

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Přítomnost singletového kyslíku v povrchových vodách

Diplomová práce

Bc. Michaela Kovaříková

Školitel: doc. Ing. Petr Porcal, Ph.D.

České Budějovice 2019

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

ZADÁVACÍ PROTOKOL MAGISTERSKÉ PRÁCE

Student: Michaela Kovaříková, Bc.
(jméno, příjmení, tituly)

Obor – zaměření studia: Chemie-Matematika pro střední školy

Katedra: Ústav chemie a biochemie

Školitel: Petr Porcal, Ing., Ph.D.
(jméno, příjmení, tituly, u externího š. název a adresa pracoviště, telefon, fax, e-mail)

Téma magisterské práce: Přítomnost singletového kyslíku v povrchových vodách

Cíle práce: Práce bude zaměřena na stanovení a popis změny koncentrace singletového kyslíku v povrchových sladkých vodách za použití různých analytických metod.

Základní doporučená literatura:

Fede A., Grannas A.M. (2015): *Photochemical Production of Singlet Oxygen from Dissolved Organic Matter in Ice*. Environ. Sci. Technol., Vol. 49: 12808-12815

Burns J.M., Cooper W.J., Ferry J.L., et al. (2012): *Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environment*. Aquat. Sci. No. 74: 683-734

Flors C., Fryer M.J., Waring J., et al. (2006): *Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green*. Journal of Experimental Botany, Vol. 57, No. 8: 1725-1734

Haag W.R., Hoigne J. (1986). *Singlet Oxygen in Surface Waters. Photochemical Formation and Steady-State Concentration in Various Types of Waters*. Environ. Sci. Technol., Vol. 20, No. 4: 341-348

Financování práce:GAČR projekt č. 15-09721S


Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Porcal, Ph.D.

podpis: 

Garant oboru mag. studia: doc. Mgr. Martin Kabeláč, Ph.D.

podpis: 

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

podpis: 

Případný souhlas vedoucího ústavu AV: Prof. RNDr. Jan Kubečka, CSc. podpis: 

V Českých Budějovicích dne8.3.2017.....podpis studenta: 

Kovaříková, M., 2019: Přítomnost singletového kyslíku v povrchových vodách. [The presence of singlet oxygen in surface waters, MS. Thesis, in Czech] 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato magisterská práce se zabývá metodami měření koncentrace singletového kyslíku v povrchových vodách a zkoumáním faktorů, které by tuto koncentraci mohly ovlivňovat. První část práce je teoretická a obsahuje úvod do problematiky fotochemie a reaktivních forem kyslíku. V druhé části je popsána metodika prováděných pokusných měření, jejich výsledky a diskuze.

Klíčová slova:

Fotochemické reakce, povrchové vody, reaktivní formy kyslíku, singletový kyslík

Annotation:

This master thesis deals with the methods of measurement of singlet oxygen steady state concentrations in surface water and the factors affecting this concentration. The first part of this work shows theoretical background and an introduction to photochemistry of surface water with respect to the reactive oxygen species. The second part describes the methodology of conducted experiments and discuss its results with respect to current literature.

Key words:

Photochemical reaction, surface water, reactive oxygen species, singlet oxygen

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 17. 4. 2019

Michaela Kovaříková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé magisterské práce doc. Ing. Petru Porcalovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, cenné rady i připomínky a trpělivost v průběhu jejího zpracování.

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah | 5 |
| Seznam zkratk | 6 |
| 1. Úvod a cíle práce | 7 |
| 2. Literární rešerše | 8 |
| 2.1 Fotochemie a excitované stavy..... | 8 |
| 2.1.1 Rozpuštěný organický materiál (DOM) | 12 |
| 2.1.2 Světelné záření ve vodním prostředí..... | 14 |
| 2.1.2.1 Rozptyl světla | 15 |
| 2.1.3 Kyslík..... | 15 |
| 2.1.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)..... | 17 |
| 2.1.4.1 Singletový kyslík..... | 19 |
| 2.2 Metody stanovení ROS | 20 |
| 2.2.1 Metody stanovení singletového kyslíku | 21 |
| 2.2.1.1 Metoda stanovení s furfurylalkoholem (FFA)..... | 21 |
| 2.2.1.2 Metoda stanovení se Singlet Oxygen Sensor Green reagent (SOSG) | 22 |
| 3. Metodika | 23 |
| 3.1 Vzorky..... | 23 |
| 3.2 Chemické analýzy | 24 |
| 3.2.1 Stanovení singletového kyslíku pomocí FFA | 25 |
| 3.2.2 Stanovení singletového kyslíku pomocí SOSG..... | 26 |
| 4. Výsledky | 29 |
| 4.1 Metoda stanovení s FFA | 29 |
| 4.2 Metoda stanovení s SOSG..... | 31 |
| 4.3 Porovnání výsledků | 35 |
| 5. Diskuse | 37 |
| 6. Závěr | 40 |
| 7. Literatura..... | 41 |
| 8. Přílohy | 43 |
| 8.1 Obrázky | 43 |
| 8.2 Tabulky | 45 |

Seznam zkratek

| Zkratka | Popis |
|---------|---|
| CDOM | opticky aktivní rozpuštěné organické látky (chromophoric or colored dissolved organic matter) |
| DMF | dimethylfumarát ($C_6H_8O_4$) |
| DMSO | dimethylsulfoxid ($(CH_3)_2SO$) |
| DOC | rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) |
| DOM | rozpuštěné organické látky (dissolved organic matter) |
| FA | fulvokyseliny (fulvic acids) |
| FFA | furfurylalkohol (furan-2-ylmethanol) |
| HA | humínové kyseliny (humic acids) |
| HS | humínové látky (humic substances) |
| NOM | přírodní organické látky (natural organic matter) |
| POM | partikulované organické látky (particulate organic matter) |
| SOSG | singlet oxygen sensor green |

1. Úvod a cíle práce

Singletový kyslík je jednou z reaktivních forem kyslíku, která se vyskytuje ve vodním prostředí, a jeho vznik může být iniciován slunečním zářením. Vzhledem ke své vysoké reaktivitě je tato molekula schopná degradovat například některé polymery, proteiny a základní aminokyseliny. Díky těmto vlastnostem hraje významnou roli při degradaci organických látek obsažených v povrchových vodách (Lang et al., 2006; Helms et al., 2008).

Cílem předkládané magisterské práce je zhodnocení možností stanovení koncentrace singletového kyslíku v povrchových vodách pomocí dvou různých metod. První z nich je metoda využívající fufurylalkohol (FFA) jako zachytávací činidlo pro singletový kyslík a druhá metoda pro tento účel využívá zachytávací činidlo s komerčním názvem Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG).

Práce se soustředí především na zjištění použitelnosti výše zmíněných metod ve vodním prostředí a jejich případné použití při terénním měření. V závislosti na použitelnosti metod bude dále provedeno srovnání množství singletového kyslíku produkovaného během ozařování různých vzorků povrchových vod České republiky a popis faktorů, které tuto produkci mohou ovlivňovat.

2. Literární rešerše

2.1 Fotochemie a excitované stavy

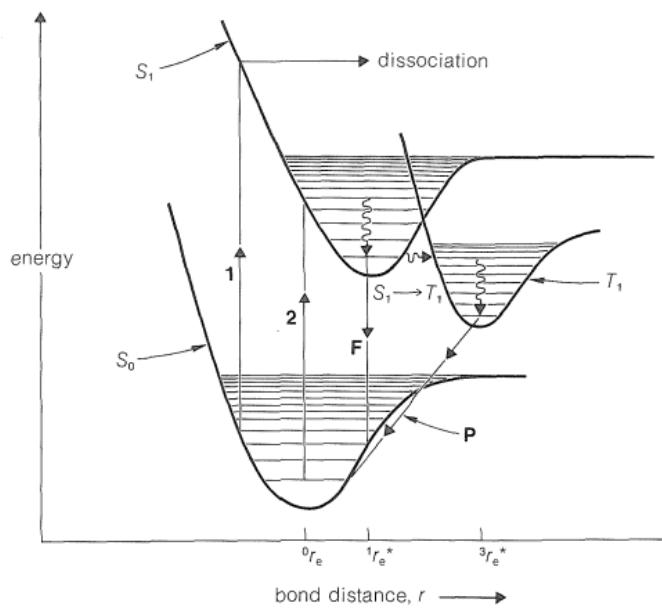
Světelné záření hraje významnou roli v chemických procesech na Zemi. Již od počátku devatenáctého století je známo, že je nedílnou součástí fotosyntézy, a s rozvojem spektroskopické techniky byly později odhaleny i další fotochemické procesy hrající významnou roli v našich životech. Příkladem může být zrak, který je zprostředkován fotochemickými reakcemi, či ničivé až destruktivní účinky UV záření na buněčnou DNA.

Většina fotochemických reakcí probíhá v následujících třech krocích:

1. Absorpce záření a vznik excitovaného stavu.
2. Primární fotochemická reakce zahrnující látku v excitovaném stavu.
3. Sekundární (temná) reakce, při které reagují produkty primární fotochemické reakce za vzniku stabilních produktů.

V prvním kroku dochází ke kontaktu molekuly se světelným zářením, což způsobí absorpci energie a přechod molekuly ze základního na excitovaný stav. Molekuly nebo jejich části, které jsou schopny absorbovat záření, nazýváme chromofory. Většina molekul má v základním stavu všechny své elektrony spárované, tomuto stavu říkáme singletový (S_0). Po přechodu na excitovaný stav mohou nastat dvě odlišné situace.

První možností je, že po absorbování energie se elektron dostane do vyšší energetické hladiny a převrátí své spinové číslo. Molekula má tedy dva nepárové elektrony se stejným spinovým číslem. Tomuto stavu se říká tripletový (T) a je znázorněn v diagramu elektronové konfigurace na Obrázku 2.1.



Obr. 2.1: Diagram potenciální energie základního a excitovaných stavů molekuly (Roberts a Caserio, 1977).

Druhou možností je, že se molekula dostane do excitovaného stavu, kde jeden její celý elektronový pár přejde do vyšší energetické hladiny. Výsledná molekula má tedy dva elektrony s opačným spinem v jednom antivazebném orbitalu. Tento stav se nazývá singletový excitovaný (S_1), diagram jeho elektronové konfigurace je také na Obrázku 2.1 (Roberts a Caserio, 1977).

Pro vznik singletového excitovaného stavu (S_1) musí molekula přijmout větší množství energie než při vzniku tripletového stavu (T). Vyplyvá to mimo jiné z Hundova pravidla, které říká, že orbitály se nejdříve zaplňují jedním elektronem se shodným spinovým číslem, a až poté začnou vznikat elektronové páry, protože u nepárových elektronů působí menší odpudivé síly než u spárovaných. Z tohoto důvodu je tripletový stav (T) stabilnější než singletový (S_1) (Roberts a Caserio, 1977). Životnost látek v tripletovém stavu (T) je v průměru 10^{-5} až 10^{-4} sekund, zatímco u singletového excitovaného stavu (S_1) je to jen 10^{-9} až 10^{-8} sekund (Kirk, 2011).

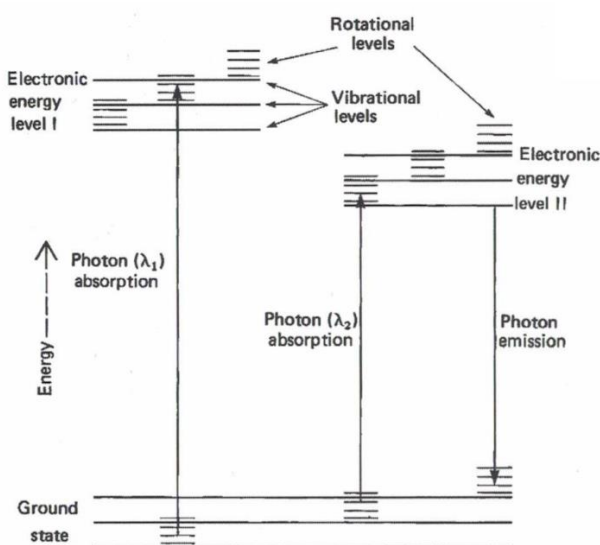
Pro přechod molekuly do excitovaného stavu musí být dodáno dostatečné množství energie a během fotochemických reakcí je tato energie dodávána ve formě světla

(tj. elektromagnetického záření). V závislosti na vlnové délce (λ) tohoto záření můžeme určit jeho energii, a to podle následujícího vzorce:

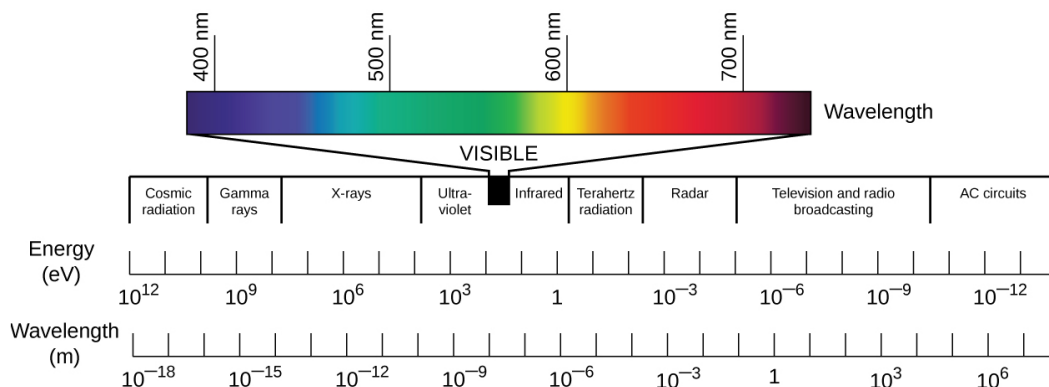
$$E = h \frac{c}{\lambda} = h \cdot \nu \quad (1)$$

kde $h = 6,626069 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ je Plankova konstanta, $c = 2,997925 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ je rychlost šíření světla ve vakuu, a ν je frekvence vlnění (Kirk, 2011). Výsledná energie vychází v jednotkách J/s a ze vzorce je patrné, že s rostoucí vlnovou délkou bude energie záření klesat.

V rámci každé energetické hladiny elektronového obalu molekul existují rotační a vibrační energetické hladiny, které jsou pro lepší představu zobrazeny na Obrázku 2.2. Při dodávání energie pomocí záření o vlnové délce větší než $20 \mu\text{m}$, které spadá do vzdálenějšího infračerveného až mikrovlnného záření podle spektra elektromagnetických vln zachyceném na Obrázku 2.3, mohou molekuly získat dostatečnou energii pouze pro přesun mezi rotačními hladinami. Infračervené záření o vlnové délce do $20 \mu\text{m}$ je schopné dodat dostatečnou energii pro přechod mezi vibračními hladinami a konečně záření v rozsahu viditelného (VIS) a ultrafialového (UV) záření má takové množství energie, které umožní vznik excitovaného stavu, neboli přesun mezi hlavními energetickými hladinami (Brezonik a Arnold, 2011).



Obr. 2.2: Přechod elektronu ze základního stavu do stavu excitovaného způsobený absorpcí fotonu o vlnové délce λ_1 nebo λ_2 , kde $\lambda_1 < \lambda_2$ (Kirk, 2011).



Obr. 2.3: Spektrum elektromagnetických vln (OpenStax, 2016).

Vznikající excitované stavy mají vyšší energetické hladiny, a proto jsou méně stabilní. Existuje několik způsobů, jak může molekula přebytečnou energii uvolnit a tím přejít zpět do základního stavu (S_0). Popíšeme nyní tři základní procesy přechodu excitovaného stavu zpět na základní.

První z možností je emise ve formě elektromagnetického záření. Podle Kashova pravidla nejprve dochází ke ztrátě vibrační energie způsobené interakcemi s okolím, a teprve po úbytku veškeré této energie v dané energetické hladině může dojít k návratu do základního stavu pomocí vyzáření fotonu (Braslavsky, 2007). Toto záření se nazývá fluorescence a jeho vlnová délka se liší od vlnové délky záření přijatého při přechodu na excitovaný stav (Roberts a Caserio, 1977). Pokud dochází k návratu do základního stavu molekuly touto cestou, nenastává v systému žádná chemická změna.

Druhým způsobem, jak může molekula uvolnit energii excitovaného stavu, je skrze chemickou reakci s jinými molekulami ve svém okolí. Tato chemická reakce se nazývá přímá fotochemická reakce, protože chromofor vstupuje přímo do reakce. Při zkoumání průběhu těchto reakcí se řídíme dvěma následujícími zákony. Prvním fotochemickým zákonem zformulovaným Ch. von Grotthusem a J. Drapperem (Grotthus-Draper law), který říká, že pouze absorbované světlo může vést k chemickým změnám, a druhým fotochemickým zákonem stanoveným S. Starkem a A. Einsteinem (Stark-Einstein law), který uvádí, že každý absorbovaný foton aktivuje jednu molekulu. Z tohoto plyne, že přímé fotolytické reakce probíhají podle kinetiky prvního řádu. Komplikující okolností pro modelování této kinetiky však zůstává kvantifikace intenzity světla, a tedy počtu aktivně se účastnících fotonů, protože tato intenzita

je ve vodním prostředí silně závislá na hloubce a také na úhlu dopadu záření (Brezonik a Arnold, 2011). Tato problematika bude blíže představena v kapitole 2.1.2 Světelné záření ve vodním prostředí.

Konečně třetí možností uvolnění energie získané absorpcí fotonu je předání energie, a tedy excitace jiné molekuly, při srážce. Reakce iniciované tímto způsobem označujeme jako nepřímou fotochemickou reakci. Chromofor nevstupuje přímo do reakce, ale excituje akceptor, který následně iniciuje chemickou reakci. Tento proces má velký význam, protože umožňuje fotochemickou přeměnu molekul neschopných absorpce fotonů v dostupných vlnových délkách. Detailnější kinetický model pro většinu těchto reakcí neexistuje, zejména z toho důvodu, že obsahují množství přechodných meziproductů, které se mohou přeměňovat různými způsoby. Navíc, stejně jako u přímé fotochemické reakce, je potřeba zvažovat měnící se intenzitu světelného záření napříč vzorkem (Brezonik a Arnold, 2011).

Existuje velké množství reakčních cest pro fotochemické reakce. Mezi nejvýznamnější bezpochyby patří disociace, tedy rozpad na menší molekuly. Tomuto typu reakce snadno podléhají například látky obsahující keto skupinu. Dalšími častými reakcemi organických látek jsou například cyklizace, izomerace, odtržení vodíkového atomu, dimerizace, nebo přenos elektronu. Je tedy zřejmé, že fotochemickým reakcím podléhají obzvláště látky organického původu (Roberts a Caserio, 1977).

2.1.1 Rozpuštěný organický materiál (DOM)

Organický materiál je hojně zastoupenou součástí povrchových vod a skládá se ze dvou hlavních složek. První složkou jsou partikulované organické látky (POM), jejichž částice mají průměr větší než 0,45 μm , a druhou složkou jsou rozpuštěné organické látky (DOM), jejichž částice mají průměr menší než 0,45 μm (Tan, 2014).

Existují dva hlavní zdroje rozpuštěného organického materiálu ve vodě. Prvním je vnější zdroj, kdy se organický materiál dostává do vodního tělesa z půdy, tento materiál se nazývá allochtonní. Druhý zdroj je vnitřní, materiál z tohoto zdroje se nazývá autochtonní,

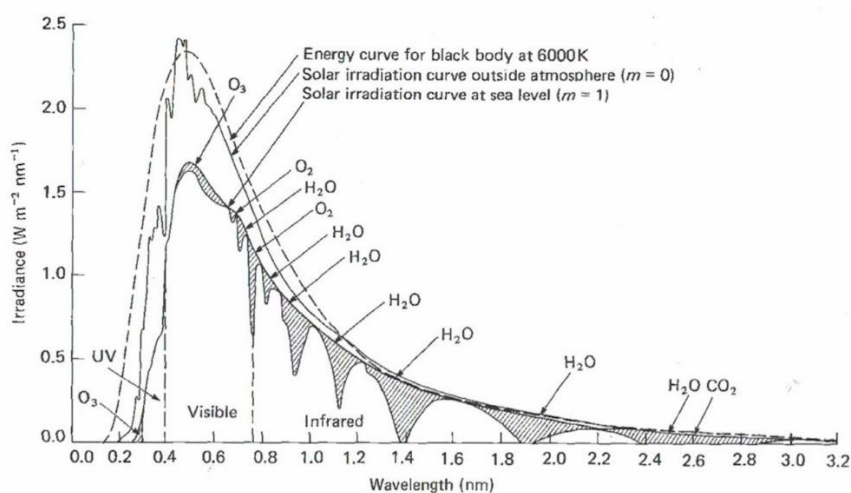
a je produkován rostlinnými a živočišnými organismy přítomnými ve vodním tělese. Ve vodních tocích a obzvláště blíže k jejich prameni je většina DOM allochtonního původu, zatímco v jezerech, nádržích a podobných vodních systémech častěji převažuje DOM autochtonního původu (Hood et al., 2005).

Složení rozpuštěných organických látek nelze snadno kvalifikovat. Nejčastěji se molekuly DOM skládají z uhlíku, kyslíku a vodíku, ale obsahují i množství jiných prvků. Největší zastoupení má však jednoznačně uhlík, který představuje zhruba 50% hmoty, a proto se při kvantifikaci DOM nejčastěji přechází na zjišťování obsahu rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Látky tvořící DOM se dají rozdělit do dvou skupin. Jsou jimi látky huminového a nehuminového charakteru. Mezi huminové látky patří zaprvé huminové kyseliny, jejichž obsah uhlíku je přibližně 57 %, a jsou rozpustné pouze v kyselém prostředí, a zadruhé fulvokyseliny, jejichž obsah uhlíku se pohybuje okolo 46 %, a jsou zcela rozpustné. Mezi nehuminové látky patří především proteiny a polysacharidy (Pivokonský et al., 2010; Tan, 2014).

Mezi rozpuštěné organické látky dále také patří nízkomolekulární sloučeniny, jako jsou karboxylové kyseliny a aminokyseliny. Tyto látky vznikají především degradací vysokomolekulárních organických sloučenin zmíněných v předešlém odstavci. Významný podíl z těchto degradačních reakcí tvoří reakce fotochemické. Při ozařování chromoforických DOM (CDOM) dochází k jejich fotochemické oxidaci. Produkty této reakce jsou právě nízkomolekulární organické sloučeniny, dále jsou to anorganické sloučeniny (konkrétně oxid uhličitý a oxid uhelnatý), a navíc dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, o kterých více pojednává kapitola 2.1.5 Reaktivní formy kyslíku (ROS). CDOM určují z velké části optické vlastnosti povrchových vod, ochraňují organismy před působením UV záření a hrají klíčovou roli v množství biochemických a fotochemických reakcí (Berggren et al., 2010; Helms et al., 2008).

2.1.2 Světelné záření ve vodním prostředí

Množství a spektrální složení světla, které dopadá na zemský povrch je ovlivněno třemi faktory. Těmi jsou absorpce, odraz a rozptyl. Absorpce záření je z největší části způsobena molekulami H_2O , O_3 , O_2 a CO_2 . V dané zeměpisné šířce se tyto faktory periodicky mění především v závislosti na naklonění Země vůči Slunci a množství srážek v atmosféře. Rozdíl množství světla vstupujícího do atmosféry a dopadajícího na hladinu moře je znázorněn na Obrázku 2.4 (Kirk, 2011).



Obr. 2.4: Množství a spektrální složení záření vstupujícího do atmosféry ($m = 0$) a záření dopadajícího na hladinu moře ($m = 1$) (Kirk, 2011).

Pronikání světla pod vodní hladinu je silně závislé na úhlu dopadajícího záření a koncentraci a typu rozpuštěných látek v ní obsažených. Proud světla prostupující vodním sloupcem konstantně ztrácí fotony v důsledku rozptylu a absorpce světla způsobené přítomnými částicemi, ale zároveň také v důsledku rozptylu světla, které původně prostupovalo v jiném směru, fotony získává. Množství pronikajícího světla se s hloubkou vodního sloupce exponenciálně zmenšuje. Tuto závislost je možné zapsat následující rovnicí:

$$I_z = I_0 e^{-kz} \quad (2)$$

kde I_z je intenzita světla v hloubce z , I_0 je intenzita světla těsně pod hladinou a k je tzv. extinkční koeficient. Extinkční koeficient je nejčastěji určován experimentálně (Kirk, 2011; Schwarzenbach et. al., 1993).

2.1.2.1 Rozptyl světla

Rozptyl světla je jev, při kterém během interakce s molekulou dochází k odklonu fotonu z jeho původní dráhy. Rozlišujeme dva druhy tohoto rozptylu.

Prvním druhem je elastický rozptyl světla. V tomto případě se změní pouze dráha fotonu a jeho vlnová délka zůstává stejná. Ve většině případů dochází právě k elastickému rozptylu světla. Malá část záření však během interakce s molekulou může ztratit nebo přijmout dané množství energie odpovídající energii vibrační nebo rotační vrstvy molekuly, čímž se změní vlnová délka tohoto záření. Tomuto rozptylu říkáme neelastický, nebo také Ramanův rozptyl, podle indického fyzika, který tento fenomén objevil. Pro molekulu vody je tento jev výrazný a její Ramanovo emisní spektrum se v různých přírodních vodách liší jen málo. Je tedy možné využít známé parametry Ramanova emisního spektra vody pro normalizaci fluorescenčních měření. Takto normalizovaná data se uvádějí v Ramanových jednotkách, které vyjadřují poměr naměřeného emisního záření analyzovaného vzorku a plochy píku Ramanova spektra v odpovídající vlnové délce emisního záření vody (Kirk, 2011; Ohno, 2002).

2.1.3 Kyslík

Objev kyslíku je nejčastěji připisován Josephu Priestlymu, který ho získal zahříváním oxidu rtuťnatého pomocí zvětšovacího sklíčka a tento objev publikoval ve své knize roku 1775. Ve stejné době se podařilo kyslík získat také Carlu Wilhelmu Scheelovi. Ten ho uměl vyrábět stejným způsobem jako Priestly, ale navíc také zahříváním oxidu manganičitého. Scheel měl však potíže s vydavatelstvím, a tak své poznatky publikoval až roku 1777. Oba dva si sice všimli, že tento prvek podporuje hoření, ale ani jeden z nich si neuvědomoval důležitost svého objevu.

Až francouzský chemik Antoine Lavoisier, který s kyslíkem experimentoval, vytvořil teorii, že při spalování kovů dochází k tvorbě sloučenin s tímto plynem, a položil tak základ moderní chemii (Ebsworth et al., 1975).

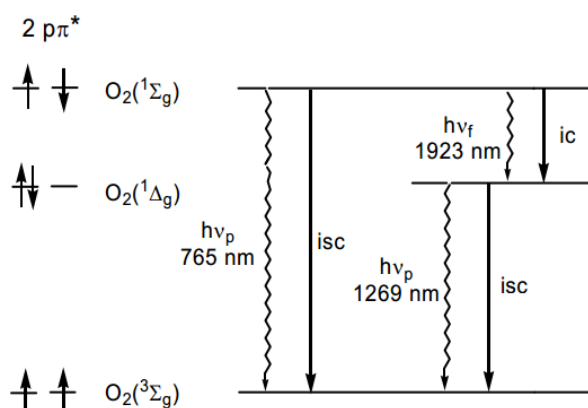
Kyslík je osmým prvkem periodické soustavy prvků. Je to bezbarvý plyn bez zápachu, který je životně důležitý pro všechny aerobní organismy. Nachází se v 16. skupině a 2. periodě a je nejrozšířenějším prvkem na Zemi. Pouze izotopy ^{17}O a ^{18}O jsou stabilní. Ve své valenční vrstvě má šest elektronů a je to tedy dvouvalný prvek. Nejčastěji se vyskytuje v oxidačním stavu -II, ale může nabývat i oxidačních stavů -I a +I (Dole, 1965). Kyslík v čisté podobě tvoří dvou atomární molekuly, ale je schopný reagovat s většinou ostatních prvků periodické soustavy; často ho tedy nalezneme ve sloučeninách. Významná je také tří atomární molekula kyslíku O_3 , která se nazývá ozon.

Ozon se za běžných podmínek vyskytuje jako bezbarvý plyn; v kapalném stavu získává tmavě modrou barvu. Vzniká ve stratosféře reakcí kyslíku s UV zářením nebo v nižších vrstvách atmosféry při elektromagnetickém výboji doprovázejícím bouřky. Uměle se také připravuje pomocí elektrického výboje, do kterého je zaváděn kyslík. Jedná se o velice silné oxidační činidlo, proto je při povrchu země obecně považovaný za škodlivou látku. Patří však také mezi skleníkové plyny a utváří velice důležitou ozonovou vrstvu. Ozonová vrstva se nachází 15-50 km nad Zemským povrchem a pohlcuje většinu UV záření, což způsobuje zvýšení teploty. Díky této vrstvě jsou živé organismy chráněny před ničivým UV zářením a nejnižší vrstva atmosféry (troposféra) si uchovává svou teplotu (Daintith, 2008).

Dvouatomární molekulový kyslík je výjimečný tím, že se nejedná o molekulu v singletovém stavu, jako většina molekul v základním stavu, ale vyskytuje se ve stavu tripletovém. Reakce mezi molekulami v singletovém a tripletovém stavu jsou možné jen tehdy, pokud se podaří vytvořit podmínky pro překonání spinového zákazu a jejich aktivační energie je velice vysoká. Z tohoto důvodu je reaktivnost kyslíku v základním stavu značně snížena. Spinový zákaz říká, že elektrony s různým spinovým číslem mohou sice toto číslo změnit (například absorpcí fotonu), ale nemohou zároveň volně měnit energetické hladiny, protože je potřeba zachovat celkový spin molekuly. Bez spinového zákazu by všudypřítomný vzdušný

kyslík zoxidoval většinu organické hmoty na Zemi na oxid uhličitý a vodu. Na Obrázku 2.5 je zobrazen diagram energetických hladin a přechodů mezi základním a excitovanými stavy kyslíku a obsazení elektronů v nejvyšším antivazebném orbitalu (Lang et al., 2005; Daintith, 2008).

Rozpuštěný kyslík je důležitým účastníkem fotochemických reakcí ve vodním prostředí, proto, že se zde vždy vyskytuje ve vysokých koncentracích a energie potřebná k jeho excitaci je poměrně nízká (Brezonik a Arnold, 2011).

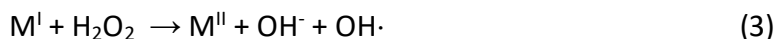


Obr. 2.5: Diagram přechodů mezi základním a excitovanými stavy kyslíku. Symbol ³Σ_g značí základní stav, ¹Δ_g je tripletový excitovaný, a ¹Σ_g je singletový excitovaný stav (Lang et al., 2005).

2.1.4 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

V této kapitole si postupně představíme jednotlivé běžně se vyskytující reaktivní formy kyslíku, které se často označují zkratkou ROS přejatou z anglického: „Reactive oxygen species“. Jedná se o molekuly jejichž poločas rozpadu ve vodním prostředí se pohybuje v rozmezí nanosekund až pár hodin, a jejichž struktura obsahuje kyslík. V přírodních povrchových vodách se jejich koncentrace většinou pohybuje v piko až mikro molárních koncentracích, přesto díky své reaktivnosti výrazně ovlivňují probíhající chemické přeměny (Burns et al., 2012). Dají se rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky s radikálovým charakterem, mezi které patří mimo jiné hydroxylový radikál a superoxidový anion. Druhou skupinou jsou látky singletového charakteru a řadí se sem například peroxid vodíku a singletový kyslík. Nejčastěji ROS vznikají fotolytickou reakcí, přenosem elektronu či předáním energie (Burns et al., 2012).

Hydroxylový radikál značíme $\text{OH}\cdot$ (nebo v zahraniční literatuře také $\text{HO}\cdot$, což lépe popisuje umístění nepárového elektronu v této molekule). Jedná se o neselektivní oxidační činidlo s poločasem rozpadu v rámci mikrosekund. Tento radikál vzniká například během fotolytických reakcí dusičnanů nebo DOM. Další z mnoha možností vzniku je tzv. Haber-Weissova reakce, která se dá znázornit pomocí následující rovnice

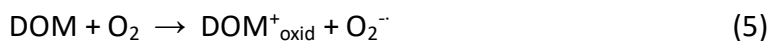


kde M reprezentuje donor elektronu. Díky tomu, že hydroxylový radikál je schopný reagovat se širokým spektrem látek, je jeho koncentrace v povrchových vodách během slunečného dne v rozmezí pouhých 10^{-15} a 10^{-18} mol/l (Burns et al., 2012; Brezonik a Arnold, 2011).

Superoxidový anion, neboli superoxid, je forma tripletového kyslíku v základním stavu, která je ochuzena o jeden elektron. Značí se $\text{O}_2^{\cdot-}$ a ve vodním prostředí může vznikat dvěma základními způsoby. První možností je redukce přechodného kovu (M), znázorněna následující rovnicí:



Druhým způsobem vzniku superoxidu je v průběhu fotodegradace DOM, který lze zapsat pomocí této rovnice:



Koncentrace superoxidu v povrchových vodách je 10^{-9} - 10^{-12} mol/l a jeho poločas rozpadu byl naměřen v rozmezí 1-3 minut v závislosti na pH (Burns et al., 2012). Jedná se tedy o poměrně stálý ROS, a to díky tomu, že u něj dochází ke stabilizaci pomocí rezonance.

Peroxid vodíku značíme H_2O_2 a jedná se o slabou kyselinu, která je nedílnou součástí přírodních vod. Jeho význam spočívá v tom, že slouží jako indikátor fotochemické oxidace DOM, a také v jeho schopnosti degradovat některé polutanty. Jednou z možností jeho vzniku je oxidace redukováného přechodného kovu (M), jak je naznačeno v následující rovnici



Poločas rozpadu peroxidu vodíku je silně závislý na pH prostředí, přítomnosti přechodných kovů, a přítomnosti některých organických sloučenin. V neutrálním prostředí se však poločas

rozpadu obvykle pohybuje okolo 10 h. Jeho koncentrace v povrchových vodách během slunečného dne se pohybují mezi 10^{-7} a 10^{-11} mol/l (Burns et al., 2012).

V příloze na Obrázku P1 je znázorněno schéma, které ukazuje přeměny uvedených ROS mezi sebou pomocí přesunu energie či elektronu, a také ilustruje tvorbu dalších produktů.

2.1.4.1 Singletový kyslík

Singletový kyslík je excitovaný stav molekulového kyslíku, který má v nejvyšších antivazebných orbitalech dva elektrony s opačným spinovým číslem tak, jak je znázorněno na Obrázku 2.5. Tuto formu kyslíku značíme $^1\text{O}_2$ a je velmi reaktivní, obzvláště v porovnání s kyslíkem v základním tripletovém stavu. Je tomu tak proto, že se jedná o molekulu ve vyšší energetické hladině, ale také proto, že singletová forma může reagovat s naprostou většinou ostatních látek bez nutnosti překonávání spinového zákazu, a aktivační energie těchto reakcí je tedy mnohem nižší.

Pro vznik singletového kyslíku je zapotřebí překonat spinový zákaz. Tomuto procesu říkáme aktivace kyslíku a je možné ji provést několika způsoby. Příkladem fyzikálního procesu, který je schopen generovat $^1\text{O}_2$, je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Produkci singletového kyslíku je také možné zaznamenat v biologických systémech, kde je tvořen enzymaticky některými druhy peroxidáz. Chemicky ho lze získat například reakcí chlornanu s peroxidem vodíku, nebo fotochemicky vzniká při fotolýze ozonu, fotolýze komplexů s přenosem náboje kyslík-organická molekula a fotoexcitací molekulárního kyslíku (Lang et al., 2005; Roberts, 1977).

V současnosti se nejvíce zkoumají a vyvíjejí fotosenzitizované reakce produkující $^1\text{O}_2$. Jako fotosenzitizátory v tomto případě slouží aromatické a heterocyklické organické sloučeniny, barevné kovové komplexy a množství barviv, jako eosin, akridin, bengálská červeň, methylenová modř nebo porfyriny. Obecně platí, že senzitivátor, který excituje elektron π orbitalu, poskytuje singletový kyslík. Praktické využití pro $^1\text{O}_2$ nalezneme například při organických syntézách, kde se využívá jako silné a zároveň selektivní oxidační činidlo,

při fotodynamické terapii v medicíně, kdy se pomocí blízkého IR záření a senzitivátoru (produkujícího $^1\text{O}_2$) léčí některé typy rakoviny, a při dezinfekci cílené na zneškodnění bakteriálních kmenů resistantních vůči antibiotikům (Lang et al., 2005; Lang et al., 2006).

Singletový kyslík má také škodlivé účinky, které souvisí právě s vysokou reaktivností této molekuly. Může například degradovat některé polymery, pokud obsahují fotosenzitivující barviva. V lidském těle tento ROS degraduje proteiny a podporuje mutagenitu a efekty stárnutí (Lang et al., 2006).

2.2 Metody stanovení ROS

Pro stanovení reaktivních forem kyslíku je obecně možné použít přímé i nepřímé analytické metody. Mezi přímé metody patří například IR spektrometrie. Všechny zmiňované ROS se ale v přírodních vodách vyskytují ve velice nízkých koncentracích a s výjimkou peroxidu vodíku mají poločas rozpadu menší než jedna milisekunda. Proto se místo přímého určování těchto látek většinou přistupuje k nepřímým metodám, jejichž cílem je v prvním kroku vytvořit s konkrétní ROS stabilnější sloučeninu.

Při volbě nepřímé analytické metody musíme zvažovat několik faktorů. Největším rozdílem oproti přímým metodám je, že zaváděním látky, která má s ROS vytvořit stabilnější sloučeninu, riskujeme narušení pozorovaného systému. Výběr metody zaprvé podmiňujeme její citlivostí, selektivností používaných činidel, protože množství z nich je schopno reagovat s vícero zástupci ROS, a také její rychlostí. V druhé řadě je nutné posoudit dostupnost, cenu chemikálií i potřebných přístrojů, a možnosti pro měření v terénu.

Z těchto důvodů se běžně užívanými metodami staly ty, využívající cenově dostupné látky, které lze stanovovat spektroskopicky, konkrétně pomocí UV-VIS absorbance, fluorescence či chemiluminiscence. Častým omezujícím faktorem těchto metod bývá přítomnost DOM, které také interagují se zářením, a jejichž přítomnost způsobuje takový šum na pozadí měření, že by přes něj nebylo možné určit přítomnost hledané ROS, který se zpravidla vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích. Proto je někdy nutné měřené látky nejprve

oddělit od zbytku vzorku, k čemuž se hojně využívají zejména chromatografické metody. Tento postup přidává na časové náročnosti měření a je potřeba používat látky, které budou v tomto časovém rozmezí dostatečně stabilní (Burns et al., 2012).

2.2.1 Metody stanovení singletového kyslíku

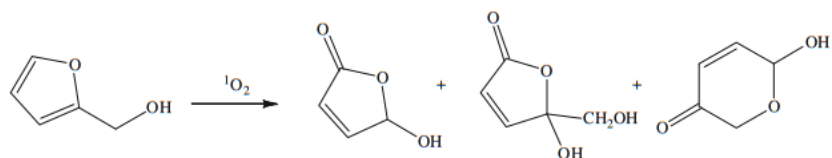
Určení koncentrace singletového kyslíku pomocí přímé metody je možné díky tomu, že jeho molekuly emitují infračervené záření o vlnové délce 1 268 nm. Intenzita tohoto záření je však tak nízká, že využití této metody není možné při nízkých koncentracích a mimo umělé podmínky vytvořené v laboratoři.

Pro měření obsahu $^1\text{O}_2$ v přírodním prostředí je zapotřebí zvolit nepřímou metodu stanovení, která využívá zachycující činidla vysoce reaktivní a specifická výhradně pro tuto reaktivní formu kyslíku. Tato činidla musí být navíc rozpustná ve vodě, být stabilní po dobu potřebnou k provedení měření, nesmí reagovat nebo jinak narušovat ostatní látky ve zkoumaném vzorku, a navíc se nesmí jednat o fotosenzitizátor, který by tímto sám zapříčiňoval tvorbu singletového kyslíku, a ovlivňoval naměřené hodnoty. Těmto náročným podmínkám vyhovují jen dvě známé látky, kterými jsou furfurylalkohol (systematicky furan-2-ylmethanol, běž označován FFA) a 1,3-cyklohexadien-1,4-diethanoát. Vzhledem ke komerční dostupnosti je téměř výhradně používán FFA, jehož strukturní vzorec je na Obrázku P2 v příloze (Burns et al., 2012).

2.2.1.1 Metoda stanovení s furfurylalkoholem (FFA)

Jedná se o nepřímou metodu. Tato metoda využívá jako zachycující činidlo FFA, který je vůči singletovému kyslíku vysoce selektivní, reakce s ním probíhá dostatečně rychle, a reakce s ostatními druhy ROS neprobíhá. Produkt reakce je nestabilní a rychle podléhá hydrolyzaci. Reakce FFA s $^1\text{O}_2$ je znázorněna na Obrázku 2.6. Koncentrace singletového kyslíku se určuje podle úbytku množství FFA. Jelikož se tento úbytek řídí podle kinetiky druhého řádu

a koncentrace $^1\text{O}_2$ v povrchových vodách jsou nízké, je potřeba zahájit měření přidáním FFA do vzorku, vzorek poté vystavit záření na dobu alespoň několika desítek minut, aby bylo vyprodukováno měřitelné množství $^1\text{O}_2$, a poté neodkladně změřit množství zbylého FFA. Určení úbytku FFA by mělo proběhnout do několika hodin od ukončení ozařování, jelikož FFA není ve vzorku zcela stabilní ani bez přítomnosti světelného záření. Výsledky měření jsou závislé na pH a teplotě; detekci FFA provádíme na spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 218 \text{ nm}$. Před detekcí je nutné zařadit separační metodu (téměř výhradně vysoce účinnou kapalinovou chromatografii), aby nedocházelo k rušení signálu jinými látkami přítomnými ve vzorku. Je patrné, že tato metoda není vhodná pro měření v terénu (Burns et al., 2012).



Obr. 2.6: Schéma chemické reakce FFA s $^1\text{O}_2$ (Burns et al., 2012).

2.2.1.2 Metoda stanovení se Singlet Oxygen Sensor Green reagent (SOSG)

Jedná se o nepřímou metodu, která využívá SOSG jako zachycující činidlo pro $^1\text{O}_2$, jehož výhodou je, že nereaguje s žádným jiným ROS než s $^1\text{O}_2$ a je komerčně dostupné. Činidlo je potřeba skladovat ve vysušené formě, bez přístupu světla a při teplotě nižší než $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. V důsledku ozařování vydává SOSG slabé modré fluorescenční záření s excitačními píky při $\lambda_{1\text{ex}} = 372 \text{ nm}$ a $\lambda_{2\text{ex}} = 393 \text{ nm}$ a příslušnými emisními píky v $\lambda_{1\text{em}} = 395 \text{ nm}$ a $\lambda_{2\text{em}} = 416 \text{ nm}$. V přítomnosti $^1\text{O}_2$ však SOSG vydává zelené fluorescenční záření s excitačním píkem při $\lambda_{\text{ex}} = 504 \text{ nm}$ a příslušným emisním píkem v $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. V této vlnové délce většinou nedochází k rušení signálu v důsledku přítomnosti jiných látek, proto můžeme provádět měření přímo bez nutnosti separace složek ve vzorku. Strukturní vzorec SOSG a jeho reakční schéma s $^1\text{O}_2$ je na Obrázku P3 v příloze. Signál z fluorimetrického detektoru náležící zelenému fluorescenčnímu záření odpovídá koncentraci $^1\text{O}_2$ ve vzorku. Produkt reakce činidla s $^1\text{O}_2$ není příliš stabilní a je doporučováno přistoupit k měření bezprostředně po ukončení experimentu. K aktivaci SOSG může dojít také důsledkem alkalického pH nebo v přítomnosti určitých

rozpouštědel, jako například acetonitrilu, DMSO, DMF a acetonu, na což je potřeba myslet při výběru analytické metody (ThermoFisher Scientific, 2004).

3. Metodika

3.1 Vzorky

Vzorky tekoucích i stojatých povrchových vod byly odebírány z lokalit, které jsou dlouhodobě monitorovány Hydrobiologickým ústavem Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Hlavními kritérii pro výběr testovaných vzorků byla jejich odlišnost v množství a stáří obsaženého DOM, v rozdílnosti jejich pH a také množství slunečního záření, kterému byly před odběrem vystaveny. Posledním kritériem byla dostupnost čerstvých vzorků v době provádění měření.

Celkem bylo měření postupně provedeno u 46 vzorků. Vzorky pocházely z různých vodních nádrží a jezer, potoků a řek, jejich přehled a bližší informace o nich jsou uvedeny v příloze v Tabulce P1.

Vzorky byly z terénu přiváženy v termoboxech bez přístupu světla. Nejpozději do druhého dne byly filtrovány přes skleněný filtr s porozitou 0,45 μm (Macherey Nagel, Německo). Jejich ozařování a měření bylo prováděno v rozmezí několika dní od odběru (do týdne od odběru), zfiltrované vzorky byly uchovávány ve tmě při teplotě okolo 4 °C.

Ozařování vzorků probíhalo v křemenných nádobách o objemu 350 ml či čtyřstěnných kyvetách, které propouštějí UV záření, v ozařovacím reaktoru SolSim (Luzchem). Tento reaktor je vybaven xenonovou lampou o výkonu 300 W. Během každého pokusu bylo dbáno na to, aby záření prostupovalo souměrně celým objemem vzorku, a byl vždy používán difuzér, který přímé světlo vycházející z lampy rozptýlil.

3.2 Chemické analýzy

Následující měření pH, absorbance a analýzy obsahu DOC byly prováděny na Hydrobiologickém ústavu v Českých Budějovicích v rámci pravidelných měření a dlouhodobého monitorování vzorků povrchových vod z různých lokalit České republiky. Pro ředění roztoků nebo kalibrační měření byla vždy použita ultra čistá voda (UCV).

Měření pH bylo prováděno na přístroji TIM865 (Radiometer analytica). Probíhalo za stálého míchání vzorku, a před každým měřením je prováděna kalibrace pomocí pufrů s hodnotou pH 4 a 7.

Stanovení množství DOC probíhalo na přístroji SHIMADZU (TOC 5000A, Japonsko), jehož detekční limit je 8 $\mu\text{mol/l}$. Po okyselení vzorku, jímž jsou anorganické formy uhlíku převedeny na CO_2 a po vybublání tohoto CO_2 je rozpuštěný organický uhlík katalytickým spalováním při teplotě 680 $^\circ\text{C}$ převeden na CO_2 , který je následně analyzován v infračerveném detektoru.

Absorbance byla u všech vzorků měřena na přístroji Shimadzu UV-2700 (Japan) a to při vlnových délkách standardně používaných pro charakterizaci obsahu organických látek, tj. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 300 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 350 \text{ nm}$, a $\lambda_4 = 400 \text{ nm}$. Později bylo zjištěno, že toto rozmezí není dostačující a pro stanovení absorbance při delších vlnových délkách bylo použito proložení naměřených hodnot exponenciální křivkou v MS Excel. V obecné křivce

$$y = a \cdot e^{b \cdot x} \quad (7)$$

a a b udávají strmost a prohnutost křivky, x je hodnota vlnové délky a y výsledná hodnota absorbance. Pro potřeby měření bylo nutné zjistit hodnotu absorbance při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Příklad namodelované křivky poklesu absorbance a její rovnice pro vzorek Plesne-pritok_25/10 je v příloze na Obrázku P4.

3.2.1 Stanovení singletového kyslíku pomocí FFA

Zásobní roztok FFA o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ byl připravován denně čerstvý, případně skladován ve tmě při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$ do druhého dne. Před ozařováním bylo ke 2 ml vzorků přidáno 0,5 ml zásobního roztoku FFA, takže koncentrace FFA v ozařovaných roztocích činila 1 $\mu\text{mol/l}$. Každé měření bylo prováděno třikrát.

Stanovení zbytkového FFA bylo prováděno metodou HPLC na chromatografu IC20 (DIONEX, USA) s kolonou Supelcosil LC-10, která má délku 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm a velikost částic 5 μm . Jako mobilní fáze sloužila směs acetonitril – voda (10 v/v % acetonitrilu), k detekci byl použit UV detektor (AD20, DIONEX) při vlnové délce 220 nm. Objem nástřiku vzorku byl 20 μl , průtok byl nastaven na 1 ml/min a měření jednoho vzorku trvalo 6 minut.

K vyhodnocení výsledků bylo použito porovnání plochy píku FFA jednak v ozářeném a neozářeném roztoku FFA v UCV, kdy nevzniká singletový kyslík a tudíž nedochází k úbytku FFA (plocha píku P_v) a jednak průměru ploch píku v ozářených vzorcích (plocha píku P), jak ukazuje rovnice (8).

$$\Delta_{FFA} = P_v - P \quad (8)$$

Pro zjištění kinetiky reakce FFA se vznikajícím $^1\text{O}_2$ byl po dobu tří hodin ozařován vzorek Plesne-pritok_25/10 a v pravidelných časových intervalech bylo prováděno měření úbytku FFA.

Úbytek FFA je přímo úměrný množství singletového kyslíku, který vznikl během ozařování (Fede a Frannas, 2015). Z tohoto důvodu se vznik $^1\text{O}_2$ také řídí kinetikou prvního řádu. Pro výpočet rychlostní konstanty jeho vzniku můžeme sestavit graf přímé úměrnosti přirozeného logaritmu Δ_{FFA} na čase (v sekundách). Pro výpočet směrnice této přímky, která je zároveň rychlostní konstantou reakce prvního řádu k_1 , použijeme následující rovnici:

$$k_1 = \frac{\ln(\Delta_{FFA})}{t} \quad (9)$$

kde t je doba ozařování vzorku. Rychlostní konstantu k_1 dosadíme do rovnice (10), která nám umožňuje zjištění rovnovážné koncentrace singletového kyslíku.

$$c_{SO1} = \frac{k_1}{k_{FFA}} \quad (10)$$

Rovnovážná koncentrace singletového kyslíku c_{SO1} je v jednotkách mol/l a k_{FFA} je rychlostní konstanta spotřeby 1O_2 pomocí činidla FFA. Hodnota k_{FFA} je 1,2.108 l/(mol s) (Fede a Grannas, 2015).

U vzorků bylo prováděno kontrolní měření bez přídavku FFA, které prokázalo, že další látky přítomné ve vzorku neovlivňují velikost píku FFA detekovaného při 220 nm.

3.2.2 Stanovení singletového kyslíku pomocí SOSG

Měření fluorescenčních spekter byla prováděna na přístroji HORIBA Jobin-Yvon FluoroMax-3. Při mapování fluorescence napříč spektrem byly vlnové délky pro excitaci zvoleny v rozmezí 240-500 nm (vždy s posunem 5 nm) a pro emisi 270-620 nm (s posunem 2 nm). Další měření byla prováděna při vlnových délkách $\lambda_{ex} = 490$ nm (vlnová délka excitačního záření) a $\lambda_{em} = 525$ nm (vlnová délka emisního záření).

SOSG činidlo bylo skladováno při teplotě -15 °C, ve tmě a ve vysušené formě. Zásobní roztok byl vždy připraven rozpuštěním 100 μ g SOSG v 1 ml methanolu, čímž jsme získali zásobní roztok o koncentraci 167 μ mol/l. Tento zásobní roztok byl ihned použit k měření, nebo skladován při teplotě -20 °C a ve tmě po dobu maximálně jednoho týdne.

K měřeným vzorkům byl přidáván Tris pufr o pH = 7,4 a koncentraci 50 mmol/l. Zásobní roztok azidu sodného byl namíchán o koncentraci 1,67 mol/l.

Po přídavku SOSG byl každý vzorek ozařován současně ve dvou variantách. Varianta A byla získána smícháním (v tomto pořadí) 0,5 ml Tris pufru, 40 μ l SSOG, 4,4 ml vzorku a 60 μ l azidu sodného. Varianta B byla smíchána pomocí (v tomto pořadí) 0,5 ml tris pufru, 60 μ l UCV, 40 μ l SOSG a 4,4 ml vzorku. UCV byla přidávána u varianty B pro zachování koncentrace všech

složek roztoku tak, jako byla ve variantě A. Výsledná koncentrace složek roztoku připraveném k ozařování byla 50 mmol/l tris pufru, 1,33 μ mol/l SOSG a 20 mmol/l azidu sodného.

Každý vzorek byl v daném bodě spektra ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm) změřen pětkrát (s 3sekundovými intervaly mezi jednotlivým měřením). Po přesné porovnání získaných výsledků fluorescenčního měření, bylo pracováno s poměrem S/R , kde S je signál fluorescence a R je intenzita elektrického proudu procházející excitační lampou. V prvním kroku jsme vypočítali průměr z těchto pěti měření, jak reprezentuje rovnice (11).

$$A = [(S_1 S_2 S_3 S_4 S_5) \div 5] / [(R_1 R_2 R_3 R_4 R_5) \div 5] \quad (11)$$

Každý den bylo potřeba zjistit emisní spektrum vody v rozmezí 360 – 460 nm při excitační vlnové délce 350 nm. Toto spektrum obsahuje jeden pík odpovídající přirozené fluorescenci vody, díky kterému byla provedena normalizace fluorescenčního záření za pomoci plochy pod daným píkem, která byla vypočtena následující rovnicí:

$$Arp = \sum_i [(x_{i+1} - x_i) \cdot y_i + \frac{(y_{i+1} - y_i) \cdot (x_{i+1} - x_i)}{2}] \quad (12)$$

kde hodnoty x odpovídají postupně všem vlnovým délkám, ve kterých se pík vyskytuje, a hodnoty y jsou naměřené hodnoty pro příslušná x .

Dalším krokem byla samotná normalizace signálu fluorescenčního záření, která byla provedena převedením na Ramanovy jednotky podle rovnice (13).

$$N = A / Arp \quad (13)$$

Kde N je normalizovaná fluorescence v Ramanových jednotkách.

Bylo nutné provést korekci dat zohledňující absorbanci při vlnové délce odpovídající excitačnímu záření, a také absorbanci odpovídající emisní vlnové délce při průchodu vzorkem. Tato korekce byla provedena pomocí následující rovnice:

$$I = N / 10^{-0,5(A_{ex} + A_{em})} \quad (14)$$

kde 0,5 odpovídá polovině šířky použité květy, A_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce (zde $\lambda_{ex} = 490$ nm), a A_{em} je absorbance při emisní vlnové délce (zde $\lambda_{em} = 525$ nm) (Ohno, 2002).

V posledním kroku úpravy dat odečteme hodnotu varianty A (s azidem sodným) od hodnoty varianty B (bez azidu sodného), podle rovnice (15).

$$\Delta_{AB} = I_B - I_A \quad (15)$$

Pro výpočtech rychlostních konstant k_2 tvorby $^1\text{O}_2$ v jednotlivých vzorcích vyjdeme z kinetiky prvního řádu a pro k_2 platí:

$$k_2 = \frac{-\ln(\Delta_{AB})}{t} \quad (16)$$

kde t je doba ozařování vzorku. Rychlostní konstantu k_2 dosadíme do rovnice (19), která nám umožňuje zjištění rovnovážné koncentrace singletového kyslíku.

$$c_{SO_2} = \frac{k_2}{k_{SOSG}} \quad (17)$$

Rovnovážná koncentrace singletového kyslíku c_{SO_2} je v jednotkách mol/l a k_{SOSG} je rychlostní konstanta spotřeby $^1\text{O}_2$ pomocí činidla SOSG. Hodnota k_{SOSG} je $3,8 \cdot 10^8$ l/(mol s) (Gollmer et al., 2011).

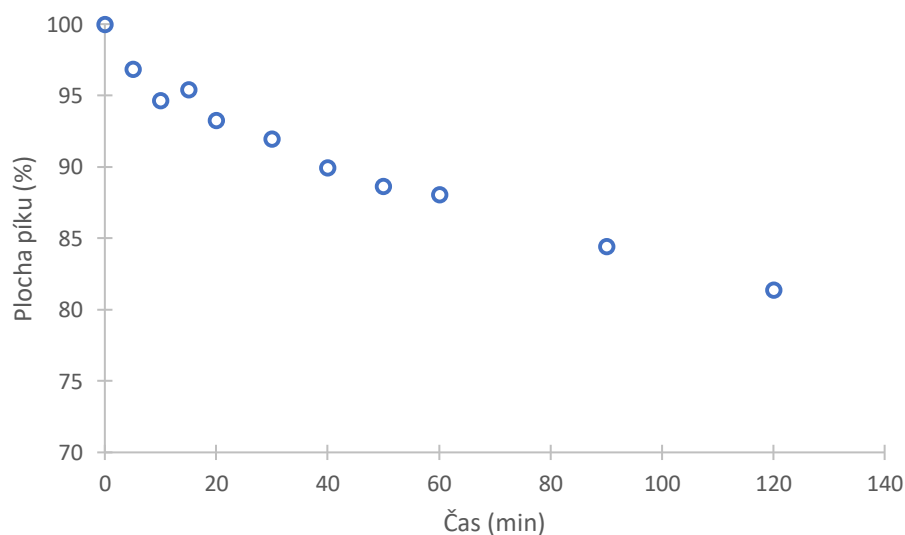
4. Výsledky

Výsledky měření pH a množství DOC obsaženého v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v příloze v Tabulce P2.

4.1 Metoda stanovení s FFA

Retenční čas pro FFA byl přibližně 4,5 minuty, což odpovídá údajům získaným z literatury (Fede a Frannas, 2015). Na výsledném chromatografu byl pík pro FFA dostatečně ostrý a jasně odlišný. Pro ilustraci je v příloze na Obrázku P5 chromatograf vzorku Klicava-pritok_2.

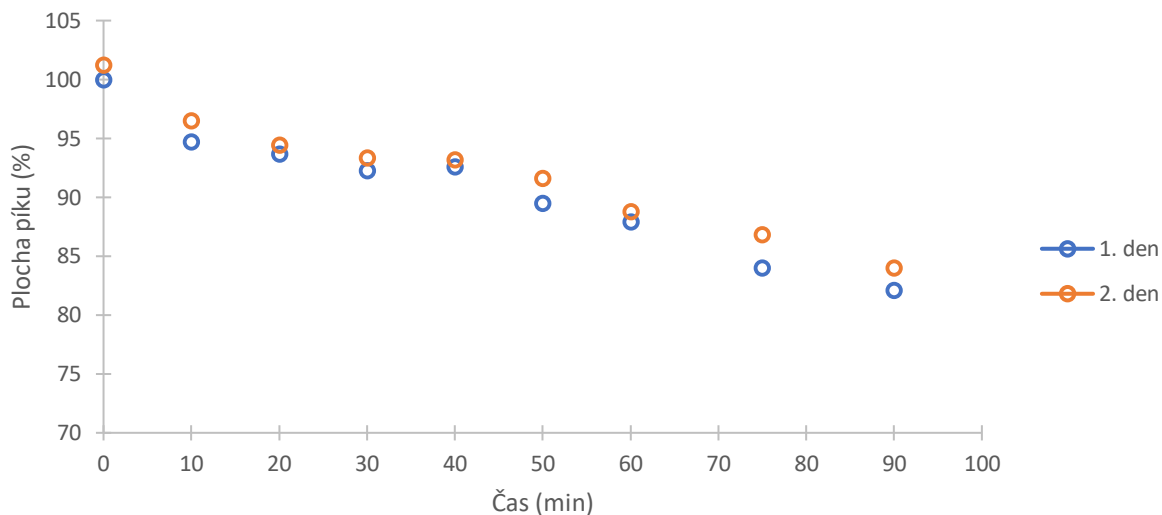
Reakce FFA se vznikajícím $^1\text{O}_2$ probíhá pomocí kinetiky prvního řádu, což bylo potvrzeno tak, že po dobu tří hodin byl ozařován vzorek Plesne-pritok_25/10, a v pravidelných intervalech bylo prováděno měření úbytku FFA. Výsledná závislost úbytku plochy píku, reprezentující množství FFA, na čase je znázorněna na Obrázku 4.1.



Obr. 4.1: Kinetika úbytku FFA v ozařovaném vzorku Plesne-pritok_25/10. Změna plochy píku je udávána v procentech.

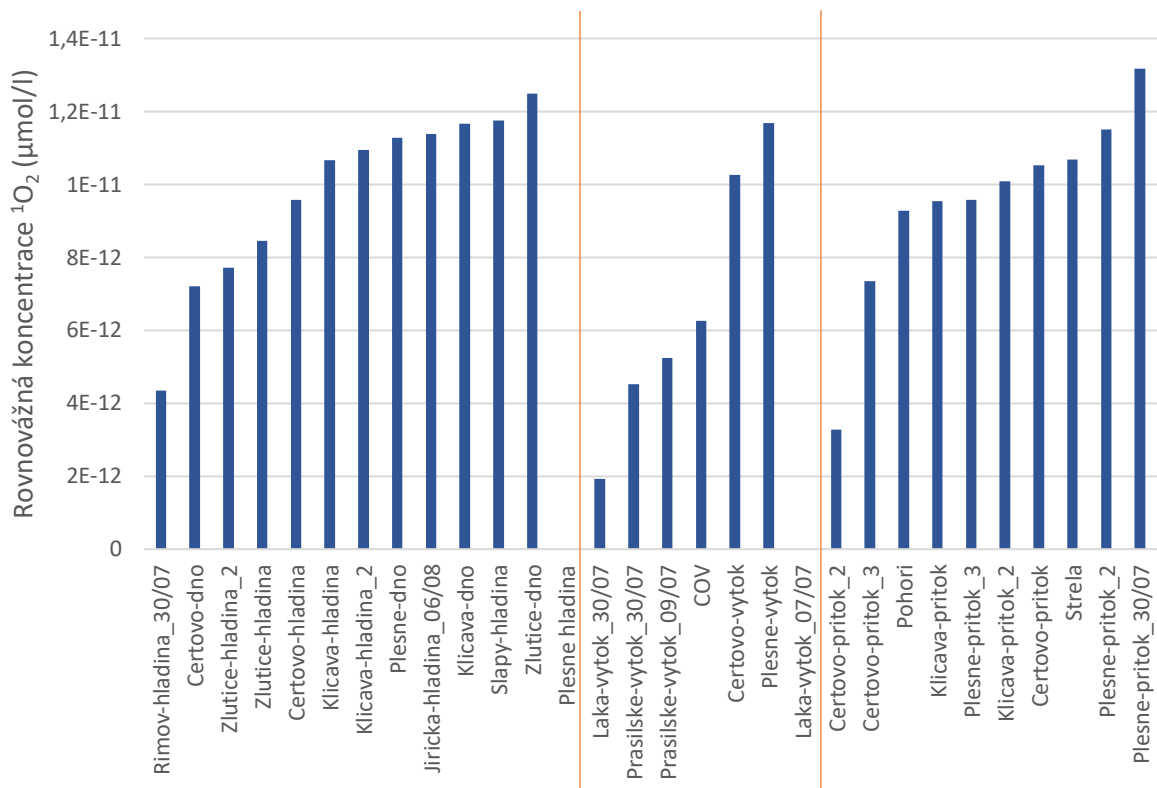
Stabilita ozářených vzorků byla testována po dobu jednoho dne při pokojové teplotě a bez vystavení přímému záření. Vzorek Plesne-pritok_25/10 byl s přidavkem FFA ozařován

po dobu 90 minut a výsledný pokles množství FFA za tuto dobu je znázorněn graficky na Obrázku 4.1. Vzorky byly opětovně přeměřeny druhý den a byl zjištěn nárůst signálu v průměru o 7 %. Tento rozdíl je také patrný na Obrázku 4.2.



Obr. 4.2: Změna množství FFA znázorněna poklesem plochy píku ve vzorku Plesne-pritok_25/10 během ozařování a kontrolního měření stejných vzorků uskutečněného druhý den.

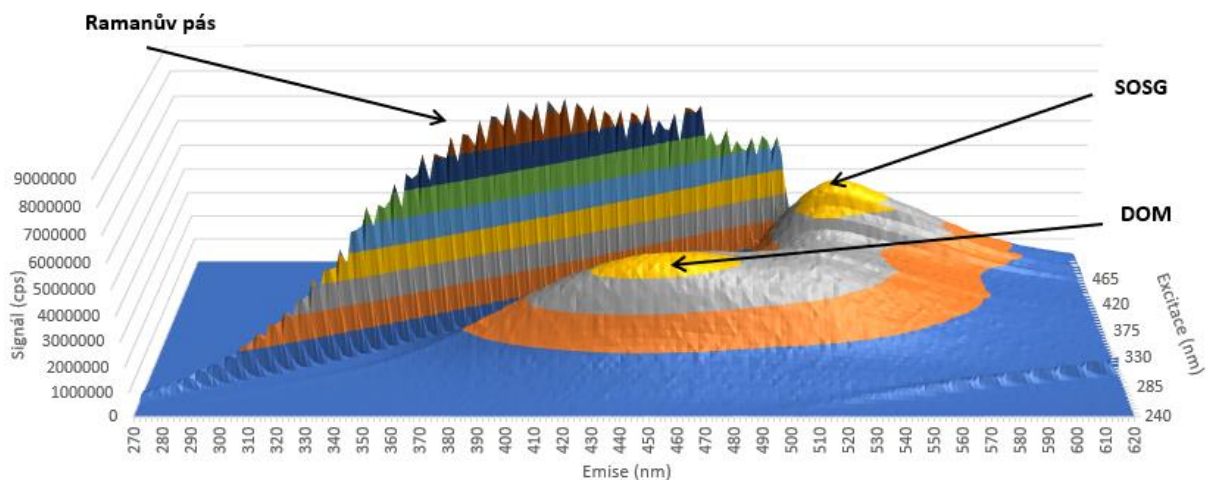
Měření rovnovážné koncentrace singletového kyslíku probíhalo u 30 vybraných vzorků, jejichž pH se pohybovalo v rozmezí od 4,5 do 9,6 a obsah DOC od 1,92 mg/l do 17,87 mg/l. Tyto vzorky byly ozařovány s přidavkem FFA po dobu 30 minut a výsledná rovnovážná koncentrace singletového kyslíku byla v rozmezí od $1,92 \cdot 10^{-12}$ mol/l do $1,32 \cdot 10^{-11}$ mol/l. Tyto výsledky jsou uvedeny v příloze v Tabulce P2 a jejich grafické srovnání je znázorněno na Obrázku 4.3. Obrázek 4.3 je rozdělen do tří částí podle původu vzorků. V první části jsou vzorky stojatých vodních ploch, ve druhé výtoky z těchto vodních ploch a ve třetí jsou přítoky a potoky. Toto rozdělení slouží k lepší porovnatelnosti výsledků v závislosti na kvalitě obsaženého DOM.



Obr. 4.3: Rovnovážná koncentrace ¹O₂ ve vybraných vzorcích měřená pomocí metody využívající FFA. Výsledky jsou ve třech kategoriích tak, že v první jsou vzorky stojatých vodních ploch, ve druhé výtoky z těchto vodních ploch a ve třetí jsou přítoky a potoky. Mezi výtoky je zařazen i výtok z čistírny odpadních vod (COV).

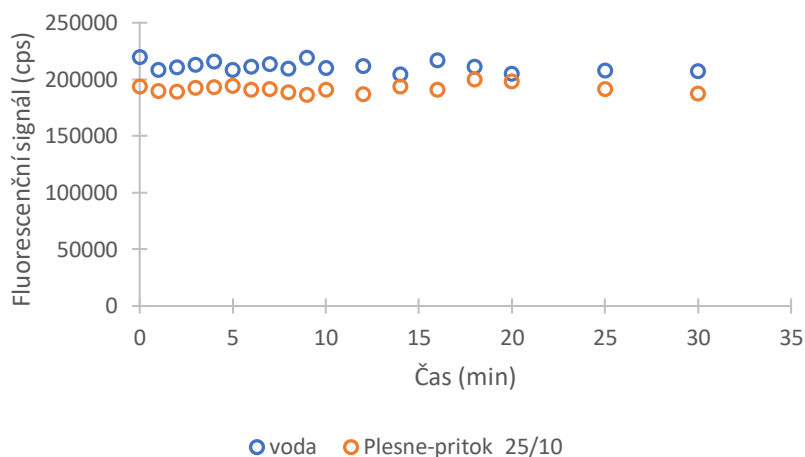
4.2 Metoda stanovení s SOSG

Experimentálně bylo zjištěno maximum fluorescence pro SOSG reagujícím s ¹O₂ při $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ (vlnová délka excitačního záření) a $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ (vlnová délka emisního záření), které bylo následně používáno pro všechna měření. Toto maximum je patrné na Obrázku 4.4, kde je zobrazeno naměřené fluorescenční spektrum vzorku Plesne-pritok_25/10 v rozmezí 240-510 nm excitačních vlnových délek a 270-620 nm emisních vlnových délek. Toto měření sloužilo k určování trendů a jeho hodnoty jsou vyjádřeny v jednotkách přístroje (cps = counts per second).



Obr. 4.4: Fluorescenční spektrum vzorku Plesne-pritok_25/10 s přidáním SOSG.

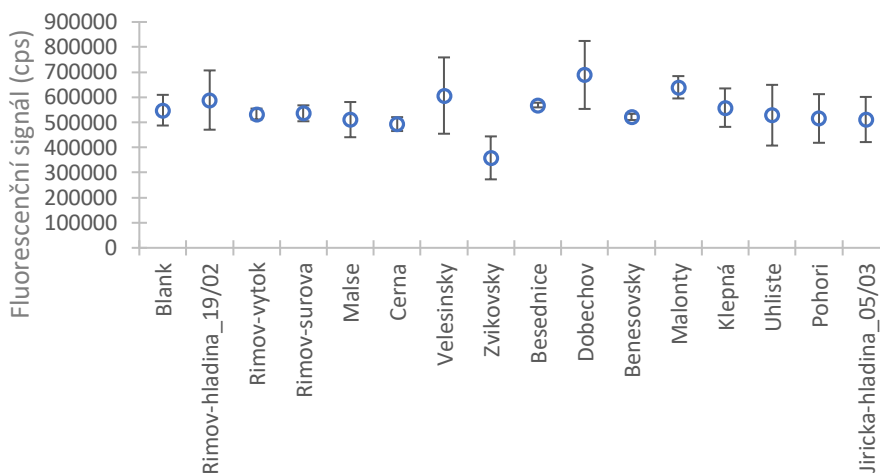
Stabilita činidla SOSG v přítomnosti vzorku s vysokou koncentrací DOC (Plesne-pritok_25/10) byla testována v tmavých podmínkách za pokojové teploty. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 4.5.



Obr. 4.5: Hodnoty fluorescenčního signálu získané pro vzorky obsahující SOSG bez přístupu světla po dobu 30 minut.

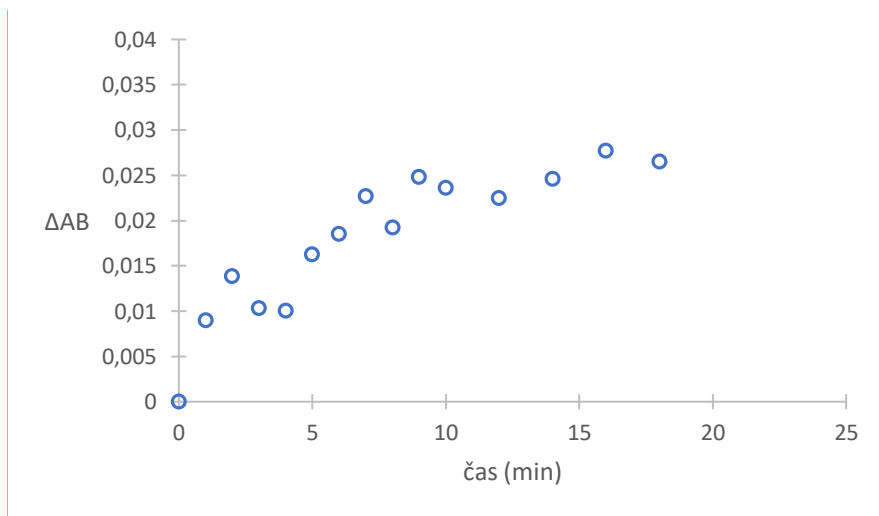
Opakovatelnost měření byla testována pro 15 vzorků, ke kterým byl přidáván pufr a SOSG. Vzorky byly ozařovány v triplicátech a několikrát průběžně měřeny až po dobu 15 minut. Naměřené hodnoty se u jednotlivých opakování značně liší (Obrázek 4.6, Tabulka P3). Souběžně se vzorky byl ozařován také kontrolní vzorek (blank), který obsahoval pufr, SOSG a vodu. Bylo zjištěno, že i u vzorku blank dochází k růstu fluorescenčního signálu

přesto, že neobsahuje žádný známý zdroj singletového kyslíku. Z pozorování průměrů a směrodatných odchylek je zřejmé, že opakovatelnost je pro některé vzorky špatná.



Obr. 4.6: Testování opakovatelnosti měření metodou využívající SOSG. Hodnoty jsou průměry se směrodatnou odchylkou udávané ve fluorescenčních jednotkách přístroje.

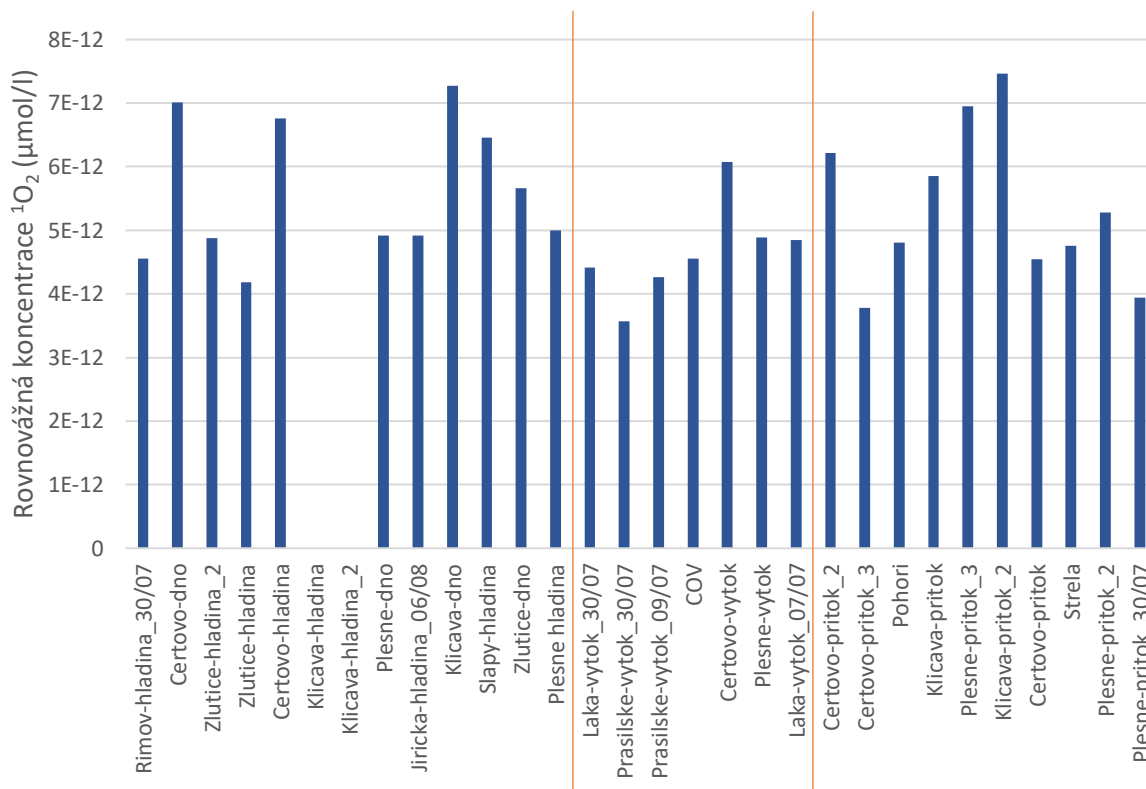
Pro testování průběhu reakce $^1\text{O}_2$ a SOSG bylo provedeno několik pokusů, které se lišily pouze v koncentraci SOSG ve vzorcích, typ i koncentrace zdroje $^1\text{O}_2$ byl vždy stejný. Výsledkem pozorování byla časová závislost růstu fluorescence, která je zobrazena na Obrázku 4.7. Tato závislost svým tvarem odpovídá kinetice prvního řádu, a to i pro různé koncentrace SOSG (Connors, 1990).



Obr. 4.7: Kinetika růstu Δ_{AB} v průběhu ozařování u vzorku Plesne-pritok_25/10.

Rovnovážná koncentrace singletového kyslíku byla měřena ve stejné sadě 30 vzorků, která byla vybrána pro předchozí měření pomocí metody využívající FFA. Vzorky byly vystaveny

umělému slunečnímu záření po dobu 30 minut a výsledná rovnovážná koncentrace $^1\text{O}_2$ byla v rozmezí $3,79 \cdot 10^{-12}$ mol/l do $7,46 \cdot 10^{-12}$ mol/l. Tyto výsledky jsou uvedeny v příloze v Tabulce P2 a jejich grafické srovnání je znázorněno na Obrázku 4.8.

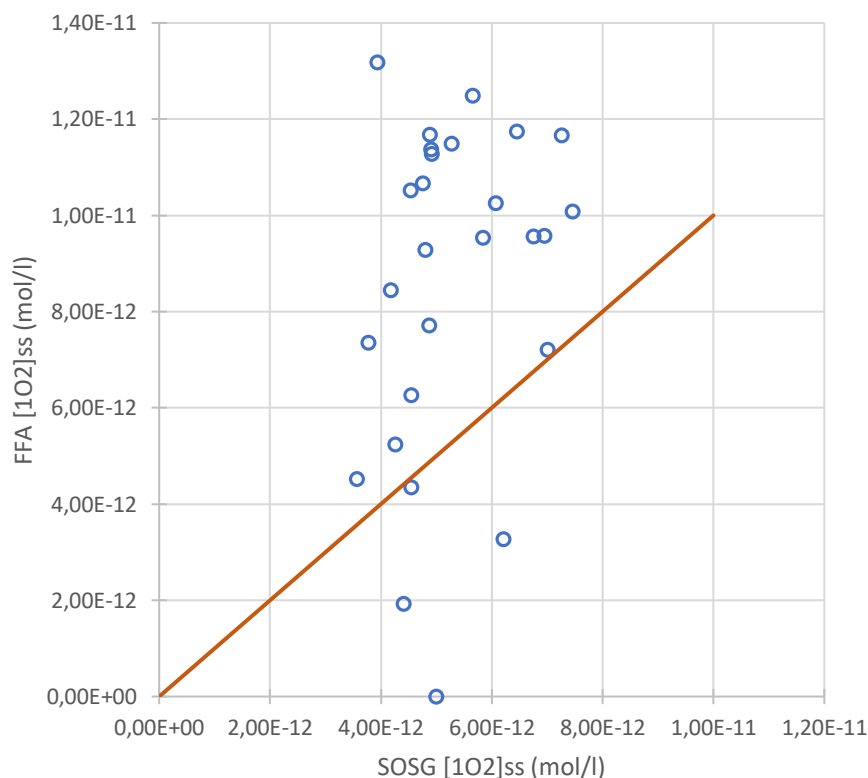


Obr. 4.8: Rovnovážná koncentrace $^1\text{O}_2$ ve vybraných vzorcích měřená pomocí metody využívající SOSG. Výsledky jsou ve třech kategoriích tak, že v první jsou vzorky stojatých vodních ploch, ve druhé výtoky z těchto vodních ploch a ve třetí jsou přítoky a potoky, pořadí vzorků odpovídá Obrázku 4.2.

Obrázek 4.8 je rozdělen do stejných tří částí jako při měření využívající FFA podle původu vzorků. V první části jsou vzorky stojatých vodních ploch, ve druhé výtoky z těchto vodních ploch a ve třetí jsou přítoky a potoky.

4.3 Porovnání výsledků

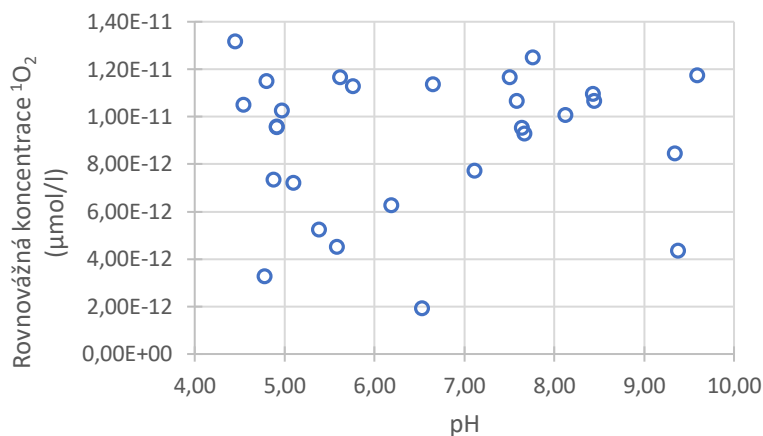
Výsledné rovnovážné koncentrace singletového kyslíku získané pomocí metody používající FFA a metody používající SOSG se neshodují. Koncentrace získané metodou s FFA vykazují ve většině případů vyšší hodnoty a pouze u dvou vzorků odpovídaly rovnovážné koncentraci singletového kyslíku naměřené metodou s SOSG. Rozdílnost výsledků zobrazuje graf na Obrázku 4.9.



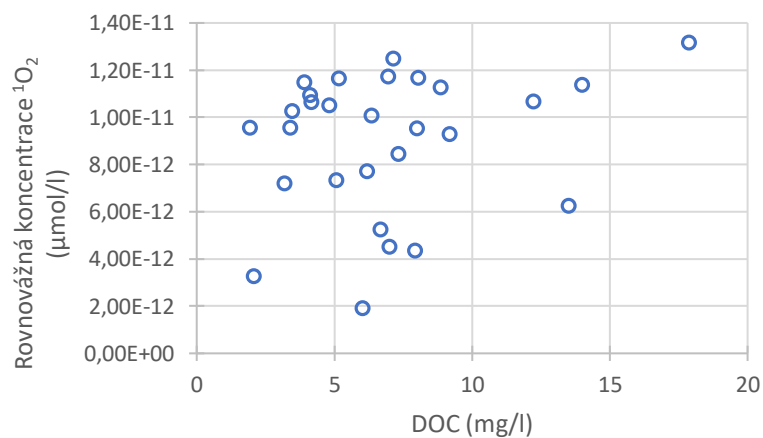
Obr. 4.9: Porovnání rovnovážných koncentrací pro jednotlivé vzorky získané metodou využívající SOSG a metodou využívající FFA. Modré body značí naměřené výsledky, oranžová křivka je závislost 1:1.

Oranžová křivka v Obrázku 4.9 zobrazuje závislost 1:1 a čím jsou naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky blíže této křivce, tím více se shodují koncentrace, které jsme naměřili pomocí obou metod.

Nebyl zaznamenán statisticky významný vztah mezi hodnotami koncentrace získané pomocí metody využívající FFA a pH či množstvím DOC ve vzorcích. Závislost rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ na pH vzorků pro celou skupinu vzorků (pH od 4,5 do 9,6) je na Obrázku 4.10. Vztah mezi rovnovážnou koncentrací singletového kyslíku a množstvím DOC ve vzorku je zobrazena na Obrázku 4.11.



Obr. 4.10: Závislost rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ na pH vzorku.



Obr. 4.11: Závislost rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ na obsahu DOC ve vzorku.

5. Diskuse

Působením umělého slunečního záření na DOM obsaženém ve vzorcích docházelo k produkci singletového kyslíku, který reagoval s použitými zachytávacími činidly. Byli jsme schopni zaznamenat stabilní růst množství vzniklého $^1\text{O}_2$ během ozařování pomocí obou použitých metod, a stanovit tak jeho rovnovážnou koncentraci.

Měření fluorescence u metody využívající SOSG bylo možné při vlnových délkách $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, protože v tomto bodě spektra nedochází k fosforescenci způsobené jinými běžnými zdroji v povrchových vodách jako například DOM nebo přirozené fosforescenci vody (Ramanův rozptyl), což ilustruje i graf fluorescenčního spektra vzorku obsahujícího vše zmíněné, který je na Obrázku 4.4. Tato metoda je citlivá na změny pH, proto byl k měřeným vzorkům přidáván Tris pufr o $\text{pH} = 7,4$. Do vzorků byl přidáván také azid sodný, protože reaguje s $^1\text{O}_2$ přednostně.

Během ozařování vzorků s obsahem SOSG dochází ke změnám tohoto činidla i bez přítomnosti singletového kyslíku, které se projevují nárůstem fluorescenčního signálu. Přídavek azidu umožňuje, při porovnání měření s azidem a bez azidu, odlišit vliv jiných faktorů než přítomnosti singletového kyslíku na fluorescenci SOSG (Silva et al., 2015).

Porovnáním získaných výsledků byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi hodnotami naměřenými pomocí metody stanovující množství vznikajícího singletového kyslíku pomocí činidla SOSG a pomocí metody využívající činidlo FFA. Toto je pravděpodobně zapříčiněno tím, že rychlostní konstanta k_{FFA} , která určuje rychlost reakce činidla FFA s $^1\text{O}_2$ ($1,2 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol s})$, Fede a Grannas, 2015), byla téměř třikrát menší, než rychlostní konstanta k_{SOSG} pro reakci SOSG s $^1\text{O}_2$ ($3,8 \cdot 10^8 \text{ l}/(\text{mol s})$, Gollmer et al., 2011). Za předpokladu stejné kinetiky tvorby $^1\text{O}_2$ je důvodem odlišných rovnovážných koncentrací rozdíl těchto rychlostních konstant, který vede k vyšším hodnotám pomocí metodiky s FFA.

Při opakovaném měření vzorků pomocí metody využívající SOSG byl rozptýlen výsledek u některých vzorků v mezích tolerance, ale u jiných byla naměřená data příliš rozptýlená, jak je znázorněno na Obrázku 4.6, metoda tedy neposkytovala opakovatelné výsledky. Činidlo SOSG

je na světle nestabilní, což může ovlivňovat výsledky měření, ale hlavně komplikuje manipulaci s ním. Při měření je zapotřebí pracovat s nízkými koncentracemi a objemy (v řádu mikro jednotek), čímž se postup stává citlivým na chybu. Produktem reakce SOSG se $^1\text{O}_2$ je účinný fotosenzitizátor, který je schopný podporovat produkci singletového kyslíku, a tedy může docházet k nežádoucímu ovlivnění měření (Gollmer et al., 2011). Vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu singletového kyslíku a jeho nízké rovnovážné koncentraci nebylo možné přidávat činidlo do předem ozářených vzorků, neboť rozdíl ve fluorescenci u takto měřených vzorků je mimo rozsah detekce. Z těchto důvodů není možné tuto metodu využít pro měření množství $^1\text{O}_2$ ve vodných roztocích a mimo laboratorní podmínky. Proto budou dále diskutovány pouze rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ získané pomocí metody využívající FFA jako zachytávací činidlo.

Metoda používající FFA poskytovala uspokojivé výsledky. Hodnoty rovnovážné koncentrace se pohybovaly v řádech 10^{-11} až 10^{-12} mol/l, což odpovídá jinde publikovaným hodnotám pro přírodní vody (např. Fede a Grannas, 2015). Nebyla zaznamenána závislost rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ na pH vzorků pro celou skupinu vzorků (pH od 4,5 do 9,6), což je patrné na Obrázku 4.10. Vztah mezi rovnovážnou koncentrací singletového kyslíku a množstvím DOC ve vzorku je zobrazena na Obrázku 4.11, ani zde nebyl nalezen statisticky významný trend pro všechny studované vzorky.

Největší rovnovážná koncentrace $^1\text{O}_2$ byla zaznamenána ve vzorku Plesne-pritok_25/10, který obsahoval největší množství DOM. Jedná se o vzorek vody získaný z malého přítoku Plešného jezera, který obsahuje čerstvě vylouhované DOM, která byla slunečnímu záření vystavena jen velmi krátkou dobu, a obsahovala proto větší podíl organických látek s vyšší molekulovou hmotností (Kopáček et al., 2003). Naopak nejmenší rovnovážná koncentrace singletového kyslíku byla zaznamenána pro vzorek Laka-vytok_30/07, který byl získán z výtoku z šumavského jezera Laka. Koncentrace DOM v tomto vzorku byla v rámci našeho souboru vzorků jen lehce pod průměrem. Tato voda však byla v jezeře vystavena slunečnímu záření po nejdélejší dobu a došlo u něj k poklesu molekulové hmotnosti v důsledku vystavení slunečnímu záření a biologickým transformacím. Takto transformované

DOM má sníženou schopnost produkce singletového kyslíku (Helmes et. al., 2008), jelikož je sám ovlivněn fotochemickými reakcemi, při kterých $^1\text{O}_2$ vzniká.

Pokud se zaměříme na vzorky z hlediska historie jejich vystavení slunečnímu záření a jejich geneze, pozorujeme stejný efekt jako u vzorků Plesne-prítok_25/10 a Laka-vytok_30/07. Vzorky odebírané ze dna vodních nádrží či jezer vykazují potenciálně vyšší rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ než odpovídající vzorky odebrané na hladině, protože voda u dna s obsahem DOM neovlivněných slunečním zářením má vyšší molekulovou hmotnost než DOM na hladině (Helmes et al., 2008). Vzorky odebírané ve výtoku vodních nádrží či jezer mají podobné složení DOM jako vzorky z hladiny. Jsou jimi například Certovo-hladina a Certovo-vytok, a jejich rovnovážné koncentrace singletového kyslíku jsou srovnatelné. Ve vzorcích odebíraných z přítoků a potoků byla až na výjimky zjištěna vyšší rovnovážná koncentrace $^1\text{O}_2$ než u výtoků a hladin, protože DOM v nich obsažená byla vystavena slunečnímu záření po kratší dobu a má vyšší molekulovou hmotnost. Je tedy patrné, že složení DOM ovlivňuje rovnovážnou koncentraci singletového kyslíku, což odpovídá poznatkům získaným z literatury (Fede a Grannas, 2015).

Obsah FFA v ozářených vzorcích vykazoval v průběhu času změny, a proto je nutné provádět jejich měření neodkladně. Toto zjištění je konzistentní s údaji získanými z literatury (Fede a Grannas, 2015). Z tohoto důvodu není ani tato metoda vhodná pro měření mimo laboratorní podmínky.

6. Závěr

Metoda využívající SOSG není vhodná pro testování rovnovážné koncentrace singletového kyslíku ve vodním prostředí. Činidlo se působením světelného záření stává nestabilním a metoda neposkytovala opakovatelné výsledky.

Hodnoty rovnovážné koncentrace singletového kyslíku získané pomocí metody využívající FFA se pohybovaly v řádech 10^{-11} až 10^{-12} mol/l, což odpovídá údajům získaným z literatury. Ve vybraných vzorcích povrchových vod nebyla zjištěna závislost rovnovážné koncentrace singletového kyslíku na pH ani na množství rozpuštěných organických látek. Naproti tomu byla pozorována závislost na „kvalitě“ DOM vyjádřené předchozí expozicí slunečnímu záření, odpovídající době zdržení v daném vodním tělese. Stabilita FFA ve vodném roztoku není dostatečná pro použití této metody pro měření mimo stabilní laboratorní podmínky.

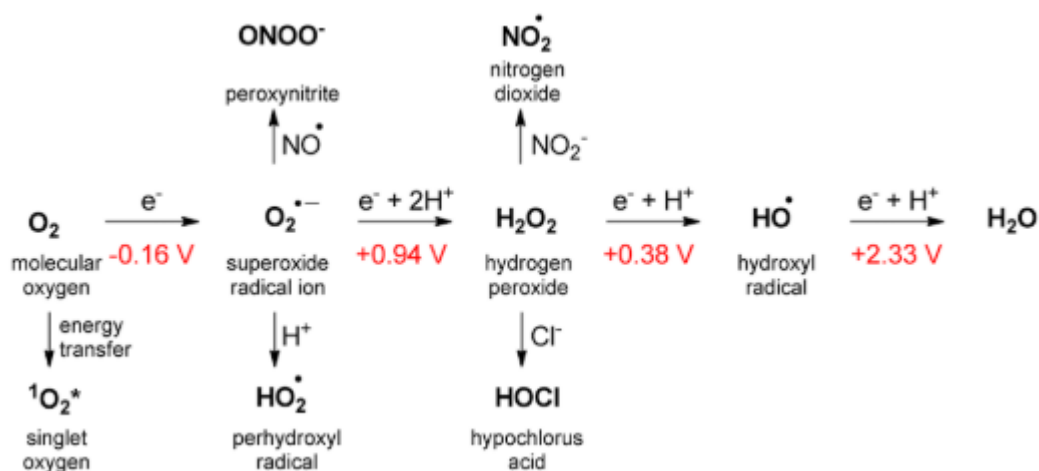
7. Literatura

- Berggren, M., Laudon, H., Haei, M. Ström, L., Jansson, M. (2010). *Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources*. ISME Journal (4): 408-416.
- Braslavsky, S.E. (2007). *Glossary of terms used in photochemistry, third edition*. Pure Appl. Chem., Vol. 79, No. 3, pp. 293-465.
- Brezonik, P. L., Arnold, W. A. (2011). *Water chemistry: An Introduction to the Chemistry of Natural and Engineered Aquatic Systems*. Oxford University Press, New York.
- Burns, J. M., Cooper, W. J., Ferry, J. L., King, D. W., DiMento, B. P., McNeill, K., Miller, Ch. J., Miller, W. L., Peake, B. M., Rusak, S. A., Rose, A. L., Waite, T. D. (2012). *Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments*. Aquatic Sciences 74: 683-734.
- Connors, K. A. (1990). *Chemical kinetics, the study of reaction rates in solution*. VCH Publishers, Inc.
- Daintith, J. (2008). *A Dictionary of Chemistry, sixth edition*. Oxford University Press, New York.
- Dole, M. (1965). *The natural history of oxygen*. The Journal of General Physiology, Rockefeller University Press.
- Ebsworth, E. A. V., Connor, J. A., Turner, J. J. (1975). *Comprehensive inorganic chemistry: The chemistry of oxygen*. Pergamon Press.
- Fede, A., Grannas, A. M. (2015). *Photochemical production of singlet oxygen from dissolved organic matter in ice*. Environmental Science and Technology, 49, 12808-12815.
- Flors, C., Frey, M. J., Waring, J., Reeder, B., Bechtold, U., Mullineaux, P. M., Nonell, S., Wilson, M. T., Baker, N. R. (2006). *Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green*. Journal of Experimental Botany, Vol. 57, No. 8, pp. 1725-1734.
- Gollmer, A., Arnbjerg, J., Blaikie, F. H., Pedersen, B. W., Breitenbach, T., Daasbjerg, K., Glasius, M., Ogilby, P. R. (2011). *Singlet oxygen sensor green: Photochemical behaviour in solution and in a mammalian cell*. Photochemistry and Photobiology, 87: 671-679.
- Helmes, J. R., Stubbin, A., Ritchie, J. D., Minor, E. C., Kieber, D. J., Mopper, K. (2008). *Absorption spectral slopes and slopes ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter*. Limnology and Oceanography, (Vol. 53 No. 3): 95-969.
- Hood, E., Williams, A. W., McKnight, D. M. (2005). *Sources of dissolved organic matter (DOM) in a Rocky Mountain stream using chemical fractionation and stable isotopes*. Biogeochemistry 74: 231-255.

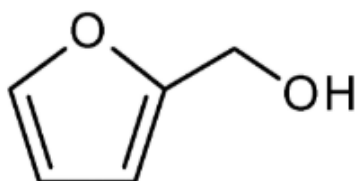
- Kiesslich, T., Gollmer, A., Maisch, T., Berneburg, M., Plaetzer, K. (2013). A comprehensive tutorial on IN Vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Vol. 2013, ID 840417.
- Kirk, John T. O. (2011). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, third edition*. Cambridge university press, New York.
- Kopáček, J., Hejzlar, J., Kaňa, J., Porcal, P., Klementová, Š. (2003). *Photochemical, chemical, and biological transformation of dissolved organic carbon and its effect on alkalinity production in acidified lakes*. Limnology and Oceanography, Inc. (Vol. 48 No. 1): 106-117.
- Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. J. (2005). *Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku*. Chemické listy 99, 211 – 221.
- Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. J. (2006). *Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva*. Chemické listy 100, 169-177.
- Nonell, S., Flors, C. (2016). *Comprehensive series in photochemical and photobiological science: Singlet oxygen – Application in biosciences and nanosciences, Vol. 1*. European Society for Photobiology.
- Ohno, T. (2002). *Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter*. Environmental Science and Technology, 36, 742-746.
- OpenStax College. *Microbiology* [Online]. ©2016 [vid. 2018-12-01]. Dostupné z: <https://cnx.org/contents/5CvTdmJL@4.4:rFziotaH@4/Introduction>
- Pivokonský, M., Pivokonská, L., Bubáková, P., Janda, V. (2010). *Úprava vody s obsahem huminových látek*. Chemické listy 104, 1015-1022.
- Roberts, J. D., Caserio, M. C. (1977). *Basic principles of Organic chemistry, second edition*. W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA.
- Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., Imboden, D. M. (1993). *Environmental organic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Silva, C. P., Lima, D. L. D., Groth, M. B., Otero, M., Esteves, V. I. (2015). *Effect of natural aquatic humic substances on the photodegradation of estrone*. Elsevier Ltd. Chemosphere 145: 248-255.
- Tan, K. H. (2014). *Humic matter in soil and the environment: Principles and Controversies*. Taylor & Francis Group, CRC Press.
- ThermoFisher Scientific. *Manuals & protocols Singlet Oxygen Sensor Green Reagent* [online]. ©2004 [vid. 2018-12-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S36002>
- ThoughtCo. *How to make tris buffer solution* [online]. ©2018 [vid. 2018-02-08]. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/how-to-make-tris-buffer-solution-603668>

8. Přílohy

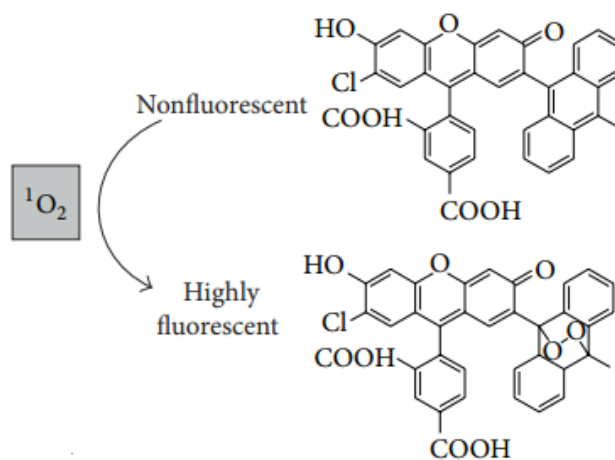
8.1 Obrázky



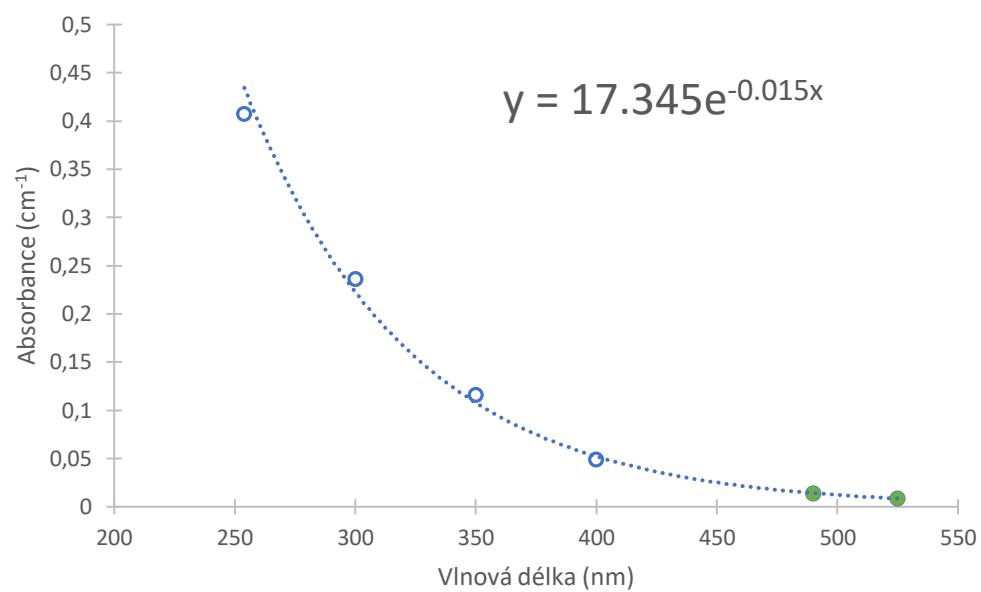
Obr. P1: Formace ROS pomocí přenosu energie nebo elektronu s uvedenými standardními redoxními potenciály, které odpovídají 1 mol/l molekul O_2 (Nonell a Flors, 2016).



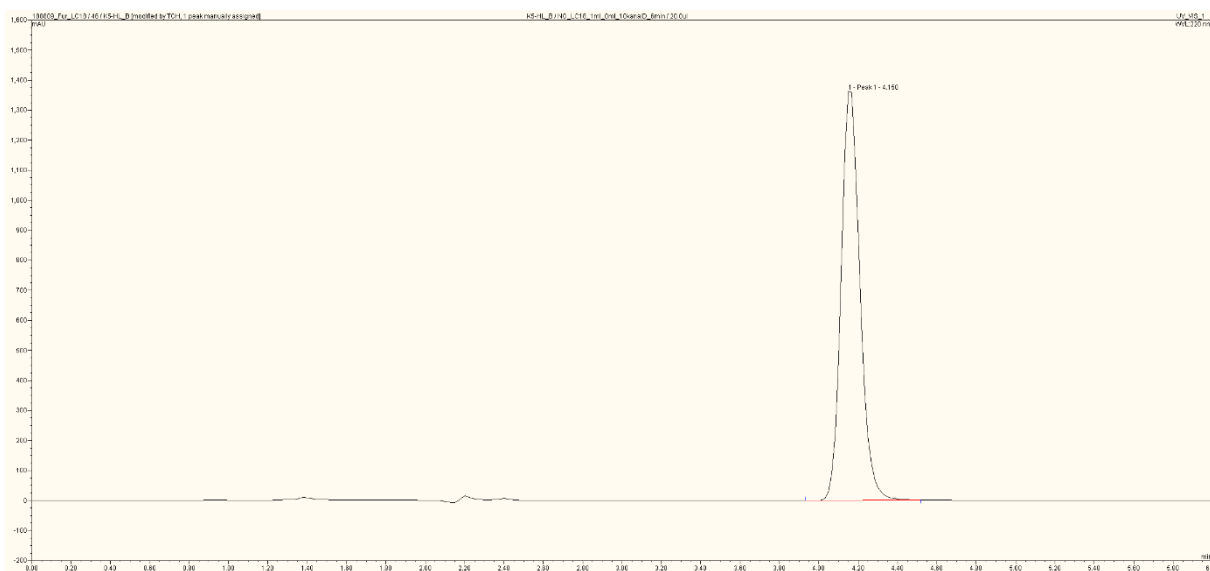
Obr. P2: Strukturní vzorec FFA.



Obr. P3: Reakce SOSG s 1O_2 (Kiesslich et al., 2013).



Obr. P4: Graf absorpčního spektra vzorku Plesne-dno.



Obr. P5: Chromatograf detekce FFA ve vzorku K5-PL (snímek obrazovky).

8.2 Tabulky

Tab. P1: Přehled všech měřených vzorků.

| Označení | Místo odběru | Typ | Datum odběru |
|-----------------------|------------------------------------|------------------|--------------|
| Plesne-pritok_25/10 | Plešné | potok | 25-10-17 |
| Rimov-hladina_19/02 | Římov - hladina | hladina nádrže | 19-02-18 |
| Rimov-vytok | Římov - výtok | výtok z nádrže | 20-02-18 |
| Rimov-surova | Odběr surové vody na úpravnu Plav | nádrž | 21-02-18 |
| Malse | Malše - soutok | řeka | 22-02-18 |
| Cerna | Černá - Ličov | řeka | 23-02-18 |
| Velesinsky | Velešínský potok, přítok do Říмова | potok | 24-02-18 |
| Zvikovsky | Zvíkovský potok, přítok do Říмова | potok | 25-02-18 |
| Besednice | Besednice | polní potok | 26-02-18 |
| Dobechov | Dobechov | polní potok | 27-02-18 |
| Benesovsky | Benešov nad Černou | luční potok | 28-02-18 |
| Malonty | Malonty | potok v pastvině | 01-03-18 |
| Klepná | Klepná | lesní potok | 02-03-18 |
| Uhliste | Uhlíště | lesní potok | 03-03-18 |
| Pohori | Pohoří | lesní potok | 04-03-18 |
| Jiricka_05/03 | Jiřícká nádrž | nádrž | 05-03-18 |
| Plesne-vytok | Plešné | výtok z jezera | 17-07-18 |
| Plesne hladina | Plešné | hladina jezera | 30-07-18 |
| Plesne-dno | Plešné | dno jezera | 30-07-18 |
| Plesne-pritok_30/07 | Plešné | přítok jezera | 30-07-18 |
| Plesne-pritok_2 | Plešné | přítok jezera | 30-07-18 |
| Plesne-pritok_3 | Plešné | přítok jezera | 30-07-18 |
| Certovo-vytok | Čertovo | výtok z jezera | 27-07-18 |
| Certovo-hladina | Čertovo | hladina jezera | 01-08-18 |
| Certovo-dno | Čertovo | dno jezera | 01-08-18 |
| Certovo-pritok | Čertovo | přítok jezera | 01-08-18 |
| Certovo-pritok_2 | Čertovo | přítok jezera | 01-08-18 |
| Certovo-pritok_3 | Čertovo | přítok jezera | 01-08-18 |
| Laka-vytok_07/07 | Laka | výtok z jezera | 07-07-18 |
| Laka-vytok_30/07 | Laka | výtok z jezera | 30-07-18 |
| Prasilske-vytok_09/07 | Prášílské | výtok z jezera | 09-07-18 |
| Prasilske-vytok_30/07 | Prášílské | výtok z jezera | 30-07-18 |
| Rimov-hladina_30/07 | Římov | hladina nádrže | 06-08-18 |
| Pohori | Pohoří | lesní potok | 06-08-18 |
| Jiricka_06/08 | Jiřícká nádrž | nádrž | 06-08-18 |
| COV | ČOV Kaplice | výtok z čističky | 06-08-18 |
| Slapy-hladina | Nádrž u obce Nebřich | hladina nádrže | 07-08-18 |
| Zlutice-hladina | Žlutice | hladina nádrže | 07-08-18 |
| Zlutice-dno | Žlutice | nádrž v 17 m | 07-08-18 |
| Zlutice-hladina_2 | Žlutice | hladina nádrže | 07-08-18 |
| Strela | Střela řeka | slévaný přítok | 07-08-18 |
| Klicava-hladina | Klíčava | hladina nádrže | 08-08-18 |
| Klicava-dno | Klíčava | nádrž ve 25 m | 08-08-18 |
| Klicava-hladina_2 | Klíčava | hladina nádrže | 08-08-18 |
| Klicava-pritok | Klíčava | slévaný přítok | 08-08-18 |
| Klicava-pritok_2 | Lánský potok | slévaný přítok | 08-08-18 |

Tab. P2: Přehled výsledků měření pH, obsahu DOC, rovnovážné koncentrace $^1\text{O}_2$ pomocí metody využívající FFA (FFA [$^1\text{O}_2$]ss) a pomocí metody využívající SOSG (SOSG [$^1\text{O}_2$]ss).
N – nedetekováno.

| Vzorek | pH | DOC (mg/l) | FFA [$^1\text{O}_2$]ss (mol/l) | SOSG [$^1\text{O}_2$]ss (mol/l) |
|-----------------------|-----|------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Plesne-pritok_25/10 | 4.3 | 23.57 | N | N |
| Rimov-hladina_19/02 | 6.9 | 5.66 | N | N |
| Rimov-vytok | 6.9 | 5.88 | N | N |
| Rimov-surova | 6.9 | 5.70 | N | N |
| Malse | 7.0 | 4.14 | N | N |
| Cerna | 6.7 | 4.41 | N | N |
| Velesinsky | 7.4 | 4.51 | N | N |
| Zvikovsky | 7.2 | 3.23 | N | N |
| Besednice | 7.1 | 4.28 | N | N |
| Dobechov | 6.9 | 6.40 | N | N |
| Benesovsky | 6.9 | 2.23 | N | N |
| Malonty | 7.0 | 4.30 | N | N |
| Klepna | 6.6 | 0.81 | N | N |
| Uhliste | 6.3 | 4.77 | N | N |
| Pohori | 5.3 | 14.10 | N | N |
| Jiricka_05/03 | 6.2 | 9.33 | N | N |
| Plesne-vytok | 5.6 | 8.05 | 1.17E-11 | 4.89E-12 |
| Plesne hladina | 5.8 | 8.21 | N | 5.00E-12 |
| Plesne-dno | 5.8 | 8.86 | 1.13E-11 | 4.92E-12 |
| Plesne-pritok_30/07 | 4.5 | 17.87 | 1.32E-11 | 3.94E-12 |
| Plesne-pritok_2 | 4.8 | 3.90 | 1.15E-11 | 5.28E-12 |
| Plesne-pritok_3 | 4.9 | 1.92 | 9.58E-12 | 6.95E-12 |
| Certovo-vytok | 5.0 | 3.46 | 1.03E-11 | 6.08E-12 |
| Certovo-hladina | 4.9 | 3.39 | 9.57E-12 | 6.76E-12 |
| Certovo-dno | 5.1 | 3.19 | 7.21E-12 | 7.02E-12 |
| Certovo-pritok | 4.5 | 4.81 | 1.05E-11 | 4.54E-12 |
| Certovo-pritok_2 | 4.8 | 2.07 | 3.28E-12 | 6.22E-12 |
| Certovo-pritok_3 | 4.9 | 5.07 | 7.35E-12 | 3.79E-12 |
| Laka-vytok_07/07 | 6.0 | 7.38 | N | 4.84E-12 |
| Laka-vytok_30/07 | 6.5 | 6.02 | 1.92E-12 | 4.42E-12 |
| Prasilske-vytok_09/07 | 5.4 | 6.66 | 5.24E-12 | 4.26E-12 |
| Prasilske-vytok_30/07 | 5.6 | 7.00 | 4.52E-12 | 3.57E-12 |
| Rimov-hladina_30/07 | 9.4 | 7.93 | 4.35E-12 | 4.56E-12 |
| Pohori | 6.2 | 13.51 | 9.28E-12 | 4.80E-12 |
| Jiricka_06/08 | 6.7 | 14.00 | 1.14E-11 | 4.92E-12 |
| COV | 7.7 | 9.19 | 6.26E-12 | 4.56E-12 |
| Slapy-hladina | 9.6 | 6.96 | 1.17E-11 | 6.46E-12 |
| Zlutice-hladina | 9.3 | 7.31 | 8.45E-12 | 4.18E-12 |
| Zlutice-dno | 7.1 | 6.19 | 1.25E-11 | 5.67E-12 |
| Zlutice-hladina_2 | 7.6 | 12.22 | 7.72E-12 | 4.88E-12 |
| Strela | 7.8 | 7.13 | 1.07E-11 | 4.76E-12 |
| Klicava-hladina | 8.4 | 4.16 | 1.07E-11 | N |
| Klicava-dno | 7.5 | 5.17 | 1.17E-11 | 7.27E-12 |
| Klicava-hladina_2 | 8.4 | 4.11 | 1.10E-11 | N |
| Klicava-pritok | 7.6 | 8.00 | 9.53E-12 | 5.85E-12 |
| Klicava-pritok_2 | 8.1 | 6.34 | 1.01E-11 | 7.46E-12 |

Tab. P3: Testování opakovatelnosti měření metody využívající SOSG. Hodnoty jsou udávány ve fluorescenčních jednotkách přístroje. N – nedetekováno.

| | signál fluorescenčního záření | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|-----------|
| | 1. opakování | | | | 2. opakování | | | | 3. opakování | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 0 | 5 | 10 | 15 | 0 | 5 | 10 | 15 |
| Blank | 323306.6 | 476259.0 | 600611.5 | 719849.2 | 303724.1 | 452304.2 | 563798.5 | 677985.4 | 274151.2 | 365928.8 | 481250.0 | 551122.2 |
| Rimov-hladina_19/02 | 523076.9 | 608658.7 | 721956.0 | 811854.2 | 300499.2 | 432398.9 | 547895.6 | 654014.5 | 419376.4 | 429594.3 | 496661.6 | 550257.5 |
| Rimov-vytok | 292013.2 | 422899.6 | 548518.5 | 647140.3 | 295766.6 | 412176.9 | 542778.7 | 634970.2 | 304356.1 | 404381.0 | 508329.4 | 597526.2 |
| Rimov-surova | 305602.7 | 404418.7 | 505407.1 | 602601.9 | 345525.0 | 456994.3 | 568851.5 | 657482.5 | 332224.7 | 417458.2 | 534086.6 | 622992.9 |
| Malse | 284833.9 | 390493.2 | 506272.6 | 603549.8 | 261304.6 | 353897.0 | 443279.5 | 532552.2 | 362212.9 | 459603.2 | 583325.4 | 654072.0 |
| Cerna | 320547.1 | 423901.9 | 521351.5 | 619856.4 | 279093.9 | 368829.2 | 466012.1 | 541615.5 | 312381.5 | 397421.3 | 491901.1 | 594218.0 |
| Velesinsky | 493405.2 | 636939.5 | 781900.9 | 905756.4 | 280354.4 | 390672.2 | 507647.3 | 608765.3 | 301600.8 | 423874.9 | 530826.8 | 647187.0 |
| Zvikovsky | 334002.1 | 471134.1 | 598214.3 | 727070.0 | 277500.2 | 368153.1 | 477178.4 | 572021.9 | N | N | N | N |
| Besednice | 300875.1 | 437488.9 | 569094.1 | 682400.8 | 298096.9 | 443187.2 | 578282.6 | 679248.8 | 343821.5 | 426703.6 | 559603.3 | 639402.0 |
| Dobechov | 315648.1 | 459734.1 | 598747.9 | 718376.6 | 316891.4 | 480045.3 | 623372.9 | 756304.9 | 515745.4 | 671268.1 | 844683.3 | 1000951.7 |
| Benesovsky | 308944.9 | 410719.3 | 536078.6 | 637903.3 | 304974.8 | 396089.0 | 514345.8 | 605834.5 | 281157.8 | 383320.7 | 514693.3 | 595969.2 |
| Malonty | 356004.2 | 511873.4 | 667829.2 | 759660.7 | 349380.4 | 522315.5 | 663114.8 | 752209.0 | 317448.3 | 476737.6 | 588503.6 | 725657.8 |
| Klepňá | 385072.1 | 494667.3 | 616306.5 | 719694.8 | 269168.8 | 379548.9 | 471732.1 | 562067.3 | 360638.6 | 462941.8 | 588011.8 | 710161.4 |
| Uhliste | 427496.0 | 547168.0 | 668049.8 | 788024.5 | 285037.9 | 370029.4 | 453762.4 | 531075.6 | 269402.5 | 362573.7 | 463681.3 | 541955.7 |
| Pohori | 427654.6 | 506326.7 | 627195.5 | 728826.4 | 311306.5 | 394246.2 | 466218.8 | 543297.4 | 289201.3 | 359810.0 | 453136.9 | 516021.7 |
| Jiricka-hladina_05/03 | 415510.9 | 490847.3 | 604664.3 | 718251.3 | 331222.8 | 424374.1 | 504298.5 | 590380.8 | 271086.6 | 329692.2 | 425206.6 | 486745.8 |