masenih udjela pojedinih elemenata daju specifične informacije o sastavu SOM-a [19].

Za određivanje ugljika, vodika i dušika analizirani uzorak u foliji ili kapsuli spaljen je u oksidirajućoj atmosferi u vertikalnoj peći. Elementarni ugljik, vodik i dušik prevode se u CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> i NO<sub>x</sub>. Oslobođeni plinovi vode se preko filtera u balastni cilindar gdje se ta mješavina plinova homogenizira. Za svaki određeni element postoji zasebni detektor. Za ugljik i vodik koristi infracrveni detektor (IR), a za dušik detektor toplinske vodljivosti (TC). Detekcija nastalih plinova odvija se tako da uzorak prolazi kroz uređaj za konstantno doziranje u infracrveni (IR) detekcijski sustav. Sadržaj ugljika i vodika određuje se na principu neposredne IR apsorpcije gdje se mjeri količina CO<sub>2</sub>, odnosno H<sub>2</sub>O. Smjesa izgorivih plinova nošena helijem odvodi se u katalitičku peć (vrući bakar) gdje se NO<sub>x</sub> prevodi u NO<sub>2</sub>, a zatim se u kolonama punjenima odgovarajućim kemikalijama uklanjaju CO<sub>2</sub> i vlaga. Mješavina helija i dušika dovodi se u detektor toplinske vodljivosti (TC), gdje se mjeri količina N<sub>2</sub>.

#### 3.3.5. ATR-FTIR spektroskopija

Sastav organske faze tla određen je infracrvenom spektroskopijom, metodom prigušene totalne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflection Fourier Transform InfraRed*, ATR-FTIR) na spektrometru Spectrum Two ATR-FTIR (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, SAD), na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani. Spektrometar je opremljen LiTaO<sub>3</sub> detektorom. Za svaki su uzorak snimljena dva spektra od 16 skenova, u području valnih

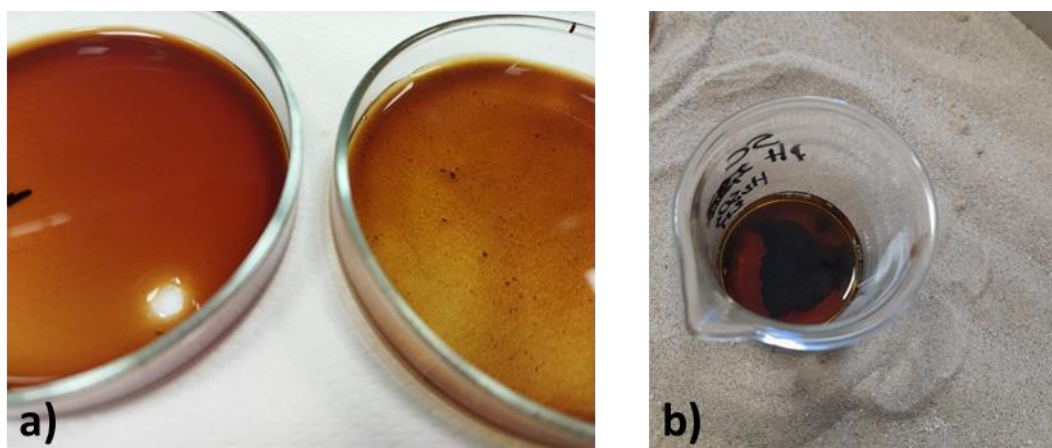


duljina od  $400\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$  i rezolucijom od  $0,5\text{ cm}^{-1}$ . Spektri su snimani u apsorpcijskom modu, i korigirani za pozadinu. Relevantne apsorpcijske vrpce interpretirane su softverom Spectrum, verzija 10.5.3, PerkinElmer Inc, koji je korišten i za oduzimanje spektra pepela od ekstrakta SOM-a pri pH 7.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati ekstrakcije i spaljivanja organske faze tla

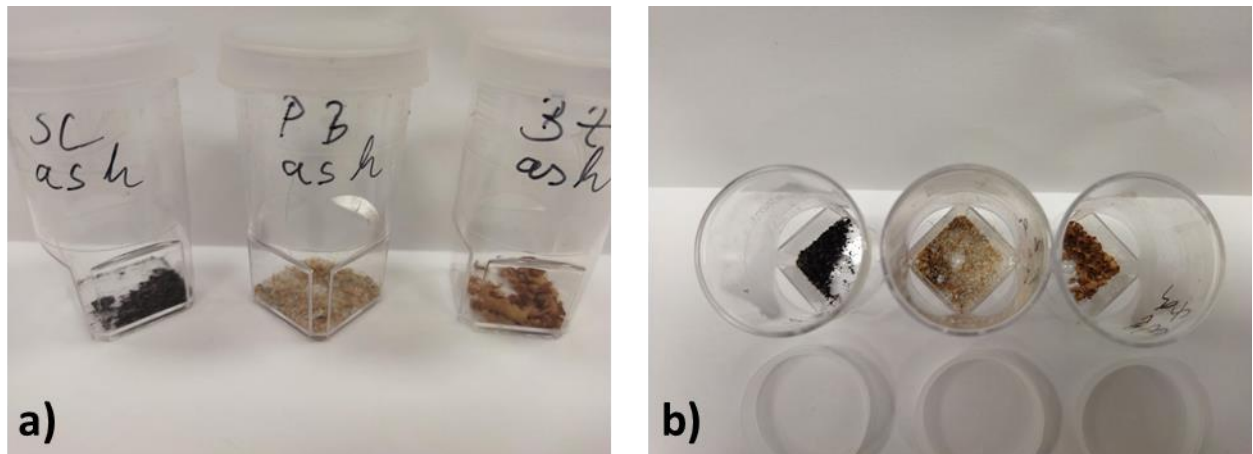
Reprezentativni primjerci suspenzija organske faze tla nakon zakiseljavanja do pH 7 i pH 2 prikazani su na Slici 10. Zakiseljavanjem do pH 7 u otopinama je primijećeno zamućenje, ali bez trenutnog taloženja. Malobrojni točkasti talog nastao je naknadno tijekom grijanja u pješčanoj kupelji (Slika 11a). Nakon uparavanja do suhog, na dnu petrijevih zdjelica zaostao je tanki sloj ekstrakta. Zakiseljavanjem do pH 2, i s kloridnom i sa sumpornom kiselinom, došlo je trenutnog nastajanja taloga (Slika 11b), čija se količina povećavala tijekom grijanja u pješčanoj kupelji.



**Slika 11.** Suspenzije i talozi uzoraka tla tijekom ekstrakcije organske faze pri a) pH 7 i b) pH 2.

Žarenjem ekstrakata dobivenih zakiseljavanjem do pH 7 (uzorci PB-7  $H_2SO_4$ , BZ-7  $H_2SO_4$  i SC-7  $H_2SO_4$ ) dobiven je pepeo (engl. *ash*), u kojemu su sadržane anorganske (mineralne) tvari tla. Postupak žarenja do pepela i snimanje IR spektra pepela pokazao se kao koristan postupak za dobivanje tzv. razlikovnih IR spektara, tj. spektara dobivenih oduzimanjem spektra pepela od spektra cijelog ekstrakta [17,20]. Razlikovni spektri korisni su jer su u njima naglašene karakteristične vrpce funkcionalnih skupina SOM-a, a potisnute karakteristične vrpce funkcionalnih skupina anorganske faze. Dodatno, i spektri pepela korisni su sami po sebi za detaljniju analizu mineralne faze tla i razlika u mineralnim fazama pojedinih uzoraka. Spektri pepela i razlikovni spektri uzoraka analizirani su u poglavljima 4.3.3 odnosno 4.3.5. I prije IR

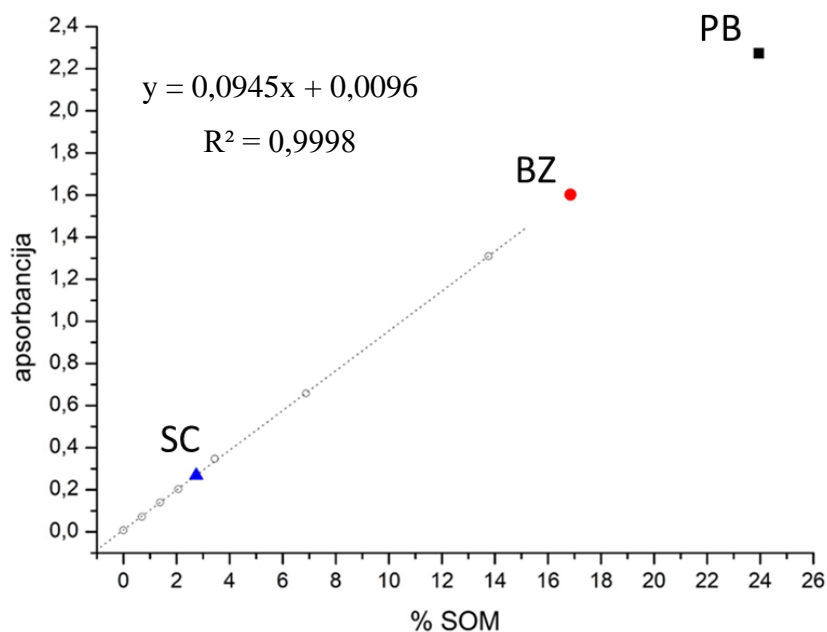
analize, značajne razlike u mineralnim fazama bile su razvidne golim okom, kao posljedica primjetnih razlika u boji i teksturi pepela, posebice kod uzorka SC (Slika 12).



**Slika 12.** Pepelo nakon spaljivanja ekstrakta 8 h pri 430 °C.

#### 4.2. Udio organske faze u tlima

Za točniju interpretaciju IR spektara potrebno je znati količinu SOM-a u uzorcima. Udio organske faze, označen kao % SOM, određen je spektrofotometrijski, tj. mokrim spaljivanjem s kalijevim bikromatom, pomoću glukoze kao standarda. Očitane su vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini 585 nm za seriju otopina glukoze, iz čega je izrađen baždarni pravac, iz kojega je potom određena količina SOM-a u uzorcima (Slika 13).



**Slika 13.** Baždarni pravac za određivanje količine SOM-a u uzorcima, dobiven bikromatnom metodom. Uzorak PB predstavlja plasa bor tlo, BZ bukva zlobin tlo, a SC slavonsku crnicu.

Jednadžba dobivenog pravca je  $y = 0,0945x + 0,0096$ . Uz grafičko određivanje nepoznate količine, jednadžba pravca iskorištena je za računsku potvrdu i dobivanje preciznijih vrijednosti rezultata. Dobiveni su sljedeći rezultati:

$$\% \text{ SOM (SC)} = \frac{0,269 - 0,0096}{0,0945} = 2,74 \%$$

$$\% \text{ SOM (BZ)} = \frac{1,602 - 0,0096}{0,0945} = 16,9 \%$$

$$\% \text{ SOM (PB)} = \frac{2,274 - 0,0096}{0,0945} = 23,9 \%$$

Iz rezultata proizlazi da je SC slabo humozno tlo, dok se PB i BZ mogu karakterizirati kao vrlo humuzna tla (Tablica 4). Količina SOM-a u tlu SC unutar očekivanog je za hrvatska poljoprivredna tla (1 % – 5 % SOM), dok je količina SOM-a kod uzoraka BZ i PB neuobičajeno visoka. Ovakav se rezultat može pripisati lokaciji s koje su uzeti uzorci, tj. činjenici da su uzorci BZ i PB primjerci šumskog tla, uobičajeno bogatijeg SOM-om u odnosu na uobičajena poljoprivredna tla. Kvantitativni rezultat odgovara očekivanom kvalitativnom temeljem boja otopina uzoraka nakon dodatka bikromata (Slika 10), kada je uočeno da u otopini s uzorkom SC dominira narančasta boja, kod uzorka BZ je neprimjetna, dok je uzorak PB duboke zelene boje. Narančasta boja upućuje da je ostalo mnogo neizreagirano bikromata tj. veliku koncentraciju zaostalih  $\text{Cr}^{6+}$  iona, kao posljedica nedovoljne količine organske tvari koja bi ih izreducirala. S druge strane, kod uzorka PB, bila je očita prisutnost značajno veće količine organske tvari, koja je gotovo u potpunosti izreducirala  $\text{Cr}^{6+}$  u zeleni  $\text{Cr}^{3+}$ .

#### 4.3. Sastav organske faze tla: elementarna analiza

Rezultati elementarne analize uzoraka tla, zajedno s izračunatim C/H i C/N omjerima, prikazani su u Tablici 5. Veća vrijednost C/H omjera upućuje na veći udio aromatskih spojeva i C=C veza u ostalim spojevima SOM-a, tj. na veću zastupljenost hidrofobnih skupina. Iz toga proizlazi da manja vrijednost C/H omjera znači veću hidrofilnost.

Rezultati pokazuju najveći udio ugljika kod uzorka PB, nakon čega slijede BZ, te SC s vrlo malom vrijednošću. Ovakav poredak u skladu je s rezultatima za sadržaj SOM-a dobivenih bikromatnom metodom (poglavlje 4.2.). C/H omjer otkriva najveću zastupljenost hidrofobnih

skupina kod PB tla, dok je tlo SC – po ovim rezultatima – najhidrofilnije. C/N omjer najmanji je za SC, što indicira da je ovo tlo najbogatije skupinama koje sadrže dušik.

**Tablica 5.** Elementarna analiza uzoraka tla.

UZORAK	W(C)/%	W(H)/%	W(N)/%	C/H omjer	C/N omjer
<b>PB</b>	17,87	2,626	0,8670	6,805	20,61
<b>BZ</b>	13,81	2,403	0,9831	5,747	14,05
<b>SC</b>	1,699	0,7669	0,1801	2,215	9,434

#### 4.4. Sastav organske faze: ATR-FTIR spektri

##### 4.3.1. Glavna obilježja FTIR spektara uzoraka tla

Tlo je iznimno složena matrica, kako zbog velikog broja organskih i anorganskih tvari, tako i zbog velikih varijacija u njihovim udjelima i sastavu. Zbog porasta svijesti o važnosti kvalitete tla (poglavlje 1.2), posljednjih desetljeća ulažu se povećani naponi u postizanju što točnijih, preciznijih i praktičnijih analiza tla. IR spektroskopija je klasična, široko rasprostranjena i lako dostupna metoda, ali intrinzično nepraktična za sustave koji obiluju funkcionalnim skupinama, pa postoji velik broj istraživanja u kojima se IR spektroskopija primjenjuje, usavršava i preispituje u kontekstu analize tla [12,17,19–38]. Popis funkcionalnih skupina koje se mogu naći u tlu, s položajima njihovih karakterističnih vrpce, dan je u Tablici 6.

**Tablica 6.** Položaji karakterističnih IR vrpce funkcionalnih skupina u tlima (prilagođeno iz ref. [11,35])

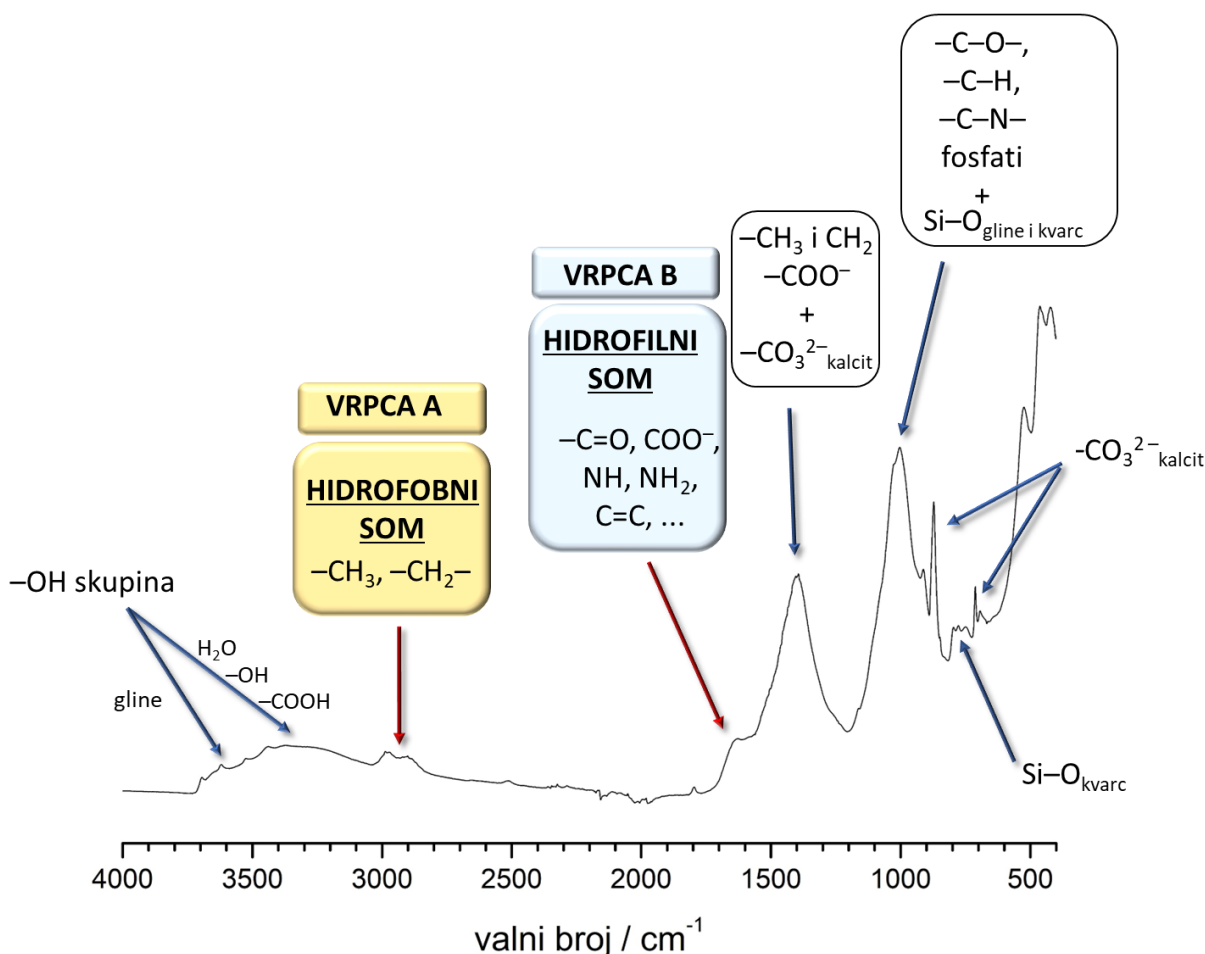
<b>Položaj vrpce/cm<sup>-1</sup></b>	
<b>3700 – 3600</b>	Istezanje O–H veze u glinama (unutrašnje površine)
<b>3600–3400</b>	Istezanje O–H veze u vodi, karboksilnoj i hidroksidnoj skupini
<b>3020–2800</b>	Simetrično i asimetrično C–H istezanje u CH <sub>3</sub> i CH <sub>2</sub> skupinama
<b>2550–2515</b>	Vibracije CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> u kalcitu i mineralima kalcitne i dolomitne skupine
<b>2000, 1880 i 1790</b>	Vibracije višeg reda i kombinacije vrpce za kvarc i silikate
<b>1650–1515</b>	NH <sub>2</sub> i NH savijanje u primarnim i sekundarnim amidima (vrpca amid II)
<b>1650 – 1640</b>	C=O istezanje u amidima (vrpca amid I)
<b>1650 – 1580</b>	NH savijanje u primarnim aminima
<b>1650 – 1550</b>	Asimetrično istezanje COO <sup>-</sup>
<b>1630</b>	Savijanje molekula vode u hidratacijskim slojevima u filosilikatima iz tla; C=O karbonila ili kinona povezanih vodikovim vezama

<b>1625 – 1600</b>	Istezanje C=C skupine konjugirane s drugom C=C skupinom, aromatski prsten, C=O i/ili COO <sup>-</sup> u nezasićenim ketonima, karboksilnim kiselinama i amidima
<b>1462 – 1430</b>	Vibracije CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> u kalcitu i mineralima kalcitne i dolomitne skupine; C–H savijanje u CH <sub>3</sub> i CH <sub>2</sub> skupinama
<b>1420 – 1330</b>	Simetrično istezanje COO <sup>-</sup>
<b>1384 – 1350</b>	Vibracije povezane s nitratima
<b>1035</b>	Istezanje Si–O u glinama
<b>1300 – 1000</b>	<i>In-plane</i> savijanje C–H veza aromatskog prstena; C–O istezanje u alkoholima, eterima, fenolima, karboksilnim kiselinama i esterima; istezanje C–O u polisaharidima; C–N istezanje u alifatskim i aromatskim aminima
<b>1200 – 900 (max na 1080)</b>	asimetrično istezanje Si–O skupina u kvarcu
<b>1200 – 800</b>	istezanje i savijanje Si–O skupina u glinama
<b>1100 – 1000</b>	Vibracije povezane s fosfatnom skupinom
<b>915</b>	Al – OH – Al vibracije u illitu (glina)
<b>887 – 866</b>	Vibracije CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> u kalcitu i mineralima kalcitne i dolomitne skupine
<b>800 – 795 i 780 – 775</b>	Simetrično Si–O istezanje u kvarcu
<b>800 – 666</b>	<i>Out-of-plane</i> NH ljuľanje u amidima
<b>900 – 675</b>	<i>Out-of-plane</i> savijanje C–H veza aromatskog prstena
<b>715 – 712</b>	Osnovne vibracije CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> u kalcitu
<b>695</b>	Si–O savijanje u kvarcu

Kao prvi korak u analizi IR spektara uzoraka korištenih u ovom istraživanju, na reprezentativnom je spektru (spektar uzorka BZ-tlo) proučeno koje su funkcionalne skupine prisutne, kolika je razlučivost i kakvo je slaganje s literaturnim izvorima. Reprezentativni spektar s obilježenim najistaknutijim vrpčama prikazan je na Slici 14. Kako je ovo spektar cjelovitog uzorka, sadrži vrpce i organske i mineralne faze. Uobičajeno najzastupljenije tvari u mineralnoj faza tla su gline (najčešće su kaolinit, ilit, montmorilonit), kvarc (kao glavni sastojak pijeska) i kalcit (i dolomit, vrlo sličan kalcitu).

U skladu s literaturom (Tablica 6), široka vrpca koja se proteže od ~3700 cm<sup>-1</sup> do ~3000 cm<sup>-1</sup> karakteristična je za –OH skupine iz vode, organskih funkcionalnih skupina i mineralne faze, točnije, iz glina (kaolinit, ilit, montmorilonit). Dodatna vrpca karakteristična za gline, posljedica Si-O istezanja, nalazi se na ~1035 cm<sup>-1</sup>. Međutim, snažna vrpca pri 1200–1000 cm<sup>-1</sup>, unutar koje je i vrpca Si–O istezanja glina, superpozicija je mnogobrojnih vrpce od vibracija više funkcionalnih skupina iz SOM-a (Tablica 6), od kojih je najdominantnije C–O istezanje u eterima, esterima, karboksilnim kiselinama, kod hidroksidne skupine, kod fenola, polisaharida, te Si–O istezanje u kvarcu i dr. Druga po intenzitetu je vrpca centrirana pri

$\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ , koja također obuhvaća i vrpce karakteristične za mineralnu fazu (vibracije  $\text{CO}_3^{2-}$  u kalcitu i mineralima kalcitne i dolomitne skupine), uz vrpce alifatskih lanaca i karboksilne skupine.



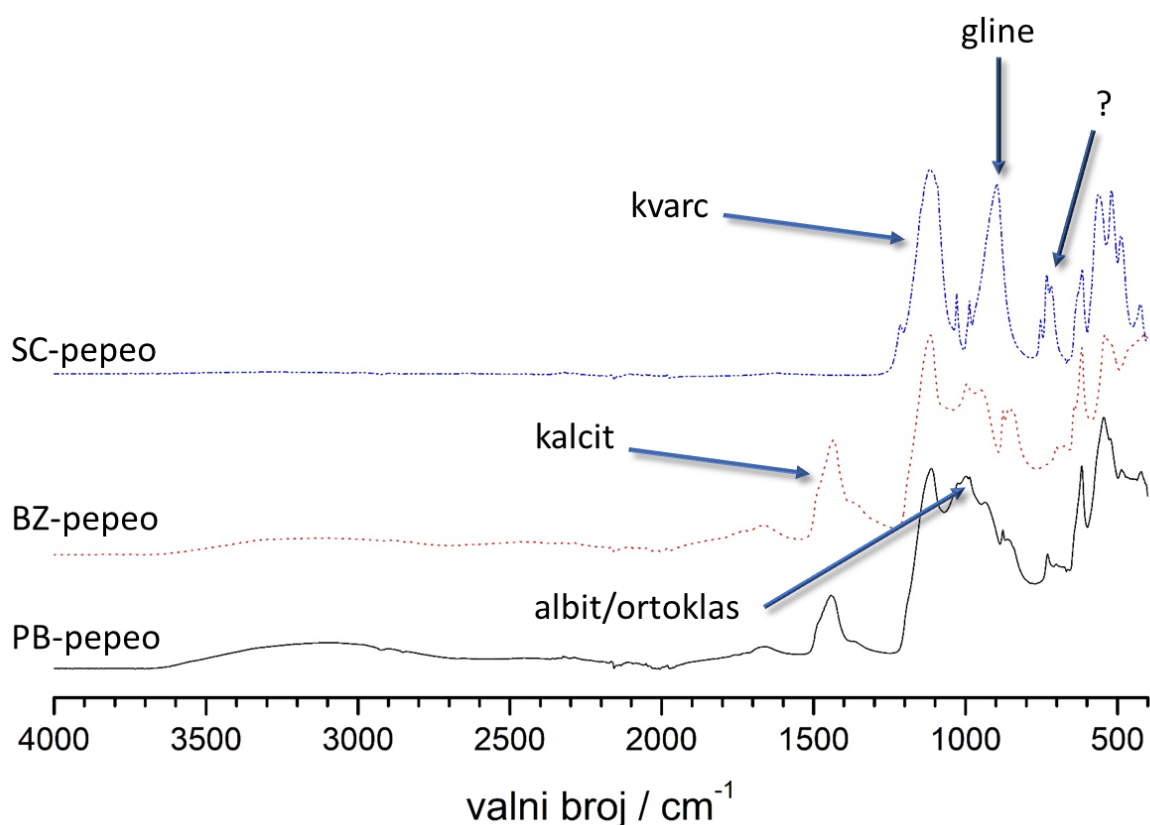
**Slika 14.** Reprezentativni uzorak FTIR spektra cjelovitog uzorka tla (uzorak BZ-tlo). Istaknute su karakteristične vrpce najznačajnijih funkcionalnih skupina.

Iz tog razloga (preklapanja vrpce organske i mineralne faze), za analizu SOM-a u literaturi su najčešće korištene druge dvije, manje intenzivne vrpce, tj. skupine vrpce [17,35,36]. Prva skupina, na slici 14 vidljiva kao „rame“ pri  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ , obuhvaća prvenstveno istezanje karbonilne ( $\text{C}=\text{O}$ ) skupine amida, ketona i karboksilnih kiselina, te konjugiranih  $\text{C}=\text{C}$  veza i aromatskih prstenova u blizini tih skupina. Druga skupina vrpce rezultat je simetričnog i asimetričnog istezanja  $\text{CH}_3-$  i  $\text{CH}_2-$  skupina. Kako su prvom skupinom vrpce obuhvaćene vibracije polarnih funkcionalnih skupina i  $\text{C}=\text{C}$  veza u blizini polarnih skupina, a drugom skupinom vrpce vibracije isključivo nepolarnih alifatskih lanaca, te se dvije vrpce općenito nazivaju vrpce hidrofilnog SOM-a odnosno hidrofobnog SOM-a, i kao takve služe kao glavna

okosnica analize kemijskog sastava SOM-a. Često ih se skraćeno naziva vrpcom A (za hidrofobni SOM) i vrpcom B (za hidrofilni SOM) [17,19,35,37].

#### 4.3.2. FTIR spektri mineralne faze tla

Kao drugi korak u IR analizi tla, snimljeni su IR spektri mineralne faze tla, tj. spektri uzoraka pepela nastalog spaljivanjem ekstrakata. Spektri mineralne faze prikazani su na Slici 15.



**Slika 15.** FTIR spektri mineralne faze tla, dobiveni iz uzoraka pepela nastalog spaljivanjem ekstrakta PB, BZ i SC pri pH 7 na 430 °C tijekom 8 sati. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.

Iz usporedbe IR spektara triju uzoraka, uočljivo je da su spektri uzoraka PB i BZ međusobno slični, dok je spektar uzorka SC značajno različit. Najuočljiviji je nedostatak relativno intenzivnih vrpca pri 1500–1300  $\text{cm}^{-1}$  (centrirana na ~1400  $\text{cm}^{-1}$ ) te onih manje intenzivnih pri ~1900–1500  $\text{cm}^{-1}$  kod uzorka SC u odnosu na BZ i PB. Vrpca je većeg intenziteta kod BZ u odnosu na PB. Široka vrpca slabog intenziteta koja se proteže od 3600–2700  $\text{cm}^{-1}$  također nedostaje kod SC. Jedna vrpca koja jest uočljiva kod SC, a nije prisutna kod BZ i PB jest



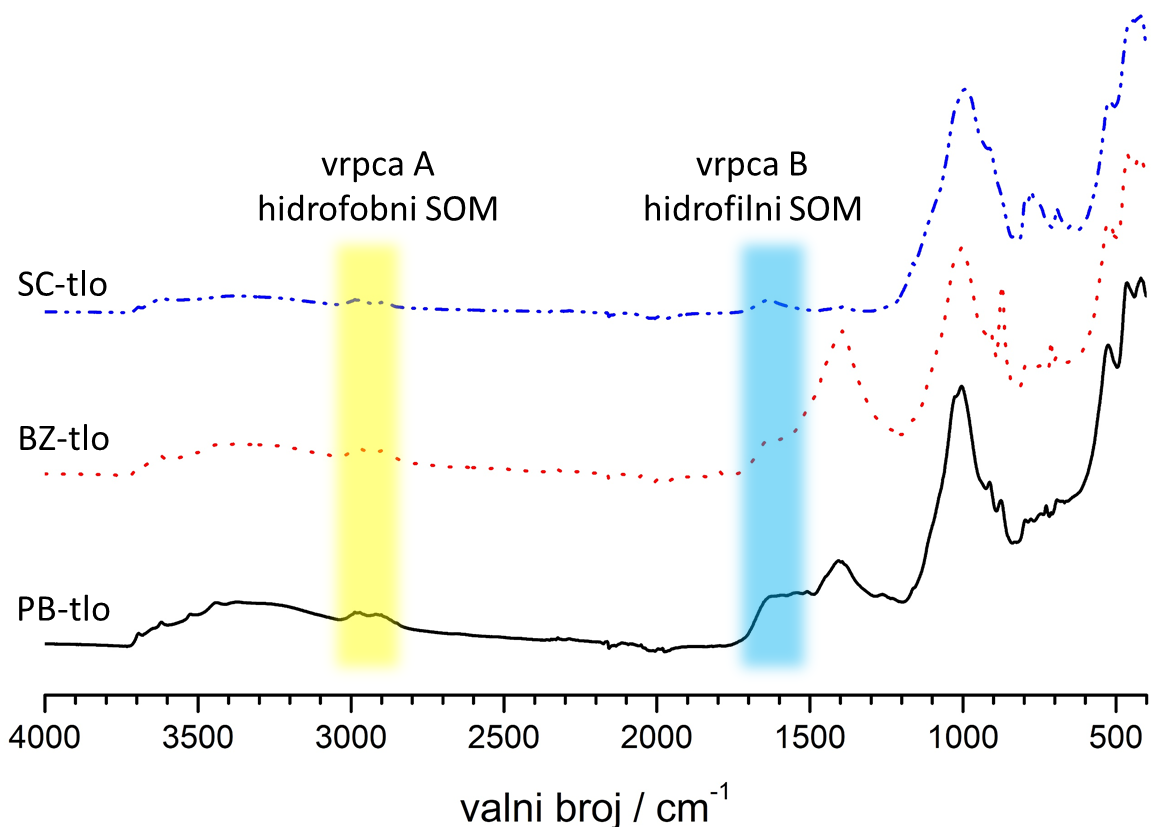
oštra vrpca srednjeg intenziteta pri  $733\text{ cm}^{-1}$ . Dodatno se može uočiti da su vrpce kod SC općenito bolje razlučene i oštrije.

Jedina skupina od u tlu uobičajenih minerala koja ima karakterističnu vrpcau pri  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  jest kalcitna i dolomitna skupina [11]. Iz toga proizlazi da su tla BZ i PB bogata kalcitom, dok ga SC (gotovo) uopće ne sadrži. Kod sva tri tla najintenzivnija vrpca je ona s maksimumom pri  $1086\text{ cm}^{-1}$ , što odgovara kvarcu. Ova je vrpca najšira i najnižeg intenziteta kod SC. Takav rezultat u skladu je s teksturnom analizom uzoraka (Tablica 2), koja je pokazala da svi uzorci sadrže pijesak u količini od minimalno 20 %, s najmanjom količinom kod SC. Ova se vrpca kod PB i BZ preklapa s vrpcom na  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ , dok su kod SC ove dvije vrpce bolje razlučene (kod uzorka SC drugi je maksimum pomaknut udesno, na  $896\text{ cm}^{-1}$ ). Ta druga vrpca kod SC može se pripisati glinama, s obzirom da su kod SC gline dominantna vrsta minerala. Pripisivanje ove vrpce glinama dodatno je potkrepljeno činjenicom da intenzitet vrpce raste (u odnosu prema vrpci kvarca) u smjeru  $BZ < PB < SC$ , što odgovara količini gline dobivenom teksturnom analizom ( $22,16\% BZ < 26,77\% PB < 47,85\% SC$ ). Međutim, kod PB i BZ uočljivo je da je vrpca šira i da je zapravo superpozicija više vrpca. Temeljem rezultata Muller i suradnici [11], razumno je pretpostaviti da dio vrpca odgovara mineralima iz feldspat skupine, albitu i ortoklasu, uz gline koje PB i BZ sadržavaju u manjim količinama.

S druge strane, u diskrepanciji s teksturnom analizom jest vrpca pri  $733\text{ cm}^{-1}$ , prisutna samo kod SC. Po literaturi, položajem bi najbliže odgovarala kalcitu ili kvarcu; međutim, kalcit se može odbaciti temeljem gore-spomenute činjenice da u spektru uzorka SC nije prisutna glavna vrpca kalcita pri  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ . Kvarc se može odbaciti temeljem teksturne analize (Tablica 2), kojom je dobiveno da uzorci PB i BZ sadrže minimalno trostruko više pijeska od SC, što bi se odrazilo na intenzitet vrpce, tj. navedena vrpca bila bi uočljivo većeg intenziteta kod BZ i PB u odnosu na SC, što ovdje nije slučaj. Za objašnjenje ove vrpce potrebni su dodatni podaci, ponajprije analiza rendgenskom difrakcijom X-zraka (XRD).

#### 4.3.3. FTIR spektri cjelovitih uzoraka tla

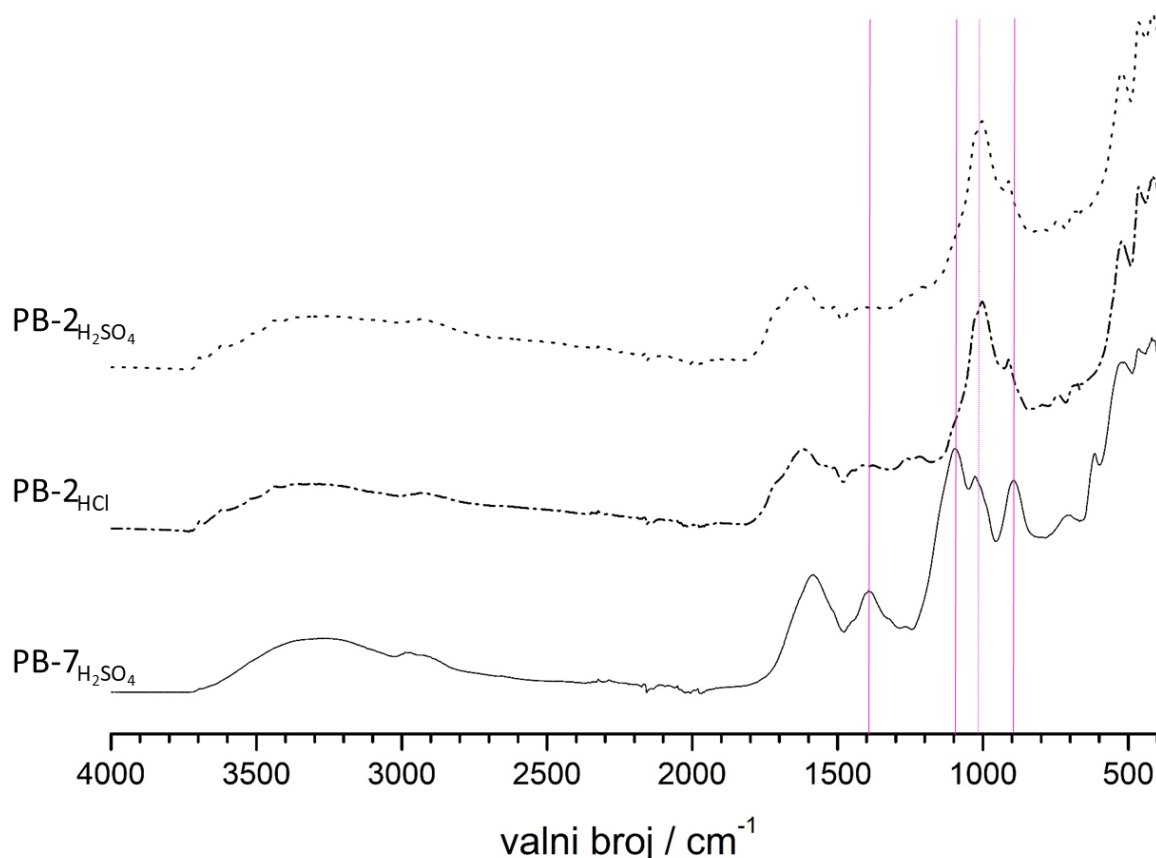
Slika 16 prikazuje ATR-FTIR spektre cjelovitih uzoraka, koji dakle sadrže vrpce i mineralne i organske faze. Radi lakše analize i u skladu s objašnjenim u odjeljku 4.3.1, žutom i plavom bojom istaknute su vrpca A i vrpca B, koje odgovaraju hidrofobnom odnosno hidrofilnom SOM-u.



**Slika 16.** FTIR spektri cjelovitih uzoraka tla (PB-tlo, BZ-tlo, SC-tlo). Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. Žutim je istaknuto područje s karakterističnim vrpcoma tzv. hidrofobnog SOM-a, a plavim područje tzv. hidrofилnog SOM-a.

Najuočljivija razlika između spektara vidljiva je kod vrpce pri  $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ , koja je karakteristična za kalcit i određene skupine SOM-a (Slika 14). Imajući u vidu rezultate analize spektara mineralne faze (Slika 15), jasno je da razlike proizlaze prvenstveno iz različitih udjela kalcita, tj. činjenice da SC (gotovo uopće) ne sadrži kalcit. Vrpcoma A i B, karakterističnim za SOM općenito, intenzitet se smanjuje u smjeru  $\text{PB} > \text{BZ} > \text{SC}$ , dakle proporcionalno s udjelom SOM-a (Slika 13). Smanjenje intenziteta uočljivije je kod vrpce karakteristične za hidrofilni SOM. Korisnije od pojedinih intenziteta zasebnih vrpca jest omjer njihovih intenziteta: u literaturi se omjer intenziteta vrpca A i B koristi za određivanje sastava SOM-a, u smislu određivanja relativnih količina hidrofilnih i hidrofobnih komponenti. Iz spektara je vidljivo da je B/A omjer najveći kod tla PB, zatim BZ i SC, iz čega proizlazi da je organska faza PB tla najbogatija polarnim skupinama, tj. da je PB najhidrofilnije tlo. Ovi rezultati u diskrepanciji su s rezultatima elementarne analize (poglavlje 3.3.4).

#### 4.3.4. FTIR spektri alkalnih ekstrakata



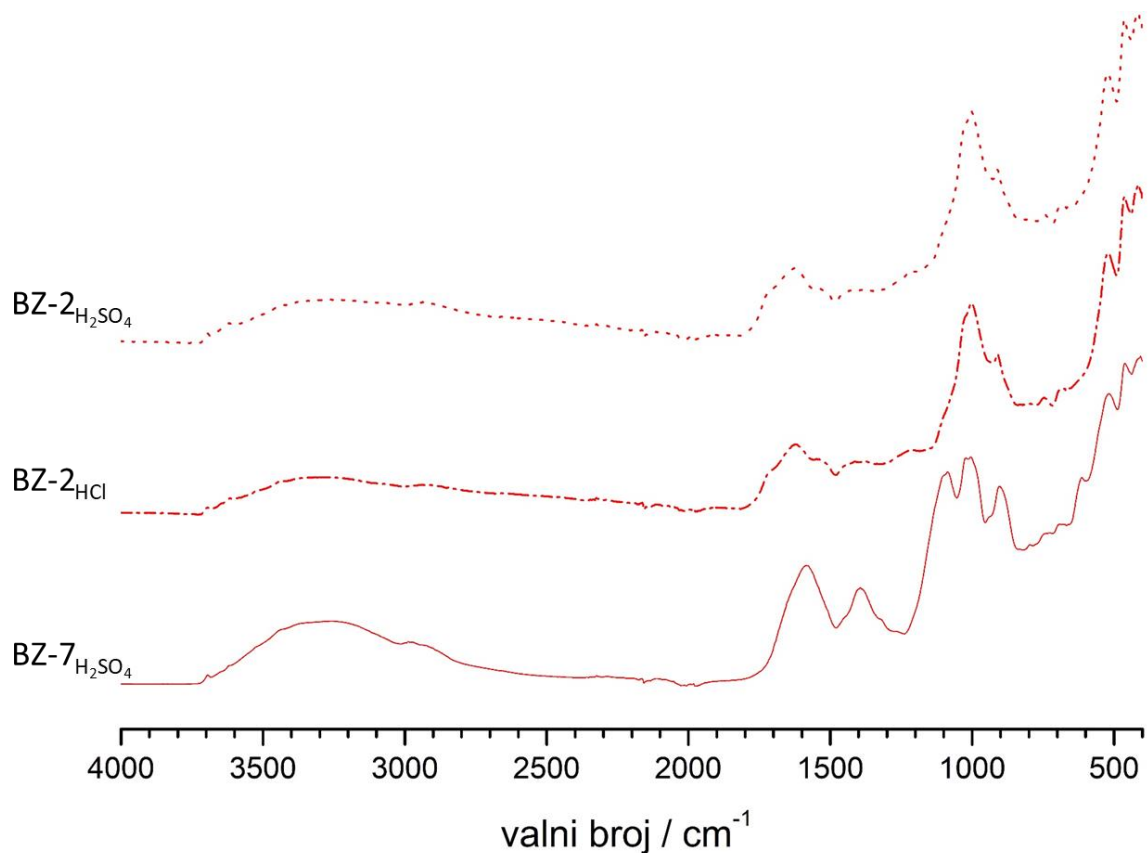
**Slika 17.** FTIR spektri alkalnih ekstrakata PB tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. Rozim okomitim linijama istaknuti su položaji relevantnih vrpci.

Jedan od ciljeva analize IR spektara bio je ustanoviti razlikuju li se, i na koji način, ekstrakti SOM-a iz tla ovisno o razlikama u pojedinim koracima u postupku ekstrakcije. Slika 17. prikazuje spektre ekstrakata iz tla PB, dobivenih ekstrakcijom pri pH 7 sa sumpornom kiselinom, zatim pri pH 2 sa sumpornom kiselinom i pri pH 2 s klorovodičnom kiselinom. Međusobnom usporedbom spektara, lako je uočljivo da su spektri ekstrakata PB-2<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> i PB-2<sub>HCl</sub> gotovo identični, dok se PB-7<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> vidno razlikuje. Ovaj je rezultat značajan jer ukazuje na to da izbor kiseline za zakiseljavanje tijekom ekstrakcije nije utjecajan čimbenik, dok krajnja pH vrijednost jest. Kod PB-2 uzoraka, vrpca pri ~1400 cm<sup>-1</sup> manjeg je intenziteta u odnosu na PB-7<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>, jednako kao i vrpca na ~1100 cm<sup>-1</sup> (koja je kod PB-2 uzoraka uočljiva tek kao slabo izraženo „rame“) te vrpca pri ~900 cm<sup>-1</sup> (istaknuto rozim punim linijama). Smanjivanjem intenziteta tih vrpci, maksimum pri ~1000 cm<sup>-1</sup> postao je dominantan (roza isprekidana linija).

Usporedbom s rezultatima IR analize mineralne faze, očito je da sve vrpce čiji se intenzitet smanjio kod PB-2 uzoraka u odnosu na PB-7 odgovaraju mineralnoj fazi (kalcit, kvarc, odnosno gline). Ovakav rezultat indicira da je kod ekstrakcije pri pH 7 u ekstraktima zaostala i mineralna faza, dok se ekstrakcijama kod kojih je zakiseljavanje išlo do pH 2 (s ikojom kiselinom) udio mineralne faze smanjio, tj. ekstrakti su postajali sve „čišći“. Međutim, i u spektrima tih ekstrakata još uvijek su vidljive karakteristične vrpce mineralne faze, kao samostalne vrpce ili „ramena“ na većoj susjednoj vrpci.

Poznato je da je vrpca pri  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  izraženog intenziteta u slučaju kada su u uzorku prisutne dominantno huminske kiseline (Slika 2) [8]. Intenzitet navedene vrpce u uzorku u čijem sastavu prevladavaju fulvinske kiseline bio bi približno jednak intenzitetu hidrofilne vrpce SOM-a. Spektri na Slici 17 dakle ukazuju da je u sastavu ekstrakata i pri pH 7 i pri pH 2 dominiraju huminske kiseline. Takav rezultat kod ekstrakata pri pH 2 u skladu je s metodom Kononove i Bjelčikove, kad se zakiseljavanje do pH 2 radi upravo zato da se izoliraju huminske kiseline.

Gore opisani zaključci od rezultata analize uzorka PB identični su kod uzorka BZ, čiji su spektri ekstrakata prikazani na Slici 18.



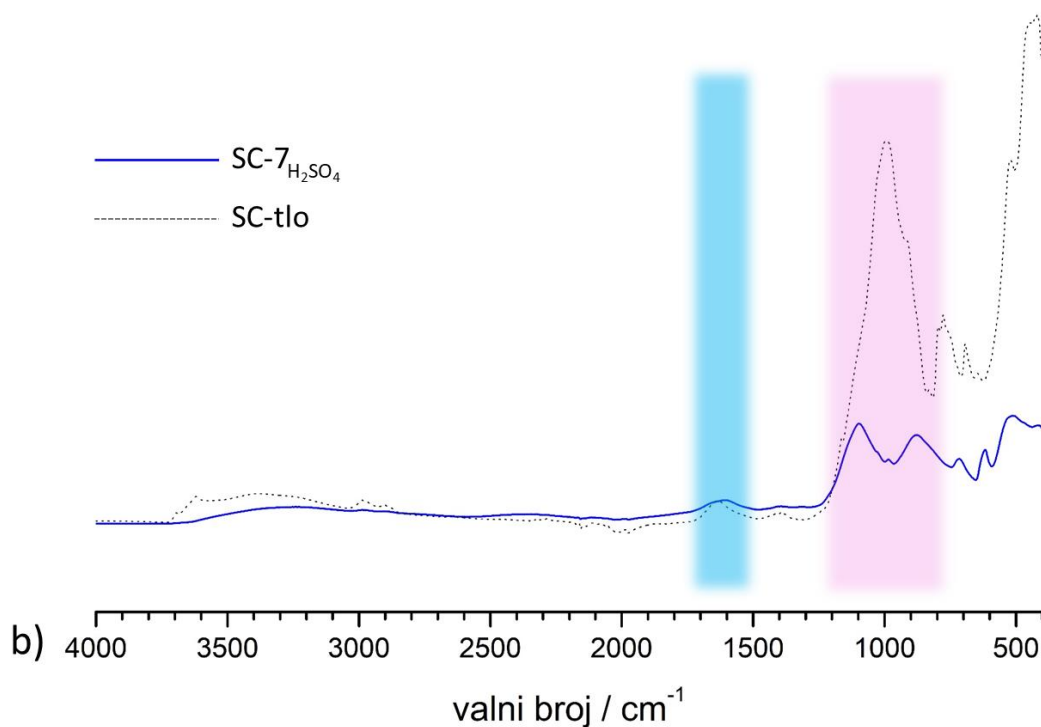
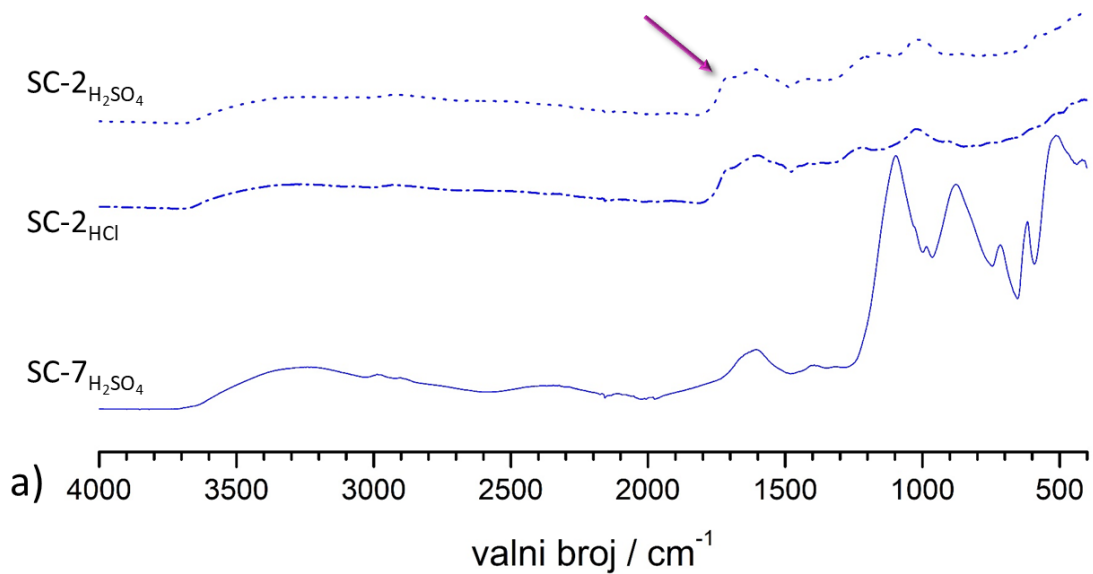
**Slika 18.** FTIR spektri alkalnih ekstrakata BZ tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.

Kod uzorka SC (Slika 19a), ponovno je uočljivo da su spektri ekstrakata pri pH 2 međusobno gotovo identični. Međutim, njihova usporedba sa spektrom SC-7<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> pokazuje značajnije razlike u odnosu na uzorke PB i BZ. Cijela skupina vrpce, koja se kod SC-7<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> protezala od ~1200 cm<sup>-1</sup> do ~600 cm<sup>-1</sup> u mnogostruko većem intenzitetu u odnosu na hidrofilnu vrpce SOM-a (~1600 cm<sup>-1</sup>), kod SC-2 spektara smanjila se do intenziteta sumjerljivog s hidrofilnom vrpcom.

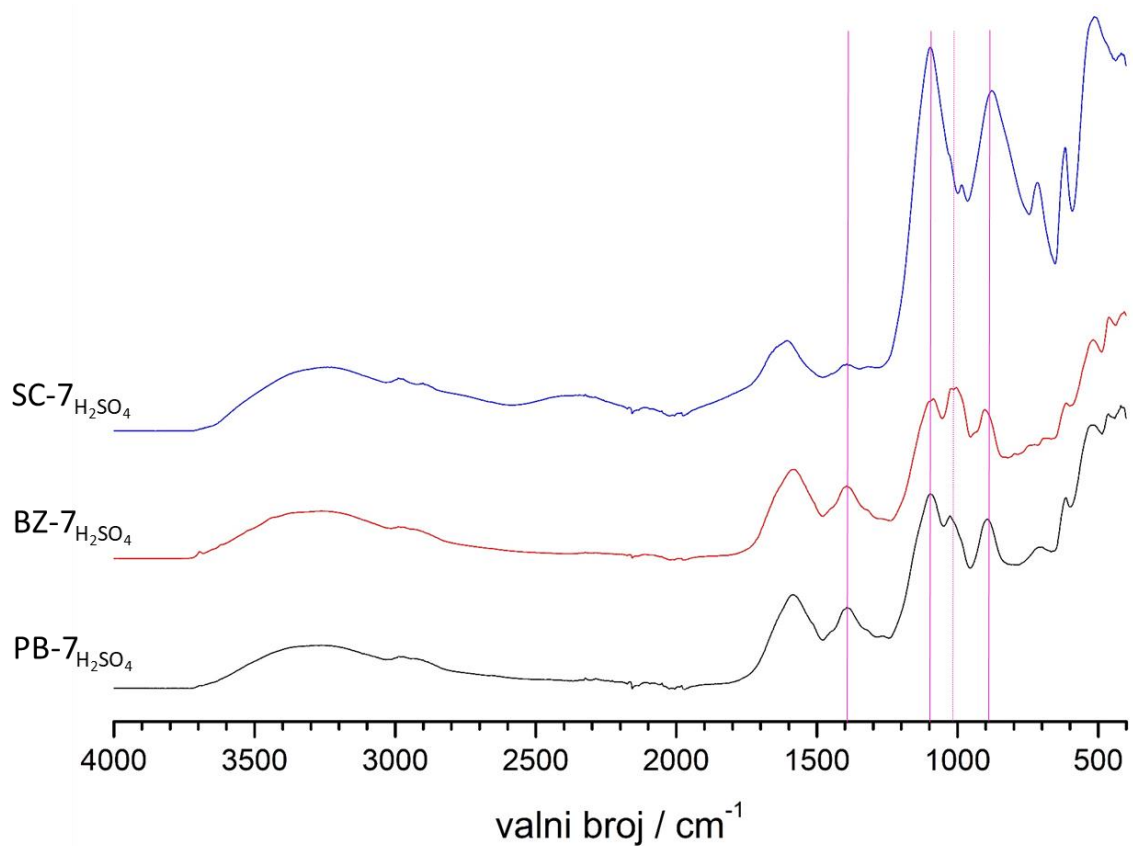
Ovaj rezultat indicira veću razliku u količini mineralne faze između ekstrakata SC-7 i SC-2, što se može pripisati različitim sastavima mineralnih faza, pri čemu je najveća razlika u velikoj količini gline prisutnoj kod SC tla. Mogućnosti su ili da je mnogo gline zaostalo u ekstraktu pri pH 7, ili da je uspješnije otklonjena zakiseljavanjem do pH 2. U tom je smislu korisna usporedba ekstrakta pri pH 7 s cjelovitim uzorkom tla, prikazana na Slici 19b. Radi lakše usporedbe, i uz pretpostavku da se cjelokupni SOM ekstrahirao, intenziteti su normirani na intenzitet hidrofilne SOM vrpce (tj. prilagođeni kako bi hidrofilne vrpce imale jednak intenzitet), istaknute plavim. Iz prikaza se vidi kako je omjer intenziteta hidrofilne vrpce i okvirnog intenziteta vrpce dominantno mineralne faze (~1200 cm<sup>-1</sup> do ~800 cm<sup>-1</sup>, istaknuto rožim) kod spektra SC-7<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> oko 4 – 5 puta manji u odnosu na spektar cjelovitog tla. Iz toga proizlazi da je oko 20 % mineralne faze zaostalo u ekstraktu pri pH 7. Daljnjim zakiseljavanjem, ostaci mineralne faze (kod SC su to pretežno gline) dodatno su uklonjeni, ali – kao što su rezultati pokazali i za PB i BZ tlo – pri SC-2 ekstraktima još uvijek su vidljive karakteristične vrpce mineralne faze. Iz usporedbe ovih spektara jasno se razlučuje i doprinos mineralne faze širokoj vrpce –OH skupina (~3700 cm<sup>-1</sup> do ~2800 cm<sup>-1</sup>).

U skupini vrpce pri nižim valnim brojevima (istaknuto rožim na Slici 19 b), uočljiv je nedostatak vrpce pri ~1000 cm<sup>-1</sup> kod ekstrakta pri pH 7, koja je lako uočljiva kod uzoraka PB-7 i BZ-7 (Slika 20). I kod ekstrakata pri pH 2, ta je vrpca tek malo većeg intenziteta od okolnih, dok kod PB-2 i BZ-2 ekstrakata dominira (Slika 21). Kako je poznato da je ta vrpca velikog intenziteta u slučaju prisutnosti huminskih kiselina, nedostatak iste upućuje da kod SC tla, za razliku od PB i BZ tla, sastavom SOM-a dominiraju fulvinske kiseline. Tome u prilog svjedoči i istaknuto „rame“ s lijeve strane hidrofilne vrpce kod SC-2 ekstrakata, istaknuto rožom strelicom na Slici 19a i Slici 21. Usporedbom sa spektrima čistih huminskih i fulvinskih kiselina iz literature [8], prikazanih na Slici 2, uočljivo je da navedeno „rame“ upućuje na povećanu količinu fulvinskih kiselina. Dodatno, rezultati elementarne analize indicirali su da je SC tlo najhidrofilnije, što je u skladu povećanim udjelom fulvinskih kiselina

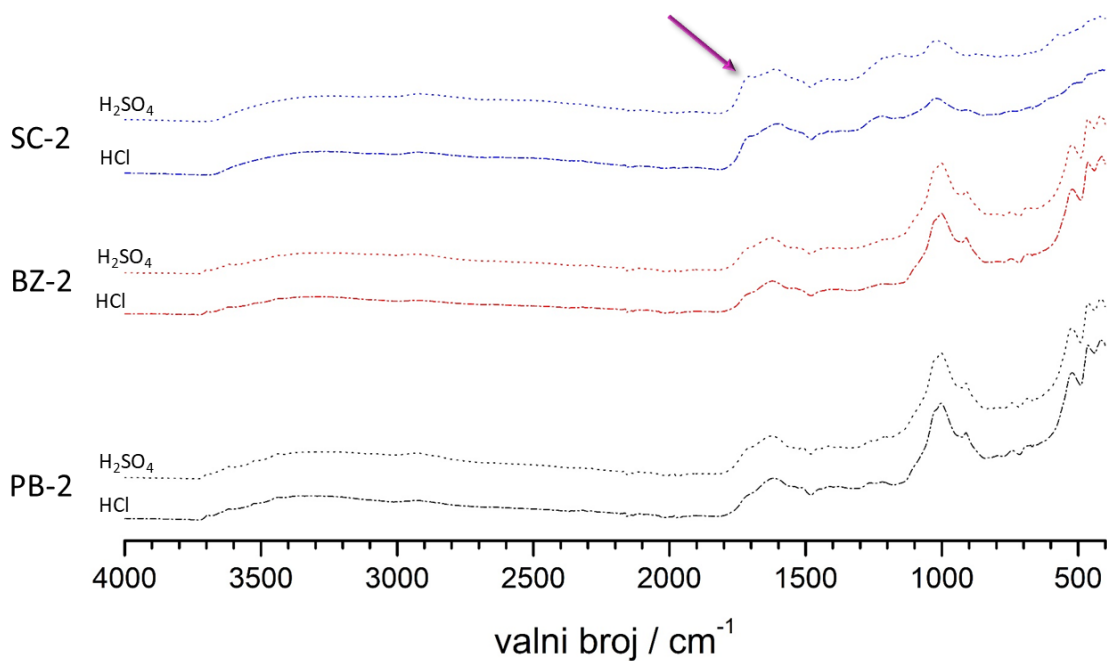
koje sadrže mnogobrojnije hidrofilne skupine (u odnosu na huminske kiseline, Slika 1). Ovakav rezultat iznenađujući je jer, po metodi Kononove i Bjelčikove, zakiseljavanje do pH 2 trebalo bi rezultirati ekstrakcijom samo huminskih kiselina.



**Slika 19.** a) FTIR spektri alkalnih ekstrakata SC tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. b) Usporedba alkalnog ekstrakta pri pH 7 i cjelovitog uzorka SC tla. Intenziteti su normirani na visinu hidrofilne vrpce SOM-a, koja je istaknuta plavim, dok je rozim istaknuto područje vrpce dominantno mineralne faze.



**Slika 20.** Usporedba spektara alkalnih ekstrakata svih tla dobivenih ekstrakcijom na pH 7 sumpornom kiselinom. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.



**Slika 21.** Usporedba spektara alkalnih ekstrakata svih tla dobivenih ekstrakcijom na pH 2 sumpornom i klorovodičnom kiselinom. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.

Iz Slike 21 mogu se donijeti i ostali zaključci. Usporedbom spektara prikazanih na slici, razvidno je da su kod svih uzoraka spektri ekstrakata gotovo identični za ekstrakciju s  $H_2SO_4$  i  $HCl$ . Drugim riječima, sastav ekstrakta neovisan je o kiselini upotrijebljenoj za zakiseljavanje tijekom ekstrakcije. Nadalje, razvidno je da su spektri ekstrakta uzoraka PB i BZ gotovo identični jedni drugima, a spektri SC uzorka mnogo su sličniji njima u odnosu na spektre cjelovitih uzoraka i mineralne faze. U svim su spektrima vidljive i slabe vrpce karakteristične za njihove mineralne faze.

Najuočljivija razlika, ona kod vrpce pri  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ , objašnjena je gore opisanim razlozima. Zajedno sa specifičnim oblikom hidrofilne vrpce, ove razlike indiciraju da se alkalni ekstrakti PB-2 i BZ-2 sastoji većinom od huminskih kiselina, a ekstrakt SC-2 sadrži i fulvinske kiseline.

#### 4.5. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da odabir kiseline za zakiseljavanje tijekom ekstrakcije ne utječe na konačan ishod ekstrakcije, tj. kemijski sastav ekstrakta. Takav rezultat indicira da anioni nastali disocijacijom kiseline, tj. kiselinski ostaci imaju ulogu samo tzv. „iona promatrača“ (engl. *spectator ion*). Valja napomenuti da su obje upotrijebljene kiseline (sumporna i klorovodična) jake kiseline, pa su njihovi kiselinski ostaci slabe baze, koje dakle ne hidroliziraju. Zato ovaj rezultat – da odabir kiseline za zakiseljavanje nije važan – ne treba poopćavati i na slabe kiseline, već ograničiti samo na jake.

Za razliku od odabira jake kiseline, istraživanje je pokazalo da krajnji pH do kojeg se radi zakiseljavanje jest utjecajan čimbenik u postupku ekstrakcije. Ovaj rezultat nije iznenađujući s obzirom da je poznato da se različite frakcije SOM-a odjeljuju upravo na temelju različite topljivosti pri nekom pH.

Međutim, rezultati pokazuju da se u ekstraktima dobivenima s obje metode nalazi nezanemariva količina zaostale mineralne faze. Zakiseljavanjem do pH 2, krajnjem pH u obje metode, udio mineralne faze se smanjuje, ali ipak nije potpuno uklonjena. Izgledno je da bi uklanjanje mineralne faze bilo uspješnije da su se ekstrakti više puta otapali u alkalnim otopinama nakon čega bi slijedilo zakiseljavanje do još nižih pH. Npr. Senesi i suradnici[39] predlažu otapanje ekstrakta u razrijeđenoj  $NaOH(aq)$ , centrifugiranje pri čak 31 400 g tijekom 20 minuta te zakiseljavanje koncentriranom klorovodičnom kiselinom do pH 1, uz ponavljanje ovog ciklusa nekoliko puta.



Što potpunije uklanjanje mineralne faze potrebno je jer se mnoge vrpce mineralnih komponenti tla preklapaju s vrpcama SOM-a, pa je – ukoliko je mineralna faza prisutna – za detaljniju analizu potrebno napraviti matematičko oduzimanje spektara samo mineralne faze od spektara ekstrakata. Bez toga, čak i s modernijom metodom poput ATR-FTIR, analiza može biti tek kvantitativna. Ukoliko je količina SOM-a malena, analiza je dodatno otežana i nepouzdana.

Kod analiza oblika hidrofobne vrpce, koja je uz elementarnu analizu „osnažila“ zaključak da se SOM kod tla SC razlikuje po kemijskom sastavu od SOM-a PB i BZ tala, u smislu većeg udjela fulvinskih kiselina, mora biti uzeta u obzir i činjenica da SC sadržava značajno veći udio glina. Naime, poznato je da organska faza – točnije, njen hidrofilni dio – ulazi među slojeve gline gdje međudjeluje s funkcionalnim skupinama na površini slojeva gline. Takva interakcija dovodi do pomaka položaja vrpce karakteristične za te skupine, i time dovodi do promjene oblika ukupne hidrofilne vrpce. Međutim, ova pretpostavka trebala bi biti potvrđena razlikovnom pretražnom kalorimetrijom ili nuklearnom magnetskom rezonancijom u čvrstom stanju.

Slično tomu, sastav mineralne faze mnogo bi preciznije (i kvantitativno) mogao biti određen difrakcijom rendgenskog zračenja. Sastav organske faze bio bi određen s većom sigurnošću i preciznošću upotrebom nuklearne magnetske rezonancije u čvrstom stanju. Stoga se može zaključiti da je ATR-FTIR spektrometrija, u svom osnovnom obliku, korisna metoda za kvalitativnu analizu tla jer na brz, jednostavan i jeftin način može dati korisne informacije. Međutim, za kvantitativne, detaljnije i pouzdanije informacije, nužno je istraživanja nadopuniti drugim komplementarnim tehnikama.

## 5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- odabir kiseline (ukoliko je jaka) upotrijebljene za zakiseljavanje tijekom ekstrakcije ne utječe na kemijski sastav ekstrakata;
- sastav početne suspenzije (smjesa natrijevog pirofosfata i natrijevog hidroksida, ili samo natrijev pirofosfat) također ne utječe na kemijski sastav ekstrakata;
- konačna vrijednost zakiseljavanja tijekom ekstrakcije bitan je čimbenik za kemijski sastav ekstrakata;
- dominantan doprinos zakiseljavanja do pH 2 pokazao se u otklanjanju mineralne faze, ne u promijeni sastava SOM-a;
- zakiseljavanje do pH 2 ni s jednom metodom ekstrakcije nije dovelo do potpunog otklanjanja mineralne faze;
- ekstrakti pri pH 2 uzoraka PB i BZ sadržavali su dominantno huminske kiseline, dok je kod ekstrakata uzorka SC i pri pH 2 zabilježeno prisustvo fulvinskih kiselina;
- ATR-FTIR spektrometrija, u svom osnovnom obliku, može dati korisne kvalitativne informacije o sastavu organske i mineralne faze tla – na brz, jednostavan i jeftin način
- ipak, detaljna analiza tla IR spektrometrijom vrlo je složena čak i u kvalitativnom smislu, i zato bi trebala biti upotpunjena dodatnim tehnikama poput difrakcije rendgenskog zračenja i nuklearne magnetske rezonancije u čvrstom stanju;
- za pouzdanu kvantitativnu analizu ATR-FTIR spektara potrebne su matematičke i statističke metode (matematičko oduzimanje spektara i analiza glavnih komponenti).

## 6. LITERATURA

1. Lehmann J, Kleber M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*. 2015 Dec;528(7580):60–8.
2. Organska tvar i kalcizacija [Internet]. Sveučilište u Osijeku; 2015 [cited 2022 Sep 13]. Available from: [http://www.fazos.unios.hr/upload/documents/ATiSBP-08\\_Organska%20tvar%20i%20kalcizacija.pdf](http://www.fazos.unios.hr/upload/documents/ATiSBP-08_Organska%20tvar%20i%20kalcizacija.pdf)
3. Karleuša R. Pokretnost i insekticida acetamiprida u tlima Republike Hrvatske [Internet]. [Diplomski rad]: Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2021 [cited 2022 Sep 13]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:415785>
4. Lal R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science*. 2004 Jun 11;304(5677):1623–7.
5. Bubalo A. Uloga organske tvari tla u agroekosustavu [Internet]. [Osijek]: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek; 2018 [cited 2022 Sep 13]. Available from: <chrome-extension://repozitorij.fazos.hr/islandora/object/pfos%3A1541/datastream/PDF/view>
6. Jug D. Obrada tla [Internet]. Poljoprivredni fakultet u Osijeku; [cited 2022 Sep 13]. Available from: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajphhttp://www.fazos.unios.hr/upload/documents/01\\_Odabrani%20tekstovi%20iz%20obrade%20tla.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajphhttp://www.fazos.unios.hr/upload/documents/01_Odabrani%20tekstovi%20iz%20obrade%20tla.pdf)
7. Znaor D. Izbacivanje oranja - vrijeme je za odlaganje pluga? 2018 Nov 20 [cited 2022 Sep 13]; Available from: <https://www.agroklub.com/kolumna/izbacivanje-oranja-vrijeme-je-za-odlaganje-pluga/46648/>
8. Mylotte R, Verheyen V, Reynolds A, Dalton C, Patti AF, Chang RR, et al. Isolation and characterisation of recalcitrant organic components from an estuarine sediment core. *J Soils Sediments*. 2015 Jan;15(1):211–24.
9. Kononova MM, Belcikova NP. A rapid analysis of humus composition in mineral soils. *Pocivovedenie*. 1961;10:75–87.

10. Kalev SD, Toor GS. The Composition of Soils and Sediments. In: Green Chemistry [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2022 Sep 22]. p. 339–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128092705000145>
11. Müller CM, Pejcic B, Esteban L, Piane CD, Raven M, Mizaikoff B. Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy: An Innovative Strategy for Analyzing Mineral Components in Energy Relevant Systems. *Sci Rep*. 2015 May;4(1):6764.
12. Margenot AJ, Parikh SJ, Calderón FJ. Improving Infrared Spectroscopy Characterization of Soil Organic Matter with Spectral Subtractions. *JoVE*. 2019 Jan 10;(143):57464.
13. Perešin A. Identifikacija polimernih ambalažnih materijala FTIR spektroskopijom [Internet]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2015 [cited 2022 Sep 22]. Available from: <https://repozitorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A83/datastream/PDF/view>
14. Kaufhold S, Hein M, Dohrmann R, Ufer K. Quantification of the mineralogical composition of clays using FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2012 Mar;59:29–39.
15. Beasley MM, Bartelink EJ, Taylor L, Miller RM. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *Journal of Archaeological Science*. 2014 Jun;46:16–22.
16. Marohnić S. Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika tla na sorpcijsko ponašanje dimetoata. [Rijeka]: Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci; 2019.
17. Ellerbrock RH, Gerke HH. Characterizing organic matter of soil aggregate coatings and biopores by Fourier transform infrared spectroscopy: Organic matter composition of coatings and biopores. *European Journal of Soil Science*. 2004 Jun;55(2):219–28.
18. Gračanin M. *Pedologija, II. dio*. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod; 1947.
19. Nadav I, Tarchitzky J, Chen Y. Induction of soil water repellency following irrigation with treated wastewater: effects of irrigation water quality and soil texture. *Irrig Sci*. 2013 May;31(3):385–94.

20. Calderón FJ, Reeves JB, Collins HP, Paul EA. Chemical Differences in Soil Organic Matter Fractions Determined by Diffuse-Reflectance Mid-Infrared Spectroscopy. *Soil Sci Soc Am J.* 2011 Mar;75(2):568–79.
21. McKissock I, Gilkes RJ, Bronswijk W van. The relationship of soil water repellency to aliphatic C and kaolin measured using DRIFT. *Soil Res.* 2003;41(2):251.
22. Nguyen T, Janik L, Raupach M. Diffuse reflectance infrared fourier transform (DRIFT) spectroscopy in soil studies. *Soil Res.* 1991;29(1):49.
23. Ellerbrock RH, Kaiser M. Stability and composition of different soluble soil organic matter fractions—evidence from  $\delta^{13}\text{C}$  and FTIR signatures. *Geoderma.* 2005 Sep;128(1–2):28–37.
24. Ellerbrock RH, Gerke HH, Bachmann J, Goebel MO. Composition of Organic Matter Fractions for Explaining Wettability of Three Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal.* 2005;69(1):57.
25. Simkovic I, Dlapa P, Doerr SH, Mataix-Solera J, Sasinkova V. Thermal destruction of soil water repellency and associated changes to soil organic matter as observed by FTIR spectroscopy. *CATENA.* 2008 Aug;74(3):205–11.
26. Ouattmane A, Provenzano MR, Hafidi M, Senesi N. Compost Maturity Assessment Using Calorimetry, Spectroscopy and Chemical Analysis. *Compost Science & Utilization.* 2000 Mar;8(2):124–34.
27. Huang CK, Kerr PE. Infrared study of the carbonate minerals. *The American Mineralogist.* 1960;45.
28. Gunasekaran S, Anbalagan G, Pandi S. Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure. *J Raman Spectrosc.* 2006 Sep;37(9):892–9.
29. Linker R, Shmulevich I, Kenny A, Shaviv A. Soil identification and chemometrics for direct determination of nitrate in soils using FTIR-ATR mid-infrared spectroscopy. *Chemosphere.* 2005 Nov;61(5):652–8.

30. Tarchitzky J, Lerner O, Shani U, Arye G, Lowengart-Aycicegi A, Brener A, et al. Water distribution pattern in treated wastewater irrigated soils: hydrophobicity effect. *Eur J Soil Science*. 2007 Jun;58(3):573–88.
31. Haberhauer G, Gerzabek MH. Drift and transmission FT-IR spectroscopy of forest soils: an approach to determine decomposition processes of forest litter. *Vibrational Spectroscopy*. 1999 Apr;19(2):413–7.
32. Baes AU, Bloom PR. Diffuse Reflectance and Transmission Fourier Transform Infrared (DRIFT) Spectroscopy of Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal*. 1989 May;53(3):695–700.
33. Janik LJ, Skjemstad JO, Shepherd KD, Spouncer LR. The prediction of soil carbon fractions using mid-infrared-partial least square analysis. *Soil Res*. 2007;45(2):73.
34. Janik LJ, Merry RH, Skjemstad JO. Can mid infrared diffuse reflectance analysis replace soil extractions? *Aust J Exp Agric*. 1998;38(7):681.
35. Bernier MH, Levy GJ, Fine P, Borisover M. Organic matter composition in soils irrigated with treated wastewater: FT-IR spectroscopic analysis of bulk soil samples. *Geoderma*. 2013 Nov;209–210:233–40.
36. Hall SJ, Berhe AA, Thompson A. Order from disorder: do soil organic matter composition and turnover co-vary with iron phase crystallinity? *Biogeochemistry*. 2018 Aug;140(1):93–110.
37. Parolo ME, Savini MC, Loewy RM. Characterization of soil organic matter by FT-IR spectroscopy and its relationship with chlorpyrifos sorption. *Journal of Environmental Management*. 2017 Jul;196:316–22.
38. Capriel P, Beck T, Borchert H, Gronholz J, Zachmann G. Hydrophobicity of the organic matter in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1995 Nov;27(11):1453–8.
39. Senesi N, Loffredo E, D’Orazio V, Brunetti G, Miano TM, La Cava P. Adsorption of Pesticides by Humic Acids from Organic Amendments and Soils. In: Clapp CE, Hayes MHB, Senesi N, Bloom PR, Jardine PM, editors. *Humic Substances and Chemical Contaminants* [Internet]. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America; 2015 [cited 2022 Sep 21]. p. 129–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2136/2001.humicsubstances.c8>

## PRILOZI

### POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Općenita struktura a) huminskih kiselina i b) fulvinskih kiselina.....	4
<b>Slika 2.</b> ATR-FTIR huminskih kiselina (HA) i fulvinskih kiselina (FA). Preuzeto i preuređeno iz rada [8].....	10
<b>Slika 3.</b> ATR-FTIR spektri glavnih komponenti mineralne faze tla. a) kvarc iz pijeska, b) najzastupljenije vrste glina; c) najzastupljenije vrste feldspata; d) minerali kalcitne skupine. Preuzeto i preuređeno iz ref. [11].....	13
<b>Slika 4.</b> a) Shematski prikaz rada ATR-FTIR spektrometra. b) Usporedba spektara dobivenih klasičnom FTIR metodom (KBr pelete), DRIFT metodom i ATR-FTIR metodom. Preuzeto iz ref. [15].....	15
<b>Slika 5.</b> Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s $H_2SO_4(aq)$ za ekstrakciju pri pH 7.....	20
<b>Slika 6.</b> Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s $H_2SO_4(aq)$ za ekstrakciju pri pH 2.....	21
<b>Slika 7.</b> Boje supernatanata uzorka nakon ispiranja 0,025 M $H_2SO_4$ .....	21
<b>Slika 8.</b> Ovisnost pH suspenzija uzoraka tla pri zakiseljavanju s $HCl(aq)$ za ekstrakciju pri pH 2.....	22
<b>Slika 9.</b> Skraćeni shematski prikaz tri načina ekstrakcije organske faze korištenih u istraživanju i sustav označavanja uzoraka. PB, BZ i SC oznake su uzoraka Plasa Bor, Bukva Zlobin, odnosno Slavonska Crnica; broj označava krajnju pH vrijednost kod zakiseljavanja tijekom ekstrakcije, a formula pokraj broja kiselinu korištenu za zakiseljavanje.....	23
<b>Slika 10.</b> a) Standardi (otopina glukoze) nakon dodatka $K_2Cr_2O_7$ i $H_2SO_4$ ; b) uzorci tla nakon dodatka $K_2Cr_2O_7$ i $H_2SO_4$ .....	24
<b>Slika 11.</b> Suspenzije i talozi uzoraka tijekom ekstrakcije pri a) pH 7 i b) pH 2.....	27
<b>Slika 12.</b> Pepeo nakon spaljivanja ekstrakta 8 h pri 430 °C.....	28
<b>Slika 13.</b> Baždarni pravac za određivanje količine SOM-a u uzorcima, dobiven bikromatnom metodom.....	28
<b>Slika 14.</b> Reprezentativni uzorak FTIR spektra cjelovitog uzorka tla (uzorak BZ-tlo). Istaknute su karakteristične vrpce najznačajnijih funkcionalnih skupina.....	32

<b>Slika 15.</b> FTIR spektri mineralne faze tla, dobiveni iz uzoraka pepela nastalog spaljivanjem ekstrakta PB, BZ i SC pri pH 7 na 430 °C tijekom 8 sati. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.....	33
<b>Slika 16.</b> FTIR spektri cjelovitih uzoraka tla (PB-tlo, BZ-tlo, SC-tlo). Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. Žutim je istaknuto područje s karakterističnim vrpčama tkz. hidrofobnog SOM-a, a plavim područje tkz. hidrofilnog SOM-a.....	35
<b>Slika 17.</b> FTIR spektri alkalnih ekstrakata PB tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. Rozim okomitim linijama istaknuti su položaji relevantnih vrpci.....	36
<b>Slika 18.</b> FTIR spektri alkalnih ekstrakata BZ tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.....	37
<b>Slika 19.</b> a) FTIR spektri alkalnih ekstrakata SC tla, dobivenih s tri metode ekstrakcije. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. b) Usporedba alkalnog ekstrakta pri pH 7 i cjelovitog uzorka SC tla. Intenziteti su normirani na visinu hidrofilne vrpce SOM-a, koja je istaknuta plavim, dok je rozim istaknuto područje vrpce dominantno mineralne faze.....	39
<b>Slika 20.</b> Usporedba spektara alkalnih ekstrakata svih tla dobivenih ekstrakcijom na pH 7 sumpornom kiselinom. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe.....	40
<b>Slika 21.</b> Usporedba spektara alkalnih ekstrakata svih tla dobivenih ekstrakcijom na pH 2 sumpornom i klorovodičnom kiselinom. Spektri su pomaknuti po y-osi radi lakše usporedbe. ....	40

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> Aktivna (aktualna), supstitucijska (izmjenjiva) i hidrolitička kiselost uzoraka tla (podaci iz ref. [16]).....	17
<b>Tablica 2.</b> Teksturni sastav uzoraka tla.....	17
<b>Tablica 3.</b> Standardne otopine glukoze za izradu kalibracijskog pravca.....	24
<b>Tablica 4.</b> Ocjena humoznosti tla prema klasifikaciji po Gračaninu [18].....	25
<b>Tablica 5.</b> Elementarna analiza uzoraka tla.....	30
<b>Tablica 6.</b> Položaji karakterističnih IR vrpci funkcionalnih skupina u tlima (prilagođeno iz ref. [11,35]).....	30



# ŽIVOTOPIS

## OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Grazia Milovan

Adresa: Jeromelina 39, 52 100, Pula

Telefonski broj i e-mail: +385 95 869 9468, grazia.milovan97@gmail.com

Državljanstvo: Hrvatsko i slovensko

Datum rođenja: 15. veljače 1997.

## OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2003. – 2011. Osnovna škola Veli vrh, Ul. Josipa Zahtile 1, 52 100, Pula

2011. – 2015. Opća gimnazija Pula, Trierska ul. 8, 52 100, Pula

2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet

Sveučilišta u Rijeci, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51 000, Rijeka

2019. – 2020. Mirovanje studija radi porodiljnog

2020. – 2022. Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet

Sveučilišta u Rijeci, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51 000, Rijeka

### Studentski poslovi:

- rad na aquaparku
- animator
- prodavač
- pomoćni konobar
- osobni asistent
- čišćenje kuća za odmor i vila (voditelj)

Volontiranje u projektima „Guinness World Record“ i „Prekidač“ udruge Sonitus.

## OSOBNOSTNE I KOMUNIKACIJSKE VJEŠTINE

- Materinski jezik: hrvatski
- Strani jezik: engleski
- Otvorena i komunikativna osoba, spremna za nova iskustva, prilagodljiva, izraženog timskog duha

### Digitalna kompetencija

- Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi
- Internet (e-mail, google+, društvene mreže)

## DODATNE INFORMACIJE

- Pasivni sudionik 1. studentskog kongresa zaštite zdravlja – Sanitas
- Aktivni sudionik 5. studentskog kongresa zaštite zdravlja – Sanitas
- Posjedovanje vozačke dozvole B kategorije