

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie ekosystémů



Fotochemické reakce přírodních organických látek, změny absorpčních a fluorescenčních charakteristik

Diplomová práce

2009

Dalibor Kříž

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Šárka Klementová CSc.

Kříž D. (2009): Fotochemické reakce přírodních organických látek, změny absorpčních a fluorescenčních charakteristik. Diplomová práce. PřF JU, České Budějovice.

[Photochemical reactions of natural organic compounds, changes in absorbance and fluorescence spectra. Master Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.]

Anotace:

Types of intrinsic fluorophores were characterized in several soil humic and fulvic acid samples and the photochemical stability of the fluorophores under UV (300 – 400 nm) irradiation was tested.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracoval samostatně pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu GAČR 206/06/0410

V Českých Budějovicích, dne

.....
Bc. Dalibor Kříž

Mé poděkování patří hlavně mé školitelce Š. Klementové za cenné rady a pomoc nejen s řešením vědeckých problémů. Velké dík směřuje též dr. Fr. Novákovi nejen za poskytnutí vzorků, bez nichž by tato práce ani nevznikla, ale též za pomoc a mnohé cenné rady. Děkuji též prof. J. Kopáčkovi a dr. P. Porcalovi za spolupráci a rady. V neposlední řadě děkuji ing. V. Hejzlarové, ing. J. Kroupové a Mgr. K. Murtingerovi za prováděné analýzy.

Obsah

1. Cíle práce.....	1
2. Úvod.....	2
3. Materiály a Metody.....	9
4. Výsledky.....	13
5. Diskuse.....	21
6. Závěry.....	23
Literatura.....	24
Přílohy.....	31

1. Cíle práce

Cílem práce bylo:

- charakterizovat fluorescenční centra (fluorofory) přítomná v izolátech půdních humínových kyselinách a fulvokyselinách
- otestovat, zda fluorescence humínových kyselin a fulvokyselin podléhá změnám při přidavku iontů kovů (Al) a zda fluorescence je použitelná ke sledování komplexace iontů Al humínovými kyselinami a fulvokyselinami
- proměřit stabilitu fluoroforů při ozařování dlouhovlnným UV zářením a popsat změny, k nimž při ozařování dochází.

2. Úvod

Díky procesům podílejících se na rozkladu zbytků těl rostlin a živočichů se do přírodních vod dostávají organické sloučeniny jako ligniny, proteiny, pektiny, polysacharidy a taniny. Tyto látky jsou transformovány biochemickými procesy, během nichž vznikají vysokomolekulární látky. Tyto procesy jsou souhrnně nazývány humifikace a relativně stabilní látky, které při dekompozici vznikají, se nazývají huminové látky (Senesi, 1993; Dojlido a Best, 1993).

Huminové látky jsou směsí mnoha sloučenin a svým charakterem odpovídají organickým kyselinám a fenolům. Jejich barva v rozmezí žlutohnědá až velmi tmavě hnědá určuje zbarvení přírodních vod. Podle Orlova (1974) se molekulární hmotnost půdních huminových látek pohybuje v širokém rozmezí 700 až 800 000. Huminové látky, především huminové kyseliny, často bývají málo rozpustné ve vodě a biodegradaci podléhají jen velmi pomalu (Dojlido a Best, 1993).

Dělení huminových látek je poměrně problematické. Odén (1919) je rozdělil do čtyř skupin podle rozpustnosti ve zředěných kyselinách, zásadách, alkoholu a ve vodě s neutrálním pH. Dělení je následující:

- huminové kyseliny se rozpouštějí v alkalických roztocích a jsou nerozpustné v minerálních kyselinách a v alkoholu
- fulvokyseliny jsou rozpustné jak v kyselém prostředí (pH přibližně 1) tak v alkalickém prostředí
- huminy nejsou rozpustné ani ve vodě s neutrálním pH ani v alkalickém prostředí
- hymatomelanové kyseliny jsou rozpustné v zásadách a alkoholu, ale nerozpustné v minerálních kyselinách

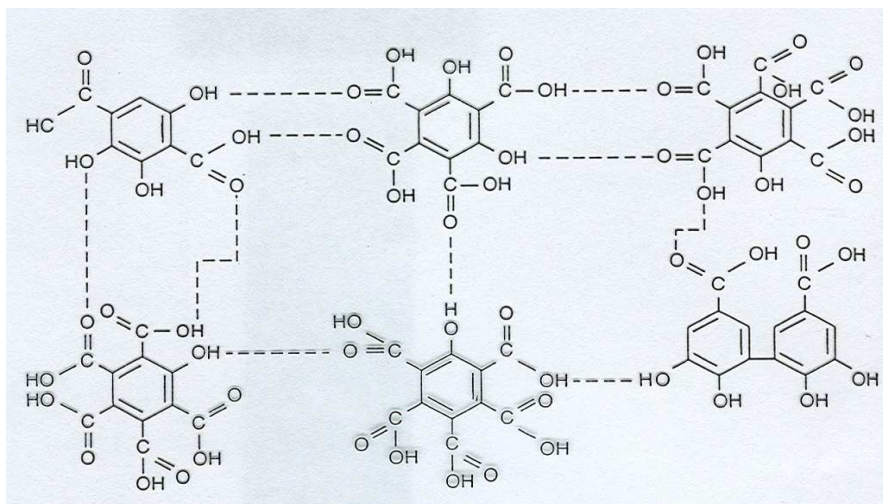
O něco jednodušší dělení uvádí například Schnitzer a Khan (1972a). Ti uvádí pouze tři skupiny a jako kritérium zvolili rozpustnost v roztocích o různém pH. Huminové kyseliny jsou rozpustné v roztocích s pH vyšším než 2, fulvokyseliny jsou rozpustné při všech hodnotách pH a huminy jsou látky, které nejsou rozpustné vůbec.

Přesná chemická struktura huminových kyselin a fulvokyselin dodnes nebyla přesně určena a vzhledem k jejich proměnlivosti zřejmě ani nikdy nebude. Chemické složení huminových látek ukazuje tabulka I (Schnitzer, 1971). Z funkčních skupin obsahují molekuly huminových látek hlavně karboxyly a fenolické OH skupiny.

Tab. I: Elementární složení huminových látek.

Prvek	Huminové kyseliny	Fulvokyseliny
	% hmotnosti	% hmotnosti
C	50 – 60	40 – 50
H	4 – 6	4 – 6
O	30 – 35	44 – 50
N	2 – 4	1 – 2
S	1 – 2	0 – 2

Teoretická struktura huminových kyselin, jak ji navrhli Schnitzer a Khan (1972b), je ukázána na obrázku 1. Podle Gjessinga (1976) je průměrný poměr mezi uhlíkem, vodíkem a dusíkem obsaženým v molekule huminové látky okolo 32 : 5,5 : 1,1.



Obr. 1: Teoretická struktura huminových látek (Schnitzer, Khan 1972b).

Huminové látky jsou podstatnou složkou půd. Jejich přítomnost zlepšuje její strukturu. Využívají se k úpravě a stabilizaci půd. Huminové látky se také používají v průmyslu jako emulgátory, pigmenty a k odstraňování kotelního kamene v kotlích (Dojlido a Best, 1993).

Huminové látky se vyskytují ve vyšších koncentracích ve vodách odvodňujících bažinné nebo rašelinné území. Způsobují zbarvení vod, které závisí na jejich koncentraci a charakteru. Nejsilnější zbarvení z huminových látek mají huminové kyseliny. Existuje pozitivní vztah mezi molekulovou hmotností huminových látek a jejich barvou, tedy čím vyšší molekulová hmotnost, tím tmavší barva (Wang et al., 1990). Intenzita zbarvení je určována hodnotou pH. Charakteristika zbarvení je sice dána složením sloučeniny, avšak platí, že se vzrůstající hodnotou pH vzrůstá i intenzita zbarvení (Packham, 1964).

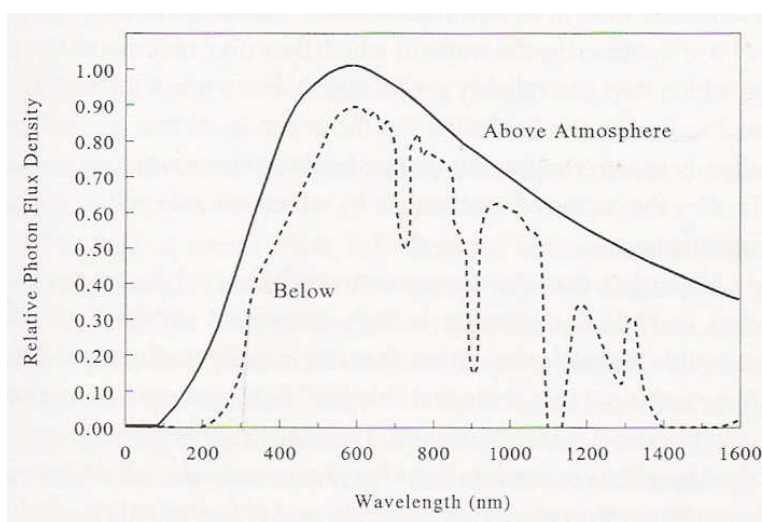
Huminové látky vytvářejí komplexy s ionty kovů, hlavně s Fe^{3+} , Al^{3+} a Cu^{2+} . Schnitzer (1971) uvádí, že roztok fulvokyselin o koncentraci 100 mg/l dokáže komplexně vázat 8,4 mg Fe^{3+} a 4,0 mg Al^{3+} v jednom litru. Stabilitu komplexů různých kovů s huminovými látkami studoval například Mantoura et al. (1978). Uvádí, že komplexy huminových látek jsou méně stabilní než komplexy syntetických látek jako například EDTA. Kovy se tak poměrně snadno mohou uvolňovat do vody a díky této nízké stabilitě komplexů jsou biologicky dostupné.

Huminové látky mají také schopnost adsorbovat mnoho sloučenin jako například pesticidy. Přítomnost huminových látek ve vodách zvyšuje rozpustnost dalších organických sloučenin. Bylo zjištěno, že sodné soli huminových látek snižují povrchové napětí vody a fungují tak jako povrchově aktivní látky, toto může být vysvětlení pro zvýšení rozpustnosti dalších organických látek (Schnitzer, 1971).

Mnoho let byly huminové látky považované za poměrně neškodné pro lidské zdraví a z pitné vody byly odstraňovány pouze z estetických důvodů. Později však bylo zjištěno, že mohou být zdrojem nežádoucího pachu vody a mohou akumulovat toxické látky tvorbou komplexů s těžkými kovy a adsorpcí organických sloučenin, jako například s pesticidů, polychlorovaných bifenyly a ftalátů (Dojlido a Best, 1993). Také bylo zjištěno, že z nich během chlorace vody mohou vznikat nežádoucí halogenované uhlovodíky (Reckhow et al., 1990). Huminové látky jsou také prekurzory toxických trihalometanů (Dojlido a Best, 1993).

V přírodních vodách mohou být huminové látky odbourávány pomocí fotoiniciovanych oxidačních reakcí, což má za následek změnu jejich fyzikálních, chemických i biologických vlastností (Zepp et al., 1992; Moran a Zepp 1997).

Zdrojem energie pro fotochemické procesy v přírodě je sluneční záření. Maximum intenzity slunečního záření dopadajícího na zemský povrch leží v rozmezí vlnových délek 400 – 600 nm. Jen malou část tvoří UV záření v rozmezí 290 – 400 nm (Mecherikunnel, 1983; Weiner a Goldberg, 1985). Ve fotoiniciovanych přeměnách huminových látek se však uplatňuje spíše záření o vlnových délkách 290 – 400 nm. Záření o vlnových délkách kratších než 285 – 290 nm je kompletně pohlceno v atmosféře (Smith a Baker, 1979; Baker et al., 1980). Spektrální distribuci slunečního záření dopadajícího na zemský povrch zobrazuje obrázek 2.



Obr. 2: Spektrální distribuce slunečního záření dopadajícího na zemský povrch (převzato z Denny, 1993).

Přítomnost složek, které jsou schopny ve vodě absorbovat nebo rozptylovat záření, jejich povaha a koncentrace rozhoduje o tom, do jaké hloubky bude v daném typu vody záření pronikat (Zika, 1981). Ve sladkých povrchových vodách se proto fotoiniciovane reakce uplatňují zpravidla pouze do hloubky několika centimetrů. Povrchová vrstva vod je však neustále obměňována díky promíchávání větrem a teplotními rozdíly, což umožňuje neustálý přísun nezreagovaných substrátů do fotochemicky aktivní zóny. Právě huminové kyseliny, fulvokyseliny a jejich komplexy

s kovy jsou odpovědné za absorpci významné části slunečního záření iniciujícího fotochemické reakce. Většina látek schopných absorbovat záření v přírodních vodách může vystupovat ve fotochemických reakcích jako fotosensitizátory, tedy látky schopné předat excitační energii některé z látek, která sama neabsorbuje, a ta je následně substrátem probíhající reakce. Absorbující látky se mohou také stát samy substrátem fotoiniciované reakce (Zepp et al., 1981a; Zepp et al., 1981b; Zepp et al., 1985).

Fotochemická reakce se skládá z několika po sobě následujících reakcí. Tyto reakce se rozdělují na primární a sekundární. Primárními reakcemi jsou reakce excitovaných molekul, tedy molekul které absorbovaly foton. Mezi primární reakce patří například tvorba radikálů fotoredukci nebo fotooxidací, homolytické štěpení kovalentních vazeb za vzniku radikálů a přenos energie při fotosensitizovaných reakcích bez tvorby radikálů. Sekundárními reakcemi jsou reakce meziproductů, které vznikly primárními reakcemi, a jsou tedy termické (Wayne, 1970).

V tabulce II jsou shrnuty oxidační činidla a částice, které se ve vodě vyskytují, nebo v ní vznikají fotochemicky, a jejich základní charakteristiky (Waite et al., 1988).

Tab. II: Přehled oxidačních částic vyskytujících se ve vodách.

Částice	Prekursor	Hlavní reakce
O_2		oxidace DOM
1O_2	DOM + O_2	H_2O (zhášení)
ROO•	DOM	rekombinace ROO•
HO•	$NO_3^- + H_2O$	DOM (hydroxylace)
HO•	$NO_3^- + H_2O$	vznik stabilnějšího radikálu
$O_2^-•$	$e^-_{aq} + O_2$	vznik H_2O_2

Humínové látky obsahují řadu chromoforů tedy skupin odpovědných za absorpci záření. Z tohoto důvodu nevykazují absorpční spektra jasná oddělená absorpční maxima, ale pohlcování záření se kontinuálně zvyšuje s klesající vlnovou délkou v celé oblasti UV záření od cca 400 nm do 190 nm (ve viditelné oblasti nad 450 nm je absorpce záření většinou zanedbatelná). Absorpční spektra mají tedy nízkou vypovídající hodnotu o charakteru humínové látky (Matthews et al., 1996).

Některé z chromoforů zodpovědných za absorpci vykazují fluorescenci – tedy zářivou deexcitaci vzbuzeného stavu. Takovéto chromofory označujeme jako

fluorofory. Fluorescence se dá využít k charakterizování změn při fotoiniciováných transformacích huminových látek. Je-li v molekule huminové látky více fluoroforů, je měření fluorescence obtížnější oproti molekulám s jedním fluoroforem, neboť se postupně může měnit excitační i emisní vlnová délka.

Skutečnost, že v molekule huminové látky může připadat na každý fluorofor několik nefluorescentních chromoforů, způsobuje, že excitační spektra nejsou inverzí absorpčních spekter a že fluorescence má nízký kvantový výtěžek, který se u huminových látek typicky pohybuje okolo 1 % (Green a Blough, 1994). Studie ukazují, že optické vlastnosti huminových látek závisí na jejich molekulární hmotnosti (Peuravouri a Pihlaja 1997, Chin at al. 1994). Také různé ligandy ovlivňují fluorescenci v různých spektrálních oblastech (Luster at al. 1996).

Změnu a posuny v excitačních a emisních vlnových délkách můžeme obejít použitím metody spektroskopie excitačně-emisních matic (EEMS). Při této metodě je opakovaně měřena intenzita fluorescence v sérii různých vlnových délek excitačního záření. Tato metoda poskytuje dostatečné informace k identifikaci různých fluorescenčních složek i v komplexních směsích (Christian at al. 1981; Lochmuler a Saavedra, 1986).

Metoda EEMS poskytuje mnoho výhod oproti tzv. „single-scan“ metodám. Data mohou být analyzována jako excitační spektra, emisní spektra nebo excitačně-emisní spektra. Kromě toho metoda EEMS poskytuje specifickou informaci o fluoroforech rozpuštěné organické hmoty (DOM) ve vzorku, a to při použití fluorescenčního maxima, tedy poměru vlnové délky excitace, při níž je intenzita emise nejvyšší, a vlnové délky v emisním maximu ($E_{x_{max}}/E_{m_{max}}$). $E_{x_{max}}/E_{m_{max}}$ není závislé na vlnové délce, kterou byla fluorescence vyvolána, nebo při které byla měřena, protože představuje jednu kombinaci excitačních a emisních vlnových délek, jejichž výsledkem je maximální fluorescence. V „single-scan“ uspořádání se lze $E_{x_{max}}/E_{m_{max}}$ dobrat pouze metodou pokus-omyl (Coble, 1996).

Výhodou použití fluorescenčních metod při studiu huminových látek je vysoká citlivost a malé narušení vzorků. Pomocí fluorescence lze rozlišit DOM podle jejich původu, obsahu aromatických struktur a také podle stupně humifikace (Kalbitz et al., 2000). Nevýhodou je to, že hodnota fluorescence nemusí charakterizovat celou molekulu, ale pouze její část (Sharpless a MacGown, 1999; Klementová et al., 2009). Dalším problémem může být výše zmíněná malá kvantová výtěžnost fluorescence u huminových látek.

Potenciál metody EEMS je v jejím využití například při ochraně zdrojů pitné vody, ke klasifikaci potenciálně vhodných zdrojů vody a při procesu úpravy pitné vody například před chlorací (Kumke et al., 1999, Marhaba et al., 2000; Marhaba a Lippincott 2000).

3. Materiály a metody

Huminové kyseliny (HK) a fulvokyseliny (FK) byly izolovány z půdních horizontů O, A a B na Šumavě a v Krkonoších. Soupis vzorků, lokality, typy půd a horizonty, ze kterých byli izolovány, je uveden v tabulce III. Typy půd byly klasifikovány podle Taxonomického klasifikačního systému půd ČR (2001).

Tab.III: Seznam vzorků, lokality, typy půd a horizonty.

Vzorek	Lokalita	Typ půd	Horizont
B2HK	Šumava - Boubín	kryptopodzol modální	O _F
T15HK	Šumava - Trojmezná	humuso-železitý podzol	O _L
T55HK	Šumava - Trojmezná	humuso-železitý podzol	E _P
B660HK	Šumava - Boubín	kryptopodzol modální	B _{SV}
N60FK	Krkonoše - Sluneční údolí	podzol rankrový	B _{HS}
N65FK	Krkonoše - Sluneční údolí	podzol rankrový	B _{HS}
V45FK	Krkonoše - Pudlava	podzol modální zrašelinělý	O _H + A _{ET}

Postup separace huminových látek popisuje například Novák et al. (1999). Vzorek půdy byl nejprve volně vysušen na vzduchu a proset na 2 mm sítu. Huminové kyseliny byly připraveny podle postupu International Humic Substances Society (IHSS). Půda byla nejprve dekalciifikována 0,1 M HCl a následně byly HK extrahovány 0,1 M NaOH. Extrakt HK byl vyčištěn opětovným vysrážením, promyt destilovanou vodou a zakoncentrován pomocí ultrafiltrační cely Amicon (filtr YM 1K NMWL) v atmosféře N₂. Sodné humáty byly převedeny na H⁺ formu pomocí kolony plněné silně kyselým katexem Dowex WX4 v H⁺ cyklu. HK byly následně lyofilizovány v přístroji HETO 8.0 při průměrné teplotě -50 °C až do úplného vysušení.

Fulvokyseliny byly izolovány standardní metodou (Malcolm, 1991) z matečného louhu po vysrážení HK. Nejprve byla upravena pH hodnota roztoku na 2,5 a fulvokyseliny byly sorbovány na koloně plněné Amberlitem XAD-8. Následně byla kolona promyta destilovanou vodou a FK eluovány 0,1M NaOH. Postup převedení sodných fulvátů na fulvokyseliny a jejich lyofilizace je shodný s postupem použitým u

HK popsaným výše. Bezvodé preparáty HK a FK byly skladovány v temnu až do jejich použití.

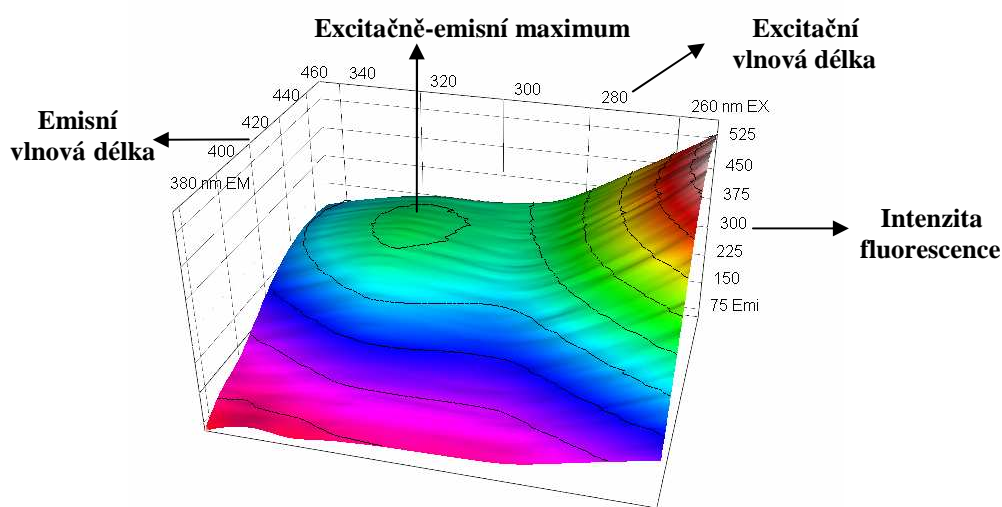
Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v ultračisté vodě (Filter Premier CDP 6920, USA). Pokud bylo potřeba z důvodů lepší rozpustnosti HK, bylo přidáním NaOH pH zvýšeno až na hodnotu 10. Hodnota pH byla následně upravena přidáním 0,1 M HCl na hodnotu 4. Hodnota DOC se pohybovala mezi hodnotami 6 – 40 mg/l. K některým vzorkům byl přidán Al z roztoku vzniklého rozpuštěním hliníkového drátu v koncentrované HCl tak, že výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 1 g/l. Poté bylo opět upraveno pH roztoku přidáním 0,1M NaOH na hodnotu 4. Roztoky s přidáním hliníkem byly před ozařováním skladovány v temnu při 5°C po dobu tří dnů. Před ozařováním byly všechny roztoky vzorků zfiltrány přes nylonový membránový filtr 0,2 um.

Ozařování bylo prováděno v křemenných zkumavkách umístěných ve fotochemickém reaktoru Rayonet RPR 200 vybaveném UV lampami RPR 3500 (Brandfort, CT). Lampy poskytují UV záření v rozmezí 300 – 400 nm s maximem intenzity v 350 nm a s výrobcem udávanou fotonovou intenzitou $1,5 - 5 * 10^{16} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-3}$. Vzorky byly ozařovány po dobu 0 (temná kontrola), 1, 2, 4, 7, 12 a 24 hodin. FA s přidáním Al byly ozařovány po dobu 0, 1, 2, 4 a 7 hodin, protože po této době už byla pozorovaná intenzita fluorescence takřka nulová a další ozařování tedy zbytečné. Celková energie záření při pokusu byla přibližně $0,49 \text{ MJ m}^{-2}$, vypočteno jako intenzita záření vynásobená 120 min ozařování (Porcal et al. 2009). Pro výpočet dopadajícího UV-A záření na povrch Země v oblasti o zeměpisných souřadnicích 50°N a 15°E byl použit model „Fast simulation of downward UV doses, indices and irradiances at the Earth's surface“. Množství dopadajícího záření na horizontální povrch bylo vypočteno pro zimní rovnodennost, jarní a podzimní slunovrat a letní rovnodennost. Množství energie při 120 min laboratorního pokusu odpovídá 7, 14,5 a 65 hodinám přírodního slunečního světla během letního slunovratu, jarní nebo podzimního rovnodennosti a zimního slunovratu. Teplota v reaktoru se při ozařování pohybovala v rozmezí 35 – 38 °C. Protože předchozí studie s neozářeným vzorkem ukázaly zanedbatelný vliv teploty, nebyl k chlazení reaktoru Rayonet použit žádný chladicí systém, kromě přirozeného proudění vzduchu.

Fluorescence byla měřena spektrofluorimetrem RF-1501 od firmy Shimadzu. Vzorky byly měřeny ve fluorescenční křemenné kyvetě. Při měření byl využit software Panorama fluorescence 1.1 od firmy Shimadzu. Vzorky byly

excitovány zářením patnácti vlnových délek mezi 240 a 380 nm vždy po 10 nm. Emise byla měřena kontinuálně v rozmezí 260 až 600 nm pro každou excitační vlnovou délku. Výsledkem měření fluorescence byly excitačně-emisní matice, jejichž 3D znázornění je na obrázku 3.

Absorbance vzorků byla měřena v dvoupraprskovém spektrofotometru Shimadzu SP-1601 v křemenných kyvetách proti destilované vodě s využitím programu UV Probe (Shimadzu). Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena v UV i VIS oblasti a to v rozmezí 200 nm – 850 nm.



Obr. 3: 3D znázornění excitačně-emisní matice.

Rozpuštěný organický uhlík (DOC) byl analyzován pomocí přístroje TOC 5000A od firmy Shimadzu s využitím chemické oxidace a spalování při 600 °C a v přítomnosti platinového katalyzátoru.

U vzorků byl zjišťován nativní obsah Al a Fe pomocí atomového absorpčního spektrometru Varian AA2 40Z s grafitovou kyvetou. Koncentrace Al ve vzorcích byla v rozmezí 0,2 – 18 $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ DOC. Koncentrace Fe ve vzorcích byla v rozmezí 0,9 – 1,5 $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ DOC.

Vzhledem k limitovanému množství všech vzorků byla reprodukovatelnost ověřena pouze na jednom vzorku a to FK N60. Toto bylo ověřováno pro neozářený vzorek a pro vzorek ozářený čtyři hodiny, to vše provedeno třikrát. Pro neozářený

vzorek byla střední hodnota a směrodatná odchylka intenzity fluorescence $103,3 \pm 0,58$, střední hodnota a směrodatná odchylka koncentrace DOC $6,0 \pm 0,2$. Pro ozářený vzorek byly hodnoty pro intenzitu fluorescence 94 ± 1 a pro koncentraci DOC $5,43 \pm 0,12$.

4. Výsledky

Během ozařování byl u všech vzorků pozorován pokles koncentrace DOC. U huminových kyselin (HK) se pokles koncentrace DOC během 24 hodinového ozařování pohyboval mezi 15 – 25 %. U fulvokyselin (FK) byl pokles koncentrace DOC během 24 hodin vyšší a pohyboval se mezi 25 – 40 %. Pokles DOC při ozařování u jednotlivých studovaných vzorků je shrnut v tabulce IV.

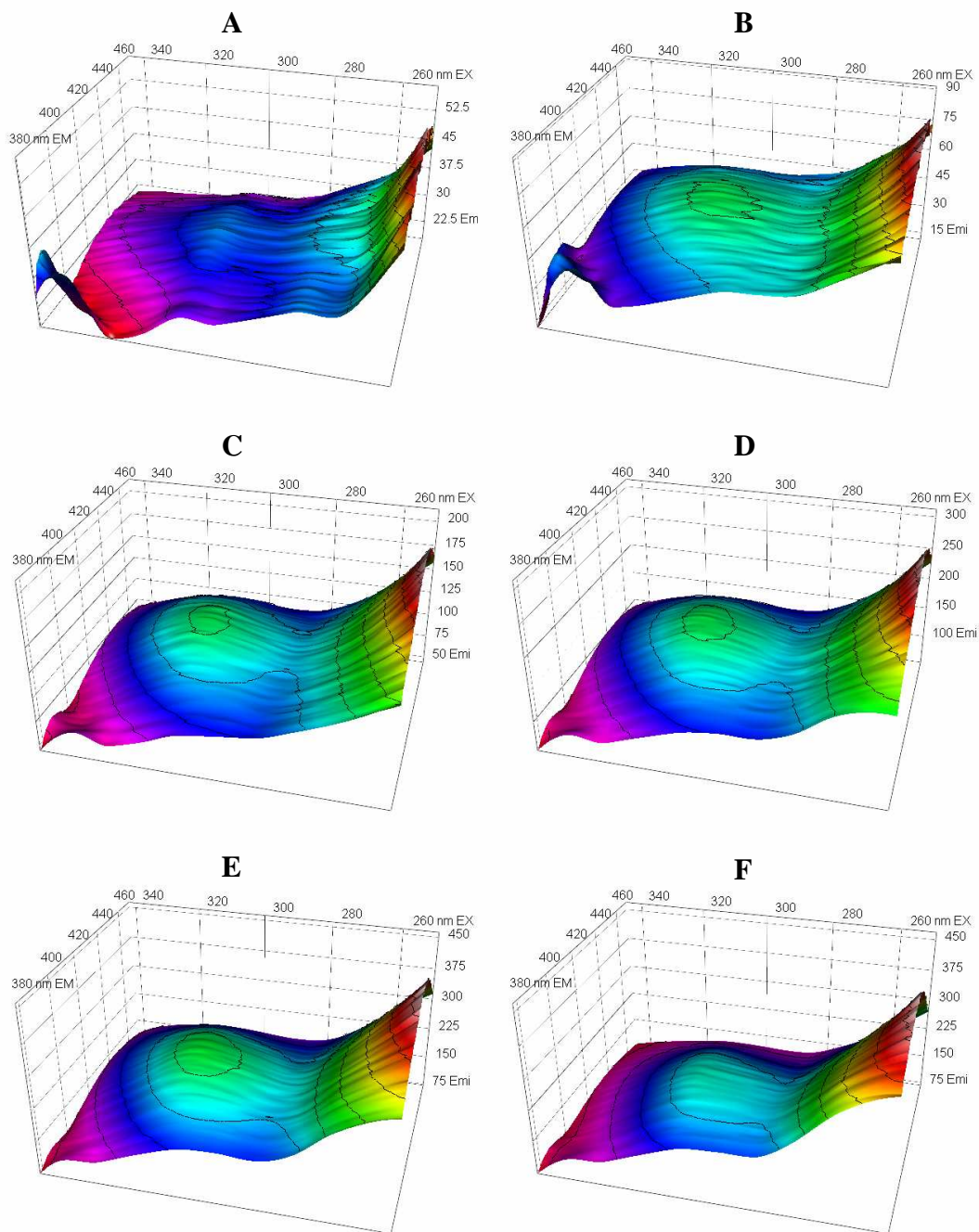
Tab. IV: Procentuální pokles DOC během 24 hodin ozařování.

Vzorek	Pokles DOC
B2HK	25%
T15HK	20%
T55HK	15%
B660FK	40%
N60FK	25%
N65FK	35%
V45FK	35%

V neozářených vzorcích HK byla hodnota excitačního maxima vždy rovna 300 nm. U vzorků FK označených jako N60, N65 a B660 byla hodnota excitačního maxima 310 nm a u vzorku V45 byla 320 nm. Emisní maxima neozářených HK se pohybovala v rozmezí 425 – 435 nm. Emisní maxima FK byla v rozmezí 430 – 450 nm.

Během ozařování byl u huminových kyselin pozorován zřetelný nárůst fluorescence a současné vytvoření nového fluorescenčního píku. Maximální fluorescence byla pozorována u vzorků ozařovaných po dobu 12 hodin. Pokud byl vzorek ozařován dále, docházelo k opětovnému poklesu fluorescence, jak je vidět na obrázku 4, na kterém je zobrazena série excitačně-emisních matic pro vzorek T15. Na rozdíl od HK se fluorescence FK chovala odlišně. U vzorků N60, N65 a B660 byla nejvyšší fluorescence u neozářených vzorků a současně byl dobře vyvinutý tvar fluorescenčního píku. Při ozařování se fluorescence postupně snižovala. Zajímavé je chování FK V45, jejíž fluorescence se chovala podobně jako fluorescence HK a během

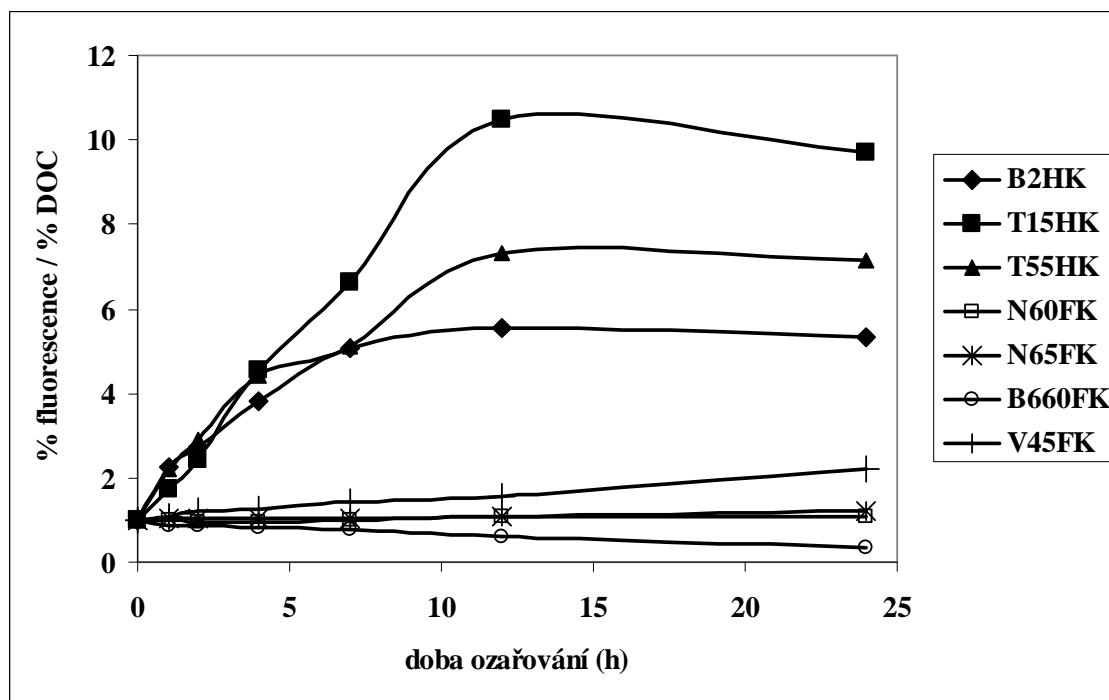
ozařování se zvyšovala a vytvářel se fluorescenční pík. Narozdíl od HK se ale u V45 fluorescence zvyšovala po celou dobu ozařování.



Obr. 4: Fluorescenční excitačně-emisní 3-D matice vzorku HK T15.
A: neozářený vzorek; B: ozářený 1 hodinu; C: ozářený 4 hodiny;
D: ozářený 7 hodin; E: ozářený 12 hodin; F: ozářený 24 hodin.

Vzhledem k tomu, že koncentrace DOC se u jednotlivých vzorků lišila, bylo pro vyjádření fotochemicky indukovaných změn použito vztah mezi relativní intenzitou fluorescence a dobou ozařování. Relativní intenzita fluorescence byla brána jako poměr mezi intenzitou fluorescence a koncentrací DOC, přičemž oboje bylo vyjádřeno v procentech tak, že neozářenému vzorku byla přiřazena hodnota 100%. Časový průběh fotochemických změn fluorescence při ozařování s použitím uvedeného výnosu je pro všechny studované vzorky znázorněn na obrázku 5.

Jak je vidět z obrázku 5, u všech vzorků HK dochází k zřetelnému nárůstu fluorescence během prvních 12 hodin ozařování. Relativní fluorescence FK se během ozařování mění jen minimálně. U vzorků N60 a N65 je pokles fluorescence prakticky přímo úměrný poklesu koncentrace DOC. U vzorku B660 je pokles fluorescence rychlejší než je rychlost fotochemického odbourávání DOC. Opačná situace je u vzorku V45. Křivka relativní fluorescence vykazuje mírný nárůst, avšak svým průběhem se liší od křivky relativní fluorescence HK.



Obr. 5: Fotochemicky indukované změny intenzity fluorescence u vzorků HK a FK.

Jak již bylo uvedeno, excitační maxima všech tří HK mají u neozářených vzorků hodnotu 300 nm. U vzorku T55 však během ozařování po přibližně dvou hodinách mění na hodnotu 310 nm. Vzorky FK N60, N65 a B660 vykazují jak u neozářených vzorků tak i během ozařování konstantní hodnotu excitačního maxima 310 nm. U FK V45 se původní hodnota 320 nm mění u vzorku, který byl ozářen 7 hodin, na hodnotu 310 nm. Hodnota 310 nm se při dalším ozařování již nemění.

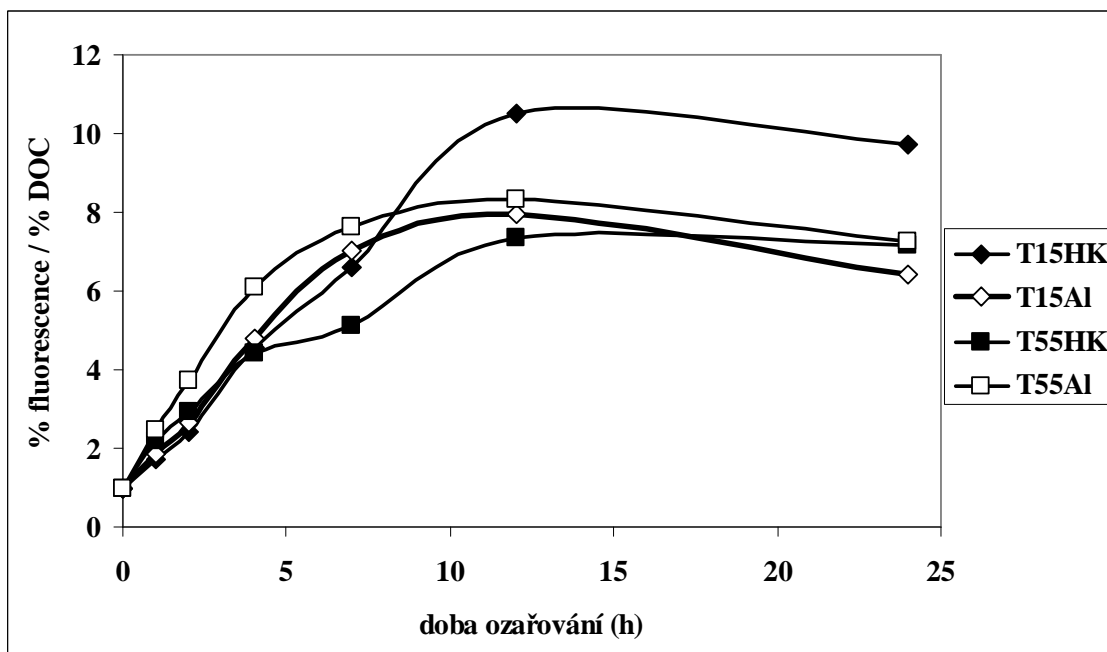
Emisní maxima všech studovaných vzorků ukazují postupný hypsochromní efekt. Hypsochromní efekt, někdy označován jako blue shift, je posun emisních vlnových délek směrem ke kratším. Hodnoty a posuny vlnových délek excitačních a emisních maxim pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce V.

Tab. V: Hypsochromní efekt emisních maxim vzorků HK a FK.

Vzorek HK/FK	Emisní maximum neozářeného vzorku	Emisní maximum po 24 hodinách
B2HK	429 nm	414 nm
T15HK	428 nm	411 nm
T55HK	430 nm	423 nm
N60FK	442 nm	430 nm
N65FK	442 nm	425 nm
B660FK	429 nm	403 nm
V45FK	444 nm	429 nm

V další části práce byl zkoumán vliv iontů hliníku, které byly k roztoku přidávány ve formě AlCl_3 v koncentraci $\text{Al } 100 \mu\text{g/l}$. Přidáním hliníku nedošlo k žádným signifikantním změnám v poloze excitačně-emisních maxim fluorescence u všech tří HK, došlo ale ke změně relativní intenzity fluorescence. Výsledky pro HK T15 a T55 jsou znázorněny v obrázku 6. Jak je z obrázku patrné, u vzorku T15 po přidání Al nedošlo během prvních sedmi hodin ke zřetelné změně fluorescence ve srovnání se vzorkem bez přídavku Al. Mezi 7 a 12 hodinou ozařování se však zřetelně snížila fluorescence v porovnání se vzorkem bez přídavku. U vzorku T55 s přidaným Al je během ozařování od počátku pozorována mírně vyšší fluorescence než u vzorku nativního. Vyšší fluorescence je pozorována až do dvanácti hodin ozařování, pak dochází k poklesu, a hodnoty fluorescence po 24 hodinách jsou prakticky shodné.

Vzorek HK B2 s přidaným Al byl ozařován pouze 7 hodin a za tuto dobu nedošlo prakticky k žádným zřetelným změnám v relativní fluorescenci.



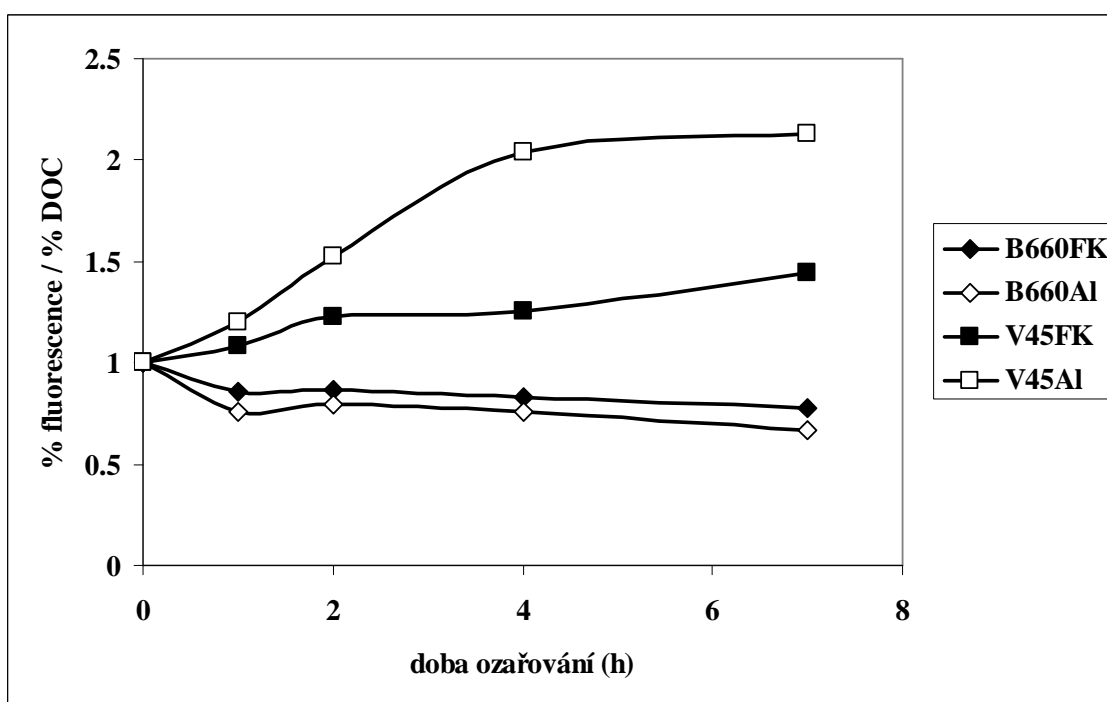
Obr. 6: Změny relativní intenzity fluorescence u vzorků HK T15 a T55 po přidání Al.

U vzorků FK N60, N65 a B660 nemělo přidání Al žádný vliv na polohu excitačně-emisního maxima. Pouze u vzorku V45 došlo k rychlejšímu posunu excitačního maxima z 320 nm na 310 nm, a to již během první hodiny ozařování.

Tab. VI: Relativní intenzita fluorescence vzorků FK bez přidaného Al a s přidaným Al.

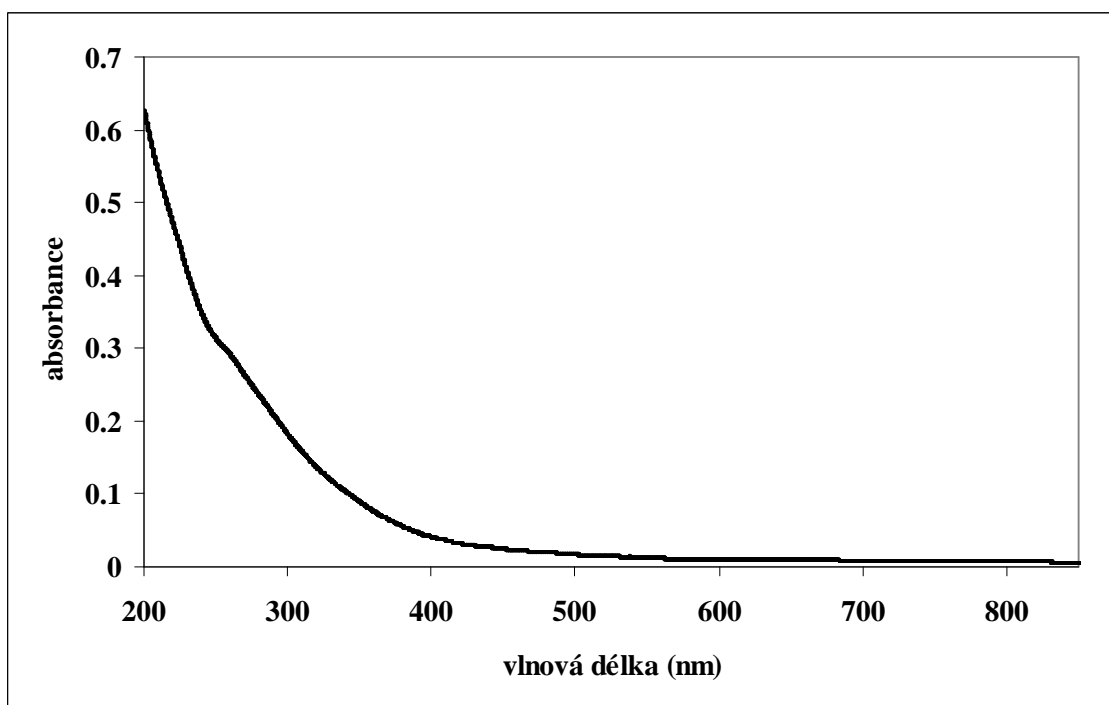
Doba ozařování (hodiny)	Relativní intenzita fluorescence (% původní fluorescence / % původní koncentrace DOC)			
	bez přidaného Al / s přidaným Al			
	B660	N60	N65	V45
neozářený	1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
1	0,86 / 0,76	0,98 / 1,11	1,03 / 1,02	1,08 / 1,2
2	0,87 / 0,79	0,96 / 1,15	1,03 / 1,1	1,22 / 1,53
4	0,83 / 0,76	0,97 / 1,4	1,06 / 1,22	1,25 / 2,04
7	0,77 / 0,67	0,98 / 1,69	1,05 / 1,4	1,45 / 2,13

Po přidání Al relativní intenzita fluorescence během ozařování mírně vzrostla u vzorků N60, N65 a V45. U vzorku B660 došlo naopak k mírnému poklesu intenzity fluorescence. Změny intenzity fluorescence po přidání Al^{3+} pro vzorky FK B660 a V45 jsou ukázány v obrázku 7. Vzorek V45 vykazuje nejvyšší nárůst fluorescence (vztažené k obsahu DOC). Hodnoty relativní intenzity fluorescence vzorků bez přidaného Al a s přidaným Al pro prvních sedm hodin ozařování jsou shrnuty v tabulce VI.



Obr. 7: Změny relativní fluorescence u vzorků FK B660 a V45 po přidání Al.

Pro doplnění údajů o chování vzorků při ozařování byla měřena absorpční spektra neozářených vzorků i vzorků po ozařování v jednotlivých ozařovacích časech. Příklad absorpčního spektra jednoho ze vzorků, FK B660, je znázorněn na obrázku 8. Absorpční spektra všech vzorků byla velmi podobná svým průběhem.



Obr. 8: Absorpční spektrum neozářeného vzorku FK B660.

Pro porovnání změn, ke kterým dochází u vzorků během ozařování, bylo použito změny absorbance záření o vlnové délce 250 nm a 400 nm, tedy změny absorbance jak v UV tak VIS oblasti. Absorbance byla vyjádřena v procentech tak, že neozářenému vzorku byla přidělena hodnota 100 %. Hodnoty absorbancí, vyjádřené jako procenta absorbance neozářeného vzorku, jsou shrnuty v tabulce VII.

Tab. VII: Procentuální hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků.

Doba ozař. (hodiny)	Absorbance (% neozářeného vzorku) 250 nm / 400 nm						
	B2HK	T15HK	T55HK	B660FK	N60FK	N65FK	V45FK
0	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
1	100 / 78	92 / 83	97 / 96	93 / 88	98 / 94	97 / 93	97 / 90
2	95 / 73	89 / 76	96 / 91	78 / 76	98 / 91	96 / 90	96 / 86
4	93 / 71	90 / 71	94 / 88	66 / 63	94 / 86	92 / 83	92 / 79
7	80 / 47	79 / 56	90 / 78	46 / 54	91 / 82	88 / 76	88 / 72
12	69 / 44	66 / 40	79 / 69	41 / 56	85 / 72	78 / 63	78 / 59
24	43 / 14	39 / 21	62 / 49	24 / 44	67 / 53	57 / 42	57 / 38

U vzorků HK B2 a T15 došlo v UV oblasti během 24 hodin ozařování k poklesu absorbance o přibližně 60 %. U vzorku HK T55 byl pokles absorbance v UV oblasti menší, pouze asi 40 %. Ve viditelném spektru došlo po 24 hodinách k největšímu poklesu u vzorku B2 a to o cca 85 %. U vzorku T15 byl pokles přibližně 80% a u vzorku T55 byl pokles přibližně 50 %. Pokud porovnáme průběh poklesů absorbancí u jednotlivých vzorků tak, že procentuální pokles ve VIS spektru dělíme procentuálním poklesem v UV spektru, zjistíme, že poměr A_{VIS} / A_{UV} klesá, což znamená, že pokles ve VIS oblasti je rychlejší. Největší rozdíl v rychlostech změny absorbance je u vzorku B2 a nejmenší rozdíl je u vzorku T55.

Přidáním Al došlo u všech vzorků HK ke zvýšení poklesu absorbance v UV oblasti. Ve VIS spektru se přídavek Al projevil hlavně na začátku ozařování, kdy došlo k rychlejšímu poklesu, a tento efekt byl pozorován u všech sledovaných vzorků HK.

U vzorků FK N60, N65 a V45 došlo během 24 hodin ozařování k poklesu absorbance v UV oblasti o zhruba 35 – 45 %. Nejvyšší pokles absorbance byl pozorován u vzorku B660, kde došlo po 24 hodinách ozařování k poklesu asi o 75 %. Ve viditelném spektru byl pokles absorbance u všech vzorků mezi 50 – 60 %. Porovnáme-li poklesy absorbancí ve viditelném a UV spektru, zjistíme, že u vzorků N60, N65 a V45 dochází k rychlejšímu poklesu v UV spektru. U vzorku B660 je tomu naopak, zpočátku je sice pokles nepatrně vyšší ve VIS spektru, ale po přibližně sedmi hodinách ozařování dochází k výrazně rychlejšímu poklesu absorbancí v UV spektru.

Po přidání Al došlo u vzorků N60, N65 a V45 v UV oblasti k viditelnému zrychlení úbytku absorbance. U vzorku B660 došlo naopak ke snížení rychlosti úbytku absorbance v UV oblasti. Ve viditelném spektru nebyl u vzorků N60, N65 a B660 pozorován prakticky žádný vliv přidaného hliníku. U vzorku V45 došlo po přidání hliníku k zrychlení úbytku absorbance. Porovnáme-li úbytky absorbancí ve VIS a UV oblasti, zjistíme že u vzorků N60 a N65 dochází po přidání Al ke srovnání rychlostí odbourávání, obdobně jako u vzorku B660. U vzorku V45 stále klesá absorbance rychleji ve VIS spektru, avšak rozdíl mezi VIS a UV spektrem není již tak markantní jako u vzorku bez přidaného hliníku.

5. Diskuse

U všech studovaných vzorků se hodnoty excitačních maxim pohybovaly v rozmezí 300 – 320 nm a hodnoty emisních maxim v rozmezí 425 – 450 nm. Tyto hodnoty excitačně-emisních maxim odpovídají kategorii „humínová fluorescence“ jak ji uvádí Coble (1996). Protože všechny použité vzorky byly izolovány z půd, vznikaly při procesu humifikace v půdních horizontech pod povrchem, jejich fluorofory nebyly před experimenty nikdy vystaveny UV záření a lze je tedy považovat za fotochemicky nedotčené.

U všech vzorků HK dochází během prvních 12 hodin ozařování k nárůstu fluorescence. Tento nárůst může být způsoben fotochemicky indukovaným vznikem nových fluoroforů. Druhým možným vysvětlením nárůstu fluorescence je odkrytí existujících fluoroforů, takže nedochází k jejich stínění. Tyto fluorofory jsou původně u neozařených molekul uvnitř složitých struktur HK a během ozařování dochází k fotochemickému odbourávání povrchových struktur a jejich odhalení. Třetím možným vysvětlením je to, že s klesající koncentrací DOC se snižuje frekvence intramolekulárního přenosu excitační energie a zvyšuje se tedy kvantová výtěžnost fluorescence.

Fluorescence vzorku FK V45 se chová odlišně od ostatních FK a průběhem změny fluorescence během ozařování se blíží HK. Rozdílné chování tohoto vzorku může být způsobeno tím, že narozdíl od ostatních pochází z vyššího půdního horizontu a nedošlo u něho k takovým přeměnám jako u ostatních (Kalbitz et al., 2000).

U všech studovaných vzorků dochází během ozařování ke změně polohy excitačně-emisního maxima. Na poloze excitačně-emisního maxima ve vzorku se podílejí všechny fluorescentní složky ve vzorku obsažené. Změny polohy maxima mohou být způsobeny chemickými změnami v molekule, nebo změnami ve vlastnostech rozpouštědla. Bylo například popsáno, že k hypsochromnímu posunu dochází u huminových látek, pokud porovnáváme vzorky ze sladkých vod a z vody mořské. Tento posun je nejspíše způsoben změnou salinity roztoku (Coble, 1996; Del Castillo et al., 2000). Toto ovšem není případ mnou ozařovaných vzorků, neboť u nich během pokusu nedocházelo ke změně složení roztoku. Za posun směrem ke kratším vlnovým délkám, tedy hypsochromní efekt, jsou zde odpovědný spíše chemické změny v molekule. Tyto

chemické změny mají za následek zkracování konjugovaných systémů, konformační změny, které zvyšují rigiditu molekuly, a hlavně eliminaci substituentů, které přispívají k hyperkonjugaci.

U vzorku HK T15 došlo po přidání Al ke zvýšení fluorescence. Podle Mulona et al. (2005) může toto být způsobeno hustotou náboje iontu Al(III) a následným indukčním efektem, což se projevuje právě zvýšením fluorescence u fluorescentních ligandů hliníku, jako například chinolátovými a katecholátovými podjednotkami.

U vzorku HK T55 došlo po přidání Al k poklesu fluorescence během prvních sedmi hodin ozařování v porovnání se vzorkem bez přídavku Al. Pokles fluorescence může být způsoben částečně koagulací rozpuštěného organického materiálu (koncentrace DOC byla u vzorku s přidaným Al o 16% nižší než u vzorku bez přídavku), částečně díky mikrokoagulaci vedoucí k vyššímu samozhášení fluorescence a zamezení odhalování fluoroforů.

U vzorku FK V45 došlo po přidání Al k největšímu nárůstu relativní fluorescence oproti vzorku bez přídavku. Tento vzorek pochází z vyššího půdního horizontu než ostatní vzorky FK, proto u něj zřejmě neproběhlo tolik chemických přeměn, což může vysvětlovat to, že se svým fotochemickým chováním blíží huminovým kyselinám.

Výsledky potvrzují předešlé výzkumy Sharplesse a McGowna (1999), kteří studovali změny fluorescence vlivem Al u HK. Zjistili, že seskupení HK, vyvolané Al, sice emituje fluorescenci, ale s nižší intenzitou. Toto může být způsobeno samozhášením, nebo stíněním u větších agregátů, a v neposlední řadě vlivem úbytku látky způsobeným koagulací. Esteves da Silva et al. (1997) studovali interakci půdních FK s hliníkem při nízkých hodnotách pH a zjistili že komplexy jsou méně stabilní při hodnotách $\text{pH} < 4$. Proto se dá očekávat, že při acidifikaci dochází ke zvýšenému uvolňování hliníku, pokud pH klesne pod 4,5. Vzhledem k tomu, že pH roztoků bylo upraveno na hodnotu 4, dá se očekávat, že pokud vůbec docházelo ke vzniku komplexů, vznikaly komplexy pouze se slabými vazbami. Toto může být vysvětlení, proč nedocházelo k ovlivnění chování fluoroforů, a i vliv na intenzitu fluorescence je zanedbatelný.

V souladu s literaturou (např. Hautala et al., 2000), vykazují absorpční spektra všech vzorků s klesající energií záření pokles absorpce.

6. Závěry

Spektroskopie s využitím excitačně-emisních matic je účinnou metodou ke studiu fotochemicky indukovaných změn v rozpuštěných humínových látkách.

Humínové látky podléhají výrazným fotoinicovaným transformacím již po laboratorním ozařování v řádu několika hodin, přičemž toto ozařování odpovídá cca několika desítkám až stovkám hodin ozařování v přírodních podmínkách – jde tedy o změny, k nimž v přírodě může dojít za část letní sezony.

Spektroskopie s využitím excitačně-emisních matic není nejvhodnější metodou ke studiu komplexace iontů kovů huminovými látkami, neboť část molekul huminových látek obsahujících fluorofor se nemusí účastnit komplexačních reakcí.

Literatura

Baker K.S., Smith R.C., Green A.E.S. (1980): Middle ultraviolet-radiation reaching the ocean surface.

Photochem. Photobiol. 32, 367-374.

Coble P.G. (1996): Charakterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy.

Mar. Chem. 51, 325 -346.

Del Castillo C.E., Gilbes F., Coble P.G., Muller-Karger F.E. (2000): On the dispersal of riverine colored dissolved organic matter over the West Florida Shelf.

Limnol. Oceanogr. 45, 1425-1432.

Denny M. W. (1993): Light in air and water.

V knize *Air and water*. Princeton University Press, Princeton, Nem Jersey, 221-252.

Dojlido J.R., Best G.A. (1993): Humic substances.

V knize *Chemistry of water and water pollution*. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England, 261 – 267.

Esteves da Silva J.C.G., Machando A.A.S.C., Oliveira C.J.S. (1997): Study of the interaction of Al(III) with a soil fulvic acid in the acid pH range by self-modeling mixture analysis of synchronous fluorescence spectral data.

Anal. Chim. Acta 349, 23 – 31.

Gjessing E.T. (1976): Chemical composition.

V knize *Physical and Chemical Charakteristics of Aquatic Humus*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI. 25-29.

Green S.A., Blough N.V. (1994): Optical-absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic-matter in natural-waters.

Limnol. Oceanogr. 39, 1903-1916.

Hautala K., Peuravuori J., Pihlaja K. (2000): Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analysis.

Wat. Res. 34, 246-258.

Chin Y.-P., Aiken G., O'Loughlin E. (1994): Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances.

Environ. Sci. Technol. 28, 1853-1858.

Christian G.D., Callis J.B., Dadson E.R. (1981): Array detectors and excitation-emission matrices in multicomponent analysis.

V knize *Modern Fluorescence Spectroscopy* (editor E.L. Wehry). 4. Plenum, New York, NY, 111-165.*

International Humic Substances Society: Isolation of IHSS soil fulvic and humic acids
<http://ihss.gatech.edu/ihss2/soilhafa.html>, 30.3.2009.

Kumke M.U., Zwiener C., Abbt-Braun G., Frimmel F.H. (1999): Spectroscopic characterization of fulvic acid fractions of a contaminated groundwater.

Acta hydrochim. hydrobiol. 27, 409-415.

Kalbitz K., Geyer S., Geyer W. (2000): A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances.

Chemosphere. 40, 1305-1312.

Klementová Š., Kříž D., Kopáček J., Novák F., Porcal P. (2009): UV photoiniciated changes of humic fluorophores, influence of metal ions.

Photochem. Photobiol. DOI: 10.1039/B817044D.

Luster J., Lloyd T., Sposito G., Fry I.V. (1996): Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper(II) and aluminum(III) complexation by dissolved organic matter.

Environ. Sci. Technol. 30, 1565-1574.

Lochmuller C.H., Saavedra S.S. (1986): Conformational changes in soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization.

Anal. Chem. 58, 1978-1981.

Malcolm R.L. (1991). Factors to be considered in the isolation and characterisation of aquatic humic substances.

V knize *Humic substances in the aquatic and terrestrial environment* (editoři Allard B., Borén H., Grimvall A.). Proc. Of the International Symposium Linköping, Sweden, August 21-23, 1989. Lecture Notes in Earth Sciences, New York, Springer Verlag, 33, 9-36.

Mantoura R.F.C., Dickson A., Riley J.P. (1978): Complexation of metals with humic materials in natural-waters.

Estuar. & Coastal. Mar. Sci. 6, 387-408.

Marhaba T.F., Lippincott R.L. (2000): Application of fluorescence technique for rapid identification of DOM fractions in source waters.

Journal of Environmental Engineering-ASCE. 126, 1039-1044.

Marhaba T.F., Van D., Lippincott L. (2000): Rapid identification of dissolved organic matter fractions in water by spectral fluorescent signatures.

Wat. Res. 34, 3543-3550.

Matthews B.J.H., Jones A.C., Theodorou N.K., Tudhope A.W. (1996): Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs.

Mar. Chem. 55, 317-332.

Mecherikunnel A.T., Gatlin J.A., Richmond J.C. (1983): Data on total and spectral solar irradiance.

Appl. Opt. 22, 1354-1359.

Moran M.A., Zepp R.G. (1997): Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter.

Limnol. Oceanogr. 42, 1307–1316.

Mulon J.-B., Destandau É., Alain V., Bardez É. (2005): How can aluminium(III) generate fluorescence?

J. Inorg. Biochem. 99, 1749-1755.

Němeček J. a kolektiv (2001): Taxonomický klasifikační systém půd ČR. ČZU, Praha.

Norwegian Institute for Air Research, Fast simulations of downward UV doses, indices and irradiances at the Earth's surface.

<http://nadir.nilu.no/~olaeng/fastrt/fastrt.html>, 24. březen, 2009.

Novák F., Kalousková N., Machovič V., Brus J. (1999): Složení a struktura fulvokyselin horizontu B podzolové půdy z trojmezí (Šumava).

J. For. Sci. 45, 556-565.

Odén S. (1919): Die Huminsäuren.

Kolloidtechnische Beihefte 11, Sonderausgabe, Leipzig, 75.**

Orlov D.S. (1974): Molekuljarno-vjesovoje raspredělenje častic gumusovych kislot pa dannym gel-filtraciji.

V knize *Gumusovye kisloty počv* (editoři: Žuk N.A., Gorelik N.M.). Izdatělstvo Moskovskovo Universit'eta, 106-111.

Packham R.F. (1964): Studies of organic colour in natural water.

Proc. Soc. Water Treatment Exam. 13, 316 – 334.***

Peuravuori J., Pihlaja K. (1997): Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances.

Anal. Chim. Acta 337, 133-149.

Porcal P., Amirbahman A., Kopáček J., Novák F., Norton S.A. (2009): Photochemical release of humic and fulvic acid-bound metals from simulated soil and streamwater.

J. Environ. Monit. DOI: 10. 1039/b812330f.

Reckhow D.A., Singer P.C., Malcolm R.L. (1990): Chlorination of humic materials – by-product formation and chemical interpretations.

Environ. Sci. Technol. 24, 1655-1664.

Senesi N. (1993): Natural constituents and their influences on contaminant behavior.

V knize *Organic Substances in Soil and Water* (editoři Beck A.J., Jones, K.C., Hayes, M.H.B., Mingelgrin, U.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 74-77.

Sharples C.M., McGown L.B. (1999): Effects of aluminum-induced aggregation on the fluorescence of humic substances.

Environ. Sci. Technol. 33, 3264-3270.

Schnitzer, M (1971): Metal-organic matter interaction in soils and waters.

V knize *Organic Compounds in Aquatic Environments* (editoři Faust S.D., Hunder J.V.). Marcel Dekker, New York, 297-315.

Schnitzer M., Khan S.U. (1972a): Introduction to Humic Substances.

V knize *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, New York, 1-7.

Schnitzer M., Khan S.U. (1972b): Chemical structure of humic substances.

V knize *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, New York, 137-198.

Smith R.C., Baker K.S. (1979): Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural-waters.

Photochem. Photobiol. 29, 311-323.

Waite T.D., Sawyer D.T., Zafirov O.C. (1988): Oceanic reactive chemical transients. *Appl. Geochem.* 3, 9-17.

Wang Z.D., Pant B.C., Langford C.H. (1990): Spectroscopic and structural characterization of a laurantian fulvic-acid – notes on the origin of the color. *Anal. Chim. Acta* 232, 43-49.

Wayne R.P. (1970): Basic principles of photochemistry. V knize *Photochemistry*. Butterworth & Co Ltd, 1-16.

Weiner E.R., Goldberg M.C. (1985): Aquatic photochemistry – selected topics from current research. *Toxicol. Environ. Chem.* 9, 327-339.

Zepp R.G., Baughman G.L., Schlotzhauer P.F. (1981a): Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water. 1. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere.* 10, 109-117.

Zepp R.G., Baughman G.L., Schlotzhauer P.F. (1981b): Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water. 2. Photosensitized oxygenations. *Chemosphere.* 10, 119-126.

Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., Sink R.M. (1985): Photosensitized transformations involving electronic-energy transfer in natural-waters – role of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 19, 74-81.

Zepp R.G., Faust B.C., Hoigné J. (1992): Hydroxyl radical formation in aqueous reaction (pH 3–8) of iron(II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.* 26, 313–319.

Zika R.G. (1981): Marine organic photochemistry.

V knize: *Marine Organic Chemistry* (editoři Duursma E.K., Dawson R.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 299-325.

* Citace převzata z:

Coble P.G. (1996): Charakterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy.

Mar. Chem. 51, 325 -346.

** Citace převzata z:

ISI Web of Knowledge

http://apps.isiknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=W2ofa14B3eJ3f4ih@EK&preferencesSaved=&highlighted_tab=WOS, 18.4.2009.

*** Citace převzata z:

Hautala K., Peuravuori J., Pihlaja K. (2000): Measurement of Aquatic Humus content by Spectroscopic Analyses.

Wat. Res. 34, 246-258.

Přílohy

Příloha 1: Seznam zkratk

DOC – rozpuštěný organický uhlík

DOM – rozpuštěné organické látky

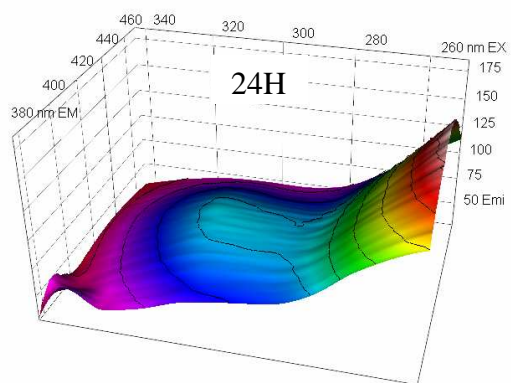
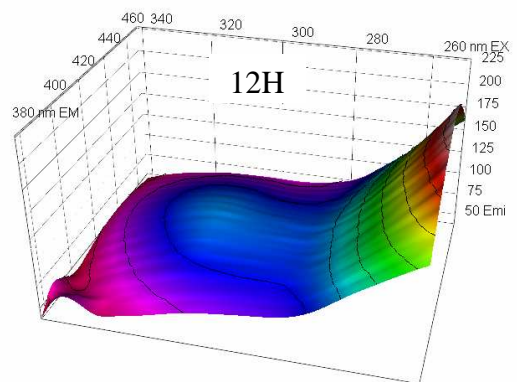
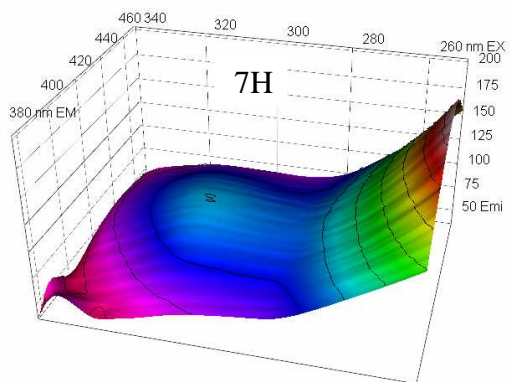
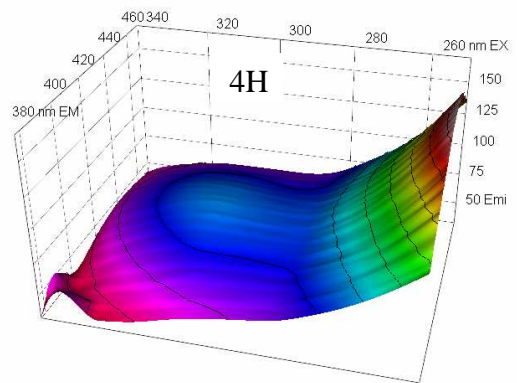
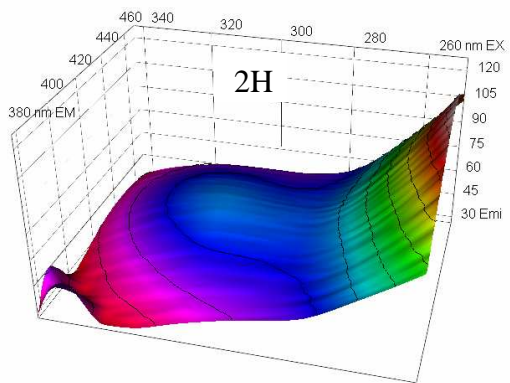
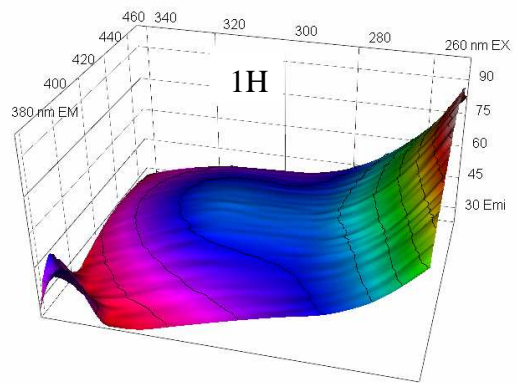
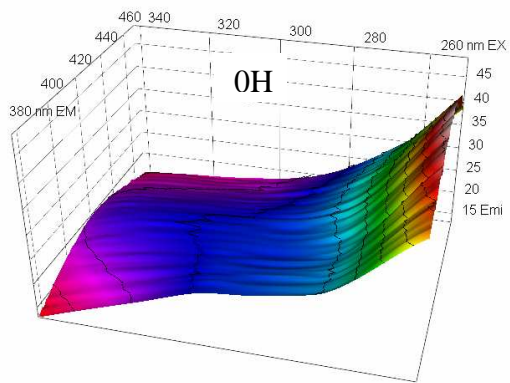
EEMS – spektroskopie excitačně-emisních matic

Ex_{max}/Em_{max} – excitačně-emisní maximum

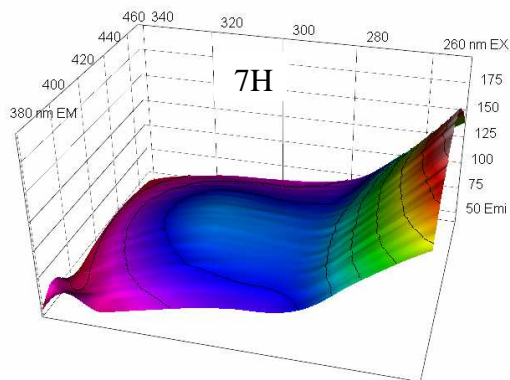
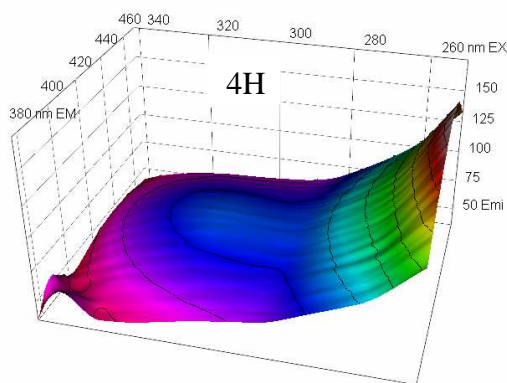
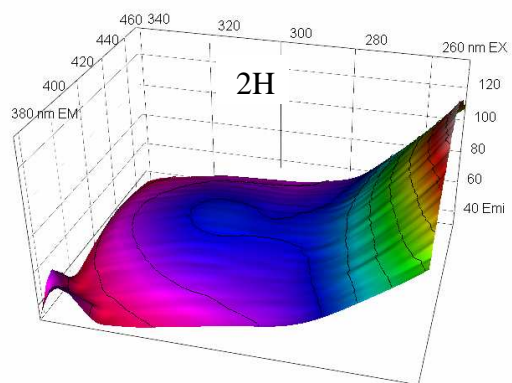
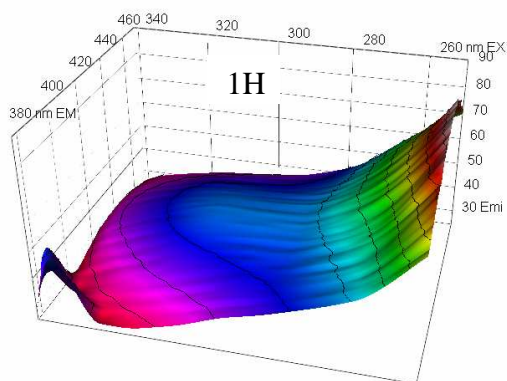
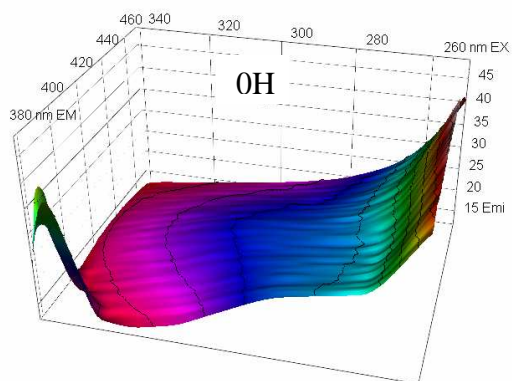
FK – fulvokyselina

HK – huminová kyselina

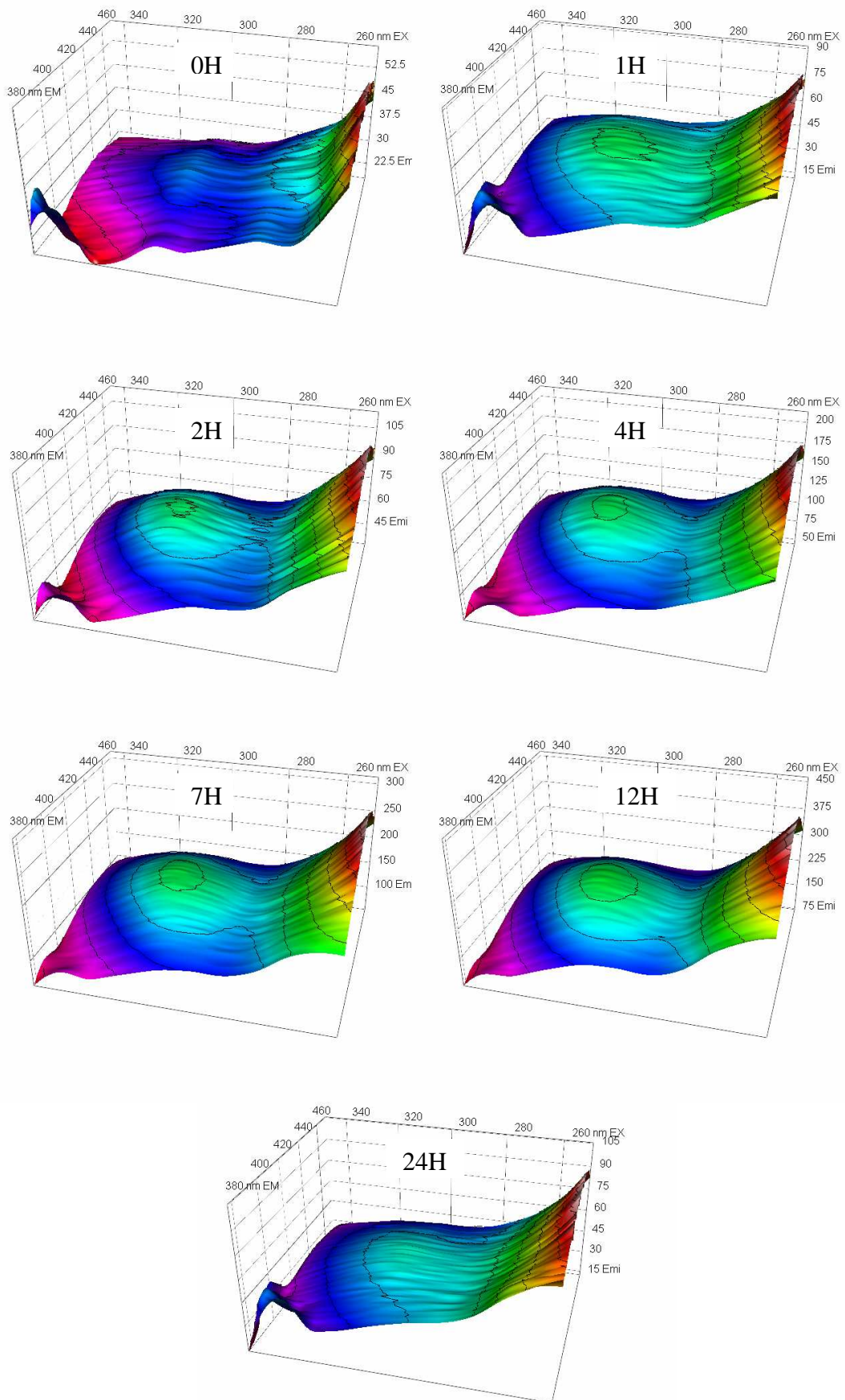
Příloha 2: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK B2



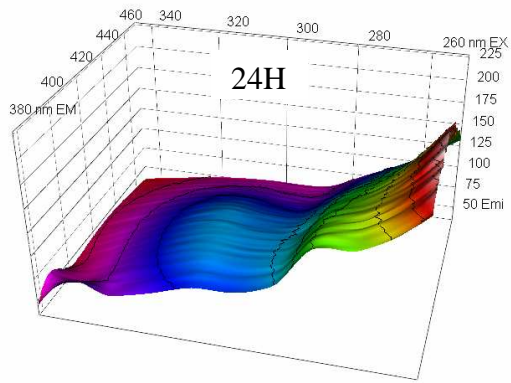
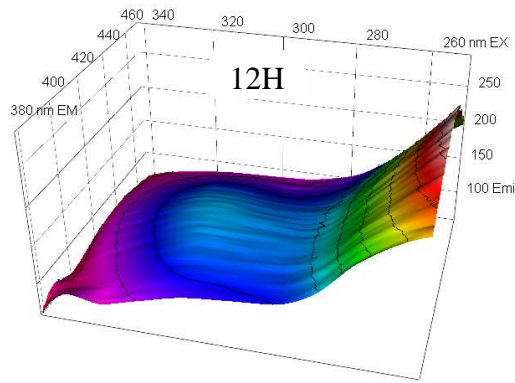
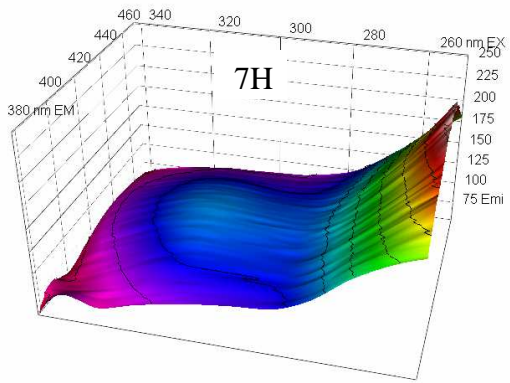
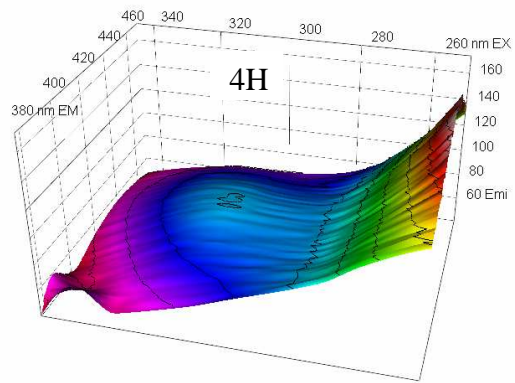
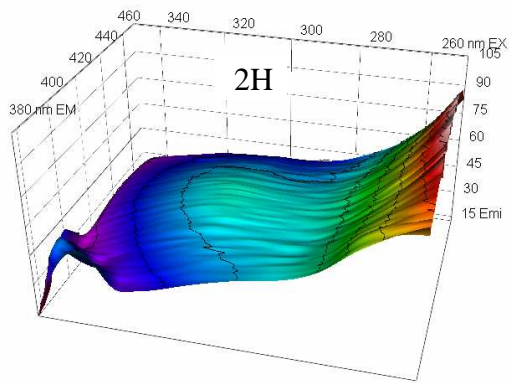
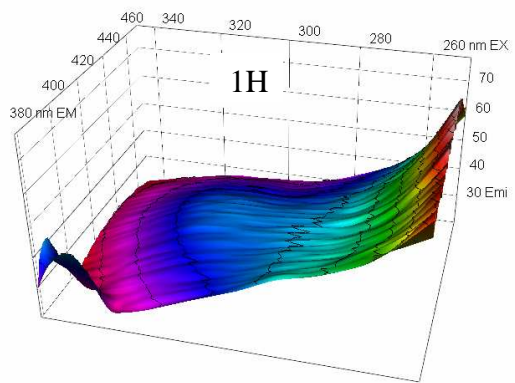
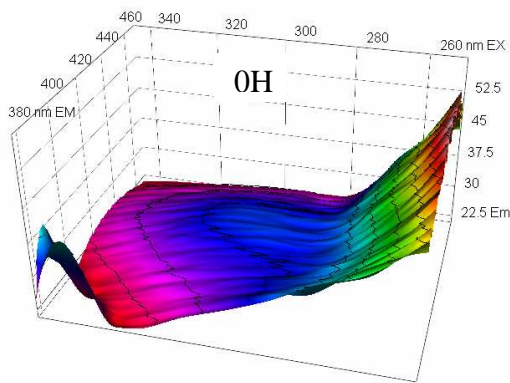
Příloha 3: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK B2 + Al(III)



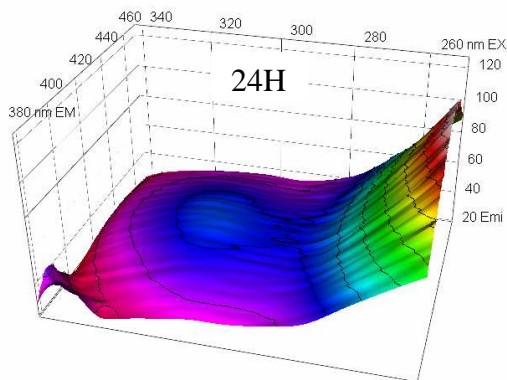
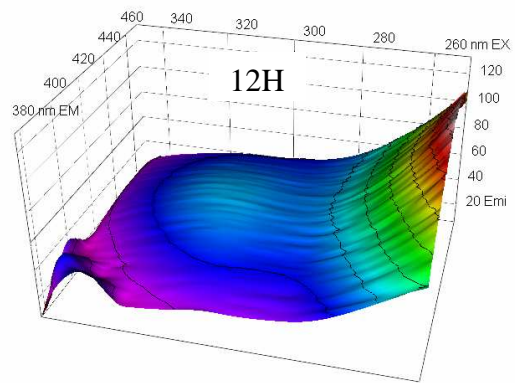
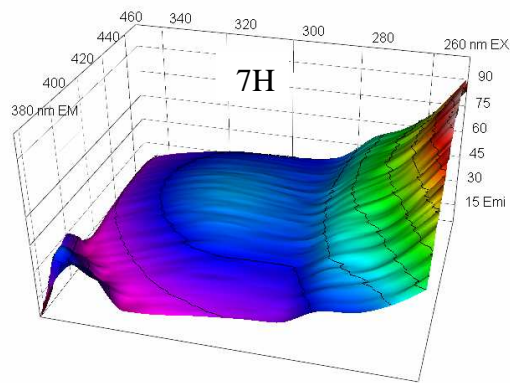
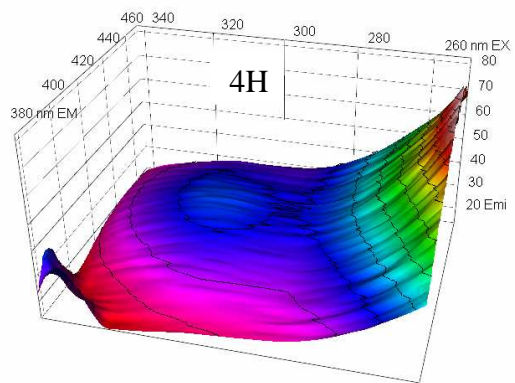
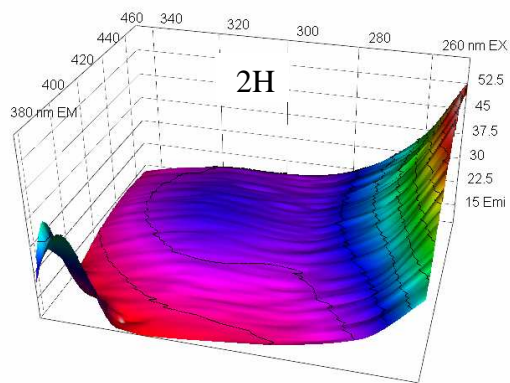
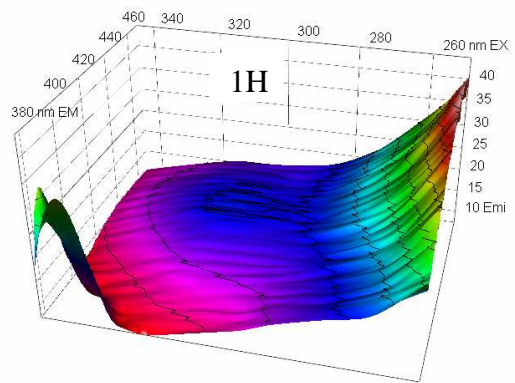
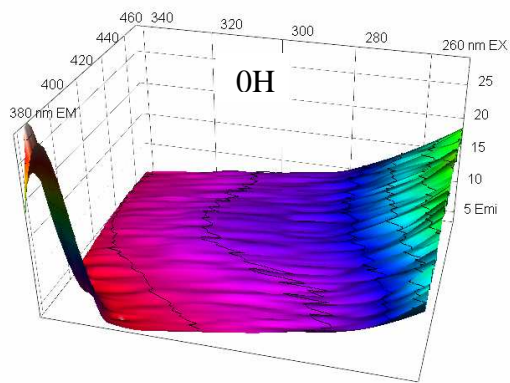
Příloha 4: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK T15



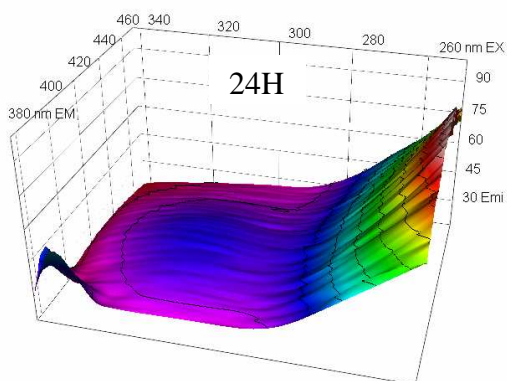
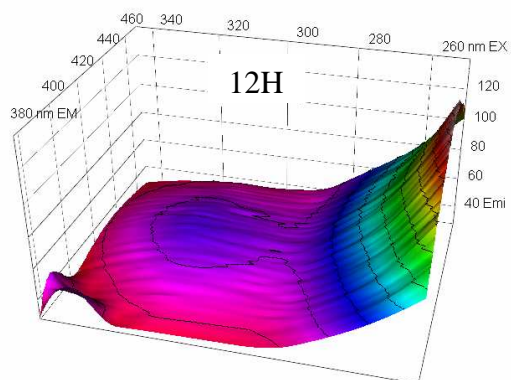
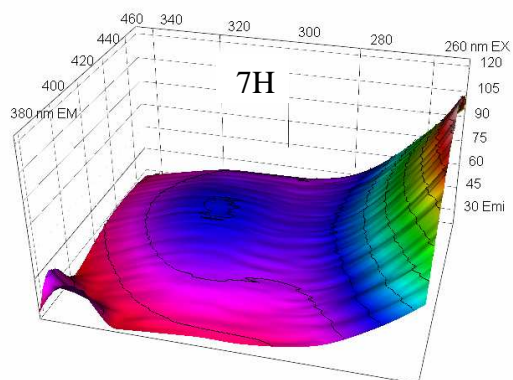
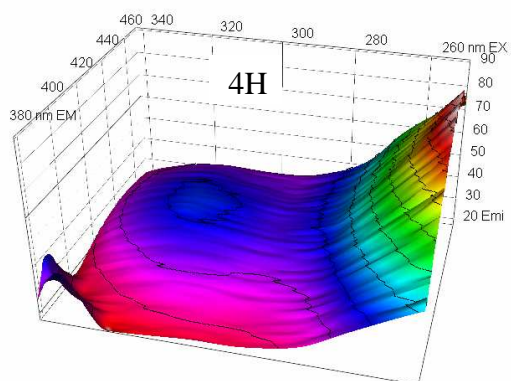
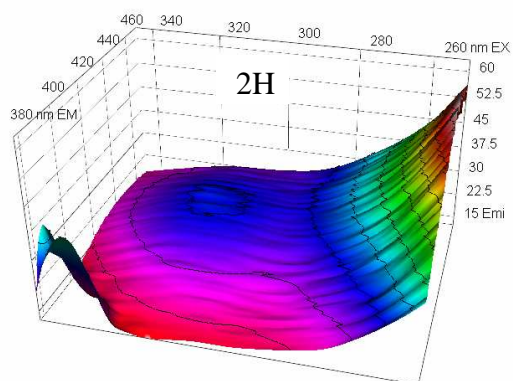
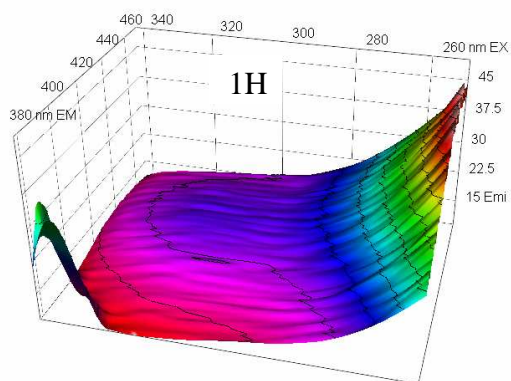
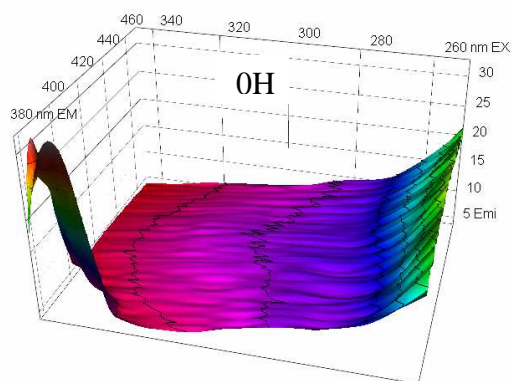
Příloha 5: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK T15 + Al(III)



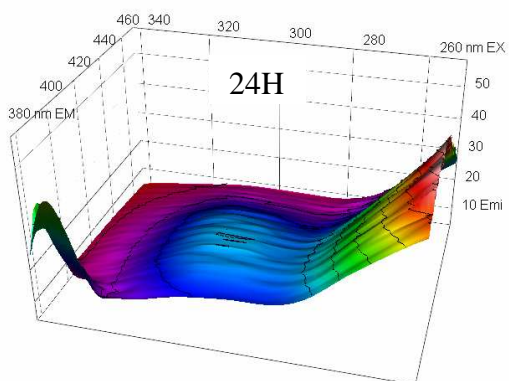
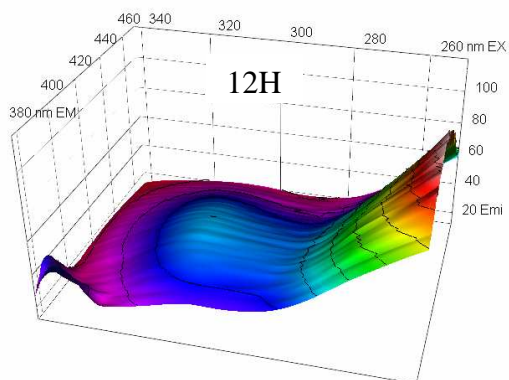
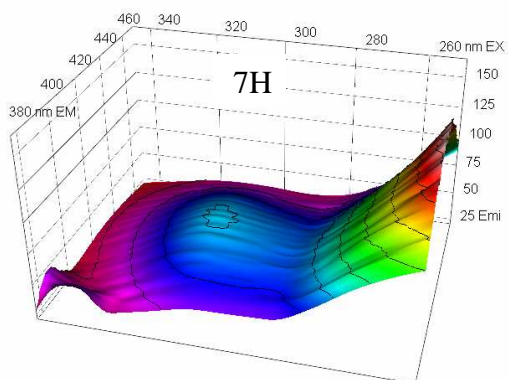
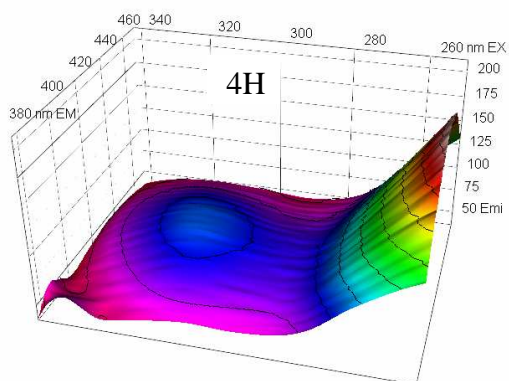
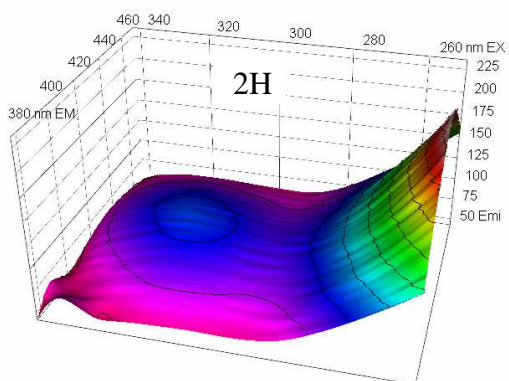
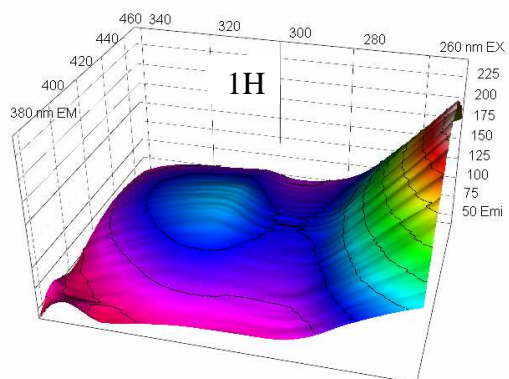
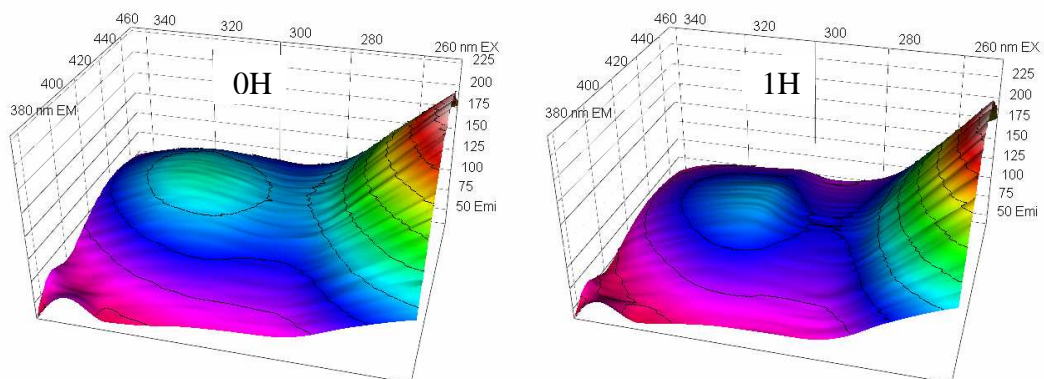
Příloha 6: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK T55



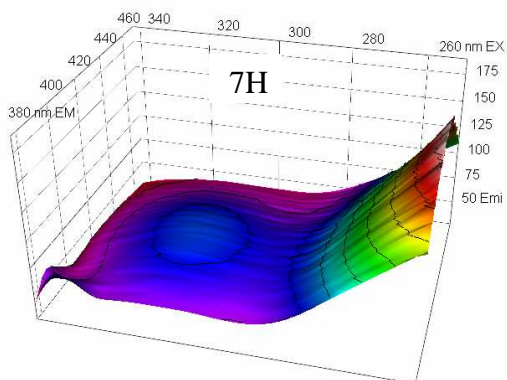
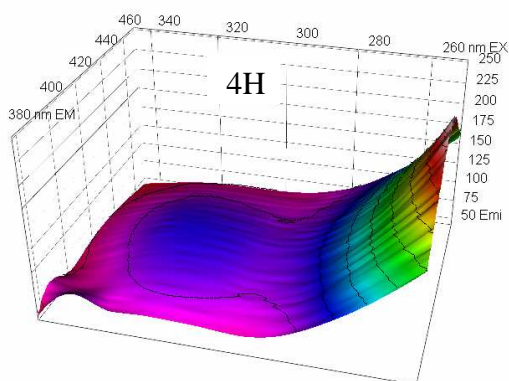
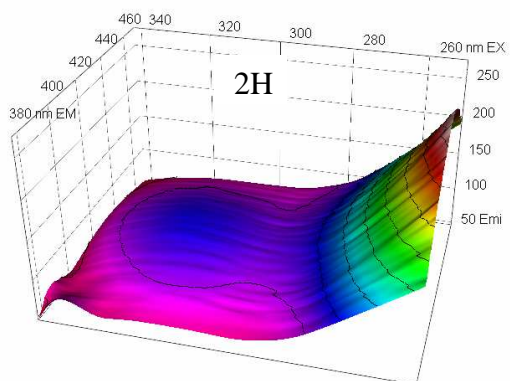
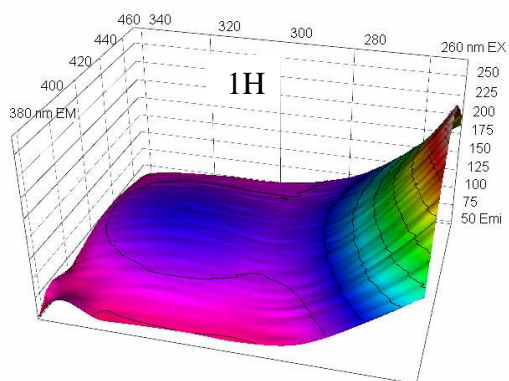
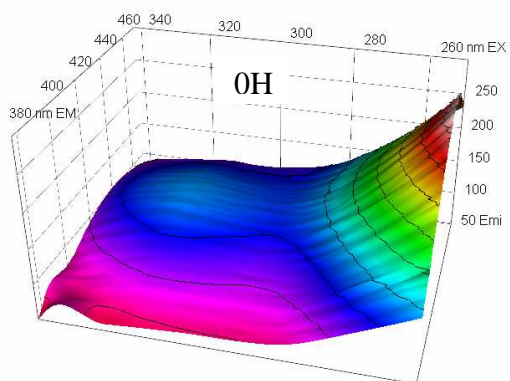
Příloha 7: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku HK T55 + Al(III)



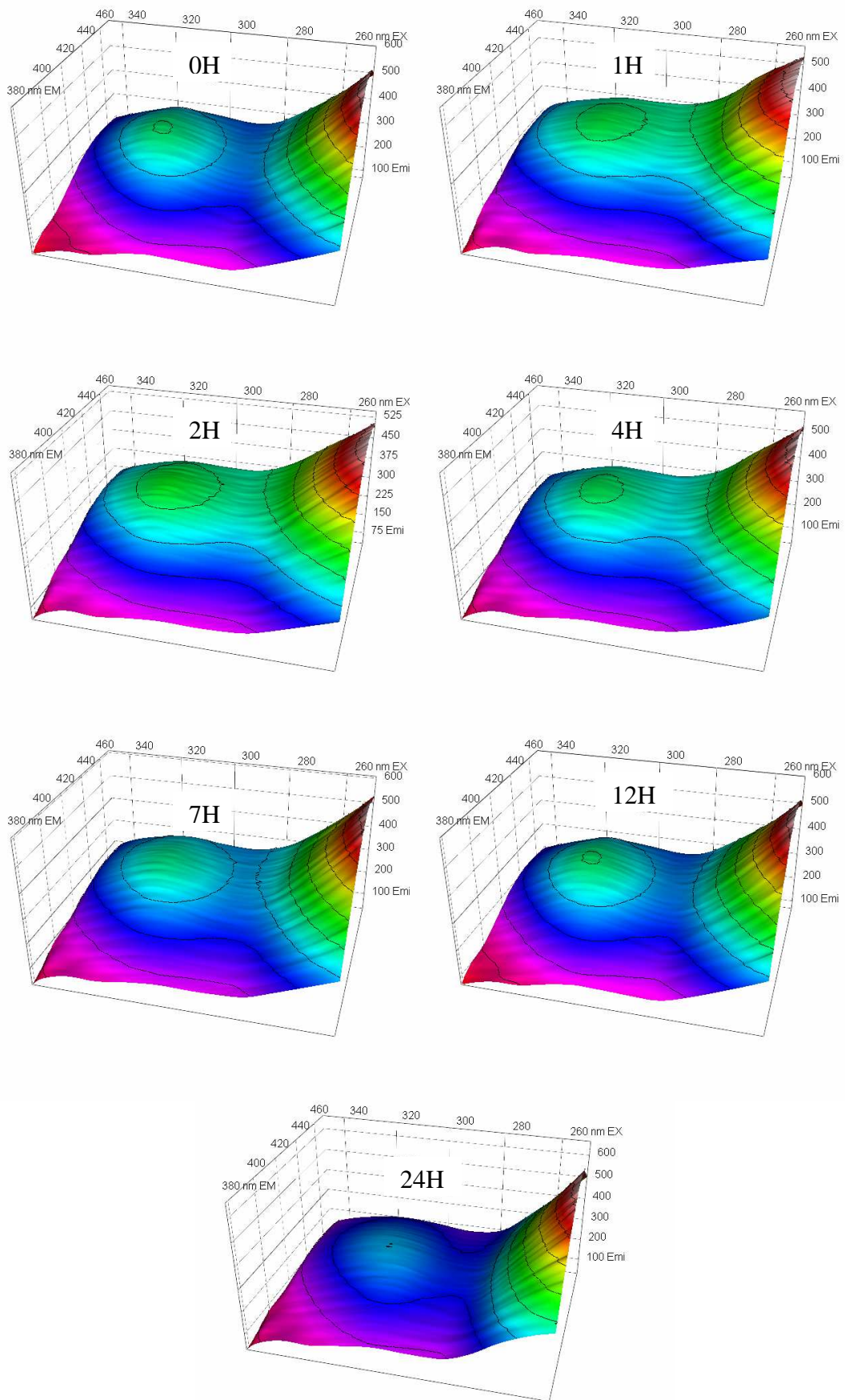
Příloha 8: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK B660



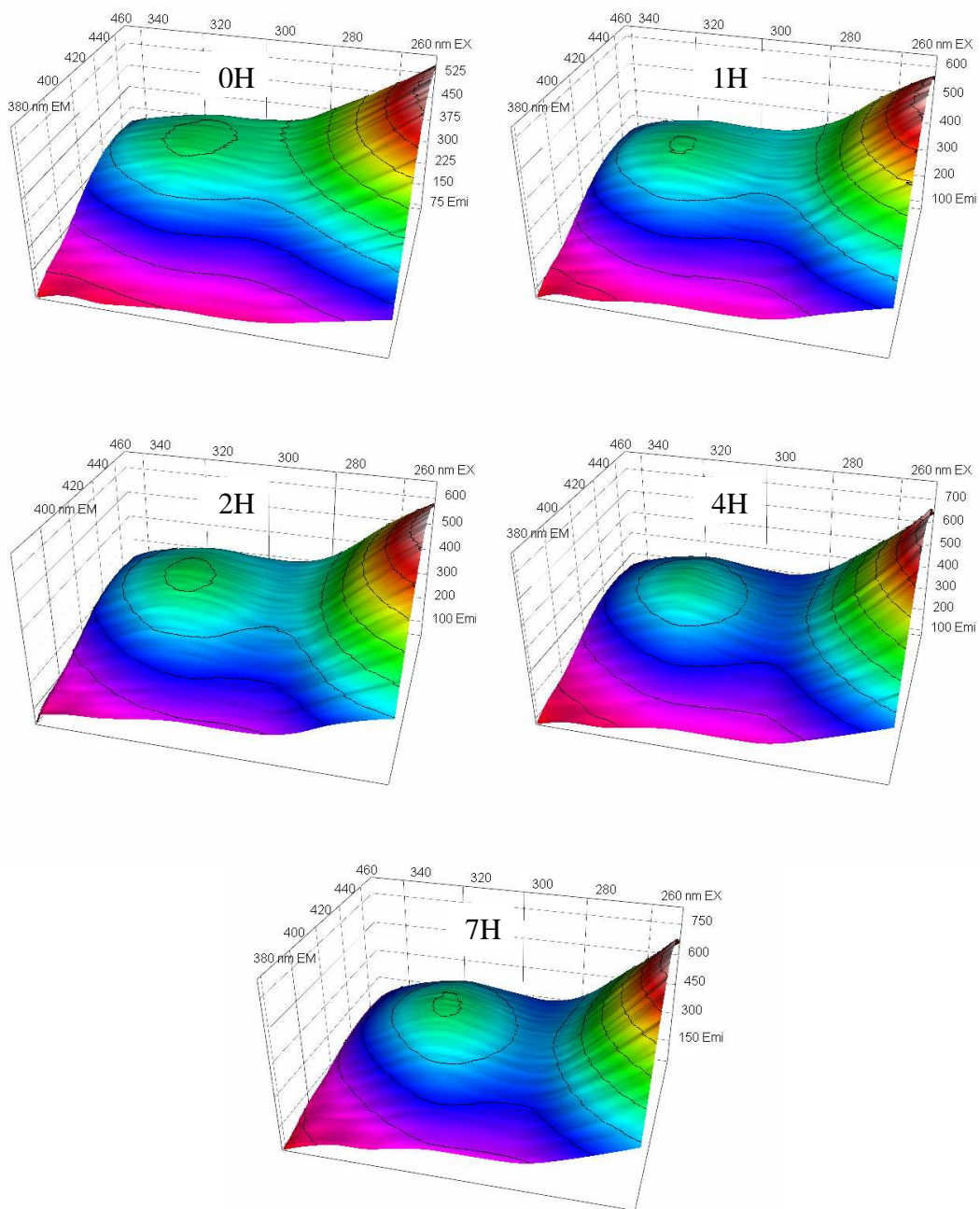
Příloha 9: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK B660 + Al(III)



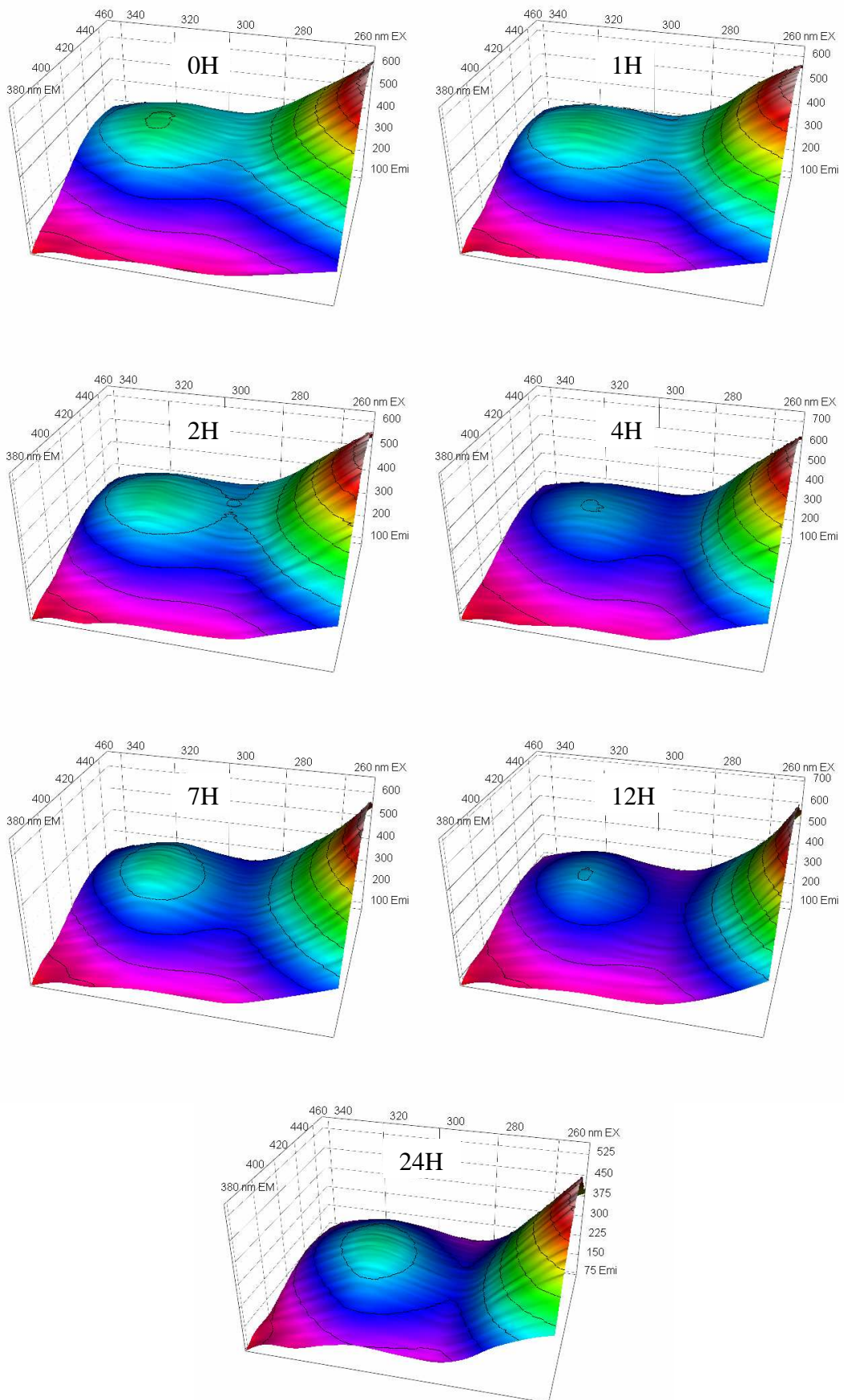
Příloha 10: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK N60



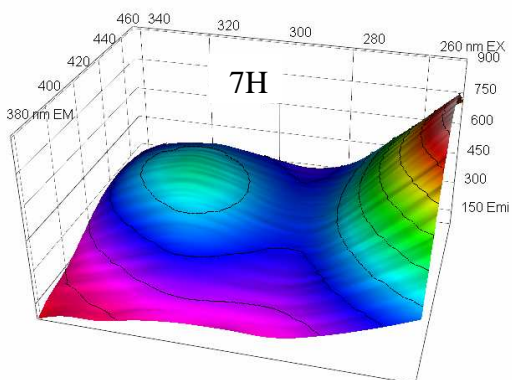
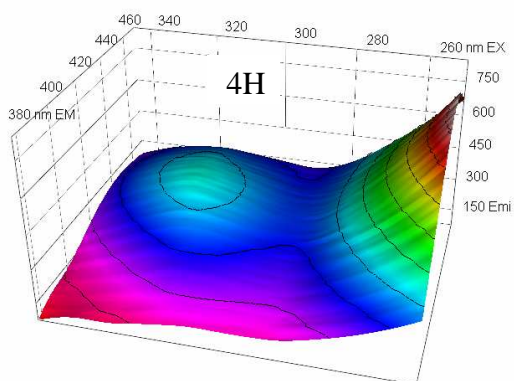
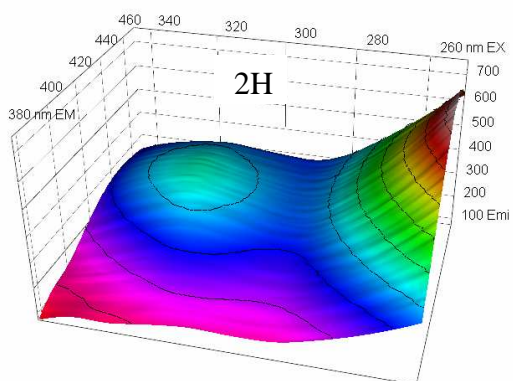
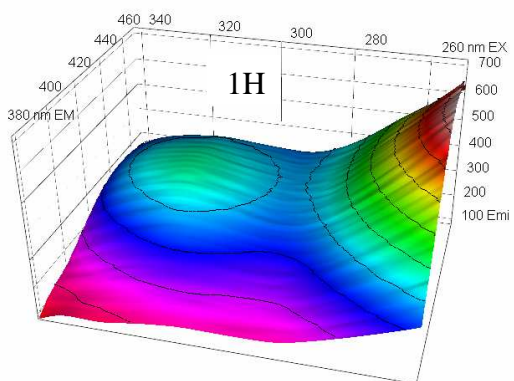
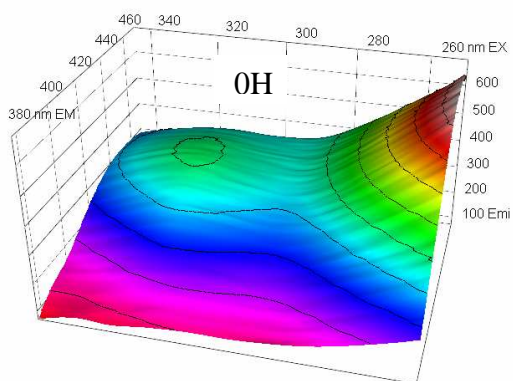
Příloha 11: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK N60 + Al(III)



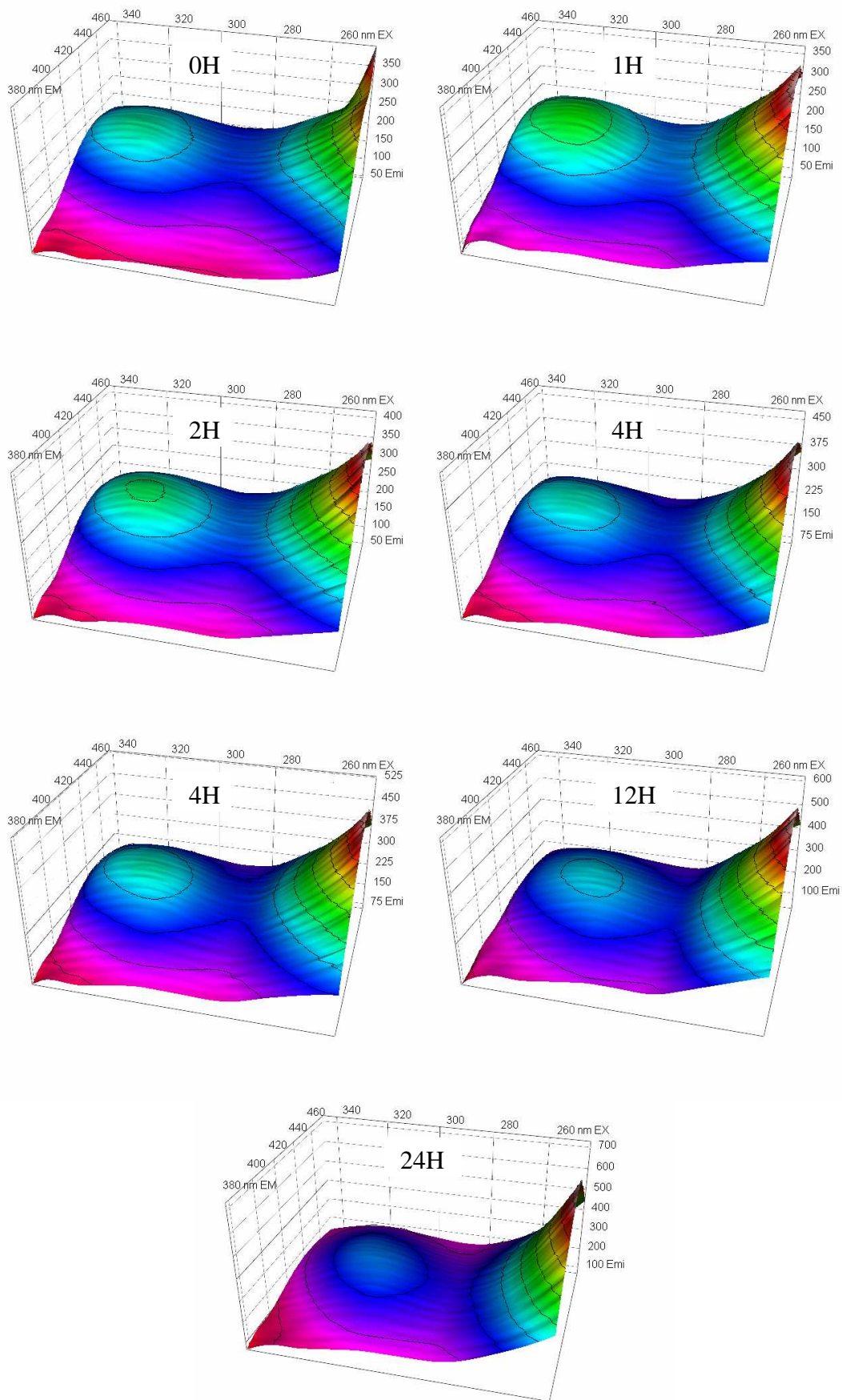
Příloha 12: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK N65



Příloha 13: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK N65 + Al(III)



Příloha 14: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK V45



Příloha 14: 3D fluorescenční excitačně-emisní matice vzorku FK V45 + Al(III)

