

Pro gradu -tutkielma

**Raudan ja superoksidin vaikutus liuenneen
orgaanisen aineen hajoamiseen**

Marja-Terttu Näsi



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

27.12.2018

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede ja -teknologia

Näsi, Marja-Terttu: Raudan ja superoksidin vaikutus liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen
Pro gradu -tutkielma: 64 s.
Työn ohjaajat: Yliopistonlehtori Anssi Vähätalo ja post-doc tutkija Yihua Xiao
Tarkastajat: FT Jonna Kuha
Joulukuu 2018

Hakusanat: Liuennut orgaaninen aine, superoksidi, kumariini, Haber-Weiss-reaktio, Fenton-reaktio

Viime aikoina kiinnostus liuenneen orgaanisen aineen (DOM) ja raudan välisen vuorovaikutuksen ymmärtämiseen on lisääntynyt. Erityisesti raudan vaikutusta DOM:n hajoamiseen ei tunneta tarkasti. Monien bakteerien tiedetään tuottavan solun ulkopuolelle superoksidia, joka voi muodostaa vetyperoksidia. Vetyperoksidi reagoi raudan kanssa muodostaen hydroksyyliiradikaaleja, jotka voivat hajottaa DOM:a bakteereille sopiviksi substraateiksi. Tässä pro gradu -tutkielmassa selvitettiin raudan vaikutusta DOM:n hajoamisessa hyödyntäen superoksidin lähteenä KO_2 -liuosta bakteerien sijasta. Reaktiomekanismia tutkittiin seuraamalla hydroksyyliiradikaalien muodostumista käyttämällä kumariinia koettimena. DOM:n hajoamista tarkasteltiin fluoresenssi- ja absorbanssimittauksilla. Hydroksyyliiradikaalien muodostuminen oli vähäistä liuoksissa, jotka sisälsivät vain DOM:a tai joihin lisättiin vain rautaa tai superoksidia. Hydroksyyliiradikaaleja muodostui sekä rautaa että superoksidia sisältävissä liuoksissa. Liuenneesta orgaanisesta aineesta löydettiin neljä fluoresoivaa komponenttia: kaksi humus- ja yksi proteiinialueen komponentti sekä 7-hydroksikumariini, joka on kumariinin ja hydroksyyliiradikaalin välisen reaktion reaktiotuote. Ilman superoksidia DOM:n hajoamista ei tapahtunut lainkaan, mutta superoksidin ja varsinkin vielä raudan läsnä ollessa hajoaminen oli huomattavaa. Tämän perusteella tutkitulla reaktioreitillä voi olla DOM:n hajoamista edistävä vaikutus.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science and technology

Näsi, Marja-Terttu: The effect of iron and superoxide on the degradation of dissolved organic matter
MSc thesis: 64 p.
Supervisors: Senior Lecturer Anssi Vähätalo and Postdoctoral Researcher Yihua Xiao
Inspectors: PhD Jonna Kuha
December 2018

Key words: Dissolved organic matter, superoxide, coumarin, Haber-Weiss-reaction, Fenton reaction

Recently interactions between the dissolved organic matter (DOM) and iron have attracted increased attention. Especially the effect of iron on the degradation of DOM is not well-known. It has been shown that some bacteria can produce extracellular superoxide, which forms hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can react with iron and produce hydroxyl radicals that degrade humic-like DOM into suitable substrates for bacteria. In this master thesis the degradation of DOM-iron associations were assessed by using KO_2 -solution as the source of superoxide instead of bacteria. The reaction mechanism was examined by following the formation of hydroxyl radicals using coumarin as a probe. The degradation of DOM was studied by fluorescence and absorbance measurements. Yields of hydroxyl radical reactions were low in the experimental treatments that contained DOM alone or with the introductions of iron or KO_2 separately. Hydroxyl radicals were produced in the solutions including both iron and superoxide. DOM included four fluorescent components: two humic-like and one protein-like component and 7-hydroxycoumarin, the product of the reaction between coumarin and hydroxyl radical. Significant degradations of DOM occurred only in solutions containing superoxide, especially combined with iron. Based on these results these reaction routes can enhance the degradation of DOM.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 TEORIA	3
2.1 Tutkimuskohteena olevan liuennneen orgaanisen aineen hajoamisprosessi	3
2.1.1 Liuennut orgaaninen aine.....	3
2.1.2 Raudan sitoutuminen liuennneeseen orgaaniseen aineeseen sekä raudan osuus Fenton- ja Haber-Weiss-reaktioissa	5
2.1.3 Vesistöissä esiintyvät hapen reaktiiviset muodot	6
2.2 Liuennneen orgaanisen aineen optinen karakterisointi	10
2.2.1 UV-Vis absorptiospektroskopia.....	10
2.2.2 Fluoresenssi	12
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	16
3.1 Tutkimusjärvi, sen liuennut orgaaninen aine ja tutkimuksessa käytetyt reagenssit.....	16
3.2. Koejärjestely	17
3.3 Analyttiset menetelmät.....	19
3.3.1 Analyysissä käytettyjen liuosten valmistus	19
3.3.2 Ferriraudan kompleksointi liuennneeseen orgaaniseen aineeseen	20
3.3.3 Absorbanssi-mittaukset	21
3.3.4 Fluoresenssi-mittaukset	22
3.3.5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia -mittaukset (HPLC).....	25
4 TULOKSET	34
4.1 Superoksidin ja raudan merkitys liuennneen orgaanisen aineen valon absorptioon	34

4.2 Superoksidin ja raudan merkitys liuenneen orgaanisen aineen fluoresenssiin	37
4.3 Superoksidin ja raudan vaikutus hydroksyyli-radikaalin muodostumiseen .	43
5 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET	49
5.1 Tulosten tarkastelu	49
5.1.1 Havainnot superoksidin ja raudan vaikutuksesta liuenneen orgaanisen aineen optisiin ominaisuuksiin ja hydroksyyli-radikaalin muodostumiseen...	50
5.1.2 Tutkittu reaktioreitti	52
5.2 Johtopäätökset	55
KIITOKSET.....	55
KIRJALLISUUS.....	56

SANASTO JA LYHENTEET

LYHENTEET

CDOM	Colored Dissolved Organic Matter Värillinen liuennut orgaaninen aine
DOC	Dissolved Organic Carbon Liuennut orgaaninen hiili
DOM	Dissolved Organic Matter Liuennut orgaaninen aine
FDOM	Fluorescent Dissolved Organic Matter Fluoresoiva liuennut orgaaninen aine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
ROS	Reactive Oxygen Species Reaktiiviset happiyhdisteet
SOD	Superoxide dismutase Superoksididismutaasi

1 JOHDANTO

Liuenut orgaaninen aine (DOM) sisältää orgaanista hiiltä, joka toimii energian- ja ravinnonlähteenä heterotrofisille bakteereille. Rauta on maankuoren neljänneksi runsain alkuaine ja se vaikuttaa monien alkuaineiden biogeokemialliseen kiertoon (Cotner & Heath 1990; Sarkkola ym. 2013; Kritzberg ym. 2014; Weyhenmeyer ym. 2014). Viime aikoina sekä DOM:n että raudan pitoisuudet ovat kasvaneet boreaalisen vyöhykkeen joissa (Kritzberg & Ekström 2012; Sarkkola ym. 2013; Weyhenmeyer ym. 2014), mikä on lisännyt kiinnostusta ymmärtää paremmin niiden välistä vuorovaikutusta.

Epäorgaaniset rautayhdisteet ovat huonosti veteen liukenevia, ja ne sitoutuvat usein DOM:iin (Boyd & Ellwood 2010). Esimerkiksi Suwannee-joen fulvohapojen hypoteettisen keskivertomolekyylin on todettu sisältävän $14,3 \mu\text{mol} [\text{mg C}]^{-1}$ potentiaalisia sitoutumispaikkoja raudalle (Leenheer ym. 1998; Ritchie & Perdue 2003). Raudan sitoutuminen on ollut makeissa vesissä suuruusluokaltaan kuitenkin ainoastaan $2 \mu\text{mol Fe} [\text{mg C}]^{-1}$ (Neubauer ym. 2013).

Ruotsin järvissä noin puolet DOC:sta häviää alle 2,5 vuodessa (Algesten ym. 2003). Vaikka osa DOM:sta päätyy flokkulaatiossa sedimentteihin ja osa hajoaa auringon säteilyn vaikutuksesta, eivät nämä prosessit voi yksinään selittää DOM:n hajoamista järvissä (Vähätalo & Wetzel 2008; Vähätalo ym. 2010). Hajoamisprosessi sisältää siis todennäköisesti vielä joitakin muita tekijöitä

Bakteerit voivat ottaa suoraan solun sisään molekyylejä ja hajottaa niitä solun sisällä tapahtuvassa metaboliassa (Arnosti 2004). Tämä on mahdollista molekyyleille, jotka ovat kooltaan alle 600 Da eli 600 g mol^{-1} (Weiss ym. 1991). DOM koostuu kuitenkin lähinnä tätä raja-arvoa suuremmista yhdisteistä. Tietyt heterotrofiset bakteerit voivat käyttää solunulkopuolisia entsyymejä sellaisten molekyylin hajottamiseen, jotka ovat liian suuria bakteerien suoraan

sisäänottoon. Tätä kutsutaan entsyymaattiseksi katalyysiksi, joka on selektiivinen ja vain tiettyjen polymeerien hydrolyysiä koskeva reaktio. DOM:n sidoksissa entsyymit kuitenkin hydrolysoivat heikosti (Arnosti 2004).

Raudan abioottiset reaktiot voivat helpottaa orgaanisen aineen hajoamista ja tuottaa substraatteja mikrobeille. Näissä reaktioissa superoksidi voi pelkistää liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutuneen ferriraudan ferriraudaksi, Fe(II) (Rose & Waite 2005). Fenton-reaktiossa ferrirauta reagoi edelleen vetyperoksidin kanssa muodostaen mm. hydroksyyliiradikaalin (Nakatani ym. 2007). Syntyneet reaktiiviset happiradikaalit voivat johtaa aromaattisten renkaiden hajoamiseen (Miller ym. 2013; Yuan ym. 2016), hiilidioksidin sekä orgaanisten happojen muodostumiseen (Pracht ym. 2001; Studenroth ym. 2013).

Oletetaan, että bakteerit voisivat hyödyntää rautaa hajottaakseen DOM:a solun ulkopuolella (Diaz ym. 2013). Bakteriplankton koostuu kuitenkin sadoista lajeista, joilla kaikilla on omia erityisiä metabolisia toimintoja (Taipale ym. 2011), jolloin tämä luultavasti rajoittuisi vain tiettyihin lajeihin. *Caulobacter*-bakteerit erottuivat selkeästi muista bakteeriryhmistä, kun DOM:n hajoamista kiihdytettiin raudan avulla (Xiao ym. 2016). Onkin siis mahdollista, että bakteerit tuottaisivat solun ulkopuolista superoksidia, joka reagoidessaan hydroksyyliiradikaaliksi johtaisi liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen (Xiao ym. 2016).

Tässä pro gradu -tutkielmassa tarkoituksena on selvittää raudan ja superoksidin vaikutusta liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen. Koska reaktioita haluttiin nopeuttaa, käytettiin tutkimuksessa kaliumsuperoksidia bakteerien sijasta superoksidin lähteenä. Reaktioissa syntynyttä hydroksyyliiradikaalia määritettiin HPLC-mittausten avulla kumariinin toimiessa koettimena. Liuenneen orgaanisen aineen hajoamista seurattiin fluoresenssi- ja absorbanssimittauksilla.

2 TEORIA

2.1 Tutkimuskohteena olevan liunneen orgaanisen aineen hajoamisprosessi

2.1.1 Liennut orgaaninen aine

Vesistöjen humus koostuu heterogeenisistä biomolekyyleistä, jotka ovat molekyylimassaltaan suuria ja väriltään keltaisia, mustia tai ruskeita (Hessen & Tranvik 1998). Humus voidaan jakaa liukoisuuden mukaan kolmeen komponenttiin: fulvohappoihin, humushappoihin ja humiiniin. Fulvohapot ovat orgaanisia happoja, jotka ovat liukoisia kaikissa pH-arvoissa. Humushapot taas ovat liukoisia pH:n ollessa yli kahden ja humiini on pääosin liukenematon. Vesistöjen humus voi esiintyä joko liunneessa tai kiinteässä muodossa (Hessen & Tranvik 1998).

Vesistöissä suurin osa orgaanisesta materiaalista on liunneena orgaanisena aineena (DOM). DOM on heterogeeninen alifaattisten ja aromaattisten yhdisteiden seos ja liunneet fulvohapot kattavat 40-60 % DOM:sta monissa vesiekosysteemeissä (Hessen & Tranvik 1998). DOM:n koostumus kuitenkin vaihtelee sen alkulähteen sekä hajoamisprosessin vaiheen mukaan (Opsahl ym. 1999). Sisävesissä ja rannikoilla DOM:n päälähde on maalta lähtöisin oleva hajonnut kasviaines, joka on liennut veteen ja kulkeutunut eteenpäin vesistöissä. Toinen DOM:n päälähde on vesikasvien hajoamisesta syntynyt aines (Hansel & Carlson 2002).

Mikro-organismien hapettamisreaktioiden seurauksena sekä alifaattisiin että aromaattisiin DOM:n osiin voi syntyä karboksyyliiryhmiä. Nämä karboksyyliiryhmät vaikuttavat suuresti DOM:n liukoisuuteen. Mikrobien toiminnan lisäksi DOM:n hajoamiseen vaikuttavat fotokemialliset reaktiot. UV-

valo muuttaa mm. veden optisia ominaisuuksia sekä tuottaa erilaisia reaktiivisia happiradikaaleja (Hessen & Tranvik 1998).

Osa DOM:sta on värillistä liuennutta orgaanista ainetta (CDOM), joka absorboi UV-säteilyä sekä näkyvää valoa. CDOM vastaa suurelta osin luonnonvesien optisista ominaisuuksista. Yksi sen päätehtävistä on suojella eliöitä haitalliselta UV-säteilyltä (Walsh ym. 2003), minkä lisäksi sillä on suuri rooli useissa biogeokemiallisissa sekä fotokemiallisissa prosesseissa (Hansel & Carlson 2002). CDOM virittyy UV-valon ja sinisen valon alueella ja osa viritysenenergiasta purkautuu fluoresenssina (FDOM). Kaksi DOM:n fluoresoivaa pääkomponenttia ovat humus- ja proteiiniaines. Näistä humusaines fluoresoi sinisen valon aallonpituusalueella ja proteiiniaines puolestaan UV-valon aallonpituusalueella (Coble 1996).

DOM:n eristämiseksi vesinäytteestä on kehitetty useita analyttisiä menetelmiä. Kiinteäfaasiuutto, jossa hyödynnetään XAD-hartsia (polymeerinen adsorbentti), kehitettiin 1970-luvun lopulla (Aiken ym. 1979; Lara & Thomas 1994; Dittmar ym. 2001). Myöhemmin ultrasuodatuksesta 1-kDa:n suodatinkoolla tuli suosittu menetelmä, mutta sen tehokkuus on ollut vain n. 30 % (Amon & Benner 1996; Benner ym. 1997). Käänteisosmoosi ja elektrodialyysi ovat tarjonneet yhdessä tätä tehokkaamman menetelmän (Vetter ym. 2007). Erityisesti makean veden tapauksessa silika-C18 sorbenttia on käytetty DOM:n eristämiseen (Kim ym. 2003). Ultrasuodatuksen ja kiinteäfaasiuuton yhdistelmä onkin parantanut murtoveden DOC:n eristämistä 70 %:iin (Simjouw ym. 2005), mutta se on kuitenkin todettu työlääksi ja aikaa vieväksi (Dittmar ym. 2008).

Kiinteäfaasiuutto, joka hyödyntää kaupallisia, esipakattuja kiinteäfaasiuuttopatruunoita, on todettu tehokkaaksi menetelmäksi. Se ei vaadi monia työvälineitä ja soveltuu myös maastossa käytettäväksi. Menetelmässä näytteet suodatetaan välittömästi näytteenoton jälkeen. Seuraavaksi niiden pH lasketaan HCl-liuoksella arvoon 2, jotta orgaanisten happojen ja fenolien uuttamistehokkuus paranee.

Adsorbantti pestään metanolilla juuri ennen käyttöä ja DOM uutetaan. Seuraavassa vaiheessa vesinäytteen suola poistetaan, sorbentti kuivataan ja eluoidaan metanolin avulla ennen kiinteäfaasiuuttoa. Styreeni-divinyylibentseenipolymeerien tyyppiset sorbentit (PPL ja ENV) on todettu tehokkaimmiksi sorbenteiksi DOM:n eristämiseen. Silikapohjaisista, hiilivetyihin perustuvista sorbenteista C18 on tehokkain, mutta sen uuttotehokkuus on kuitenkin vain kaksi kolmasosaa PPL:n tehokkuudesta (Dittmar ym. 2008).

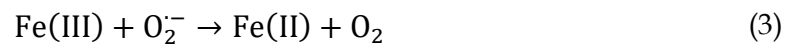
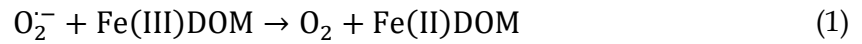
DOM:n raudan määrää voidaan vähentää lisäämällä ennen uuttoa vesinäytteeseen jotakin yhdistettä, joka sitoutuu DOM:n ligandeiksi raudan tilalle. Tällainen yhdiste on esimerkiksi NaF, jossa fluoridi-ionit sitoutuvat DOM:iin. Fluoridi-ionien käytön etuna on, että ne ovat käytännössä inerttejä reagoimaan reaktiivisten happiyhdisteiden kanssa, jotka ovat mukana CDOM:n fotoreaktioissa (Gao & Zepp 1998). Raudan poiston tehokkuudeksi on saatu tällä menetelmällä 97 % (Xiao ym. 2016).

2.1.2 Raudan sitoutuminen liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sekä raudan osuus Fenton- ja Haber-Weiss-reaktioissa

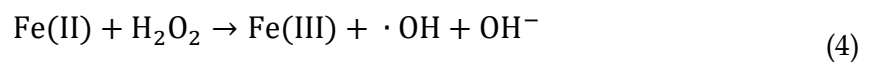
Epäorgaaniset rautayhdisteet ovat huonosti veteen liukenevia (Boyd & Ellwood 2010). Ferrirauta, Fe(III), muodostaa luonnossa liuenneen orgaanisen aineen kanssa komplekseja (Nakatani ym. 2007), ja siksi se esiintyy luonnonvesissä pääosin sitoutuneena juuri liuenneeseen orgaaniseen aineeseen (Boyd & Ellwood 2010).

Superoksidi pystyy pelkistämään sekä liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutunutta (Kaava 1) että epäorgaanisena ionina esiintyvää ferrirautaa (Kaava 3), joka on syntynyt liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutuneen ferriraudan hajotessa (Kaava 2) (Rose & Waite 2005). Ensimmäisessä tapauksessa reaktiossa syntyy ferro-orgaaninen kompleksi, joka voi hapettua uudestaan luonnonvesissä useiden eri hapettajien kuten veteen liuenneen hapen, vetyperoksidin tai hydroksyyli-radikaalin toimesta. Toisessa tapauksessa nettoreaktio on hyvin

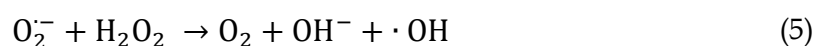
samankaltainen, mutta kuitenkin sillä eroavaisuudella, että raudan pelkistyminen tuottaa vapaata ferrorautaa eikä liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutunutta (Rose & Waite 2005).



Reaktioissa syntynyt ferrorauta voi reagoida Fenton-reaktiossa vetyperoksidin (H_2O_2) kanssa muodostaen $\cdot\text{OH}$ -radikaalin ja hydroksyyli-ionin (Kaava 4) (Nakatani ym. 2007). Reaktio toimii luonnonvesissä hydroksyyli-radikaalin muodostumisen lähteenä.



Haber-Weiss-reaktiossa (Kaava 5) vetyperoksidi ja superoksidi reagoivat tuottaen happea, hydroksyyli-ionin sekä hydroksyyli-radikaalin. Haber-Weiss-reaktio tarvitsee toimiakseen metalli-ionikatalyytin, jolloin se voidaan jakaa jo aiemmin mainittuihin kaavoihin 3 ja 4 toimien täten näiden reaktioiden nettoreaktiona (Kehrer 2000).



2.1.3 Vesistöissä esiintyvät hapen reaktiiviset muodot

Hydroksyyli-radikaali, superoksidi ja vetyperoksidi kuuluvat reaktiivisiin happiyhdisteisiin (ROS). Reaktiiviset happiyhdisteet ovat lyhytikäisiä, happiatomeja sisältäviä yhdisteitä, joiden puoliintumisaika vesistöissä vaihtelee nanosekunneista tunteihin (Kearns 1971; Zafiriou 1977, Zafiriou ym. 1984; Waite ym. 1988; Bartosz 2006; Lu ym. 2006; Schmidt 2007). Reaktiivisia happiyhdisteitä muodostuu mm. fotolyysissä sekä hapetus-pelkistysreaktioissa, ja niiden

konsentraatiot ympäristössä vaihtelevat pikomooleista mikromooleihin (Burns ym. 2012).

Hydroksyyliiradikaali on vahvin hapetin reaktiivisten happimolekyylien ryhmässä, eikä se reagoi selektiivisesti (Mill ym. 1980; Zafiriou ym. 1984). Sitä syntyy luonnonvesissä mm. jo esitetyssä Fenton-reaktiossa (Kaava 4). Superoksidi puolestaan on selektiivisempi reagoidessaan orgaanisten yhdisteiden kanssa vesistöissä (Burns ym. 2012). Superoksidi anioni O_2^- syntyy happimolekyylin pelkistyessä (Kaava 6). Superoksidianioni voi edelleen pelkistyessään tuottaa vetyperoksidia (Kaava 7). Tämä dismutaatioreaktio voi tapahtua joko itsestään tai katalyyttien kautta. Syntynyt vetyperoksidi voi pelkistyä hydroksyyliiradikaaliksi (Kaava 8), joka pelkistyessään tuottaa vettä (Kaava 9) (Turrens 2003).



Vetyperoksidi taas on termodynaamisesti vahva hapetin, mutta sen reaktionopeudet monien yhdisteiden kanssa ovat usein hitaampia verrattuna siihen, että hapettimena toimisi vapaa radikaali (Burns et al. 2012). Vetyperoksidin happovakion arvo (pKa) on 11,75, joten sitä ei esiinny luonnonvesissä (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database 2018).

2.1.3.1 Hydroksyyliiradikaalin määrittäminen

Hydroksyyliiradikaalin reaktioiden seuraaminen on haastavaa johtuen sen reaktiivisuudesta ja lyhyestä eliniästä (Louit ym. 2005). Pitoisuuden laskemiseen nesteessä on kuitenkin kehitetty useita menetelmiä, jotka voidaan luokitella suoriin ja epäsuoriin menetelmiin (Maezono ym. 2010). Yksi suorista menetelmistä perustuu elektronispin-resonanssiin (ESR), jossa parittomien elektronien siirtymiä

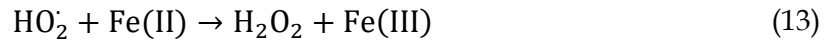
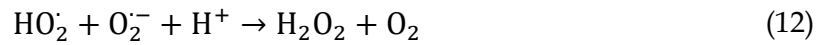
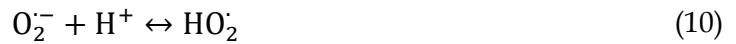
mitataan magneettisessa kentässä (Kim & Metcalfe 2007; Luo ym. 2009). Menetelmä on laajalti käytetty sensitiivisyytensä ja selektiivisyytensä takia, mutta se vaatii kuitenkin kalliin mittauslaitteen.

Kustannusten ja hydroksyyliiradikaalin lyhyen eliniän vuoksi ($\sim 10^{-9}$ s) joudutaan usein käyttämään epäsuoria mittausmenetelmiä (Maezono ym. 2010). Epäsuorat mittausmenetelmät perustuvat johonkin koettiin, joka reagoi hydroksyyliiradikaalin kanssa tunnetulla tavalla (Louit ym. 2005). Syntyneen lopputuotteen määrä voidaan mitata esimerkiksi UV-Vis absorptiospektroskopiolla (Aruoma 1994), luminesenssilla (Tsai ym. 2001) tai fluoresenssilla, ja lopulta reaktioyhtälön avulla voidaan laskea, kuinka paljon hydroksyyliiradikaalia reagoi (Louit ym. 2005).

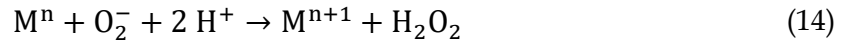
2.1.3.2 Superoksidin reaktiot ja tuottaminen liuokseen

Solujen metabolia sisältää paljon hapetus-pelkistysreaktioita, joiden yhteydessä superoksidia voi muodostua solun sisään. Muodostuminen voi olla joko entsyymattista tai ei-entsyymattista (Turrens 2003). Entsyymattisiin lähteisiin kuuluu mm. NADPH-oksidaasi, joka tapahtuu solun membraaneilla ja voi pelkistää hapen superoksidiksi (Babior 2000; Babior ym. 2002; Vignais 2002). Ei-entsyymattisiin lähteisiin kuuluvat puolestaan esimerkiksi tiolit ja pelkistyneet flaviinit, jotka voivat pelkistää hapen superoksidiksi (Turrens 2003). Superoksidia voi syntyä myös solun ulkopuolelle biologisten prosessien, kuten bakteerien tuottamana (Diaz ym. 2013).

Hieman happamassa liuoksessa superoksidin ja sen protonoituneen muodon hydroperoksyyliradikaalin välillä on tasapaino (Kaava 10) (Behar ym. 1970). Hydroperoksyyliradikaali voi reagoida edelleen itsensä tai superoksidin kanssa muodostaen vetyperoksidia ja happea katalysoimattoman dismutaatioreaktion kautta (Kaava 11 ja 12) (Voelker & Sedlak 1995; Voelker ym. 2000; Heller & Croot 2010a). Lisäksi raudan läsnä ollessa Fe(II) voi reagoida hydroperoksyyliradikaalin kanssa muodostaen vetyperoksidia ja Fe(III):a (Kaava 13) (Yuegang & Jürg 1992).



Superoksidi voi toimia reaktioissa sekä pelkistäjänä että hapettajana, ja merivesissä se vaikuttaa raudan ja kuparin kanssa monien yhdisteiden hapetuspelkistysreaktioihin (Kaava 14 ja 15, M-kirjain kuvaa joko rautaa tai kuparia) (Voelker & Sedlak 1995; Voelker ym. 2000; Heller & Croot 2010a). Tyypillisesti reaktiot kuparin tai raudan kanssa ovat hyvin nopeita ja reaktioissa tarvitaan vain pieni määrä metallia katalysoimaan superoksidin dismutaatioreaktiota (engl. catalyzed dismutation pathway) (Bielski ym. 1985). Nämä reaktiot voivat johtaa jo aikaisemmin esiteltyyn Haber-Weiss-reaktioon (Kaava 5), jossa muodostuu hydroksyyli-radikaalia.



Yksi tapa tuottaa superoksidia liuokseen on kaliumsuperoksidi (KO_2). Kaliumsuperoksidin käytön ongelmana on tosin erittäin alhainen saantoprosentti (~15 %) sekä vetyperoksidin muodostuminen (Bolann & Ulvik 1991). Aiemmin kaupallisen kaliumsuperoksidin uskottiin myös olevan metallien kontaminoima. Kontaminaatio saattoi kuitenkin johtua välineistä ja reagensseista, jotka eivät olleet täysin metallivapaita (Weinstein & Bielski 1979).

Eräessä tutkimuksessa analysoitiin KO_2 -reagenssin rauta- ja kuparipitoisuutta ja tulosten mukaan reagenssi sisälsi $0,7 \pm 0,1$ ppm rautaa (kuivapaino) ja alle 0,06 ppm kuparia. Tutkimuksessa metallipitoisuudella ei uskottu olevan vaikutusta tuloksiin. Kaliumsuperoksidin luonteen takia sitä voidaan kuitenkin käyttää vain kertaluontoisissa analyyseissä (Heller & Croot 2010b).

2.2 Liuenneen orgaanisen aineen optinen karakterisointi

2.2.1 UV-Vis absorptiospektroskopia

Molekyyliorbitaalit voivat olla luonteeltaan joko sitovia, ei-sitovia tai hajottavia. Jos molekyyli absorboi sopivan määrän energiaa, miehityllä orbitaalilla elektroni virittyy miehittämättömälle orbitaalille tai osittain miehityllä orbitaalille. Energiatilaltaan korkeimmalla sijaitsevan miehityllä molekyliorbitaalin (HOMO, highest occupied molecular orbital) ja energiatilaltaan alimmalla sijaitsevan miehittämättömän molekyliorbitaalin (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital) välinen energiaero näkyy yleensä absorptiona näkyvän valon tai UV-valon aallonpituusalueilla (Housecroft & Sharpe 2012).

Molekyliorbitaalien energia on kvantittunut, joten elektroninen siirtymä voidaan yhdistää tiettyyn energiamäärään ΔE . Molekyliabsorptiospektrit yleensä koostuvat leveämmistä piikeistä kuin atomiabsorptiospektrit. Toisin kuin atomeilla, molekyyliissä tapahtuu vibraatio- ja rotaatioliikettä, joka on hitaampaa kuin fotonin absorptio. Molekylin geometria vaikuttaa ΔE :n määrään ja samalla myös absorptiospektriin (Housecroft & Sharpe 2012).

Liuenneen orgaanisen aineen spektroskopia poikkeaa kuitenkin merkittävästi yllä kuvatusta yksittäisten yhdisteiden spektroskopiasta. DOM koostuu tuhansista erilaisista yhdisteistä, jolloin DOM:n absorptiospektroskopia koskee molekyyliseoksia. Tällöin DOM:n mitattu absorptio on suurempi kuin yksittäisten elektronisiirtymien summa molekyliorbitaalilta toiselle. Lisäksi absorptiota aiheuttavat reaktiot, joissa varaus siirtyy funktionaaliselta ryhmältä toiselle joko molekyylin sisällä tai molekyylien välillä. Spektroskopian avulla ei siis pystytä suoraan selvittämään yksittäisiä yhdisteitä tai funktionaalisia ryhmiä, mutta silti sen avulla voidaan arvioida DOM:n koostumusta (Sharpless & Blough 2014).

2.2.1.1 Absorptiospektrin kulmakertoimet CDOM:n määrittämisessä.

Jotta CDOM:n ominaisuuksia voidaan määrittää spektristä, on avuksi kehitetty useita parametreja, joista suuri osa keskittyy absorptioiden suhteiden hyödyntämiseen. Nämä suhteet ovat riippumattomia CDOM:n konsentraatiosta (Helms ym. 2008). DOM-molekyylien kokoa voidaan tarkastella 250 ja 365 nanometrin absorptiosuhteen avulla, mitä kutsutaan myös E2:E3-suhteeksi. Kun molekyylien koko kasvaa, E2:E3-suhde pienenee, sillä suuremmat molekyylit absorboivat valoa voimakkaammin korkeammilla aallonpituuksilla (De Haan & De Boer 1987).

465 ja 665 nanometrin aallonpituusalueiden välinen absorptiosuhde (E4:E6) puolestaan kuvaa hyvin CDOM:n aromaattisuutta (Chin ym. 1994), vaikka erään tutkimuksen (Chen ym. 1977) mukaan sen on todettu korreloivan aromaattisuutta paremmin molekyylien koon, karboksyylien, happamuuden sekä O:C- ja C:N-suhteiden kanssa. Tämän vuoksi suhdetta voidaan hyödyntää humuspitoisia järviä määritettäessä (Summers ym. 1987).

Absorptiokerroin ilmoitetaan aina luonnollisina logaritmeina (m^{-1}), jotka perustuvat Napierianin systeemiin (Kaava 16). Mittalaitteet ilmoittavat mittaustuloksen kymmenkantaisena logaritmiin pohjautuvana absorbanssina, jolla ei ole yksikköä (Braslavsky 2007). Absorptiokerrointa voidaan edelleen käyttää spektrin kulmakertoimen määrittämisessä. Tällöin hyödynnetään eksponenttifunktion epälineaarista sovitusta absorptiospektrille eri aallonpituuksilla (Kaava 17) (Twardowski ym. 2004).

$$a = \frac{2,303(A - A_{MQ})}{0,01}, \quad (16)$$

jossa a on absorptiokerroin m^{-1} , A on näytteen absorbanssin arvo, A_{MQ} on ultrapuhtaan veden absorbanssi ja 0,01 on metreinä ilmoitettuna se etäisyys, jonka valo kulkee kyvetissä näytteen läpi.

$$a_{\lambda} = a_{\lambda_{\text{ref}}} e^{-S(\lambda - \lambda_{\text{ref}})}, \quad (17)$$

jossa a on Napierianin absorptiokerroin (m^{-1}), λ on aallonpituus (nm), λ_{ref} on referenssi aallonpituus (nm) ja S on spektrin kulmakerroin (nm^{-1}).

Spektrin kulmakerroin tarjoaa enemmän tietoa CDOM:n ominaisuuksista kuin absorptioarvot yksinään. Kuten E2:E3- ja E4:E6-suhteet, on kulmakerroin riippumaton CDOM:n konsentraatiosta (Brown 1977). Kulmakerrointa voidaan käyttää kuvaamaan fulvo- ja humiinihappojen suhdetta, minkä lisäksi kulmakertoimen on huomattu korreloivan fulvohappojen isolaattien molekyyliainojen kanssa. Kulmakerroin riippuu kuitenkin aina käytetystä aallonpituusvälistä (Carder ym. 1989). Tässä työssä käytettiin aallonpituusvälejä 275-295 nm sekä 350-400 nm, sillä nämä spektrin alueet antavat viitteitä liuenneen orgaanisen aineen molekyylikoosta ja sen altistumisesta auringon säteilyn aiheuttamalle valokemialliselle hajoamiselle (Helms ym. 2008).

CDOM:n UV-Vis-absorptiospektrin tulisi laskea lähes eksponentiaalisesti aallonpituuden laskiessa (Twardowski ym. 2004). Jos kulmakertoimen arvo on suuri, on myös käyrä jyrkempi. Tällöin absorptio väheneminen on kasvavalla aallonpituudella nopeampaa (Helms ym. 2008).

2.2.2 Fluoresenssi

Molekyylin absorboidessa valoa (energiaa) molekyyli virittyy ja elektroni siirtyy miehittämättömälle orbitaalille. Energiaero perustason (S_0) ja virittyneen singlettitason (S_1 tai korkeampi) välillä määrittää aallonpituuden, jolla valo on absorboitunut. Fluoresenssi voi johtaa useisiin siirtymisiin virittyneiden singlettitasojen välillä, minkä vuoksi molekulaarisissa absorptiospektreissä havaitaan usein leveitä piikkejä (Stedmon ym. 2003).

Virittymistä seuraa säteilemätön viritystilän purkautuminen matalimmalle singlettitasolle sisäsiirtymän ja relaksaation vibraatioperustilan avulla. Säteilytön vaimeneminen, fluoresenssi ja systeemien välinen siirtymä kilpailevat viritystilän

purkautumisesta perustasolle (S_0). Fluoresenssin emission aallonpituus määrittyy S_1 - ja S_0 -tasojen energiaeron perusteella. Mitä suurempi molekyylin konjugaatio on, sitä vähemmän on myös energiaeroa, mikä puolestaan johtaa fluoresenssin pidempään aallonpituuteen (Stedmon ym. 2003). Konjugaation myötä absorptioenergia myös vähenee eli absorptio tapahtuu pidemmällä aallonpituudella.

Kun mitataan emissiospektrejä useilla eri viritysaallonpituuksilla, voidaan niistä muodostaa fluoresenssin emissio-viritysmatriiseja (EEM). Matriiseja voidaan hyödyntää fluoresoivan liuenneen orgaanisen aineen (FDOM) rakenteen ja ominaisuuksien määrittämisessä. Menetelmä tarjoaa tietoa sekä FDOM:n fluoresenssin määrästä ja sekä eksitaation ja emission aallonpituuksien riippuvuudesta (Stedmon ym. 2003). EEM:t ovat kuitenkin itsessään hankalasti tulkittavia. Aikaisemmin EEM:n ominaisuuksien tulkitseminen nojasi pitkälti visuaaliseen spektrin eri osien tarkasteluun ja piikkien tutkimiseen (Coble 1996; McKnight ym. 2001). Nykyisin tilastollisia menetelmiä hyödynnetään DOM:n fluoresenssisignaalien määrittämisessä (Boehme & Coble 2000; Persson & Wedborg 2001; Stedmon ym. 2003) ja yksi esimerkki tällaisesta menetelmästä on Parallel factor analysis (PARAFAC).

2.2.2.1 Parallel factor analysis (PARAFAC)

PARAFAC on tilastotieteellinen lähestymistapa tulkita EEM-matriiseja. Se jakaa analysoitavassa aineistossa olevat EEM-matriisit tilastollisiin komponentteihin, joiden avulla voidaan hahmottaa EEM-matriisien rakennetta ja vertailla näytteitä toisiinsa. Spektrin fluoresenssidata on kolmiulotteista, jolloin näytteen fluoresenssi vaihtelee eksitaation ja emission mukaan. Kun data yhdistetään, saadaan kolmisuuntaisia datalaatikkoja. Lopulta mallista saadaan parametrit a , b ja c , jotka edustavat fluoroforien konsentraatiota sekä emissio- ja eksitaatioaallonpituuksia. (Stedmon & Bro 2008).

PARAFAC-analyysi voidaan jakaa viiteen eri vaiheeseen (Kuva 1). Ensimmäinen vaihe on datan tuominen johonkin ohjelmaan, joka tukee PARAFAC-analyysiä (esim. MATLAB). Tämän jälkeen data esikäsitellään, jolloin siitä korjataan systemaattiset vääristymät herätevalon absorptiossa, fluoresenssin emissiospektrissä sekä fluoresenssin intensiteetissä, poistetaan signaalit, jotka eivät liity fluoresenssiin (Rayleigh ja Raman sironta) sekä normalisoidaan fluoresenssin emissiointensiteetti näytteiden välillä käyttämällä hyväksi veden Raman signaalin intensiteettiä. Kolmannessa vaiheessa tutustutaan paremmin dataan ja pyritään tarkastelemaan, kuinka monta PARAFAC-komponenttia data sisältää. Lisäksi tutkitaan, tuleeko joitakin poikkeavia havaintoja poistaa. Neljännessä vaiheessa määritellään komponenttien lopullinen määrä ja katsotaan, onko malli validi. Viimeisessä vaiheessa päästään tarkastelemaan mallin antamia tuloksia (Murphy ym. 2013).



Kuva 1. PARAFAC-analyysin päävaiheet (Murphy ym. 2013).

Riippuen liuenneen orgaanisen aineen laadusta, näkyvät sen eri fluoresoivien komponenttien virittymisen ja emission piikit spektrissä eri alueilla (Taulukko 1). Proteiinin kaltainen alue on pienemmillä aallonpituuksilla, humuksen kaltainen

hieman suuremmilla ja maaperän fulvohapoista johtuva ja planktonperäinen puolestaan suurimmilla aallonpituuksilla (Coble 2007). Virittymisestä ja emissiosta syntyvien piikkien sijainti vaihtelee DOM:n koostumuksen mukaan (Stedmon & Bro 2008). PARAFAC-analyysissä löydettyjä fluoresoivia komponentteja voidaan tulkita esimerkiksi fluoresenssin intensiteetin maksimin (F_{\max}) avulla. F_{\max} -arvo lasketaan kertomalla eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien maksimit jokaiselle komponentille niiden painoarvolla. Saadut intensiteetit ovat tällöin samassa skaalassa kuin alkuperäiset EEM:t (Murphy ym. 2013).

Taulukko 1. Tyypilliset liuenneen orgaanisen aineen alkuperää karakterisoivat eri fluoresoivien komponenttien virittymisen ja emission maksimiaallonpituudet ja/tai aallonpituusalueet (Coble 2007).

Fluoresoiva komponentti	Virittymisen maksimi (nm)	Emission maksimi (nm)
Tyrosiinin ja proteiinin kaltaiset	275	305
Tryptofaanin ja proteiinin kaltaiset	275	340
Humus	260	400-460
Meren humus	290-310	370-410
Humus	320-360	420-460
Maaperän fulvohappo	390	509
Maaperän fulvohappo	455	521
Planktonin tuottama DOM	280	370

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Tutkimusjärvi, sen liuennut orgaaninen aine ja tutkimuksessa käytetyt reagenssit

Tutkimusjärvenä toimi Etelä-Suomessa sijaitseva Valkea-Kotinen (61°14' N, 25°04' E) (Xiao ym. 2016). Kyseessä on luonnontilainen, pääosin havumetsän ympäröimä järvi (Vähätalo ym. 1999; Arvola ym. 2010). Happamassa pintavedessä (pH 5,4) DOC:n konsentraatio on ollut 945 μM , kokonaisraudan 5 μM ja liuennun fosforin 0,16 μM (Keskitalo ym. 1998; Vähätalo ym. 2003; Einola ym. 2011). Suurin osa DOM:sta (75 %) on koostunut humusaineista ja suurista molekyylimassoista (Vogt ym. 2004). DOM:n keskiverto molekyylimassa on ollut 1130 g mol⁻¹ massaspektrometrillä mitattuna ja n. 4000 g mol⁻¹ kokoeksklusiokromatografiolla määritettynä (Vogt et al. 2004).

Vesinäytteet oli otettu 26.10.2012 ja työtä varten oli valmistettu DOM:n perusliuosta Xiao ym. tutkimuksen (2016) mukaisesti. Näytteet oli suodatettu välittömästi 0,45 μm filterillä (AcroPak™1000 capsule, Pall) ja seuraavana päivänä ne oli suodatettu uudestaan 0,2 μm filterillä (Sartobran 300 sterile capsule, Sartorius Stedim) ja niiden pH-arvo oli säädetty n. kahteen 37-prosenttisella HCl-liuoksella (Titrisol, Merck). Näytteet oli säilytetty pimeässä huoneessa 11 °C:ssa. Ennen DOM:n kiinteäfaasiuuttoa näytteisiin oli lisätty NaF-liuosta (0,01 M) Dittmar ym. tutkimuksen (2008) mukaisesti. Fluoridi-ionien odotettiin vaihtuvan raudan tilalle DOM:n ligandeiksi ja vähentävän raudan määrää uutetussa DOM:ssa (Gao & Zepp 1998).

Tässä tutkimuksessa analyysien suorittamista varten tarvittiin useita eri reagensseja, joiden valmistajat ja puhtaudet on koottu seuraavaan taulukkoon 2.

Taulukko 2. Käytettyjen reagenssien valmistajat ja puhtaus.

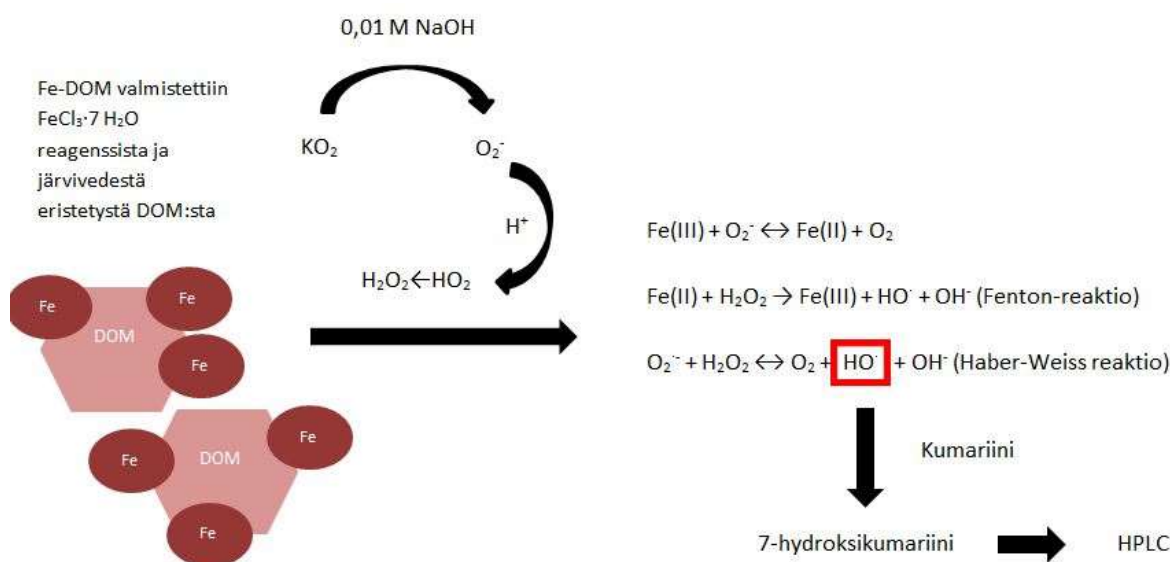
Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus (%)
Kumariini	Sigma-Aldrich	98,0
7-hydroksikumariini	Sigma-Aldrich	98,0
KO ₂	Merck kGaA	90,0
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich	97,0
Na ₂ SO ₄	Riedel-de Haën	99,0
NaHCO ₃	Merck kGaA	99,0
KCl	Merck kGaA	99,5
MgCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck kGaA	99,0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck kGaA	99,0
MnSO ₄ · H ₂ O	Merck kGaA	98,0
NaNO ₃	VWR International	99,7
NH ₄ Cl	Merck kGaA	99,8
GlyP ^{*)}	VWR International	98,0
HCl	Merck kGaA, Titrisol	-
NaOH	Merck kGaA	99,0

*) natriumglyserofosfaatti hydraattina

3.2. Koejärjestely

Tässä tutkimuksessa tarkoituksena oli selvittää raudan ja superoksidin mahdollista vaikutusta liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen (Kuva 2). Reaktion nopeuttamisen vuoksi työssä hyödynnettiin superoksidin lähteenä

kaliumsuperoksidia bakteerien sijasta. Kaliumsuperoksidia voidaan käyttää superoksidin reaktiivisuuden määrittämiseen, koska se on halpa ja suora superoksidin lähde. Syntynyttä hydroksyyliiradikaalia määritettiin HPLC-mittausten avulla kumariinin toimiessa koettimena. Liunneen orgaanisen aineen hajoamista puolestaan mitattiin fluoresenssi- ja absorbanssimittauksilla.



Kuva 2. Rautaa sisältävän DOM-liuoksen (Fe-DOM) reaktiomekanismin tarkastelu HPLC-laitteistolla kumariinin toimiessa koettimena.

Tutkimusliuoksia valmistettiin 20.-21.11.2017 neljää erilaista (Taulukko 3) ja kustakin kolme rinnakkaista liuosta. Ensimmäinen liuos sisälsi DOM-, kumariini- ja KO₂-liuosta sekä keinotekoista järvivettä. Tämän liuoksen avulla pystyttiin tarkastelemaan, vaikuttaako superoksidi yksinään mitenkään hydroksyyliiradikaalien muodostumiseen. Toisessa tutkimusliuoksessa oli näiden edellisten lisäksi vielä Fe-liuosta. Tämän liuoksen avulla nähtiin, onko raudalla yhdessä superoksidin kanssa lisävaikutusta hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen.

Kolmas tutkimusliuos sisälsi DOM-liuosta, kumariinia ja keinotekoista järvivettä. Tämä tutkimusliuos toimi koeasetelmassa kontrolliliuoksena eikä siinä oletettu tapahtuvan tutkittuja reaktioita. Neljäs tutkimusliuos puolestaan sisälsi edellisten

lisäksi vielä rautaa, jolloin nähtiin, pystyykö rauta yksinään ilman superoksidia muodostamaan hydroksyyliiradikaalia.

Taulukko 3. Käytetty koejärjestely: taulukossa rasti kuvaa tutkimusliuokseen lisättyä komponenttia ja viiva poisjätettyä.

Tutkimusliuos	DOM (20 mg l ⁻¹)	Fe (19,7 μM)	Kumariini (10,1 μM)	KO ₂ (13,7 μM)	Keinotekoinen järvivesi (1 ml kutakin liuosta)	Tutkimus- kysymys
DOM + KO ₂	x	-	x	x	x	Superoksidin vaikutus
DOM-Fe + KO ₂	x	x	x	x	x	Superoksidin ja raudan vaikutus
DOM	x	-	x	-	x	Kontrolli
DOM-Fe	x	x	x	-	x	Raudan vaikutus ilman superoksidia

3.3 Analyytiset menetelmät

3.3.1 Analyysissä käytettyjen liuosten valmistus

Analyysissä käytetyt liuokset valmistettiin 14.-16.11.2017. Työn suorittamista varten tarvittiin keinotekoista järvivettä, joka koostui kuudesta eri liuoksesta. Näistä viisi valmistettiin analyysiä varten (Taulukko 4) ja Na₂SiO₃ · 5 H₂O -liuos puolestaan oli valmistettu jo keväällä 2017. Liuoksia säilytettiin kylmiössä ja ne sekoitettiin keinotekoiseksi järvivedeksi vasta ennen niiden lisäämistä tutkimusliuoksiin.

Taulukko 4. Keinotekoisien järviveden valmistamiseen käytetyt reagenssit ja pitoisuudet.

	Liuos	Käytetty reagenssi	Pitoisuus (mM)
		Na_2SO_4	54
1		NaHCO_3	0,048
		KCl	7,9
2		$\text{MgCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	45
		$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	79
3		$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,33
4		NaNO_3	5,0
		NH_4Cl	0,019
5		GlyP ^{*)}	21

*) natriumglyserofosfaatti hydraattina

Valmistetulla $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -liuoksella saatiin lisättyä rautaa osaan tutkimusliuoksista myöhemmässä työvaiheessa. KO_2 -liuosta varten puolestaan tarvittiin 0,05 M NaOH-liuosta, sillä KO_2 -reagenssi liuotettiin siihen. Liuoksen mittapullo oli puhdistettu 2-prosenttisessä typpihappoliuoksessa, ja mittapullo suojattiin valolta folion avulla. Lisäksi työn suorittamista varten tarvittiin 0,1 M HCl-liuosta sekä 1 M ja 0,1 M NaOH-liuosta, joita käytettiin pH-arvojen säätämisessä.

3.3.2 Ferriraudan kompleksointi liuenneeseen orgaaniseen aineeseen

Tutkimusliuosten valmistamiseen käytettiin pH-mittareita (SevenEasy Mettler Toledon sekä PHM 220 Lab pH meter meterlab). Valmistuksessa käytettiin lisäksi apuna byrettiä (Brand bürette digital) ja magneettisekoittajaa. Kaikista tutkimusliuoksista valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä. Tutkimusliuosten pH säädettiin arvoon 5 NaOH- ja HCl-liuosten avulla. Rautaa sisältävissä

tutkimusliuksissa pH-arvo säädettiin kuitenkin ensin tasolle 2, jonka jälkeen lisättiin $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -liuosta.

Tässä alhaisessa pH:ssa Fe(III) esiintyy epäorgaanisena ionina $[\text{Fe}(\text{OH}_2)_6]^{+3}$ kuuden vesimolekyylin koordinoimana. DOM:n pääasialliset sitoutumispaikat eli karboksyyli-ryhmät esiintyvät karboksyylihappoina (R-COOH) eivätkä sido rautaa. Seuraavaksi pH-arvo nostettiin arvoon 5. Kun pH-arvoa nostetaan, karboksyylihapoista tulee karboksylaatti-ryhmiä (R-COO⁻), jotka pystyvät sitomaan ferrirautaa. Samanaikaisesti ferrirauta hydrolysoituu ja siitä tulee oletettavasti $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{OH}_2)_4]^-$, joka sitoutuu karboksyyli-ryhmään, jolloin lopputuloksena on mononukleaarinen varaukseton kompleksi DOM:n kanssa $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{OH}_2)_3(\text{R-COO})]$. Kaikkiin tutkimusliuksiin lisättiin vielä kumariiniliuosta ja tiettyihin lisäksi KO_2 -liuosta, minkä jälkeen pH-arvo säädettiin jälleen tasolle 5.

Kaikkiin tutkimusliuksiin lisättiin 1 ml kutakin keinotekoisesta järveden kantaliuosta. Tämän jälkeen ne sekoitettiin 100 ml:aan ultrapuhdasta vettä ja siirrettiin muovipulloihin. Näissä valmiissa tutkimusliuksissa kumariinin pitoisuus oli 10,1 μM , kaliumsuperoksidin 13,7 μM ja raudan 19,7 μM . Muovipullot peitettiin foliolla ja siirrettiin pimeään huoneeseen. Reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 3 h, 6 h, 20 h, 26 h ja 168 h. HPLC-analyysiä varten otettiin 5 ml kutakin tutkimusliuosta, jotka siirrettiin muovisiin koeputkiin ja laitettiin pakastimeen. Absorbanssi- ja fluoresenssimittauksia varten kutakin tutkimusliuosta siirrettiin 10 ml lasipurkkeihin, jotka peitettiin foliolla ja laitettiin jääkaappiin.

3.3.3 Absorbanssi-mittaukset

Absorbanssi mitattiin tutkimusliuksista, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 3 h, 6 h, 20 h, 26 h ja 168 h. Mittauksiin asti (23.11.2017 ja 168 h -liuokset 29.11.2017) liuoksia säilytettiin jääkaapissa, jolloin reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieneni.

Absorbanssi-mittaukset suoritettiin Perkinin Elmer Lambda UV-Vis -spektrofotometrillä. Asetuksista laitettiin päälle D2 sekä Tungsten lamput. Mittausalue valittiin 700,00 nm:stä 190,00 nm:iin. Datan keruuväliksi asetettiin puolestaan 1,00 nm ja skannausnopeudeksi 266,75 nm.

Kaikissa mittauksissa mitattiin aluksi kolme kertaa ultrapuhdasta vettä, jonka jälkeen tutkimusliuokset mitattiin vuorotellen. Kyvetti asetettiin aina ensimmäiselle valotielle ja toisella valotiellä ei ollut mittausten aikana mitään. Tutkimusliuos lisättiin aina automaattipipetillä kyvettiin ja edellinen tutkimusliuos poistettiin kyvetistä imulla.

Mittausten jälkeen kolmesta ultrapuhdasvesinäytteestä laskettiin keskiarvo kullekin aallonpituudelle. Tämän jälkeen lasketut keskiarvot vähennettiin kunkin aallonpituuden tutkimusliuoksista. Korjaukset laskettiin ottamalla tutkimusliuoksista aallonpituusväliltä 680-700 nm absorptio arvojen keskiarvo, joka vähennettiin tutkimusliuosten absorptioiden arvoista. Laskettiin absorptiokertoimet (Kaava 16) ja poimittiin tutkimusliuosten arvot aallonpituudella 410 nm. Kustakin rinnakkaisesta tutkimusliuoksesta laskettiin keskiarvot, jotta pystyttiin luomaan kuvaaja, jossa absorptiokertoimet voitiin esittää eri ajanhetkillä.

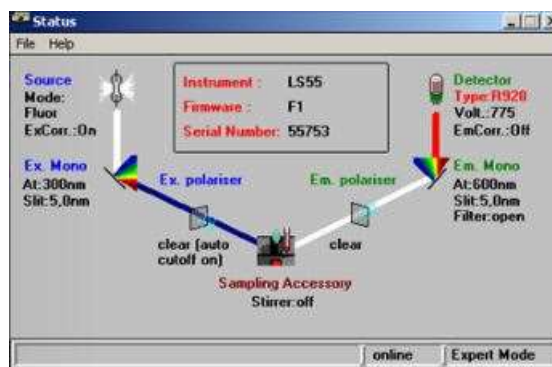
Kulmakertoimen $S_{275-295}$ -arvo laskettiin käyttämällä kaikkia datapisteitä valitulla spektrialueella ja sovittamalla niihin yhtälö 17. Tällöin voitiin luoda kuvaaja, jossa tutkimusliuosten $S_{275-295}$ -arvot olivat kuvattuna eri ajanhetkillä. Kulmakertoimen arvo $S_{350-400}$ laskettiin vastaavasti kuin $S_{275-295}$ arvo. Tällöin voitiin luoda kuvaaja, jossa tutkimusliuosten kulmakertoimien suhde ($S_{275-295} : S_{350-400}$) esitettiin eri ajanhetkillä.

3.3.4 Fluoresenssi-mittaukset

Fluoresenssi mitattiin tutkimusliuoksista, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä viikon eli 168 h. Mittauksiin asti (21.12.2017) liuoksia

säilytettiin jääkaapissa, jolloin reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieni. Tutkimusliuosten lisäksi mitattiin 5.2.2018 pelkästään kumariinia ja 7-hydroksikumariinia sisältävät tutkimusliuokset, jotka oli laimennettu niiden perusliuoksista ultrapuhtaaseen veteen. Kumariiniliuoksen pitoisuus oli 10,13 μM ja 7-hydroksikumariinin 9,93 μM .

Fluoresenssi mitattiin "Steady state spectrofluorometer" -laitteella (Perkin Elmer L555). Laitteessa käytettiin muuten oletusasetuksia, mutta detektorina käytettiin tyypin R928 detektoria ja Em. Mono -kohta säädettiin filter "open" -asentoon (Kuva 3).



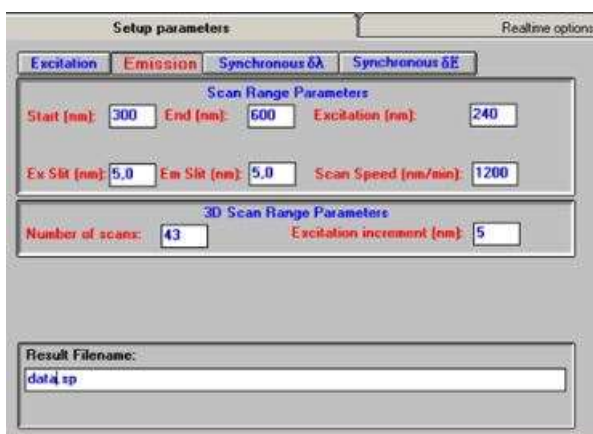
Kuva 3. Fluoresenssilaitteen perusasetukset.

Jokaisella mittauskerralla ennen varsinaisten näytteiden mittaamista mitattiin kolme kertaa ultrapuhdasta vettä laitteen tarkistamiseksi. Tässä vaiheessa laitteen asetukset (Kuva 4) säädettiin siten, että mittausväli oli 310 nm:stä 600 nm:iin, herätevalon aallonpituus oli 300 nm, virittymisen sekä emission kaistan leveys 5,0 nm ja skannausnopeus 300 nm min⁻¹.



Kuva 4. Laitteen tarkistuksen asetukset ultrapuhdasta vettä sisältävillä näytteillä ennen varsinaista tutkimusliuosten mittausta.

Tutkimusliuosten mittauksissa asetukset (Kuva 5) säädettiin siten, että kunkin herätevalon aallonpituudelle emissiota mitattiin 300 nm:sta 600 nm:iin. Herätevalon aallonpituus oli 240 nm, virittymisen ja emission kaistan leveys 5,0 nm ja skannausnopeus puolestaan 1200 nm min⁻¹. 3D-parametreissa skannausten lukumääräksi laitettiin 43 ja virittymisen kasvuksi 5 nm.



Kuva 5. Fluoresenssilaitteen asetukset tutkimusliuosten mittausten aikana.

Varsinaisia mittausliuoksia piti laimentaa laitteen takia, joten 2 ml näytettä laimennettiin aina 8 ml:aan ultrapuhdasta vettä. Tuloksissa tutkimusliuosten konsentraatiot kuitenkin kerrottiin takaisin alkuperäiselle, laimentamista

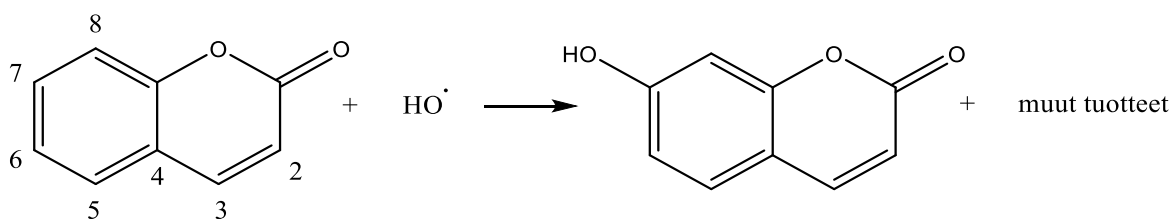
edeltävälle tasolle. Kukin liuos laitettiin kyvetiin aina automaattipipetillä ja edellinen näyte poistettiin kyvetistä imulla.

3.3.5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia -mittaukset (HPLC)

3.3.5.1 Määritysmenetelmän valinta

Viime vuosikymmeninä hydroksyyli-radikaalin havaitsemiseen on käytetty monia fluoresoivia yhdisteitä, kuten tereftaalihappoa (Armstrong ym. 1963) ja bentsoehappoa (Armstrong & Grant 1960). Tässä työssä koettimen tuli täyttää kuitenkin seuraavat ehdot: sen tuli olla vesiliukoinen, se ei saanut olla toksinen eikä toimia ravinnonlähteenä myöhemmissä kokeissa käytettävälle bakteerille. Kumariini täytti kaikki edelliset ehdot, ja sen pitoisuuksia päädyttiin mittaamaan korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC).

Kumariini ei ole fluoresoiva yhdiste, mutta reagoidessaan vesiliuoksessa hydroksyyli-radikaalin kanssa se muodostaa 7-hydroksikumariinia, joka on fluoresoiva (Kuva 6 ja Kaava 18) (Louit ym. 2005; Maezono ym. 2011). Kumariinin käytön etuna on, että 7-hydroksikumariini esiintyy näkyvällä aallonpituusalueella, fluoresenssin maksimin ollessa n. 456 nm. Reaktiossa voi kuitenkin muodostua myös muita hydroksikumariineja (Louit ym. 2005).



Kuva 6. Kumariini reagoi hydroksyyli-radikaalin kanssa muodostaen 7-hydroksikumariinia ja vettä (piirretty "ChemDraw Professional 15.0" -ohjelmalla).



Fluoresenssidetektorilla mitattiin 7-hydroksikumariinin muodostumispitoisuuksia eri tutkimusliuoksissa, minkä lisäksi päädyttiin käyttämään diodirividetektoria

(PDA), jotta pystyttiin tarkastelemaan kumariinin määrää eri liuoksissa. Kolonnina käytettiin käänteisfaasiin perustuvaa "Bridge Columnsin XBridge™ C18 (2,5 µm)" -kolonnia, jossa silikaan oli kiinnitetty alifaattinen C18-ketju. Ajoliuoksina toimivat asetonitriili ja metanolin vesiliuos. Käytössä oli gradienttiajo, jotta liuosten tilavuussuhteita pystyttiin muuttamaan analysoinnin aikana.

3.3.5.2 Hydroksyyliiradikaalin määrän laskeminen

Tokumura ym. tutkimuksen (2011) mukaan reaktiossa mukana olleen hydroksyyliiradikaalin määrä voidaan ratkaista suoraan reaktioyhtälön kertoimien perusteella. Laskuissa tulee kuitenkin huomioida, että kumariinin ja hydroksyyliiradikaalin välinen reaktio tuottaa reaktiotuotteina 7-hydroksikumariinin lisäksi mm. 6-hydroksikumariinia ja 5-hydroksikumariinia (Tokumura ym. 2011). 7-hydroksikumariinin osuus muista hydroksikumariineista on 4,7 % (Burgos Castillo ym. 2018).

Tämän tavan lisäksi hydroksyyliiradikaalin määrää haluttiin tarkastella myös jollakin toisella tavalla. Carenan ym. (2017) tutkimuksessa esiteltyä laskutapaa mukaillen hydroksyyliiradikaalin määrä päätettiin laskea koettimena toimineen kumariinin ja tutkimusliuosten tunnettujen, hydroksyyliiradikaaleja sitovien yhdisteiden ja molekyylien avulla. Tutkimuksessa hydroksyyliiradikaali reagoi kumariinin kanssa tuottaen 7-hydroksikumariinia (Kaava 18). Laskuissa käytettiin edelleen samaa arviota, jonka mukaan 7-hydroksikumariinin osuus muista hydroksikumariineista on 4,7 % (Burgos Castillo ym. 2018).

Tässä määrittävissä toisen asteen reaktionopeusvakion arvona käytettiin arvoa $5,6 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Burgos Castillo ym. 2018). Koska 7-hydroksikumariini voi reagoida edelleen hydroksyyliiradikaalin kanssa, käytettiin tälle reaktiolle toisen asteen reaktionopeusvakion arvoa $6,1 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Payá ym. 1992). Tutkimusliuoksissa käytettiin keinotekoista järvivettä, joka sisälsi epäorgaanisia

suoloja (Taulukko 4) ja DOM:a (20 mg l⁻¹). Hydroksyyliiradikaalin kanssa reagoivina yhdisteinä toimivat tällöin DOM, Cl⁻ ja HCO₃⁻.

7-hydroksikumariinin pitoisuuden muutos reaktioliuoksessa ($R_{7-OH-cou}$) voidaan esittää kaavalla

$$R_{7-OH-cou} = +R_{7-OH-cou} - R_{7-OH-cou}, \quad (19)$$

jossa $+R_{7-OH-cou}$ kuvaa 7-hydroksikumariinin muodostumisnopeutta (mol l⁻¹ s⁻¹) ja $-R_{7-OH-cou}$ 7-hydroksikumariinin hajoamisnopeutta (mol l⁻¹ s⁻¹).

7-hydroksikumariinin muodostumisnopeus kaavassa seitsemän voidaan esittää kaavalla

$$+R_{7-OH-cou} = \frac{+R_{OH}\eta k_{OH,cou}[cou]}{\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])}, \quad (20)$$

jossa R_{OH} on hydroksyyliiradikaalien muodostumisnopeus (mol l⁻¹ s⁻¹), η (0,047) on 7-hydroksikumariinin osuus muista hydroksikumariineista (Burgos Castillo ym. 2018), $k_{OH,cou}$ on toisen asteen reaktionopeusvakio kumariinin ja hydroksyyliiradikaalin väliselle reaktiolle ($5,60 \cdot 10^9$ l mol⁻¹ s⁻¹ (Burgos Castillo ym. 2018)), $[cou]$ on kumariinin konsentraatio (mol l⁻¹), $\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])$ on ensimmäisen kertaluvun reaktionopeusvakio yleisesti kaikille reaktioille hydroksyyliiradikaalin ja yhdisteen j välillä, missä $j[scavj]$ on kunkin hydroksyyliiradikaalin kanssa reagoivan yhdisteen j konsentraatio ja $k_{OH,scavj}$ on niiden ja hydroksyyliiradikaalin välisen reaktion toisen asteen reaktionopeusvakio. $k_{OH,cou} [cou] / \Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])$ esittää siis suhdetta, jolla hydroksyyliiradikaali reagoi kumariinin kanssa tuottaen 7-hydroksikumariinia verrattuna liuoksen kaikkiin hydroksyyliiradikaalia kuluttaviin reaktioihin.

7-hydroksikumariinin hajoamista hydroksyyliiradikaalin kanssa reagoidessaan voidaan kuvata kaavalla

$$-R_{7-OH-cou} = \frac{R_{OH}k_{OH,7-OH-cou}[7-OH-cou]}{\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])}, \quad (21)$$

jossa $k_{OH,7-OH-cou}$ on toisen asteen reaktionopeusvakio 7-hydroksikumariinin ja hydroksyyliiradikaalin väliselle reaktiolle ($6,10 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Payá ym. 1992)) ja $[7-OH-cou]$ on 7-hydroksikumariinin konsentraatio (mol l^{-1}).

Kun kaavat 20 ja 21 sijoitetaan kaavaan 19, saadaan

$$R_{7-OH-cou} = \frac{R_{OH}(\eta k_{OH,cou}[cou] - k_{OH,7-OH-cou}[7-OH-cou])}{\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])}, \quad (22)$$

Hydroksyyliiradikaalin reaktio liuksissa voidaan kuvata ensimmäisen kertaluokan reaktionopeusvakiona, joka summaa kaikki yksittäiset reaktiot:

$$\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj]) = k_{OH,cou}[cou] + k_{OH,7-OH-cou}[7-OH-cou] + k_{DOM,OH}[DOM] + k_{Cl,OH}[Cl^-] + k_{HCO_3^-,OH}[HCO_3^-], \quad (23)$$

jossa $k_{DOM,OH}$ on toisen asteen reaktionopeusvakio DOM:n ja hydroksyyliiradikaalin väliselle reaktiolle ($1,9 \cdot 10^4 \text{ l (mg C)}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Westerhoff ym. 2007), $[DOM]$ on DOM:n konsentraatio (10 mg C l^{-1}), $k_{Cl,OH}$ on toisen asteen reaktionopeusvakio kloridi-ionin ja hydroksyyliiradikaalin väliselle reaktiolle ($9 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, katso s. 12), $[Cl^-]$ on kloridi-ionin konsentraatio ($999 \mu\text{M}$), $k_{HCO_3^-,OH}$ on toisen asteen reaktionopeusvakio bikarbonaatti-ionin ja hydroksyyliiradikaalin väliselle reaktiolle ($8,5 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Buxton ym. 1988)) ja $[HCO_3^-]$ on bikarbonaatti-ionin konsentraatio ($4 \mu\text{M}$).

Kloridi-ionin ja hydroksyyliiradikaalin välinen reaktionopeusvakio riippuu liuoksen happamuudesta (Liao ym. 2001). Hydroksyyliiradikaali reagoi kloridi-ionin kanssa (Kaava 24), jolloin lähtöaineiden ja reaktiotuotteen välille muodostuu

tasapaino. Protonaatioreaktiossa hypokloridihapon anioninen radikaali HOCl⁻ reagoi kloridi-ioniksi ja vedeksi (Kaava 25) (Buxton ym. 1988).



Kaavan 20 reaktio riippuu pH-arvosta: pH-arvon ollessa 7,2 tai enemmän, siirtyy reaktion tasapaino lopputuotteiden puolelle. Toisen asteen reaktionopeusvakio hydroksyyli-radikaalin ja kloridi-ionin väliselle reaktiolle on $4.3 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Buxton ym. 1988) pH:n ollessa 2. Tässä tutkimuksessa pH-arvo oli kuitenkin 5. Aikaisemmassa tutkimuksessa hydroksyyli-radikaalin reaktionopeus n-klooributaanin kanssa 2500 mM Cl-liuoksessa oli 50 kertaa nopeampi pH:ssa 5 kuin pH:ssa 2 (Liao ym. 2001). Tämän perusteella oletetaan, että toisen asteen kertaluvun reaktionopeusvakio kaavalle 12 on 50 kertaa pienempi pH:ssa 5 ($9 \cdot 10^7 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) kuin pH:ssa 2.

Hydroksyyli-radikaali voi myös hapettaa ferrorautaa ferriraudaksi ($k = 3 \cdot 10^8 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Kaava 26). Täten myös rauta reagoi hydroksyyli-radikaalin kanssa (Burgos Castillo ym. 2018), mutta tätä ei ole huomioitu arvossa R_{OH} koska Fe²⁺-konsentraatio ei ole tunnettu.



Hydroksyyli-radikaalin muodostuminen lasketaan kaavan 27 avulla

$$R_{OH} = \quad (27)$$

$$R_{7\text{OH-cou}} = \frac{\Sigma(k_{OH,scavj}[scavj])}{\eta k_{OH,cou}[cou] - k_{OH,7\text{-OH-cou}}[7\text{-OH-cou}]}$$

jossa $R_{7\text{OH-cou}}$ on 7-hydroksikumariinin muodostumisnopeus tietyllä aikavälillä ($\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$), $[cou]$ ja $[7\text{-OH-cou}]$ ovat keskiarvot kumariniin ja 7-hydroksikumariinin konsentraatioista vastaavalla aikavälillä.

3.3.5.3 Metodin testaus

HPLC-ajon metodin testausta varten valmistettiin neljä standardia 20.2.2018. Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin standardit valmistettiin 100 μM perusliuoksista ja liuosten lopullinen konsentraatio oli 10 μM . Kolmas standardi sisälsi 2,5 ml kumariinin 100 μM perusliuosta, 10 ml DOM:n perusliuosta sekä ultrapuhdasta vettä. Neljäs standardi oli vastaava, mutta kumariinin tilalla käytettiin 7-hydroksikumariinia. Standardeja ei suodatettu, koska niissä ei ollut silmämääräisesti havaittavissa partikkeleita.

Standardit siirrettiin vialeihin ja ajettiin HPLC-laitteistolla (Shimadzu, LC-30AD (pump), SIL-30AC (autosampler), RF-20Axs (Fluorescence detector)) käyttäen sekä PDA- että fluoresenssidetektoria. Kolonnina käytettiin Bridge columns XBridge™ C18 2,5 μm kolonnina ja injektio-tilavuutena 5 μl :aa. Ajoliuoksena käytettiin 0,3 % veteen liuotettua metanolia sekä asetonitriiliä. Asetonitriiliä käytettiin ajon eri vaiheissa tietyllä tilavuusprosentilla (Taulukko 5)

Taulukko 5. HPLC-mittauksen gradienttiajo. Eluenttina toimi 0,3 % metanolin vesiliuos.

Asetonitriilin osuus tilavuusprosentteina (%)	Ajon vaihe (min)
10	0,5
45	6,00
75	6,50
75	9,0
10	9,5
10	12,5

Pumpun kokonaisvirtaamaksi asetettiin 0,300 ml min^{-1} . Ensimmäinen detektori oli asetettu havainnoimaan aallonpituuksia 320-450 nm ja toinen 325-455 nm. Kolonniuunin lämpötila oli 30 °C autosamplerin lämpötilan ollessa 4 °C viileämpi.

Tällä mittauksella saatiin selville, voiko metodia käyttää tutkimusliuosten mittaamiseen ja onko injektio-tilavuus sopiva.

Otettiin tutkimusliuokset, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 26 h ja 168 h, sulamaan pakastimesta ja laitettiin ne vialleihin ajoa varten. Mittaukset suoritettiin samalla tavalla kuin standardien mittaukset, mutta detektorina käytettiin vielä tässä metodin varmistusvaiheessa vain fluoresenssidetektoria ja injektio-tilavuutena käytettiin 2,5 µl.

3.3.5.4 Näytteiden ajo

Valmistettiin 21.2.2018 7-hydroksikumariinin standardeja (Taulukko 6) varten 7-hydroksikumariinin 100 µM-perusliuoksesta 7-hydroksikumariinin 10 µM välilaimennos sekoittamalla 10 ml 7-hydroksikumariinia, 40 ml DOM-liuosta ja 50 ml ultrapuhdasta vettä. Muut standardit valmistettiin laimentamalla tästä välilaimennoksesta. 7-hydroksikumariinin standardit siirrettiin ajoon 3 h, 6 h ja 20 h näytteiden kanssa käyttäen pelkkää fluoresenssidetektoria ja injektio-tilavuutena 2,5 µl:aa.

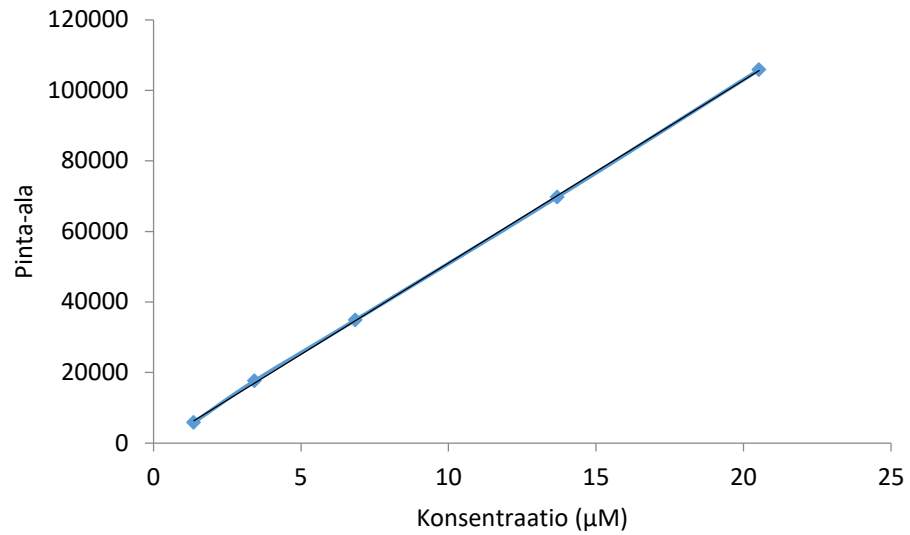
Valmistettiin lisäksi kumariinin standardit (Taulukko 6). 20,53 mg l⁻¹:n näyte valmistettiin lisäämällä 20,5 ml:aa kumariinin 100 µM perusliuosta ja 40 ml DOM-liuosta 100 ml:n mittapulloon ja laimennettiin ultrapuhdalla vedellä. Muut standardit valmistettiin laimentamalla tästä välilaimennoksesta.

Taulukko 6. Standardit 7-hydroksikumariinille ja kumariinille.

7-hydroksikumariinin standardit (μM)	kumariinin standardit (μM)
0,0031	1,37
0,0062	3,42
0,0123	6,84
0,3084	13,69
0,0617	20,53
0,1234	
0,3084	

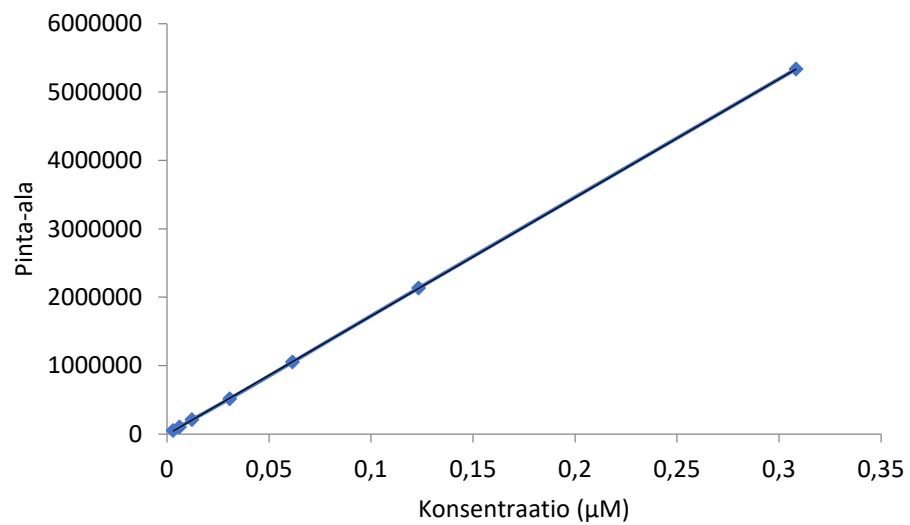
Laitettiin 22.2.2018 7-hydroksikumariinin ja kumariinin standardit sekä kaikki tutkimusliuokset ajoon. Standardeja ja tutkimusliuoksia oli säilytetty ennen ajoa jääkaapissa. Ajossa käytettiin PDA- ja fluoresenssidetektoria sekä injektioilavuutta 5,0 μl . Fluoresenssidetektorilla pystyttiin seuraamaan hydroksyyliiradikaalin muodostumista ja PDA-detektorilla puolestaan kumariinin vähenemistä.

HPLC-mittauksessa saatiin kumariinille standardikäyrä (Kuva 7). Suoran yhtälö oli $y = 5184,5x - 769,3$ ja R^2 -arvo 0,9999.



Kuva 7. Kumariinin standardikäyrä. Suoran yhtälö oli $y = 5184,5x - 769,3$ ja R^2 -arvo 0,9999.

7-hydroksikumariinilla standardikäyrän (Kuva 8) suoran yhtälöksi saatiin $y = 2 \cdot 10^7x - 7768,6$ ja R^2 -arvoksi 1.



Kuva 8. 7-hydroksikumariinin standardikäyrä. Suoran yhtälö oli $y = 2 \cdot 10^7x - 7768,6$ ja R^2 -arvo 1.

4 TULOKSET

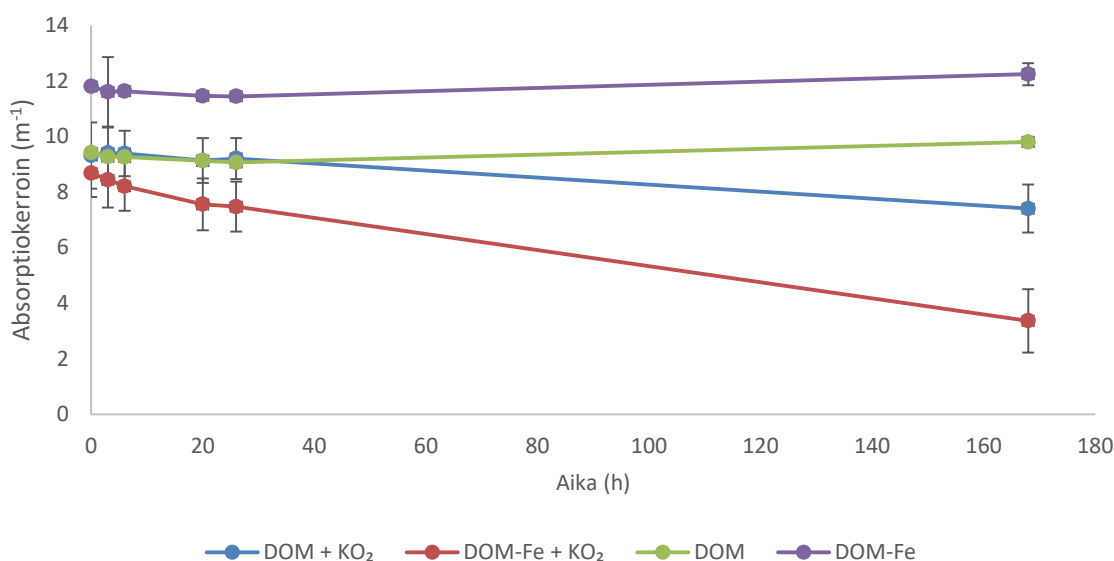
4.1 Superoksidin ja raudan merkitys liuenneen orgaanisen aineen valon absorptioon

Superoksidin ja liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutuneen raudan merkitys CDOM:n absorptiolle saatiin selville kompleksoimalla järvivedestä eristettyyn DOM:iin (20 mg l^{-1}) ferrirautaa ($19,7 \text{ } \mu\text{M}$) keinotekoisessa järvivesimatriisissa (Taulukko 4) sekä kaliumsuperoksidin ($13,7 \text{ } \mu\text{M}$) läsnä ollessa että ilman sitä. Absorbanssi mitattiin tutkimusliuoksista, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 3 h, 6 h, 20 h, 26 h ja 168 h. Mittauksiin asti liuokset olivat 168 h jääkaapissa lukuun ottamatta ajanhetken 168 h -tutkimusliuoksia, jotka olivat jääkaapissa 312 h ennen mittauksia. Jääkaapissa reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieneni.

Koejärjestelyssä asetettujen tutkimuskysymysten mukaisesti "DOM"-käsittelyssä ei pitänyt tapahtua superoksidin tai raudan välittämiä reaktioita. Mittausten perusteella niitä ei tapahtunutkaan, sillä absorptiokertoimen arvoissa ei ollut suurta muutosta eri ajanhetkien välillä (Kuva 9). "DOM + KO_2 " -käsittelyssä tutkittiin superoksidilisäyksen vaikutusta tutkittuihin reaktioihin. Mittausten perusteella superoksidilisäyksellä oli vaikutusta absorptiokertoimen arvoon, sillä arvo laski aikavälillä 26 h -168 h (Kuva 9).

"DOM-Fe"-käsittelyssä tarkasteltiin ferriraudan kompleksoinnin vaikutusta tutkittuihin reaktioihin. Raudan lisäämisellä oli selvästi vaikutusta, koska kontrolliin nähden (käsittely DOM) absorptiokerroin oli suurempi (Kuva 9). Tosin absorptiokertoimen arvossa ei tapahtunut muutoksia eri ajanhetkien välillä.

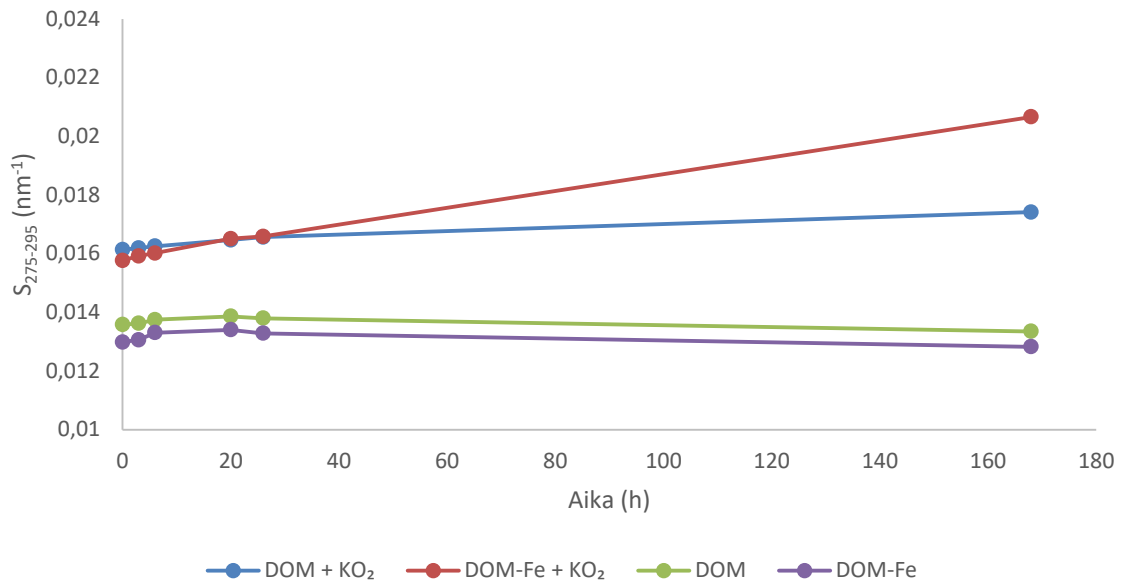
”DOM-Fe + KO₂” -käsittelyssä tutkimuskysymyksenä oli, miten superoksidin lisäys vaikuttaa tutkittuihin reaktioihin, kun liuenneeseen orgaaniseen aineeseen on sitoutuneena ferrirautaa. Tässä tapauksessa ”DOM-Fe”-käsittely toimi pääasiallisena vertailukohteena. Superoksidia sisältäneessä käsittelyssä absorptiokertoimen arvo oli huomattavasti vertailukohdetta pienempi, ja se laski eri ajanhetkien välillä 61 % (Kuva 9). Verrattaessa ”DOM + KO₂” -käsittelyyn vastaava arvo oli 21 %.



Kuva 9. Tutkimusliuosten absorptiokertoimet eri ajanhetkillä aallonpituudella 410 nm. Ajanhetket kuvaavat sitä aikaa, jonka reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa, jolloin reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnat.

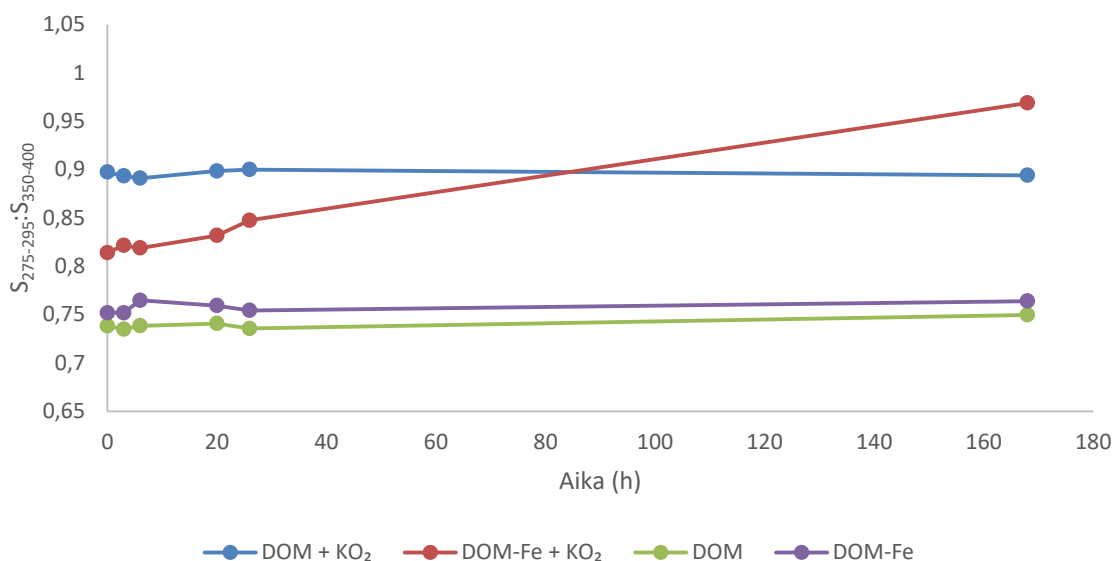
”DOM”-käsittelyssä ei ollut havaittavissa muutosta CDOM:n absorptio kulmakertoimien S₂₇₅₋₂₉₅-arvoissa (Kuva 10). Myöskään ”DOM-Fe”-käsittelyssä kulmakertoimen arvo ei juuri muuttunut eri ajanhetkien välillä (Kuva 10). ”DOM + KO₂” -käsittelyssä kulmakertoimen arvo nousi hieman eri ajanhetkien välillä (Kuva 10). Selkeintä kulmakertoimen nousu oli ”DOM-Fe + KO₂” -käsittelyssä,

jolloin myös absorption väheneminen oli kasvavalla aallonpituudella nopeinta (Kuva 10).



Kuva 10. Tutkimusliuosten CDOM absorption kulmakertoimien $S_{275-295}$ -arvot eri ajanhetkillä. Ajanhetket kuvaavat sitä aikaa, jonka reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa, jolloin reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieneni.

Vastaavat havainnot toistuivat tarkasteltaessa CDOM:n absorption kulmakertoimien suhteita ($S_{275-295}$: $S_{350-400}$) (Kuva 11). "DOM"- ja "DOM-Fe" käsittelyissä kulmakertoimien suhteessa ei tapahtunut muutosta eri ajanhetkien välillä. Myöskään "DOM + KO₂" -käsittelyssä muutosta ei tapahtunut. Sen sijaan "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä käyrä oli selvästi nouseva.



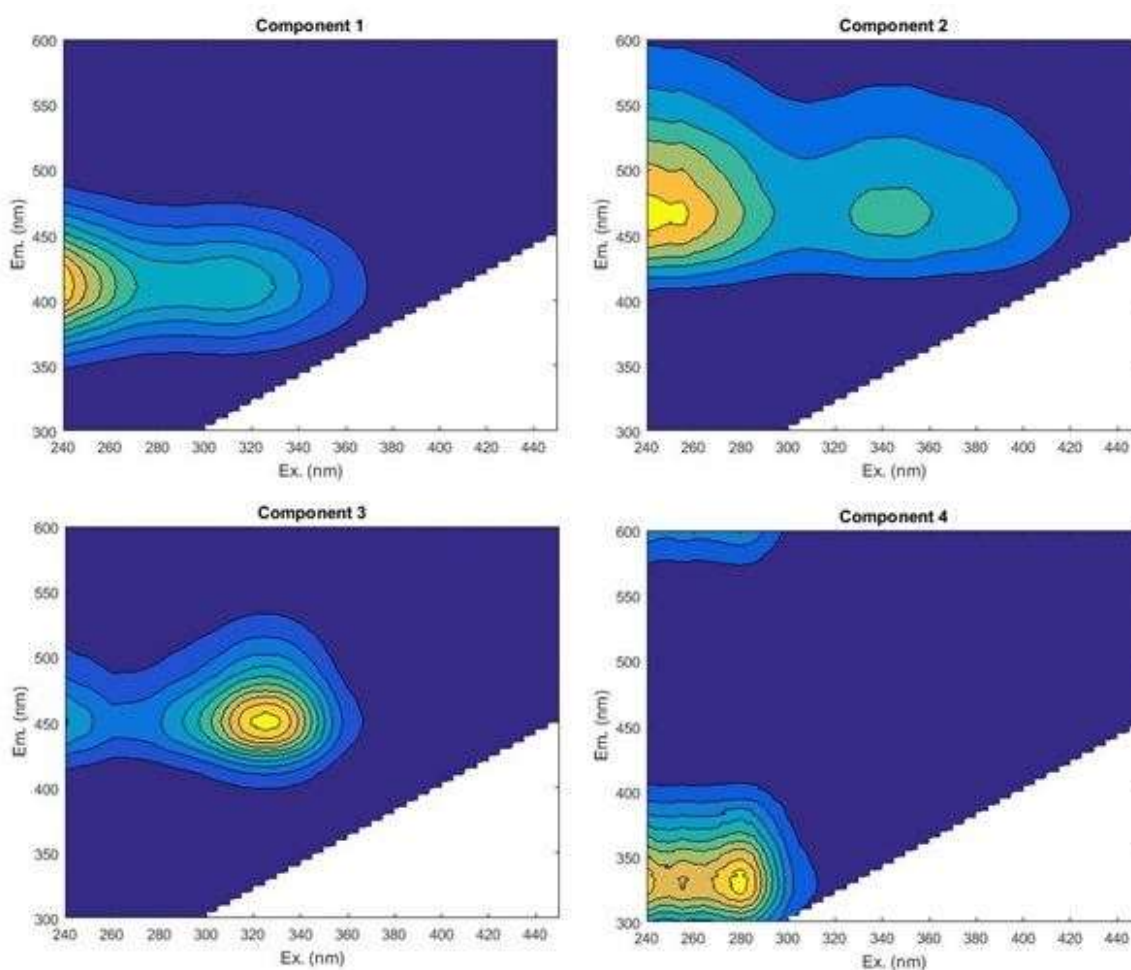
Kuva 11. Tutkimusliuosten CDOM absorption kulmakertoimien suhteiden arvot ($S_{275-295}:S_{350-400}$) eri ajanhetkillä. Ajanhetket kuvaavat sitä aikaa, jonka reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa, jolloin reaktionopeus pieneni.

4.2 Superoksidin ja raudan merkitys liuenteen orgaanisen aineen fluoresenssiin

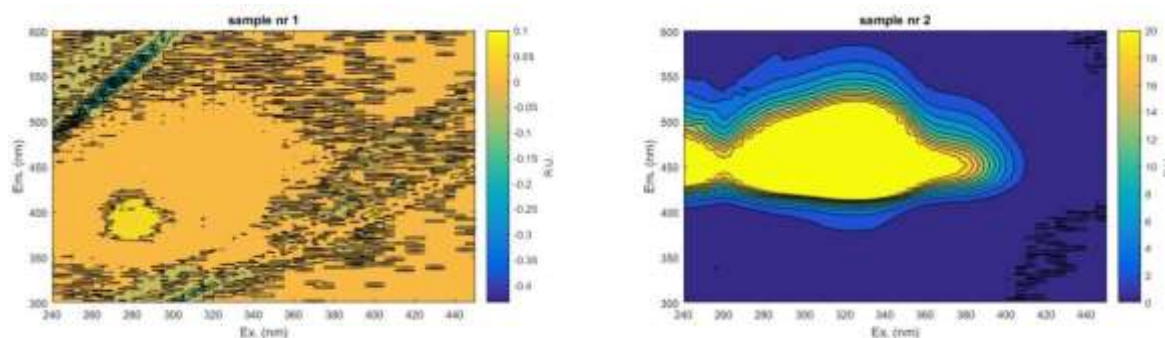
Superoksidin ja raudan merkitystä liuenteen orgaanisen aineen fluoresenssin intensiteettiin tutkittiin EEM-matriisien avulla (ks. 2.2.2.1). Fluoresenssi mitattiin tutkimusliuoksista, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 3 h, 26 h ja 168 h. Mittauksiin asti liuokset olivat jääkaapissa 312-840 h, jolloin reaktiot eivät pysähtyneet, mutta reaktionopeus pieneni.

Fluoresenssimittauksessa saatuja liuosten EEM-matriiseja analysoitiin PARAFAC-analyysin avulla "MATLAB R2015b" -ohjelmistossa. PARAFAC-analyysin avulla selvitetiin, kuinka monta fluoresoivaa komponenttia tutkimusliuokset sisälsivät. Tuloksena löytyi neljä fluoresoivaa komponenttia (Kuva 12). Kaksi komponenteista (Kuva 12 komponentit 1 ja 2) liittyi järveden humus-tyyppiseen aineeseen, sillä virittymisen ja emission aallonpituusalueet osuivat humukselle

ominaiselle aallonpituusalueelle (Taulukko 1). Yksi komponentti liittyi järiveden proteiini-tyyppiseen aineeseen (Kuva 12 komponentti 4), koska se esiintyi proteiinialueella. Yhden komponentin määrittämistä varten mitattiin kumariinin ja 7-hydroksikumariinin fluoresenssi (Kuva 13). Näiden perusteella kumariini ei ollut fluoresoiva yhdiste, kun taas 7-hydroksikumariini puolestaan oli, ja sen virittymisen ja emission aallonpituusalueet vastasivat tätä fluoresoivaa komponenttia (Kuva 12 komponentti 3).

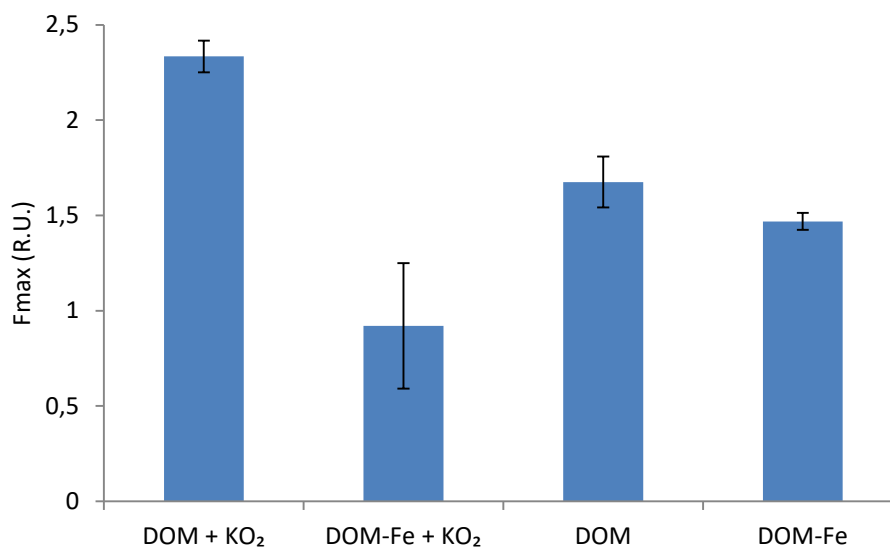


Kuva 12. PARAFAC-analyysin avulla tutkimusliuoksista löydetty neljä fluoresoivaa komponenttia.



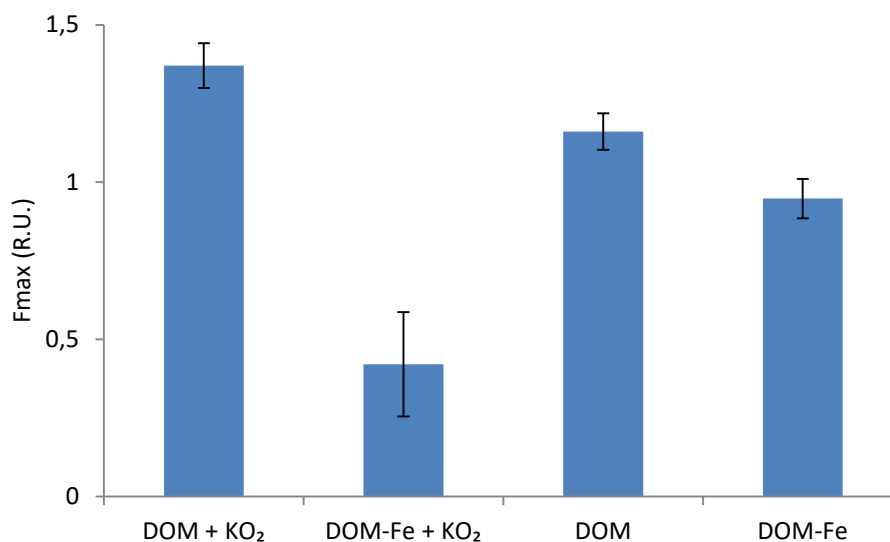
Kuva 13. Kumariinin (vasemmalla) ja 7-hydroksikumariinin (oikealla) viritystilan ja emission piikit. Huomaa noin tuhatkertainen ero osakuvien välillä fluoresenssin intensiteettiä osoittavassa asteikossa. Kumariinin pitoisuus oli $10,1 \mu\text{M}$ ja 7-hydroksikumariinin pitoisuus $9,9 \mu\text{M}$.

Fluoresoivista komponenteista tarkasteltiin lähemmin tutkimusliuoksia, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä 168 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne oli siirretty jääkaappiin, jossa ne olivat 840 h ennen mittauksia. Ensimmäisessä humuksesta johtuvassa komponentissa oli eri käsittelyiden välillä fluoresenssin intensiteetissä eroavaisuuksia (Kuva 14). "DOM + KO_2 " -käsittelyssä F_{max} -arvo oli 2,3 kun taas "DOM-Fe + KO_2 " -käsittelyssä arvo oli huomattavasti pienempi, vain 0,9. "DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyissä F_{max} -arvot eivät eronneet juurikaan toisistaan molempien ollessa luokkaa 1,5.



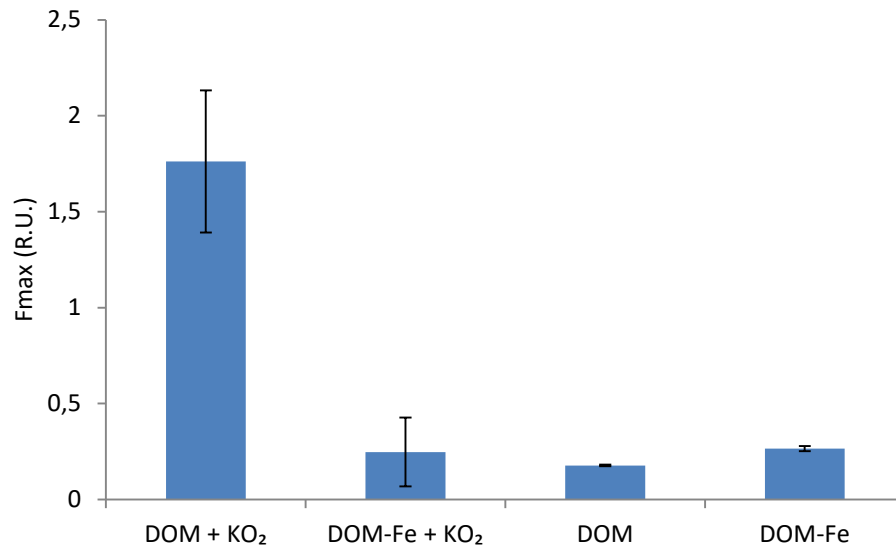
Kuva 14. Humuksesta johtuva fluoresoiva komponentti 1: Rinnakkaisten tutkimusliuosten keskiarvojen F_{\max} -arvot kuvattu ajanhetkellä 168 h. Reaktiot olivat 168 h käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa 840 h, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan.

Toisessa humuksesta johtuvassa komponentissa käsittelyiden väliset erot olivat samankaltaisia komponenttiin 1 verrattuna, mutta raudan sitoutuminen liuenneeseen orgaaniseen aineeseen vähensi sen fluoresenssia (DOM-Fe vs. DOM). (Kuva 15). "DOM + KO₂" -käsittelyssä F_{\max} -arvo oli suurin, 1,4 vaikkakin ero "DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyihin oli nyt paljon pienempi sen ollessa vain 0,2-0,5. "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä F_{\max} -arvo oli edelleen selkeästi pienin, vain 0,4.



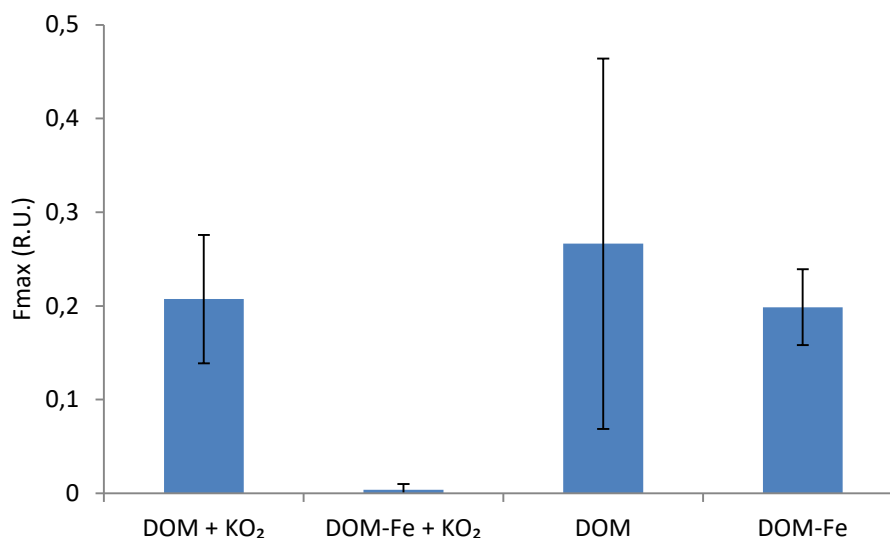
Kuva 15. Humuksesta johtuva fluoresoiva komponentti 2: Rinnakkaisten tutkimusliuosten keskiarvojen F_{\max} -arvot kuvattu ajanhetkellä 168 h. Reaktiot olivat 168 h käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa 840 h, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan.

Kolmannessa fluoresoivassa komponentissa, joka johtui 7-hydroksikumariinista (Kuva 16), F_{\max} -arvoissa oli eroa verrattuna humuksesta johtuviin komponentteihin. "DOM + KO₂" -käsittelyssä F_{\max} -arvo oli 1,7 eli suunnilleen sama kuin edellisissä komponenteissa. Kaikissa muissa käsittelyissä arvot olivat kuitenkin vain n. 0,20.



Kuva 16. 7-hydroksikumariinista johtuva fluoresoiva komponentti 3: Rinnakkaisten tutkimusliuosten keskiarvojen F_{max} -arvot kuvattu ajanhetkellä 168 h. Reaktiot olivat 168 h käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa 840 h, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan.

Neljännessä, proteiinialueen fluoresoivassa komponentissa F_{max} -arvot olivat pienimpiä (Kuva 17). "DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyissä arvot olivat 0,27 ja 0,20. Tosin näistä "DOM"-käsittelyn hajonta oli kolmen rinnakkaisen liuoksen välillä erittäin suurta. "DOM+ KO_2 " -käsittelyssä arvo oli näiden kanssa samaa tasoa, 0,21 ja "DOM-Fe + KO_2 " -käsittelyssä puolestaan 0.



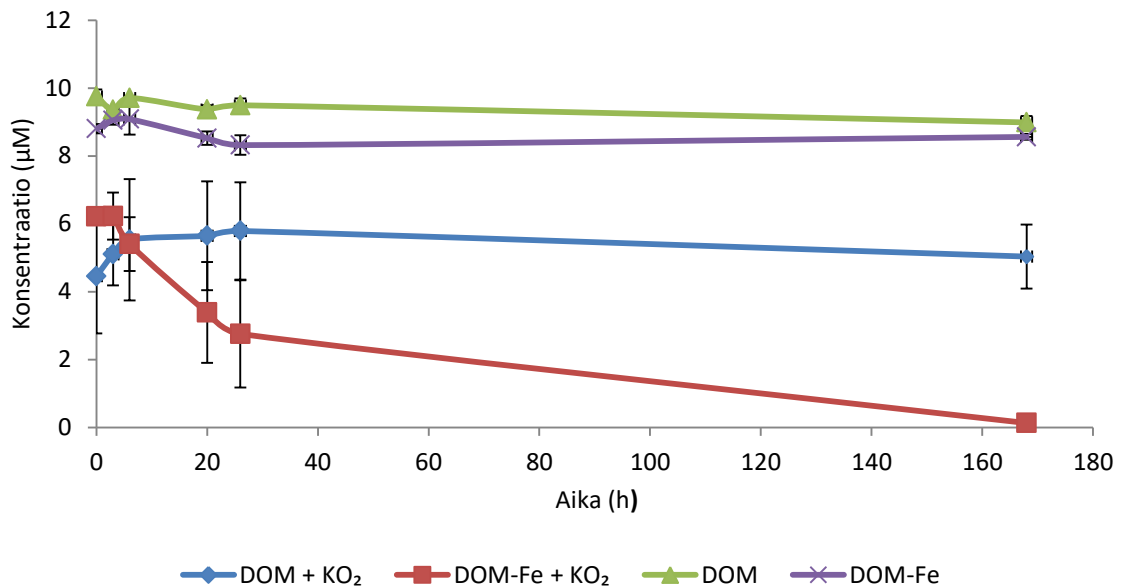
Kuva 17. Proteiinialueesta johtuva fluoresoiva komponentti 4: Rinnakkaisten tutkimusliuosten keskiarvojen F_{\max} -arvot kuvattu ajanhetkellä 168 h. Reaktiot olivat 168 h käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin jääkaapissa 840 h, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan.

4.3 Superoksidin ja raudan vaikutus hydroksyyli-radikaalin muodostumiseen

Superoksidin ja raudan vaikutusta hydroksyyli-radikaalien muodostumiseen tarkasteltiin käyttämällä koettimena kumariinia, joka reagoi hydroksyyli-radikaalin kanssa tunnetulla tavalla. Mittaukset suoritettiin tutkimusliuoksille, joissa reaktiot olivat olleet käynnissä huoneenlämmössä 0 h, 3 h, 6 h, 20 h, 26 h ja 168 h. Mittauksiin asti liuokset olivat pakastimessa, jolloin reaktionopeudet pienenivät. Mittauksissa määritettiin kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuudet eri ajanhetkillä. Jos kumariini oli reagoinut 7-hydroksikumariiniksi, oli reaktiossa muodostunut hydroksyyli-radikaaleja.

"DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyissä ei ollut merkittävää muutosta kumariinin konsentraatioissa eri ajanhetkien välillä (Kuva 18). "DOM + KO_2 " -käsittelyssä kumariinin pitoisuus kasvoi ajanhetkeen 26 h asti, minkä jälkeen sen konsentraatio

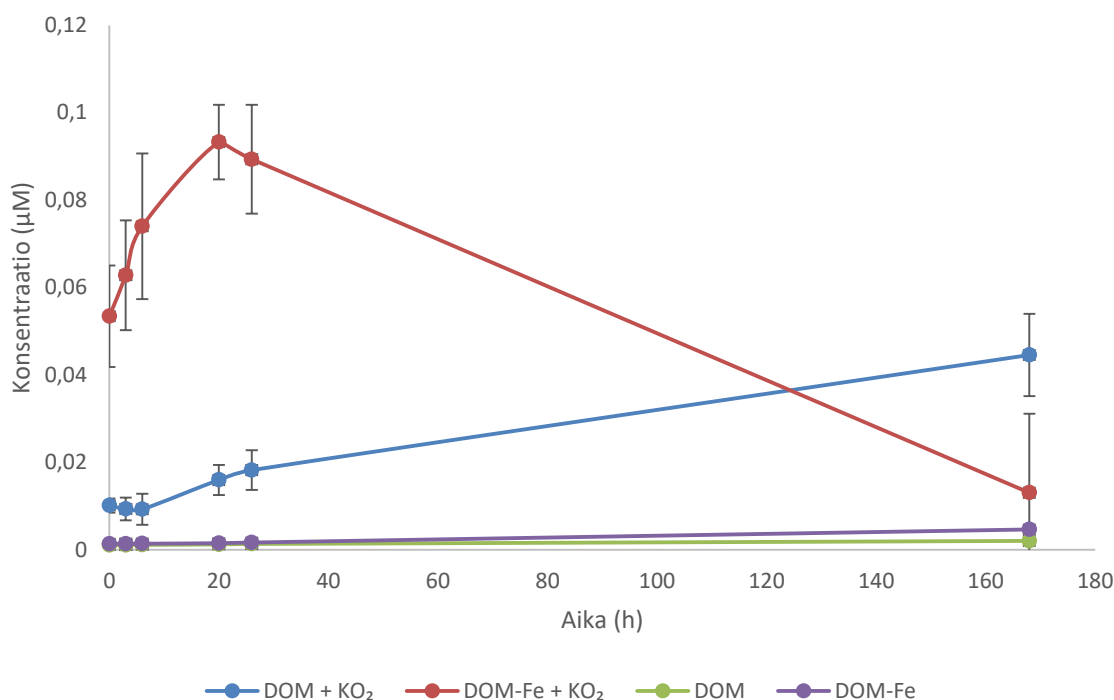
lähti pienen laskuun (Kuva 18). Ottaen huomioon määrittystulosten keskihajonnan, kumariinin pitoisuus ei kuitenkaan muuttunut tilastollisesti merkitsevästi eri näytteenottoaikojen välillä. "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä kumariinin konsentraatio väheni suuresti heti alusta alkaen, ja ajanhetkellä 168 h pitoisuudet ovat jo alle määrittysrajan 0,76 µM (Kuva 18).



Kuva 18. Kumariinin konsentraatio näytteissä eri ajanhetkillä. Ajanhetket kuvaavat sitä aikaa, jonka reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin pakastimessa, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan. Määrittysraja oli 0,76 µM.

"DOM"-käsittelyssä 7-hydroksikumariinin konsentraatio säilyi muuttumattomana ajanhetkeen 26 h asti, sillä pitoisuus oli määrittysrajan 1,8 nM alapuolella (Kuva 19). Sen sijaan 168 h ajanhetken pitoisuudet olivat juuri ja juuri (rinnakkaisten keskiarvo 2,2 nM) määrittysrajan 1,8 nM yläpuolella. Sama toistui "DOM-Fe"-käsittelyssä sillä eroavaisuudella, että ajanhetkellä 168 h pitoisuudet olivat selkeämmin määrittysrajan 1,8 nM yläpuolella (rinnakkaisten keskiarvo 4,7 nM) (Kuva 19).

"DOM + KO₂" -käsittelyssä 7-hydroksikumariinin konsentraatio nousi ajanhetkestä 6 h alkaen (Kuva 19). Ajanhetkellä 168 h kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen pitoisuuksissa oli kuitenkin suuria eroja. Yksi niistä oli määritysrajan 1,8 nM alapuolella. Kahdessa muussa toisen pitoisuus oli 3,7 nM ja toisen puolestaan 34 nM. "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä 7-hydroksikumariinin konsentraatio nousi ajanhetkeen 20 h asti, minkä jälkeen se lähti jyrkkään laskuun (Kuva 19).



Kuva 19. 7-hydroksikumariinin konsentraatio näytteissä eri ajanhetkillä. Ajanhetket kuvaavat sitä aikaa, jonka reaktiot olivat käynnissä huoneenlämmössä. Mittauksiin asti liuoksia säilytettiin pakastimessa, jolloin reaktionopeus pieneni. Virherajat osoittavat kolmen rinnakkaisen tutkimusliuoksen keskihajonnan. Määritysraja oli 1,8 nM.

Reaktioyhtälön 6 mukaan kumariinin reagoidessa hydroksyyliiradikaalin kanssa muodostuu 7-hydroksikumariinia. Koska reaktioyhtälössä kerroin on kaikilla yksi, kertovat mitatut 7-hydroksikumariinin lopulliset pitoisuudet, kuinka paljon hydroksyyliiradikaalia on vähintään pitänyt olla reaktioissa mukana, jotta 7-

hydroksikumariinia on voinut muodostua (Taulukko 7). Hydroksyyliiradikaalia on voinut olla enemmänkin tarjolla, mutta tällöin se on reagoinut joiksikin muiksi reaktiotuotteiksi.

"DOM + KO₂"- ja "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyitä tarkasteltaessa hydroksyyliiradikaalia reagoi huomattavasti suurempia määriä rautaa sisältävässä tutkimusliuoksessa (Taulukko 7). "DOM + KO₂" -käsittelyssä rinnakkaisten tutkimusliuosten hajonta oli 7-hydroksikumariinin konsentraatiossa huomattavan suurta ajanhetkellä 168 h, minkä vuoksi viimeinen arvo ei välttämättä ole aivan oikealla tasolla.

"DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyissä hydroksyyliiradikaalia reagoi 7-hydroksikumariiniksi yli määrittysrajan 1,8 nM ainoastaan 168 h tutkimusliuoksissa. Näissäkin määrittysraja ylittyi vain juuri ja juuri: "DOM"-käsittelyssä 7-hydroksikumariinia syntyi 2,0 nM ja "DOM-Fe"-käsittelyssä puolestaan 4,7 nM. Jos tarkastellaan kvantitointirajaa (18 nM), jäivät 7-hydroksikumariinin pitoisuudet näissä käsittelyissä kvantitointirajan alle. Tämän vuoksi näitä käsittelyjä ei ole tarkasteltu enempää.

Taulukko 7. 7-hydroksikumariiniksi reagoineen hydroksyyliiradikaalin kumulatiivinen pitoisuus (nM) reaktioyhtälön kertoimien perusteella kussakin tutkimusliuoksessa eri ajanhetkillä. Määritysraja oli 1,8 nM.

Aika (h)	Hydroksyyliiradikaalin kumulatiivinen pitoisuus (nM)	
	DOM + KO ₂	DOM-Fe + KO ₂
0	10	53
3	9,4	63
6	9,3	74
20	16	93
26	18	-
168	45*	-

* Rinnakkaisissa tutkimusliuoksissa suuri hajonta 7-hydroksikumariinin pitoisuuksissa.

Kumariini ei reagoi reaktiossa pelkästään 7-hydroksikumariiniksi, ja 7-hydroksikumariinin osuuden on todettu olevan 4,7 % muista hydroksikumariineista (Burgos Castillo ym. 2018). Tämän perusteella laskettiin, kuinka paljon hydroksyyliiradikaalia reagoi kumariinin kanssa (Taulukko 8). "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä hydroksyyliiradikaalia oli syntynyt enemmän verrattuna "DOM + KO₂" -käsittelyyn (Taulukko 8).

Taulukko 8. Kumariinin kanssa reagoineen hydroksyyliiradikaalin kumulatiivinen pitoisuus (nM) olettaen muodostuneen 7-hydroksikumariinin saantoprosentiksi kyseisessä reaktiossa 4,7 %. Määritysraja oli 1,8 nM.

Aika (h)	Hydroksyyliiradikaalin kumulatiivinen pitoisuus (nM)	
	DOM + KO ₂	DOM-Fe + KO ₂
0	2,2 · 10 ²	1,1 · 10 ³
3	2,0 · 10 ²	1,3 · 10 ³
6	2,0 · 10 ²	1,6 · 10 ³
20	3,4 · 10 ²	2,0 · 10 ³
26	3,9 · 10 ²	-
168	9,5 · 10 ^{2*}	-

* Rinnakkaisissa tutkimusliuoksissa suuri hajonta 7-hydroksikumariinin pitoisuuksissa.

Kumariinin kanssa reagoineet hydroksyyliiradikaalit (Taulukko 8) edustavat vain pientä osaa reaktiossa syntyneiden hydroksyyliiradikaalien määrästä. Hydroksyyliiradikaalit reagoivat myös liuenneen orgaanisen aineen, kloridi- ja bikarbonaatti-ionien kanssa (Taulukko 4). Kun edellä mainitut reaktiot otetaan huomioon, voidaan tuotettujen hydroksyyliiradikaalien konsentraatiot laskea eri ajanjaksoille kokeen aikana (Taulukko 9). "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä hydroksyyliiradikaalia syntyi enemmän verrattuna "DOM + KO₂" -käsittelyyn. Pitoisuus myös ylitti sen määrän, mitä tutkimusliuoksiin oli alun perin lisätty superoksidia (13,7 μM).

Taulukko 9. Kumariinin kanssa reagoineen hydroksyyli-radikaalin kumulatiivinen pitoisuus (μM), kun huomioitiin muut hydroksyyli-radikaalin kanssa reagoivat yhdisteet (DOM , Cl^- ja HCO_3^-). Määritysraja oli 1,8 nM.

Aika (h)	Hydroksyyli-radikaalin kumulatiivinen pitoisuus (nM)	
	DOM + KO_2	DOM-Fe + KO_2
0 – 3	1200	8300
3 – 6	840	8200
6 – 26	2400	28000
26 -168	7400*	-

* Rinnakkaisissa tutkimusliuoksissa suuri hajonta 7-hydroksikumariinin pitoisuuksissa.

5 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET

5.1 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksen tulokset osoittavat, että superoksidi aiheuttaa yhdessä liuenneeseen orgaaniseen aineeseen sitoutuneen ferriraudan kanssa reaktioita, jotka muuttavat absorptiospektrin kulmakerrointa, vähentävät humus- ja proteiinityyppisen liuenneen orgaanisen aineen fluoresenssia sekä synnyttävät hydroksyyli-radikaaleja.

5.1.1 Havainnot superoksidin ja raudan vaikutuksesta liuenneen orgaanisen aineen optisiin ominaisuuksiin ja hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen

5.1.1.1 Absorptiokerroin

Liuennutta orgaanista ainetta hajosi silloin, kun liuokseen oli lisättyä rautaa ja superoksidia (Kuva 9 "DOM-Fe + KO₂" -käsittely), mikä tukee tarkastelemaamme reaktioreittiä, jossa superoksidin ja raudan läsnä ollessa syntyy hydroksyyliiradikaaleja Haber-Weiss-reaktiossa (Kuva 2). Hajoamista tapahtui kuitenkin myös liuoksessa, jossa oli superoksidia ilman rautalisäystä (Kuva 9 "DOM + KO₂" -käsittely). Tässä käsittelyssä syntyi siis jotakin reaktioreittiä pitkin hydroksyyliiradikaalia, joka johti liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen.

Yksittäisiä reaktioita hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen "DOM + KO₂" -käsittelyssä on mahdotonta määrittää, koska DOM koostuu tuhansista erilaisista yhdisteistä. Yhtenä mahdollisuutena voidaan kuitenkin pitää käsittelyssä epäpuhtautena esiintynyttä rautaa. Kun DOM:a eristetään järvivedestä, on raudan poistamisen tehokkuus n. 97 % (Xiao ym. 2016), ja jo pienikin määrä rautaa voi katalysoida Fenton- tai Haber-Weiss -tyyppisiä reaktioita. Lisäksi käytetyt kemikaalit ovat voineet sisältää epäpuhtauksina rautaa tai muita metalleja, jotka ovat voineet katalysoida reaktioita.

5.1.1.2 Fluoresenssin intensiteetti

Fluoresenssin intensiteetissä oli eroa eri käsittelyiden välillä (Kuva 14, Kuva 15 ja Kuva 16). Ensimmäisessä ja toisessa humuksesta johtuvassa fluoresoivassa komponentissa (Kuva 14 ja Kuva 15) intensiteetti oli selkeästi pienin "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä, minkä perusteella raudan ja superoksidin välittämät reaktiot ovat johtaneet liuenneen orgaanisen aineen hajoamiseen. "DOM + KO₂" -käsittelyssä intensiteetti oli suurempi verrattuna käsittelyihin ilman superoksidia. Liuoksessa oli tapahtunut reaktioita, jotka kasvattivat humuskomponenttien fluoresenssia.

7-hydroksikumariinista johtuvassa fluoresoivassa komponentissa fluoresenssin intensiteetti oli hyvin pieni "DOM"- ja "DOM-Fe"-käsittelyissä (Kuva 16). Tämä selittyy kumariinin (Kuva 18) ja 7-hydroksikumariinin (Kuva 19) pitoisuuksilla, sillä kumariinin hajoamista ja 7-hydroksikumariinin muodostumista ei juuri tapahtunut kyseisissä käsittelyissä. "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä intensiteetti oli matala (Kuva 16), sillä kumariini ja 7-hydroksikumariini kuluivat reaktiossa loppuun (Kuva 18 ja Kuva 19). "DOM + KO₂" -käsittelyssä fluoresenssin intensiteetti oli puolestaan edelleen korkea (Kuva 16).

5.1.1.3 Hydroksyyliiradikaalin muodostuminen

Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuudet eivät juuri muuttuneet käsittelyissä ilman superoksidia (Kuva 18 ja Kuva 19). "DOM + KO₂" -käsittelyssä kumariinin pitoisuus ei keskihajonnan perusteella muuttunut tilastollisesti merkitsevästi eri näytteenottoaikojen välillä, mutta 7-hydroksikumariinin pitoisuus puolestaan nousi (Kuva 18 ja Kuva 19). "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä kumariini pääsi kulumaan reaktiossa loppuun (Kuva 18). 7-hydroksikumariinia muodostui ajanhetkeen 20 h saakka, mutta ajanhetkellä 168 h 7-hydroksikumariinin pitoisuus oli jo hyvin alhainen (Kuva 19). Alhainen pitoisuus voi johtua siitä, että hydroksyyliiradikaali reagoi sekä kumariinin että 7-hydroksikumariinin kanssa pienentäen niiden pitoisuuksia.

Kumulatiivisten pitoisuuksien perusteella hydroksyyliiradikaalia muodostui "DOM + KO₂" -käsittelyssä, vaikkakin paljon vähemmän kuin "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä (Taulukko 7 ja Taulukko 8) Kun otettiin huomioon muut hydroksyyliiradikaalin kanssa reagoivat yhdisteet, muodostui hydroksyyliiradikaalia edelleen eniten "DOM-Fe + KO₂" -käsittelyssä (Taulukko 9). Hydroksyyliiradikaalia syntyi enemmän kuin tutkimusliuokseen alun perin lisättiin superoksidia, minkä perusteella superoksidia on pitänyt muodostua jotakin toista reaktioreittiä pitkin lisää.

5.1.2 Tutkittu reaktioreitti

Tämän työn tulosten pohjalta voidaan todeta, että rauta toimi yhdessä superoksidin kanssa liuenneen orgaanisen aineen hajoamista edistävänä tekijänä. Superoksidi puolestaan vähensi CDOM-absorptiota, mutta lisäsi humuskomponenttien fluoresenssia. Rautaa sisältävissä liuoksissa havaittiin enemmän hydroksyyli-radikaaleja kuin pelkkää superoksidia sisältävissä liuoksissa. Tämän perusteella katalyyttinä toimi rauta, jolloin kyse olisi Haber-Weiss-reaktiosta.

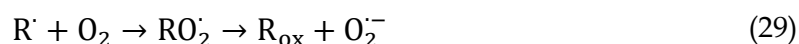
Kirjallisuuden perusteella superoksidin ja liuenneen orgaanisen aineen väliltä on löydetty merkittävä reaktio, jossa liuenneen orgaanisen aineen kinoni-ryhmät katalysoivat superoksidin muodostumista (Goldstone & Voelker 2000). Myöhemmässä tutkimuksessa, jossa on tutkittu Eteläisen jäämeren näytteitä, huomattiin kuitenkin, että superoksidin ja DOM:n väliset reaktiot eivät olleet niin merkittäviä, vaan dismutaatioreaktio oli niissä dominoivampi. Kyseisessä tutkimuksessa metallien vaikutus reaktioihin oli poistettu DTPA:n (dietyleenitriamiinipentaetikkahappo) avulla (Heller & Croot 2010).

Metallien lisäämisen osaksi DOM:n ja superoksidin välisiä reaktioita on todettu nopeuttavan superoksidin hajoamista: Kun DOM:a ja superoksidia sisältäneisiin Eteläisen jäämeren vesinäytteisiin lisättiin pieniä määriä rautaa tai kuparia, huomattiin, että metallien kelaatio nousi tärkeäksi tekijäksi superoksidin reaktiivisuuden säätelyssä (Heller & Croot 2010). Superoksidilla onkin todettu olevan tärkeä rooli raudan kierrossa, sillä se pystyy toimimaan reaktioissa sekä hapettajana että pelkistäjänä (Rose & Waite 2002). Ferrikompleksi pelkistyy suoraan ferrokompleksiksi, joka saattaa vielä hapettua uudelleen ennen kuin se tuottaa vapaata ferrorautaa (Rose & Waite 2005).

Hydroksyyli-radikaalin muodostumista fotokemiallisesti on tutkittu paljon. Raudan läsnä ollessa foto-Fenton-reaktion uskotaan olevan tärkein hydroksyyli-radikaalin lähde, joka voi vaikuttaa lopulta orgaanisten yhdisteiden

hajoamiseen luonnonvesissä (Southworth & Voelker 2003). Tutkimuksia on kuitenkin toteutettu myös ilman fotokemiallisia reaktioita. Eräässä tutkimuksessa tarkasteltiin rautaa pelkistävän "*Shewanella oneidensis*" -bakteerin vaikutusta hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen (Grossman & Kahan 2016). Tutkimuksessa käytettiin neutraalia pH-arvoa ja ympäristölle tyypillisiä raudan ja vetyperoksidin pitoisuuksia. Tuloksena huomattiin hydroksyyliiradikaalin muodostumisen olevan nopeampaa, kun rauta esiintyi ferrorautana eikä ferrirautana. Lisäksi vetyperoksidin konsentraation ja bakteerien määrän todettiin vaikuttavan lineaarisesti hydroksyyliiradikaalin muodostumiseen. Bakteerien ajaman Fenton-kemian todettiin myös vaikuttavan aromaattisten saasteiden hajoamiseen (Grossman & Kahan 2016). Tutkimuksen tulokset tukevat tässä tutkimuksessa kiinnostuksen kohteena ollutta reaktioreittiä.

Tässä työssä alun perin lisätty kaliumsuperoksidi ei pysty kuitenkaan selittämään tuotetun hydroksyyliiradikaalin määrää. Tällöin hydroksyyliiradikaalien sisältämän hapen on pitänyt tulla reaktioon jostakin muualta. Yksi selitys voi olla hydroksyyliiradikaalin ja liuenneen orgaanisen aineen (R-H) välinen reaktio, joka voi johtaa orgaanisen radikaalin (R[•]) syntymiseen (Kaava 28). Reaktiossa hydroksyyliiradikaali reagoi liuenneen orgaanisen aineen vetyatomien kanssa muuttuen vedeksi. Tällöin liuenneelle orgaaniselle aineelle jää pariton elektroni. Veteen liennut happi voi tämän parittoman elektronin avulla pelkistyä ja hapettaa liennutta orgaanista (R_{ox}) ainetta synnyttäen superoksidia (Kaava 29). Ilmakehästä voi liueta lisää happea veteen, jolloin tämä reaktio hajottaa liennutta orgaanista ainetta.



Päiväntasaajan alueen Tyynellämerellä suoritetussa tutkimuksessa on havaittu superoksidin hajoamisen olevan odotettua hitaampaa. Tämän uskottiin johtuvan metallien kompleksoitumisesta. Suuremmat metallien konsentraatiot tai vapaina

metalli-ioneina esiintyvät metalli-ionit olisivat todennäköisesti lisänneet reaktionopeutta (Rose ym. 2008). Meriveden ja makean veden välillä onkin havaittu suuria eroja DOM:n hajoamiseen kuluva ajassa. Meressä niukasti rautaa sisältävän CDOM:n kiertoon on todettu kuluvan aikaa 634 vuotta (Catalá ym. 2015), kun taas Ruotsin järvissä rautaa ja humustyyppistä DOM:a sisältävän CDOM:n kiertoon vastaava aika on vain 2,5 vuotta (Algesten ym. 2003; Weyhenmeyer ym. 2014). Näitä lukuja ei voida verrata suoraan keskenään, sillä Ruotsin järvissä kierto sisälsi lisäksi sedimentaatiota ja ftohajoamista, vaikka ftohajoaminen kattaakin vain alle 10 % orgaanisen hiilen hajoamisesta (Koehler ym. 2014). Tästä huolimatta rautaa sisältävässä makeassa vedessä hajoaminen on selvästi nopeampaa kuin niukasti rautaa sisältävässä merivedessä (Algesten ym. 2003; Catalá ym. 2015).

Kiinnostuksen kohteena olevaa reaktioreittiä ei ole erityisemmin tutkittu makeissa vesissä, mutta joitakin havaintoja raudan mahdollisesta vaikutuksesta on kuitenkin tehty. Liunneen orgaanisen aineen hajoamisessa havaittiin muutoksia, kun järiveden viipymän vuoksi sen rautapitoisuus laski tutkimuksissa, joissa tarkkailtiin humuspitoisten järvien veden väriä Ruotsissa (Köhler ym. 2013; Weyhenmeyer ym. 2014). Makeissa vesissä raudan pitoisuuksien on todettu myös olevan paljon suurempia kuin merivesissä: raudan liukoisuus meriveteen on n. nM-luokkaa (Boyd & Ellwood 2010), kun taas makeissa vesissä vastaava suuruusluokka on ollut keskimäärin 29 μM (Xiao ym. 2015).

Koska liunneen orgaanisen aineen hajoamisnopeudet sekä merien ja makeiden vesien olosuhteet (raudan ja liunneen orgaanisen aineen määrä) eroavat suuresti toisistaan, ei tämän tutkimuksen tuloksia voida verrata suoraan merivesissä tehtyihin tutkimuksiin. Tämän vuoksi tästä aiheesta tarvittaisiin lisää makeassa vedessä suoritettuja tutkimuksia. Monet merivesitutkimukset myös keskittyivät fotokemiallisiin reaktioihin, joissa superoksidia syntyy CDOM:n fotolyysissä ja syntynyt superoksidi reagoi CDOM:n tai metallien kanssa muodostaen vetyperoksidia (Heller & Croot 2010b). Monissa koejärjestelyissä superoksidi

kuitenkin lisättiin esimerkiksi juuri kaliumsuperoksidina näytteisiin (mm. Heller & Croot 2010a, b), kuten tässäkin tutkimuksessa. Merivesitutkimukset osoittavatkin, että liunneen orgaanisen aineen, superoksidin ja raudan välillä tapahtuu tiettyjä reaktioita ja tämän tutkimuksen tulokset antavat viitteitä vastaavalle reaktioreitille. Reaktioreitti saattaa siis olla molemmissa ympäristöissä sama, vaikka reaktioihin kuluvat ajat poikkeavatkin toisistaan.

5.2 Johtopäätökset

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, pystyykö bakteerien solun ulkopuolelle tuottama superoksidi hajottamaan liuennutta orgaanista ainetta raudan katalysoimana. Kokeet suoritettiin järvidesimatriisissa, joka vastasi monien boreaalisten vesistöjen happamuutta sekä liunneen orgaanisen aineen ja raudan määrää. Rauta oli koejärjestelyssä sitoutuneena liunneeseen orgaaniseen aineeseen, mikä on tyypillistä järvissä ja joissa. Lisätty kaliumsuperoksidi tuotti hydroksyyliiradikaaleja, jotka hajottivat liuennutta orgaanista ainetta. Tulokset antavat viitteitä siihen, että bakteerienkin tuottama superoksidi voi hajottaa liuennutta orgaanista ainetta samaan tapaan kuin tässä työssä havaittiin.

Luonnonvesissä mikrobit tuottavat superoksidia noin $2 \mu\text{M d}^{-1}$ (Zhang ym. 2016). Tässä työssä kaliumsuperoksidia lisättiin kuitenkin seitsemän kertaa enemmän kuin mikrobit voivat päivässä tuottaa. Tulevissa tutkimuksissa olisikin syytä selvittää, aiheuttavatko mikrobien aikaansaamat tuotantonopeudet vastaavaa orgaanisen aineen hajoamista kuin tässä tutkimuksessa havaittiin.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani yliopiston lehtori Anssi Vähätaloa ja post-doc tutkija Yihua Xiaoa mahdollisuudesta tehdä tämä pro gradu -tutkielma sekä kaikesta

heidän tarjoamastaan avusta. Lisäksi haluan kiittää laboratorioinsinööri Hannu Pakkasta ja laboratorioteknikko Emma Pajusta kaikesta avusta HPLC-laitteiston kanssa sekä laboratorioteknikko Mervi Koistista kaikesta yleisestä avustuksesta laboratoriossa. Perheeni ja läheiseni ansaitsevat myös lämpimät kiitokset kaikesta tuesta ja kannustuksesta, mutta erityisesti haluan kiittää avopuolisoani Sasu Jaakkolaa sekä ystäviäni Teemu Mäkelää ja Ilona Nummista.

KIRJALLISUUS

- Aiken G.R., Thurman E.M., Malcolm R.L. & Walton H.F. 1979. Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. *Anal. Chem.* 51: 1799–1803.
- Algesten G., Sobek S., Bergström A.-K., Ågren A., Tranvik L.J. & Jansson M. 2003. Role of lakes for organic carbon cycling in boreal zone. *Global Change Biology* 10: 141–147.
- Amon R.M.W. & Benner R. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 41: 41–51.
- Armstrong W.A., Facey R.A., Grant D.W. & Humphreys W.G. 1963. A tissue-equivalent chemical dosimeter sensitive to 1 rad. *Can. J. Chem.* 41: 1575–1577.
- Armstrong W.A. & Grant D.W. 1960. The aqueous benzoate system as a sensitive dosimeter for ionizing radiations. *Can. J. Chem.* 38: 845–850.
- Arnosti C. 2004. Speed bumps and barricades in the carbon cycle: substrate structural effects on carbon cycling. *Marine Chemistry* 92: 263 – 273.
- Aruoma O.I. 1994. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology* 233: 57–66.
- Arvola L., Rask M., Ruuhijärvi J., Tulonen T., Vuorenmaa J., Ruoho-Airola T. & Tulonen J. 2010. Long-term patterns in pH and colour in small acidic boreal lakes of varying hydrological and landscape settings. *Biogeochemistry* 101: 269–279.
- Babior B.M. 2000. The NADPH Oxidase of Endothelial Cells. *IUBMB Life* 50: 267–269.
- Babior B., Lambeth J.D. & Nauseef W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397: 342–344.

- Bartosz G. 2006. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta* 368: 53–76.
- Behar D., Czapski G., Rabani J., Dorfman L.M. & Schwarz H.A. 1970. The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *Journal of Physical Chemistry* 74: 3209–3213.
- Benner R., Biddanda B., Black B. & McCarthy M. 1997. Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Mar. Chem.* 57: 243–263.
- Bielski B.H.J., Cabelli D.E., Arudi R.L. & Ross A.B. 1985. Reactivity of HO₂/O₂⁻ Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14: 1041.
- Bolann B.J. & Ulvik R.J. 1991. Improvement of a Direct Spectrophotometric Assay for Routine Determination of Superoxide Dismutase Activity. *Clin. Chem.* 37: 1993.
- Boyd P.W. & Ellwood M.J. 2010. The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nature Geoscience* 3: 675–682.
- Braslavsky S.E. 2007. Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl. Chem.* 79: 293–465.
- Brown M. 1977. Transmission spectroscopy examinations of natural waters: C. Ultraviolet spectral characteristics of the transition from terrestrial humus to marine yellow substance. *Estuarine and Coastal Marine Science* 5: 309–317.
- Burgos Castillo R.C., Fontmorin J.-M., Tang W.Z., Dominguez-Benetton X. & Sillanpää M. 2018. Towards reliable quantification of hydroxyl radicals in the Fenton reaction using chemical probes. *RSC Advances* 8: 5321–5330.
- Burns J.M., Cooper W.J., Ferry J.L., King D.W., DiMento B.P., McNeill K., Miller C.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.
- Buxton G. V, Greenstock C.L., Helman W.P. & Ross A.B. 1988. Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals (OH/O⁻) in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17: 513–886.
- Carder K.L., Steward R.G., Harvey G.R. & Ortner P.B. 1989. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. *Limnol. Oceanogr.* 34: 68–81.
- Carena L., Minella M., Barsotti F., Brigante M., Milan M., Ferrero A., Berto S., Minero C. & Vione D. 2017. Phototransformation of the Herbicide Propanil in Paddy Field Water. *Environmental Science and Technology* 51: 2695–2704.
- Catalá T.S., Reche I., Alvarez M., Khatiwala S., Guallart E.F., Benítez-Barrios V.M., Fuentes-Lema A., Romera-Castillo C., Nieto-Cid M., Pelejero C., Fraile-Nuez E.,

- Ortega-Retuerta E., Marrasé C. & Alvarez-Salgado X.A. 2015. Water mass age and aging driving chromophoric dissolved organic matter in the dark global ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 29: 917–934.
- Chen Y., Senesi N. & Schnitzer M. 1977. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 352–358.
- 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.
- Coble P.G. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51: 325–346.
- Coble P.G. 2007. Marine Optical Biogeochemistry: The Chemistry of Ocean Color. *Chem. Rev.* 107: 402–418.
- Cotner J. B. & Heath R.T. 1990. Iron redox effects on photosensitive phosphorus release from dissolved humic materials. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1175–1181.
- De Haan H. & De Boer T. 1987. Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic Lake Tjeukemeer. *Water Research* 21: 731–734.
- Diaz J.M., Hansel C.M., Voelker B.M., Mendes C.M., Andeer P.F. & Zhang T. 2013. Widespread Production of Extracellular Superoxide by Heterotrophic Bacteria. *Science* 340.
- Dittmar T., Koch B., Hertkorn N. & Kattner G. 2008. A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 230–235.
- Dittmar T., Lara R.J. & Kattner G. 2001. River or mangrove? Tracing major organic matter sources in tropical Brazilian coastal waters. *Mar. Chem.* 73: 253–271.
- Einola E., Rantakari M., Kankaala P., Kortelainen P., Ojala A., Pajunen H., Makela S. & A.L. 2011. Carbon pools and fluxes in a chain of five boreal lakes: A dry and wet year comparison. *J. Geophys. Res.* 116.
- Gao H. & Zepp R.G. 1998. Factors influencing photoreactions of dissolved organic matter in a coastal river of the southeastern United States. *Environmental Science and Technology* 32: 2940–2946.
- Goldstone J.V. & Voelker B.M. 2000. Chemistry of Superoxide Radical in Seawater: CDOM Associated Sink of Superoxide in Coastal Waters. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1043–1048.
- Grossman J.N. & Kahan T.F. 2016. Hydroxyl radical formation from bacteria-assisted Fenton chemistry at neutral pH under environmentally relevant conditions. *Environmental Chemistry* 13: 757–766.

- Hansel D.A. & Carlson C. 2002. *Biochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* Hansel D.A. & Carlson C. (eds.). Academic Press, Elsevier.
- Heller M.I. & Croot P.L. 2010a. Superoxide Decay Kinetics in the Southern Ocean. *Environ. Sci. Technol.* 44: 191–196.
- Heller M.I. & Croot P.L. 2010b. Kinetics of superoxide reactions with dissolved organic matter in tropical Atlantic surface waters near Cape Verde (TENATSO). *Journal of Geophysical Research: Oceans* 115: 1–13.
- Helms J.R., Stubbins A., Ritchie J.D., Minor E.C., Kieber D.J. & Mopper K. 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr* 53: 955–969.
- Hessen D. & Tranvik L. (ed.). 1998. *Aquatic Humic Substances*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Housecroft C.E. & Sharpe A.G. (eds.). 2012. *Inorganic Chemistry*. Pearson Education Limited, Harlow.
- Kearns D.R. 1971. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chemical Reviews* 71: 395–427.
- Kehrer J.P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 43–50.
- Keskitalo J., Salonen K. & Holopainen A.L. 1998. Long-term fluctuations in environmental conditions, plankton and macrophytes in a humic lake, Valkea-Kotinen. *Boreal Environment Research* 3: 251–262.
- Kim J.K. & Metcalfe I.S. 2007. Investigation of the generation of hydroxyl radicals and their oxidative role in the presence of heterogeneous copper catalysts. *Chemosphere* 69: 689–696.
- Kim S., Simpson A.J., Kujawinski E.B., Freitas M.A. & Hatcher P.G. 2003. High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C18 solid phase disk. *Org. Geochem.* 34: 1325–1335.
- Koehler B., Landelius T., Weyhenmeyer G.A., Machida N. & Tranvik L.J. 2014. Sunlight-induced carbon dioxide emissions from inland waters. *Global Biogeochemical Cycles* 28: 696–711.
- Kritzberg E.S. & Ekström S.M. 2012. Increasing iron concentrations in surface waters - A factor behind brownification? *Biogeosciences* 9: 1465–1478.
- Kritzberg E.S., Villanueva A.B., Jung M. & Reader H.E. 2014. Importance of boreal rivers in providing iron to marine waters. *PLoS ONE* 9.
- Köhler S.J., Kothawala D., Futter M.N., Liungman O. & Tranvik L. 2013. In-Lake

- Processes Offset Increased Terrestrial Inputs of Dissolved Organic Carbon and Color to Lakes. *PLoS ONE* 8: 1–12.
- Lara R.J. & Thomas D.N. 1994. XAD-fractionation of ‘new’ dissolved organic matter: is the hydrophobic fraction seriously underestimated? *Mar. Chem.* 47: 93–96.
- Leenheer J.A., Brown G.K., Maccarthy P. & Cabaniss S.E. 1998. Models of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. *Environmental Science and Technology* 32: 2410–2416.
- Liao C.H., Kang S.F. & Wu F.A. 2001. Hydroxyl radical scavenging role of chloride and bicarbonate ions in the H₂O₂/UV process. *Chemosphere* 44: 1193–1200.
- Louit G., Foley S., Cabillica J., Coffigny H., Taran F., Valleix A., Renault J.P. & Pin S. 2005. The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography. *Radiation Physics and Chemistry* 72: 119–124.
- Lu C., Song G. & Lin J.M. 2006. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25: 985–995.
- Luo Y., Wang X.-R., Ji L.-L. & Su Y. 2009. EPR detection of hydroxyl radical generation and its interaction with antioxidant system in *Carassius auratus* exposed to pentachlorophenol. *J. Hazard. Mater.* 171: 1096–1102.
- Maezono T., Tokumura M., Sekine M. & Kawase Y. 2010. Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere* 82: 1422–1430.
- McKnight D.M., Boyer E.W., Boyer B.K., Doran P.T., Kulbe T. & Andersen D.T. 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46: 38–48.
- Mill T., Hendry D. G. & Richardson H. 1980. Free-Radical Oxidants in Natural Waters. *Science* 207: 886.
- Miller C.J., Rose A.L. & Waite T.D. 2013. Hydroxyl Radical Production by H₂O₂-Mediated Oxidation of Fe(II) Complexed by Suwannee River Fulvic Acid Under Circumneutral Freshwater Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 47: 829–835.
- Murphy K.R., Stedmon C.A., Graeber D. & Bro R. 2013. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods* 5: 6557.
- Nakatani N., Ueda M., Shindo H., Takeda K. & Sakugawa H. 2007. Contribution of the Photo-Fenton Reaction to Hydroxyl Radical Formation Rates in River and Rain Water Samples. *Analytical Sciences* 23: 1137–1142.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=784, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydrogen_peroxide#section=Top (accessed Oct. 25, 2018).

- Neubauer E., Köhler S.J., Kammer F. Von Der, Laudon H. & Hofmann T. 2013. Effect of pH and stream order on iron and arsenic speciation in boreal catchments. *Environmental Science and Technology* 47: 7120–7128.
- Opsahl S., Benner R. & Amon R.M.W. 1999. Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 44: 2017–2023.
- Payá M., Halliwell B. & Hoult J.R.S. 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* 44: 205–214.
- Pracht J., Boenigk J., Isenbeck-Schroter M., Keppler F. & Schöler H.F. 2001. Abiotic Fe(III) induced mineralization of phenolic substances. *Chemosphere* 44: 613–619.
- Ritchie J.D. & Perdue E. M. 2003. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 85–93.
- Rose A.L., Webb E.A., Waite T.D. & Moffett J.W. 2008. Measurement and implications of nonphotochemically generated superoxide in the equatorial Pacific Ocean. *Environ. Sci. Technol.* 42.
- Rose A.L. & Waite T.D. 2002. Kinetic model for Fe(II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter. *Environmental Science and Technology* 36: 433–444.
- Rose A.L. & Waite T.D. 2005. Reduction of organically complexed ferric iron by superoxide in a simulated natural water. *Environmental Science and Technology* 39: 2645–2650.
- Sarkkola S., Nieminen M., Koivusalo H., Laurén A., Kortelainen P., Mattsson T., Palviainen M., Piirainen S., Starr M. & Finér L. 2013. Iron concentrations are increasing in surface waters from forested headwater catchments in eastern Finland. *Sci. Total Environ.*: 683–689.
- Schmidt R. 2007. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 82: 1161–1177.
- Sharpless C.M. & Blough N. V. 2014. The importance of charge-transfer interactions in determining chromophoric dissolved organic matter (CDOM) optical and photochemical properties. *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 16: 654–671.
- Simjouw J.-P., Minor E.C. & Mopper K. 2005. Isolation and characterization of estuarine dissolved organic matter: comparison of ultrafiltration and C18 solid-phase extraction techniques. *Mar. Chem.* 96: 219–235.
- Southworth B.A. & Voelker B.M. 2003. Hydroxyl radical production via the photo-fenton reaction in the presence of fulvic acid. *Environmental Science and Technology* 37: 1130–1136.

- Stedmon C.A. & Bro R. 2008. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 6: 572–579.
- Stedmon C.A., Markager S. & Bro R. 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 82: 239–254.
- Studenroth S., Huber S.G., Kotte K. & Schoeler H.F. 2013. Natural abiotic formation of oxalic acid in soils: Results from aromatic model compounds and soil samples. *Environ. Sci. Technol.* 47: 1323–1329.
- Summers R.S., Cornel P.K. & Roberts P. V. 1987. Molecular size distribution and spectroscopic characterization of humic substances. *Science of The Total Environment* 62: 27–37.
- Taipale S., Kankaala P., Hahn M.W., Jones R.I. & Tirola M. 2011. Methane-oxidizing and photoautotrophic bacteria are major producers in a humic lake with a large anoxic hypolimnion. *Aquat. Microb. Ecol.* 64: 81–95.
- Tokumura M., Morito R., Hatayama R. & Kawase Y. 2011. Iron redox cycling in hydroxyl radical generation during the photo-Fenton oxidative degradation: Dynamic change of hydroxyl radical concentration. *Applied Catalysis B: Environmental* 106: 565–576.
- Tsai C.-H., Stern A., Chiou J.F., Chern C.L. & Liu T.-Z. 2001. Rapid and Specific Detection of Hydroxyl Radical Using an Ultraweak Chemiluminescence Analyzer and a Low-Level Chemiluminescence Emitter: Application to Hydroxyl Radical-Scavenging Ability of Aqueous Extracts of Food Constituents. *J. Agric. Food Chem* 49: 2137–2141.
- Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552: 335–344.
- Twardowski M.S., Boss E., Sullivan J.M. & Donaghay P.L. 2004. Modeling the spectral shape of absorption by chromophoric dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 89: 69–88.
- Vetter T.A., Perdue E.M., Ingall E., Koprivnjak J.-F. & Pfromm P.H. 2007. Combining reverse osmosis and electro dialysis for more complete recovery of dissolved organic matter from seawater. *Sep. Purif. Technol.* 56: 383–387.
- Vignais P. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428–1459.
- Voelker B.M. & Sedlak D.L. 1995. Iron reduction by photoproduced superoxide in seawater. *Marine Chemistry* 50: 93–102.
- Voelker B.M., Sedlak D.L. & Zafiriou O.C. 2000. Chemistry of Superoxide Radical in Seawater: Reactions with Organic Cu Complexes. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1036–1042.

- Vogt R.D., Akkanen J., Andersen D.O., Brüggemann R., Chatterjee B., Gjessing E., Kukkonen J.V.K., Larsen H.E., Luster J., Paul A., Pflugmacher S., Starr M., Steinberg C.E.W., Schmitt-Kopplin P. & Zsolnay Á. 2004. Key site variables governing the functional characteristics of Dissolved Natural Organic Matter (DNOM) in Nordic forested catchments. *Aquatic Sciences* 66: 195–210.
- Vähätalo A. V., Aarnos H. & Mäntyniemi S. 2010. Biodegradability continuum and biodegradation kinetics of natural organic matter described by the beta distribution. *Biogeochemistry* 100: 227–240.
- Vähätalo A. V., Salonen K., Münster U., Järvinen M. & Wetzel R.G. 2003. Photochemical transformation of allochthonous organic matter provides bioavailable nutrients in a humic lake. *Archiv für Hydrobiologie* 156: 287–314.
- Vähätalo A. V., Salonen K., Salkinoja-Salonen M. & Hatakka A. 1999. Photochemical mineralization of synthetic lignin in lake water indicates enhanced turnover of aromatic organic matter under solar radiation. *Biodegradation* 10: 415–420.
- Vähätalo A. V. & Wetzel R.G. 2008. Long-term photochemical and microbial decomposition of wetland-derived dissolved organic matter with alteration of C-13: C-12 mass ratio. *Limnol. Oceanogr.* 53: 1387–1392.
- Waite T.D., Sawyer D.T. & Zafiriou O.C. 1988. Panel 1: Oceanic reactive chemical transients. *Appl Geochem* 3: 9–17.
- Walsh J.J., Weisberg R.H., Dieterle D.A., He R., Darrow B.P., Jolliff J.K., Lester K.M., Vargo G.A., Kirkpatrick G.J., Fanning K.A., Sutton T.T., Jochens A.E., Biggs D.C., Nababan B., Hu C. & Muller-Karger F.E. 2003. Phytoplankton response to intrusions of slope water on the West Florida Shelf: Models and observations. *J. Geophys. Res. Oceans* 108: 21–31.
- Weinstein J. & Bielski B.H.J. 1979. Kinetics of the Interaction of HO₂ and O₂ - Radicals with Hydrogen Peroxide. The Haber- Weiss Reaction. *Journal of the American Chemical Society* 101: 58.
- Weiss M.S., Abele U., Weckesser J., Welte W., Schiltz E. & Schulz G. 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254: 1627–1630.
- Westerhoff P., Mezyk S.P., Cooper W.J. & Minakata D. 2007. Electron pulse radiolysis determination of hydroxyl radical rate constants with Suwannee river fulvic acid and other dissolved organic matter isolates. *Environmental Science and Technology* 41: 4640–4646.
- Weyhenmeyer G.A., Prairie Y.T. & Tranvik L.J. 2014. Browning of boreal freshwaters coupled to carbon-iron interactions along the aquatic continuum. *PLoS ONE* 9.
- Xiao Y.-H., Hoikkala L., Kasurinen V., Tiirola M., Kortelainen P. & Vähätalo A. V. 2016. The effect of iron on the biodegradation of natural dissolved organic matter. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 121: 2544–2561.

- Xiao Y.H., Rääke A., Hartikainen H. & Vähätalo A. V. 2015. Iron as a source of color in river waters. *Science of the Total Environment* 536: 914–923.
- Yuan X., Davis J.A., & Nico S.P. 2016. Iron-Mediated Oxidation of Methoxyhydroquinone under Dark Conditions: Kinetic and Mechanistic Insights. *Environ. Sci. Technol.* 50: 1731–1740.
- Yuegang Z. & Jürg H. 1992. Formation of Hydrogen Peroxide and Depletion of Oxalic Acid in Atmospheric Water by Photolysis of Iron(III)-Oxalato Complexes. *Environmental Science and Technology* 26: 1014–1022.
- Zafiriou O.C. 1977. Marine organic photochemistry previewed. *Marine Chemistry* 5: 497–522.
- Zafiriou O.C., Jousset-Dubien J., Zepp R.G. & Zika R.G. 1984. Photochemistry of natural waters: Many compounds and environments are affected by sunlight-induced photochemistry. *Environmental Science and Technology* 18: 358A–371A.
- Zhang T., Hansel C.M., Voelker B.M. & Lamborg C.H. 2016. Extensive Dark Biological Production of Reactive Oxygen Species in Brackish and Freshwater Ponds. *Environmental Science and Technology* 50: 2983–2993.