

**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

**FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2014**

**Vladimír Choleva**



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta elektrotechnická  
Katedra teorie obvodů**

**Efekt turbidity média na přenos ultra slabé emise fotonů  
z biologických vzorků**

**Turbidity media effect on transmission of ultra-weak photon  
emission from biological samples**

Diplomová práce

Studijní program: Komunikace, multimédia a elektronika  
Studijní obor: Elektronika

Vedoucí práce: Prof. Ing. Pavel Sovka, CSc.  
Konzultant: Ing. Michal Cifra, Ph.D. - Ústav Fotoniky a Elektroniky, AV ČR

**Bc. Vladimír Choleva**

---

**Praha 2014**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. CHOLEVA Vladimír**

Studijní program: Komunikace, multimédia a elektronika  
Obor: Elektronika

Název tématu: **Efekt turbidity na přenos signálů ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků**

### **Pokyny pro vypracování:**

1. Prostudujte literaturu týkající se problematiky ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků a organismů.
2. Na základu výsledků dle bodu (1) popište úvod do problematiky ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků a organismů.
3. Vytvořte model popisující efekt turbidity na přenos ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků.
4. Změřte absorbanci buněčné kultury pro různé koncentrace buněk ve viditelném pásmu.
5. Ověřte navržený model vlivu turbidity na ultra slabé emise fotonů z buněčné kultury.
6. Zhodnoťte dosažené výsledky.

### **Seznam odborné literatury:**

- [1] M. Cifra, P. Pospíšil, Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications, under review in Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013
- [2] A. Prasad, P. Pospíšil, Photon source within the cell, Fields of the Cell, eds. D. Fels, M. Cifra, 2013
- [3] F. Widdel, Theory and Measurement of Bacterial Growth, 2010, <http://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf>

Vedoucí: **Prof.Ing. Pavel Sovka, CSc.**

Platnost zadání: 31. 8. 2015

L.S.

Prof. Ing. Miroslav Husák, CSc.  
vedoucí katedry

Prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.  
děkan

V Praze dne 16. 1. 2014

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci „Efekt turbidity média na přenos ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků“ zpracoval sám s přispěním vedoucího práce a používal jsem pouze literaturu uvedenou na konci práce. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 07. 05. 2014.



.....

podpis

Jméno Příjmení

## **Anotace**

Práce se zabývá ultra slabou emisí fotonů z biologických vzorků. Úkolem práce je popis chování vyzařování fotonů ze vzorku v závislosti na jeho optických a geometrických vlastnostech. Hlavními zkoumanými vlivy jsou především světelný rozptyl a absorpce. Práce seznamuje se základními principy vyzařování fotonů ze vzorků a s detekcí ultra slabé emise fotonů. Dále uvádí do základů problematiky rozptylu a absorpce světla na částicích. Na základě získaných poznatků je navržen model, který popisuje chování emise fotonů v závislosti na turbiditě vzorku. Model je pomocí různých experimentů se vzorky jak chemického, tak biologického původu ověřen a optimalizován. Výsledkem práce je pochopení a popis chování ultra slabé emise fotonů v závislosti na optických vlastnostech zkoumaného vzorku, především na jeho turbiditě.

## **Klíčová slova**

ultra slabá emise fotonů, vyzařování, turbidita, světelný rozptyl, absorbance

## **Abstract**

The work deals with the ultra weak photon emission from biological samples. The task of the work is to describe the behavior of the photon emission from the sample depending on its optical and geometric attributes. Light scattering and absorption are primarily studied as the main influences. The work introduces with the basic principles of the photon emission and with detection of the ultra-weak photon emission. This paper introduces to the basic problems of scattering and absorption of light by the particles too. Based on these findings model is proposed that describes the behavior of photon emission, depending on the turbidity of the sample. The model is validated and optimized with experiments on the samples of chemical and biological origin. The result of this work is understanding and description of the behavior of ultra-weak photon emission depending on the optical attributes of the studied sample, especially on its turbidity.

## **Key words**

ultra-weak photon emission, emission, turbidity, light scattering, absorbance

## Obsah

Úvod .....	1
1. Ultra slabá emise fotonů z biologických vzorků a organismů.....	2
1.1 Úvod k ultra slabé emisi fotonů .....	2
1.2 Druhy .....	2
1.3 Mechanizmy vyzařování .....	3
1.4 Měření ultra slabé emise fotonů.....	4
1.5 Využití.....	5
2. Extinkce světla průchodem prostředím.....	6
2.1 Rozptyl světla a turbidita .....	7
2.1.1 Mechanizmy rozptylu světla .....	7
2.1.2 Rozptyl světla na buňkách .....	8
2.1.3 Měření turbidity .....	9
2.2 Absorpce .....	10
2.3 Růst mikroorganismů a měření koncentrace buněk.....	11
2.3.1 Data OD pro návrh modelu .....	13
3. Model a simulace .....	14
3.1 Diskrétní model.....	14
3.2 Výsledky modelu .....	16
3.3 Srovnání modelů .....	18
4. Experimentální část.....	21
4.1 Úvod k experimentům.....	21
4.2 Schéma měřicího systému.....	22
4.3 Měření se vzorky chemického původu .....	23
4.3.1 Mechanizmy vyzařování luminolu.....	23
4.3.2 Příprava roztoku.....	24

4.3.3	Faktory ovlivňující intenzitu vyzařování luminolu.....	26
4.3.4	Faktory ovlivňující výsledky měření .....	28
4.3.5	Měření s většími objemy.....	32
4.3.6	Turbiditní standard.....	34
4.3.7	Měření roztoku s turbiditním standardem.....	37
4.3.8	Porovnání výsledků měření s navrženým modelem .....	39
4.3.9	Doplnění modelu a porovnání s naměřenými hodnotami .....	42
4.4	Měření se vzorky biologického původu.....	44
4.4.1	Kvasinky a ultra slabá emise fotonů .....	44
4.4.2	Příprava vzorku .....	45
4.4.3	Měření .....	46
4.4.4	Porovnání výsledků měření s kvasinkami s navrženým modelem .....	49
Závěr	.....	51
Literatura	.....	53
Seznam příloh.....		55

## Seznam použitých zkratk a symbolů

APD		lavinová fotodioda (z anglického avalanche photodiode)
CCD		optický detektor pracující na principu vázaného náboje (z anglického charge coupled device)
CoQ10		koenzym Q10
DLS		dynamický rozptyl světla (z anglického dynamic light scattering)
LED		elektroluminiscenční dioda (z anglického light emitting diode)
NTU		nefelometrická turbiditní jednotka (z anglického nephelometric turbidity unit)
OD		optická hustota (z anglického optical density)
PMT		fotonásobič (z anglického photomultiplier)
ROS		reaktivní formy kyslíku (z anglického reactive oxygen species)
RTC		Resource Technology Corporation
TS		turbiditní standard
ÚFE AV ČR		Ústav fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR
UVA		blízká ultrafialová oblast elektromagnetického spektra
UVB		vzdálená ultrafialová oblast elektromagnetického spektra
YPD		živné médium pro kvasinky (z anglického yeast extract peptone dextrose)
A	(-)	absorbance
$A_a$	(-)	koeficient absorpce
$A_r$	(-)	koeficient světelného rozptylu
C	(buněk/ml)	koncentrace buněk v objemu
$C_i$	(buněk/ml)	koncentrace buněk v elementární vrstvě



$C_{lum}$	( $\mu M$ )	koncentrace luminolu v roztoku
$C_{NaHCO_3}$	(mM)	koncentrace hydrogenuhličitanu sodného v roztoku
$E_{eV}$	(eV)	energie fotonu
$C_{H_2O_2}$	(mM)	koncentrace peroxidu vodíku v roztoku
$I$	(foton/s)	výsledná intenzita vyzařování
$I(A)$	( $W/m^2$ )	intenzita světelného záření po průchodu látkou
$I_0$	( $W/m^2$ )	intenzita světelného záření před průchodem látkou
$I_b$	(foton/(s.buňka))	intenzita vyzařování fotonů jedné buňky
$I_i$	(foton/s)	intenzita vyzařování fotonů elementární vrstvy
$M_r$	(mg/mM)	molární hmotnost látky
$N$	(-)	počet buněk
$P$	(W)	výkon
$P(S)$	(-)	poměr určující pravděpodobnost sedimentace
$S/N$	(-)	poměr užitečného signálu k šumu
$SNR$	(-)	odstup užitečného signálu od šumu (z anglického signal to noise ratio)
$T$	(-)	transmitance
$T$	(K)	teplota
$V$	(ml)	objem
$V_i$	(ml)	objem elementární vrstvy
$a$	(-)	faktor konverze
$b$	(cm)	délka optické cesty
$c$	(M/l)	molární koncentrace
$c$	(m/s)	rychlost světla
$g$	( $m/s^2$ )	gravitační zrychlení

$h$	(eV.s)	Planckova konstanta
$h$	(mm)	výška
$h_{\text{celk}}$	(mm)	celková výška vzorku
$k_B$	(J/K)	Boltzmannova konstanta
$k_r$	(-)	korekční konstanta
$m$	(mg)	hmotnost látky
$n$	(-)	počet elementárních vrstev
$r$	(m)	poloměr částice
$t$	(s)	čas
$t_d$	(s)	doba buněčného dělení
$\Delta\rho$	(kg/m <sup>3</sup> )	rozdíl hustoty
$\varepsilon$	(l/(mol.cm))	molární absorpivita
$\lambda$	(nm)	vlnová délka
$\mu$	(s <sup>-1</sup> )	rychlost růstu buňky

## Úvod

Ultra slabá emise fotonů z biologických vzorků je již poměrně dlouho známý a zkoumaný jev. I přesto doposud není prozkoumaný a popsán tak dokonale, aby se jeho využití rozšířilo do všech potenciálních odvětví, kde by mohl být využíván.

Tato práce má za úkol napomoci s popisem chování ultra slabé emise fotonů ze vzorků biologického původu. Především se jedná o popis chování vzorku v závislosti na jeho optických vlastnostech, a to především na světelném rozptylu a absorpci.

Ve svém úvodu práce teoreticky popisuje jev ultra slabé emise fotonů, teorii turbidity a její měření, měření a mechanismy rozptylu světla a vysvětluje rozdíly mezi pojmy absorpce a absorbance.

Další část práce se zabývá návrhem jednoduchého modelu, který popisuje chování vzorků s různými koncentracemi buněk. Koncentrace buněk vede na změnu optických vlastností vzorku. Model byl zpracován v programu Matlab. Obsahem této části je vyhodnocení výsledků navrženého modelu a porovnání odlišných přístupů k modelování různých vlastností vzorku, které ovlivňují vypočtené výsledky.

Následující část se zabývá experimentálním ověřením navrženého modelu a popisem chování měřeného vzorku. Ověření modelu chování vzhledem k optickým vlastnostem vzorku lze provádět i na látce chemického, nikoli biologického původu. Rozdíl mezi chemiluminiscencí a ultra slabou emisí fotonů je pouze v původu emise fotonů. Pokud je možné získat látku s obdobnými optickými vlastnostmi, které mají vzorky biologického původu, lze napodobit chování biologického vzorku. Výsledkem různě zaměřených experimentů je roztok, který simuluje optické vlastnosti biologických vzorků. Tyto vlastnosti lze v závislosti na různých vlivech a parametrech v určitých mezích korigovat a nastavovat. Takový roztok je ideální vzorek pro ověření navrženého modelu. Dalším bodem této části je porovnání naměřených hodnot s daty vypočtenými pomocí modelů a částečná optimalizace modelů podle chování vzorku, které bylo zjištěné při experimentech.

V poslední části práce jsou zachyceny výsledky z měření na vzorcích biologického původu. Konkrétně jde o vzorek s pivními kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto výsledky jsou opět porovnány s navrženými modely.

# 1. Ultra slabá emise fotonů z biologických vzorků a organizmů

## 1.1 Úvod k ultra slabé emisi fotonů

Ultra slabá emise fotonů je jev, kdy buňky živočišného i rostlinného původu vyzařují malé množství fotonů spontánní emisí nebo v závislosti na vnějších podnětech. Obecně je tento jev považován za výsledek oxidativních procesů při metabolických pochodech, které probíhají uvnitř buněk. Označován je také jako chemiluminiscence nebo slabá luminiscence. Od dalších jevů, při kterých dochází k emisi fotonů, jako jsou fluorescence nebo fosforescence, se odlišuje tím, že elektronové excitované stavy nejsou buzeny žádným vnějším světelným zářením.

První měření ultra slabé emise fotonů z biologických vzorků, konkrétně ze vzorků rostlinného původu, pomocí fotonásobiče bylo provedeno již v 50. letech 20. století. Detekované záření bylo zachyceno na vlnových délkách 400 nm a 650 nm [1,2]. Snaha o zjištění původu ultra slabé emise fotonů vedla k dalším experimentům, díky kterým se dospělo ke zjištění hlavního mechanismu tohoto druhu vyzařování. Jde o reakce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) s biomolekulami. Přechod elektronů elektronicky vybuzených molekul, které vznikají při těchto oxidačních procesech, ze singletového nebo tripletového stavu do základního stavu je doprovázen emisí fotonu o odpovídající vlnové délce.

## 1.2 Druhy

Na rozdělení ultra slabé emise fotonů lze pohlížet z několika stran. Za prvé můžeme rozeznávat spontánní emisí, při které dochází k emisi fotonů pouze vlivem oxidativních metabolických procesů uvnitř buňky, tedy bez vlivu vnějších stimulů. Druhým typem je vyvolaná emise, která závisí na různých biotických i abiotických vlivech na buňku, které vyvolávají oxidativní stres. Mezi biotické vlivy patří například virové, bakteriální nebo plísňové napadení buněk. Mezi abiotické procesy může být zařazen vliv prostředí, například teplota nebo koncentrace plynů v okolí.

Další možné rozdělení ultra slabé emise fotonů je podle vlnové délky generovaného záření. Prvním typem je záření v blízké UVA oblasti ( $\lambda = 350 \div 400$  nm). Dalším druhem je záření ve viditelné oblasti spektra ( $\lambda = 400 \div 750$  nm) a posledním typem je záření v IR oblasti ( $\lambda = 750 \div 1300$  nm). Při malém množství experimentů byly zachyceny i fotony

s vlnovými délkami  $\lambda < 350$  nm, které odpovídají vzdálené UVA a UVB oblasti [3,4]. Původ tohoto záření však není doposud popsán. Za rozdílné vlnové délky generovaného záření jsou odpovědné různé druhy reakcí ROS s biomolekulami, díky kterým jsou tyto fotony generovány.

### 1.3 Mechanizmy vyzařování

Zkoumáním vlivu reaktivních forem kyslíku na ultra slabou emisi fotonů byl přijat fakt, že právě ROS jsou hlavním zdrojem energie pro emisi fotonů. Hlavními zdroji záření jsou karbonyly  $^3(\text{R}=\text{O})^*$ , chromofory  $(\text{Chr})^*$  a molekuly kyslíku  $(^1\text{O}_2)^*$  v excitovaných singletových nebo tripletových stavech. V případě rostlinných buněk se na emisi fotonů podílí také chlorofyl  $(^1\text{Chl})^*$ . Přechod těchto látek z excitovaného do základního stavu je doprovázen emisí fotonu o příslušné vlnové délce. Přechod tripletního karbonylu způsobuje emisi fotonu o vlnové délce  $\lambda = 400 \div 500$  nm (oblast fialové až zelené barvy), zatímco přechod singletního kyslíku je doprovázen emisí fotonů na vlnových délkách  $\lambda = (634, 703, 1274)$  nm (červená a infračervená oblast) a přechod chromoforů (pigmentů) způsobuje emisi fotonů o vlnových délkách  $\lambda = 550 \div 750$  nm (oblast zelené až červené barvy) [3,4].

Tyto látky vznikají v buňkách při metabolických pochodech po oxidaci biomolekul reaktivními formami kyslíku. V průběhu těchto procesů vznikají intermediáty jako dioxetan (ROOR) a tetroxid (ROOOOR). Rozkladem těchto intermediátů vznikají excitované tripletní karbonyly a excitovaný singletní kyslík. V oxidačních procesech jsou zapojeny látky, jejichž koncentrací lze ovlivňovat tyto reakce a ovlivnit tak i ultra slabou emisi fotonů. Mezi tyto látky patří například peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kyslík ( $\text{O}_2$ ) a jeho volné radikály (hydroxilový radikál  $\text{HO}^\bullet$ , alkoxylový radikál  $\text{RO}^\bullet$ , peroxylový radikál  $\text{ROO}^\bullet$ , hydroperoxylový  $\text{HO}_2^\bullet$ ) nebo železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Emisi lze ovlivnit i negativně, pokud přidáme do systému látky snižující aktivitu ROS. Takovou látkou může být například vitamín E (tokoferol), nebo enzymy glutathione nebo CoQ10. Vliv těchto látek na emisi fotonů – chemiluminiscenci byl experimentálně prokázán a tím byla potvrzena teorie o původu ultra slabé emise fotonů z biochemických procesů.

## 1.4 Měření ultra slabé emise fotonů

Ultra slabá emise fotonů není pozorovatelná pouhým lidským okem, protože počet generovaných fotonů je velice malý, jinými slovy intenzita vyzařování je nízká a je hluboko pod citlivostí lidského oka (až několik řádů).

Měřicí soustavy využívané k detekci ultra slabé emise fotonů obsahují snímací prvky pracující na bázi fotoelektrického jevu a to především z důvodu jeho zvládnutého technologického zpracování.

Šumové vlastnosti detektoru jsou velmi kritické, protože v závislosti na uspořádání v měřicí aparatuře může na snímací povrch detektoru dopadat pouze malá část z vyzářených fotonů. Na centimetr čtvereční snímací plochy mohou dopadnout za sekundu pouze desítky fotonů. Doposud vyvíjené čistě optické prvky nevykazují tyto požadované šumové vlastnosti, a proto nejsou v současné době příliš využívány.

Detektory na bázi fotoelektrického jevu by měly dosahovat vysokého zisku elektronů. To znamená, že při dopadu jednoho fotonu, bude vygenerováno velké množství elektronů. Dalším důležitým parametrem je šum na jednotkovou plochu detektoru, který by měl být co nejmenší. Vyjadřuje se jako proud detektorem při nulovém dopadajícím záření. Ekvivalent proudu může být počet pozorovaných impulzů na výstupu detektoru opět při nulovém ozáření. V anglické literatuře je tento parametr označován „dark current/count“. Metoda čítání impulsů na výstupu detektoru se používá při nízkých intenzitách dopadajícího záření kvůli zlepšení odstupu signálu od šumu. Významným parametrem je také vysoká kvantová účinnost detektoru. Je to procentuálně vyjádřený poměr mezi počtem výstupních elektronů a počtem dopadajících fotonů. Dále existuje ještě řada dalších parametrů, jako je např. citlivost na jednotlivé vlnové délky nebo teplotní stabilita atd.. [3]

Měření ultra slabé emise fotonů může být realizováno buď v 1D nebo ve 2D dimenzi. Při jednorozměrném měření dostáváme na výstupu časovou posloupnost naměřeného počtu fotonů. Jde o počet fotonů vyzářený z celého povrchu vzorku. Tento režim měření tedy neumožňuje zobrazení prostorového rozložení ultra slabé emise fotonů. K měření v jednorozměrném módu se používají fotonásobiče (PMT – photomultiplier). Jsou to zařízení, která jako snímací povrch používají fotocitlivou katodu. Po dopadu fotonu na katodu dochází ke generaci elektronů. Ty jsou dále urychlovány systémem dynod, na

kterých dochází k násobení jejich počtu. Celé zařízení je uzavřené v baňce, která obsahuje vakuum. Výhodou fotonásobičů je velký snímací povrch, vysoký zisk, dostačující kvantová účinnost a velmi dobrá hodnota šumu na jednotku plochy. Při tomto měření se k detekci záření nepoužívají lavinové fotodiody (APD – avalanche photodiode), protože mají velmi malý snímací povrch. Jsou vhodné pro měření záření, které lze zaostřit. Ultra slabá emise fotonů však představuje difúzní záření. U difúzního záření není zaostření možné.

Dvojdímenzionální měření umožňuje zobrazení prostorového rozložení ultra slabé emise fotonů. Měřicí detektor lze sestavit pomocí matice APD nebo multikanálového polovodičového PMT. Takto sestavené detektory nedisponují vysokým prostorovým rozlišením, avšak zachovávají si časové vlastnosti, takže nedochází k nárůstu času nutného k expozici detektoru. K dosažení vysokého rozlišení se ke snímání emitovaného záření používají speciální nábojově vázané snímače (CCD – charge coupled device). Tyto snímače musí být speciálně kryogenicky chlazené a některé typy obsahují násobičku elektronů. CCD detektory potřebují relativně dlouhý čas expozice. To vyplývá z jejich vlastního čtecího šumu, který musí být překročen, a z nízké intenzity ultra slabé emise fotonů. Ke snížení tohoto šumu lze použít techniku zvanou binning. Jde o snížení rozlišení vlivem spojení sousedních pixelů. Sice je sníženo rozlišení, avšak dochází ke zvětšení snímací plochy jednoho snímacího bodu, a tak ke zvýšení jeho citlivosti. Lze tak zkrátit čas potřebný k expozici detektoru. Ke zlepšení vlastností může přispět i použití čoček. Vzhledem k nárokům na jejich požadavky se však detektor velmi prodražuje.

## **1.5 Využití**

Využití ultra slabé emise fotonů by mohlo být přínosné v mnoha odvětvích. Mohla by být využita v medicíně, biologii, zemědělství nebo i v potravinářském průmyslu. Ultra slabá emise fotonů totiž v sobě nese informaci o procesech, které ji vyvolávají. Informace je nesená intenzitou vyzařování, prostorovým rozložením záření, časovou posloupností emitovaných fotonů a spektrálním složením záření. Podle některých výzkumů může ultra slabá emise fotonů z lidské kůže odrážet celkový fyziologický stav organismu [4]. V medicíně by tak mohla být tato metoda využita například k diagnostice oxidačních stresů jednotlivých tkání v celém organismu a to naprosto neinvazivní metodou. V zemědělství by mohla být využita ke zkoumání vlivu chemických prostředků na rostliny, nebo ke kontrole kvality vody, kterou jsou rostliny zavlažovány.

V potravinářském průmyslu by mohla být pomocí tohoto jevu zkoumána například kvalita potravin rostlinného i živočišného původu.

## 2. Extinkce světla průchodem prostředím

Při průchodu optického záření látkou dochází k extinkci světla. Tedy k utlumení detekovatelného optického výkonu měřeného po průchodu světla vzorkem.

Extinkce světla je často v literatuře označovaná jako absorbance. Pojem absorbance by však neměl být zaměňován s absorpcí světla. Absorpce je pouze jednou ze složek absorbance neboli extinkce světla. K absorpci dochází pouze v případě, že částice, přes které optické záření prochází, vykazují útlum určitým vlnovým délkám procházejícího záření. Útlum může být způsobený tím, že částice přijatou energii ze světelného záření přemění například na energii tepelnou. Absorpce je dominantní v molekulární chemii a z tohoto důvodu se vžil pojem absorbance pro vyjádření extinkce světla.

Druhou složkou podílející se na extinkci světla je světelný rozptyl na částicích obsažených v médiu, které je prosvěcováno světlem. Rozptyl světla je spojený s turbiditou média. Turbidita se dá do češtiny přeložit jako zakalení roztoku. Rozptyl světla je naopak dominantní při zkoumání absorbance biologických vzorků, protože většina buněk je bezbarvých [5]. Výsledný koeficient absorbance je tedy součtem koeficientu světelného rozptylu a absorpce média. Detekovatelnou intenzitu světelného záření, které prošlo látkou s celkovou absorbancí  $A$ , lze vyjádřit podle vztahu (1).

$$I(A) = I_0 e^{-A} = I_0 e^{-(A_a + A_r)} \quad (1)$$

- Kde  $I(A)$  je detekovatelná intenzita světelného záření po průchodu látkou s celkovou absorbancí  $A$  ( $\text{W}/\text{m}^2$ ),  
 $I_0$  je intenzita světelného záření před průchodem látkou ( $\text{W}/\text{m}^2$ ),  
 $A$  je celková absorbance látky (-),  
 $A_a$  je koeficient absorpce látky (-),  
 $A_r$  je koeficient světelného rozptylu látky (-).



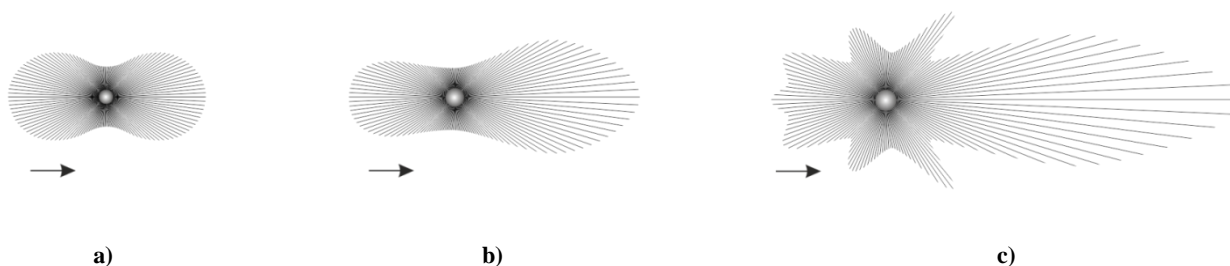
## 2.1 Rozptyl světla a turbidita

Turbidita je optická vlastnost kapalného média, ve kterém jsou rozpuštěny malé částice. Právě vlivem těchto rozpuštěných miniaturních částic dochází k rozptylu a absorpci dopadajícího světelného záření, tedy k extinkci (absorbanci) světla.

Těchto jevů se využívá v mnoha oblastech, například v mikrobiologii nebo v hospodářském průmyslu. Díky němu lze kontrolovat částice ve vodě, což umožňuje kontrolu její kvality, nebo měřit koncentraci částic v daném kapalném vzorku. Standardizování měření turbidity zavedli již v roce 1900 Whipple a Jackson [6]. Vyhodnocení měření Jacksonovým turbidimetrem se provádělo pouze lidským okem a jako zdroj světelného záření byla použita svíčka. V roce 1926 byl objeven formazin. Látka, která měla ideální vlastnosti ke standardizaci měření turbidity. Na základě použití této látky jako etalonu byly vyvinuty standardy, ke kterým se vztahují i dnešní moderní přístroje pro měření turbidity [6].

### 2.1.1 Mechanizmy rozptylu světla

Rozptyl světla vniká na mikroskopických částicích obsažených v tekutině, na kterou dopadá světelné záření. K rozptylu světelného záření dochází i na samotných molekulách tekutiny (např. vody). Jistou minimální turbiditu tedy vykazuje i naprosto čistá tekutina bez příměsí dalších částic, na kterých by docházelo k rozptylu světla.



Obrázek 1: a) Vyzařovací charakteristika částice menší než  $1/10$  vlnové délky dopadajícího světla  
b) Vyzařovací charakteristika částice o velikosti kolem  $1/4$  vlnové délky dopadajícího světla  
c) Vyzařovací charakteristika částice mnohem větší než je vlnová délka dopadajícího světla  
(šipka znázorňuje směr dopadajícího světelného záření) obrázky kresleny podle [6]

Na vlastní mechanismus rozptylu světla na částicích lze nahlížet takto.: - Částice absorbuje dopadající optické záření, načež se pak stává bodovým zdrojem záření. Částice pak vyzařuje světlo do různých úhlů. Dochází tak k rozptylu dopadajícího záření. Úhel vyzařování světla je závislý na relaci mezi velikostí částice a vlnovou délkou dopadajícího optického záření. Pokud je částice mnohem menší než je vlnová délka

dopadajícího světla ( $1/10 \lambda$ ), pak dochází k vyzařování v dopředném i zpětném směru přibližně v poměru 1:1. Při vzrůstající velikosti částice ( $1/4 \lambda$ ) dochází k nárůstu vyzařování v dopředném směru. Při dalším zvětšování rozměrů částice ( $> \lambda$ ) extrémně narůstá dopředné vyzařování a objevují se postranní maxima při vyzařování do úhlů [6]. Ilustrativně jsou vyzařovací charakteristiky pro různé velikosti částic vyobrazeny na obrázku 1.

Z těchto vlastností vyplývá, že částice větších rozměrů budou více ovlivňovat záření na vyšších vlnových délkách a méně rozměrné částice budou ovlivňovat spektrum dopadajícího záření na nižších vlnových délkách.

Vliv na rozptyl i na intenzitu rozptylu světla má i tvar a index lomu dané částice. Kulové částice se vyznačují vyšším předozadním poměrem vyzařování než částice válcovitého tvaru. Index lomu vyjadřuje míru rozptylu světla při přechodu z jednoho prostředí do druhého. V případě měření turbidity při přechodu mezi kapalinou a v ní rozpuštěnou částicí. Index lomu částice a kapaliny by měl být různý, jinak by nedocházelo k rozptylu dopadajícího světla.

Míra rozptylu světla vzrůstá s mírou koncentrace částic rozpuštěných v kapalině. Čím je vyšší koncentrace částic v měřeném vzorku, tím je vyšší rozptyl dopadajícího záření. Při překročení určité hranice koncentrace částic začíná docházet k vícenásobným rozptylům a zvyšuje se absorpce dopadajícího světla. Snižuje se schopnost měření průchozího i rozptýleného světla, jelikož v optické cestě dopadajícího světelného záření leží čím dál více částic. Dochází tak ke zhoršení měření turbidity. Při ještě vyšších koncentracích je turbidita již neměřitelná.

### **2.1.2 Rozptyl světla na buňkách**

V předcházející kapitole je obecně rozebrán rozptyl světla na částicích, na které můžeme nahlížet jako na homogenní objekt kulovitého tvaru s konstantním indexem lomu. S buňkami biologického původu je toto tvrzení pravdivé pouze za určitého vztahu velikosti buňky a vlnové délky dopadajícího světelného záření. Buňky mají určitou vnitřní strukturu složenou z organel a jejich dílčích částí. Indexy lomu různých částí této vnitřní struktury jsou odlišné a proto i na nich dochází k rozptylu dopadajícího světelného záření. Tato vnitřní struktura je dokonce považována za hlavní složku podílející se na rozptylu světla [7]. Orientační hodnoty indexů lomu jednotlivých organel jsou vypsány

v tabulce 1. Index lomu jednotlivých organel je závislý na koncentraci proteinů v dané organelle [8].

Důležitým faktorem ovlivňující charakter rozptylu světla je vztah vlnové délky dopadajícího záření a velikosti organely. Díky své velikosti se z vnitřní struktury buňky nejvíce na rozptylu světla podílí jádro, které je v porovnání s ostatními organelami největší. Další organely jako mitochondrie, lysozomy nebo peroxizomy kvůli jejich menší velikosti zvyšují rozptyl světla do zadního směru.

**Tabulka 1: Indexy lomu pro různé buněčné struktury [7,8]**

Organela	Index lomu
Mimobuněčná tekutina	1,35 - 1,36
Cytoplazma (buněčná plazma)	1,36 - 1,38
Jádro	1,38 - 1,41
Mitochondrie	1,38 - 1,41
Melanin	1,60 - 1,70

Výsledný efekt rozptylu světla na vnitřní strukturu buňky je takový, že dochází ke snížení směrovosti rozptýleného světla. Dochází tedy k výraznějšímu rozptýlení světelného záření do všech směrů a výrazně se zvyšuje i rozptyl světla do směru zadního.

### 2.1.3 Měření turbidity

Měřicí aparatura k měření turbidity se skládá ze zdroje světelného záření, čoček pro zaostření, kyvety a optického detektoru. Turbidimetr používá jeden detektor v ose se zdrojem záření. Nefelometrický turbidimetr má detektor umístěný v úhlu 90° od osy zdroje záření. Tímto uspořádáním se zvyšuje citlivost na nižší hodnoty turbidity. Pro zvýšení měřicího rozsahu může být v systému zapojeno více detektorů v různých úhlech. Výsledná naměřená hodnota turbidity je pak dána jejich dílčími příspěvky, které jsou zohledňovány v určitých poměrech [6].

Zdroje použité ke generování optického záření mohou generovat jak širokopásmové (žárovka), tak úzkopásmové (LED) spektrum výstupního záření. Úzkopásmové ozařovače se používají především, pokud je zapotřebí přesně znát vlnovou délku dopadajícího záření. Z rozptylu světla na dané vlnové délce lze odvodit velikost částic, na kterých dochází k rozptylu světla. Jako úzkopásmové zdroje záření se používají především LED diody ( $\lambda = 860 \text{ nm}$ ) nebo také lasery.

Nejvíce rozšířené zdroje jsou klasické širokopásmové žárovky. Širokopásmový zdroj je vhodný pro měření turbidity vzorku, u kterého není známo přesné složení. Rozptyl světla nastává na různě velikých částicích. Oproti úzkopásmovému zdroji je širokopásmový zdroj citlivější na malé částice, dochází však k interferencím jednotlivých vlnových délek. Hlavní požadavek na tento zdroj je jeho teplota barvy. Měla by se pohybovat v rozmezí od 2200 K do 3000 K.

Vzhledem ke spektrálním vlastnostem použitého zdroje záření by měl být v měřicí soustavě použitý detektor záření s požadovanou citlivostí na určitých vlnových délkách. Vztah spektrálních vlastností zdroje a detektoru určuje výsledné spektrální charakteristiky měřicí aparatury. Jako detektory se používají fotonásobiče, vakuové fotodiody, křemíkové fotodiody nebo kadmium sulfidový fotodetektor. Křemíková fotodioda má největší citlivost kolem 800 nm, používá se proto pro detekci větších částic. V systémech s vyšší citlivostí na malé částice se používají fotonásobiče nebo vakuové fotodiody, které mají nejvyšší hodnotu citlivosti kolem vlnové délky 400 nm [6].

Linearitu a citlivost měřicí aparatury ovlivňuje délka cesty optického záření. Je to délka měřená od zdroje záření přes rozptyl na částicích v měřeném vzorku až k detektoru. Citlivost systému roste se zvyšující se délkou optické cesty, naproti tomu klesá linearita měřicí aparatury. Zvyšování délky optické cesty nastává v případě vysokých koncentrací částic ve vzorku, protože dochází k mnohonásobnému rozptylu a absorpci.

## 2.2 Absorpce

Některé látky absorbují část spektra dopadajícího optického záření. Výsledkem tohoto jevu je pozorovatelné zabarvení těchto látek, pokud se ve vzorku vyskytují s vysokou koncentrací nebo mají vysokou molární absorbtivitu.

Pokud na látku dopadá monochromatické záření o výkonu  $P_0$ , můžeme z naměřeného výkonu  $P$ , který látkou projde, určit prostup ( $T$  – transmittance) (2) nebo absorpci ( $A_a$  – absorption) (3), (4) dané látky [9].

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2)$$

$$A_a = \log_{10} \frac{1}{T} \quad (3)$$

$$A_a = 2 - \log_{10} T_{\%} \quad (4)$$

Absorpci látky lze vypočítat i z vlastností měřeného vzorku. Vztah pro tento výpočet je dán Beer-Lambertovým zákonem (5).

$$A_a = \varepsilon b c \quad (5)$$

Kde  $A_a$  je bezrozměrná počítaná absorpce,

$\varepsilon$  je molární absorpivita (l/(mol.cm)),

$b$  je délka optické cesty (cm),

$c$  je koncentrace látky ve vzorku (mol/l).

Beer-Lambertův zákon říká, že pokud provedeme rozvrstvení vzorku, tak množství světla absorbované v každé vrstvě je stejné. Absorpce tedy závisí na celkovém množství absorbující látky, skrze kterou vede optická cesta mezi zdrojem a detektorem záření. Při velmi vysokých koncentracích látky ve vzorku už neplatí lineární závislost (5) mezi absorpcí a koncentrací [9].

### 2.3 Růst mikroorganismů a měření koncentrace buněk

Při měření biologických vzorků souvisí zvyšování koncentrace látky v měřeném vzorku s množstvím mikroorganismů v měřeném vzorku. V čase tak dochází ke zvyšování turbidity – rozptylu světla a absorpci daného vzorku.

Průběh růstu mikroorganismů vykazuje čtyři hlavní fáze – lag fázi, exponenciální fázi, konstantní fázi a fázi umírání. Někdy jsou tyto čtyři fáze doplněny o další – startující a zpomalující fáze [10].

Na počátku procesu (lag fáze) jsou buňky vloženy do čerstvého roztoku. Buňkám trvá určitou dobu, než se přizpůsobí okolnímu prostředí a nastartují se jejich metabolické procesy. Délka lag fáze závisí právě na době přizpůsobení buněk novému prostředí.

V další fázi (exponenciální) nastává růst a dělení buněk. Zvyšuje se jejich metabolická aktivita a jejich rychlost růstu je maximální. V průběhu exponenciální fáze platí pro počet buněk vztah (6) [5].

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (6)$$

Kde  $t$  je čas od počátku procesu,

$N$  je počet buněk po čase  $t$ ,

$N_0$  je počet buněk na počátku procesu,

$\mu$  je specifická rychlost růstu dané buňky, zjednodušeně rychlost růstu.

Pro rychlost růstu  $\mu$  je definován vztah (7) [5], který tuto konstantu vztahuje k času  $t_d$ . Jde o čas, který potřebuje mateřská buňka k rozdělení do dvou dceřiných buněk. Tento čas je specifický pro různé druhy mikroorganismů.

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (7)$$

V konstantní fázi dochází ke zpomalení a nakonec i k zastavení dalšího dělení buněk vlivem vyčerpání živin z roztoku a hromadění odpadních látek. Počty živých a umírajících buněk se vyrovnávají. Dále nastává fáze umírání, kdy už je koncentrace odpadních a toxických látek v roztoku velmi vysoká. Počet umírajících buněk začíná převyšovat počet živých buněk.

Měření počtu buněk v určitém objemu vzorku vychází z měření hustoty buněk ve vzorku. Měření se provádí pomocí optických metod. V závislosti na množství buněk ve vzorku dochází k rozptylu světla. Rozptyl světla je v tomto případě dominantním vlivem v rámci absorbance vzorku. K absorpci víceméně nedochází, jelikož většina buněk je bezbarvých. Provádí se tedy měření turbidity vzorku. Turbidita se v této souvislosti nazývá optická hustota (OD – optical density). V některé literatuře se pod pojmem měření optické hustoty biologického vzorku setkáme s tvrzením, že dochází k měření absorpce světelného záření, což je v případě měření počtu buněk zavádějící [11]. Optická hustota je přímo úměrná hustotě buněk (8). K výpočtu hustoty buněk z optické hustoty se zavádí faktor pro konverzi.

$$\text{hustota buněk} = \frac{N}{V} = a \cdot OD \quad (8)$$

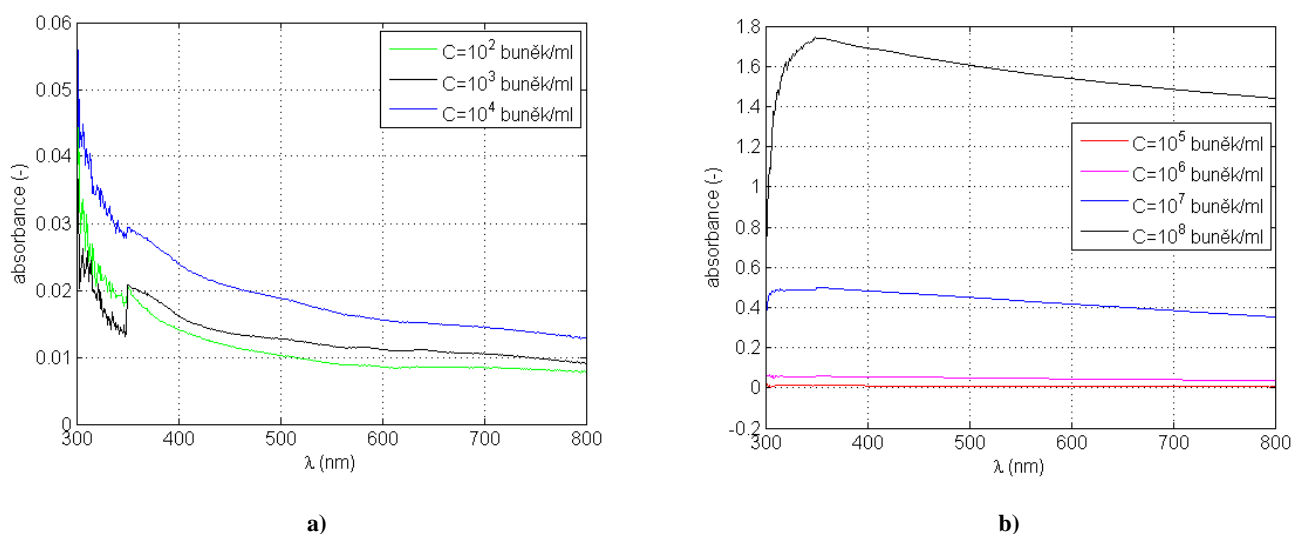
Po dosazení do (6) dostaneme (9). Z naměřené optické hustoty na začátku procesu růstu mikroorganismů a po uplynutí času  $t$ , tedy po změření počtu mikroorganismů na začátku procesu a po čase  $t$ , lze zjistit rychlost růstu daného mikroorganismu.

$$OD = OD_0 e^{\mu t} \quad (9)$$

Při překročení určité hodnoty hustoty buněk přestává platit vztah (9) a dochází ke zkreslení naměřených výsledků a je nutné provést korekci. Problém lze vyřešit zředěním vzorku v určitém poměru, kterým je pak nutné vydělit naměřená data zředěného vzorku. Výsledek pak reprezentuje skutečnou hodnotu optické hustoty pro vzorek v nezředěném stavu.

### 2.3.1 Data OD pro návrh modelu

Data absorbancí roztoku s kvasinkami o různé koncentraci jsou vyobrazena na grafech na obrázku 2. Absorbance roztoku byla měřena v intervalu vlnových délek  $\langle 300 \text{ nm} \div 800 \text{ nm} \rangle$ . Běžně se provádí měření absorbance ke zjištění koncentrace látky v roztoku na  $\lambda = 600 \text{ nm}$ . V tomto případě bylo prováděno měření roztoku o známé koncentraci buněk v roztoku za účelem zjištění jeho absorbance. Vlivem korekce (odečtení absorbance média, ve kterém se kvasinky nacházejí) jsou platná data absorbance roztoku při  $\lambda \geq 350 \text{ nm}$ .



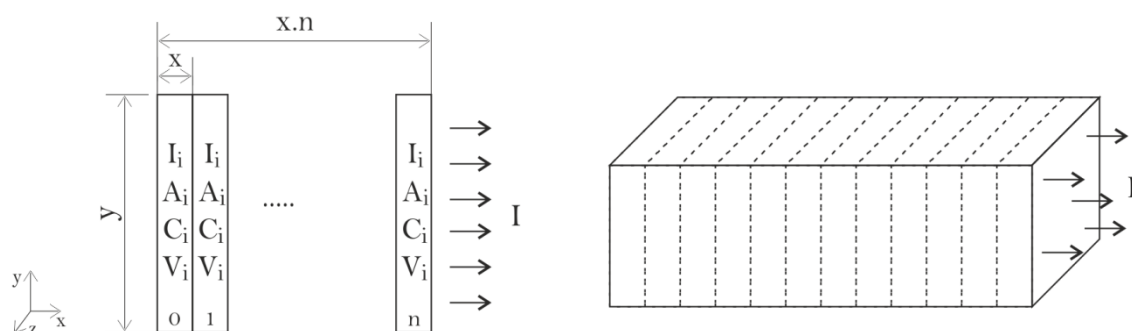
Obrázek 2: a) Závislost absorbance roztoku na vlnové délce pro koncentrace  $10^2$  až  $10^4$  buněk /ml  
b) Závislost absorbance roztoku na vlnové délce pro koncentrace  $10^5$  až  $10^8$  buněk /ml

Z naměřených dat lze vyvodit několik závěrů. Se zvyšující se koncentrací buněk v roztoku roste jeho absorpance. Při zvyšování vlnové délky zdrojového záření dochází k mírnému poklesu absorpance roztoku, tedy na vyšších vlnových délkách je velikost absorpance menší než na nízkých vlnových délkách.

### 3. Model a simulace

#### 3.1 Diskrétní model

Cílem modelování je výpočet zobrazení výsledné intenzity vyzařování ultra slabé emise fotonů v závislosti na koncentraci buněk v roztoku (jejich absorpanci) a na geometrických rozměrech vzorku.



Obrázek 3: Diskretizace úlohy

Pro zavedení modelu je vhodné vytvořit diskrétní síť z  $n$  elementárních struktur o rozměrech  $x$ ,  $y$ ,  $z$ . Síť je znázorněná na obrázku 3. Vzhledem k naměřeným datům absorpance roztoku, která jsou měřena v kyvetě o průměru 1 cm, je vhodné základní strukturu pro první přiblížení složit z hranolu o hraně 1 cm. Veškeré vypočtené intenzity vyzařování jsou tedy vztaženy k ploše detektoru o velikosti 1 cm<sup>2</sup>. Při znalosti intenzity vyzařování jedné buňky, která se pohybuje v intervalu  $\langle 10^{-1} \div 10^{-5} \rangle$  foton/(s.buňka), lze vypočítat intenzitu vyzařování elementární vrstvy podle (10).

$$I_i = I_b \cdot V_i \cdot C_i \quad (10)$$

Kde  $I_i$  je intenzita vyzařování světelného záření jedné vrstvy (foton/s),

$I_b$  je intenzita vyzařování světelného záření jedné buňky (foton/(s.buňka)),



$V_i$  je objem elementární vrstvy (ml),

$C_i$  je koncentrace buněk v elementární vrstvě (počet buněk/ml).

Absorbance vrstev v závislosti na koncentraci buněk v roztoku je známá z naměřených dat (viz. kapitola 2.3.1). Výsledná intenzita světelného záření vzorku je suma příspěvků dílčích intenzit vyzařování jednotlivých elementárních vrstev. Podle vztahu (11) pak lze vypočítat výslednou intenzitu vyzařování.

$$I = \sum_{i=0}^n I_i \frac{1}{(x(n-i))^2} e^{-A(x(n-i))} \quad (11)$$

Kde  $I$  je výsledná intenzita světelného záření (foton/s),

$I_i$  je intenzita vyzařování světelného záření jedné vrstvy (foton/s),

$A$  je absorbance jedné vrstvy (-),

$x$  je rozměr elementární vrstvy (cm),

$n$  je počet elementárních vrstev (-).

Člen  $\frac{1}{(x(n-i))^2}$  vyjadřuje útlum amplitudy vyzařování v závislosti na vzdálenosti zdroje záření od detektoru záření dle aproximace pro útlum amplitudy kulové vlny vlivem ředění energie do prostoru. Pro blízké vzdálenosti od detektoru nelze tuto aproximaci použít. Při umístění detektoru na hranu vzorku musí být zavedena korekce. Při modelování tohoto typu útlumu bylo použito několik odlišných postupů, které jsou srovnány v kapitole 3.3.

Převod jednotek intenzity světelného záření z foton/s na vyzářený výkon ve W byl proveden podle následujícího postupu. energii fotonu lze vyjádřit podle vztahu (12).

$$E_{eV} = \frac{h c}{\lambda} \quad (12)$$

Kde  $E_{eV}$  je energie fotonu (eV),

$h$  je Planckova konstanta (eV.s),

$c$  je rychlost světla (m/s),

$\lambda$  je vlnová délka fotonu (m).

Pro vlnovou délku  $\lambda = 400 \text{ nm}$  vychází podle (12) energie fotonu  $E_{eV} = 3,1 \text{ eV}$ . Dále platí, že  $1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  a  $W = \text{J/s}$ . Při znalosti intenzity vyzařování jedné buňky, která se pohybuje v rozmezí  $10^{-5} \div 10^{-1} \text{ foton/(s.buňka)}$ , lze vypočítat intenzitu vyzařování jedné buňky ve  $W/\text{buňka}$  podle (13) (pro  $I_b = 10^{-1} \text{ foton/(s.buňka)}$ ).

$$\begin{aligned} I_W &= I_b \cdot E_{eV} \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} = 0,1 \cdot 3,1 \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} = \\ &= 4,79 \cdot 10^{-20} \text{ W/buňka} \end{aligned} \quad (13)$$

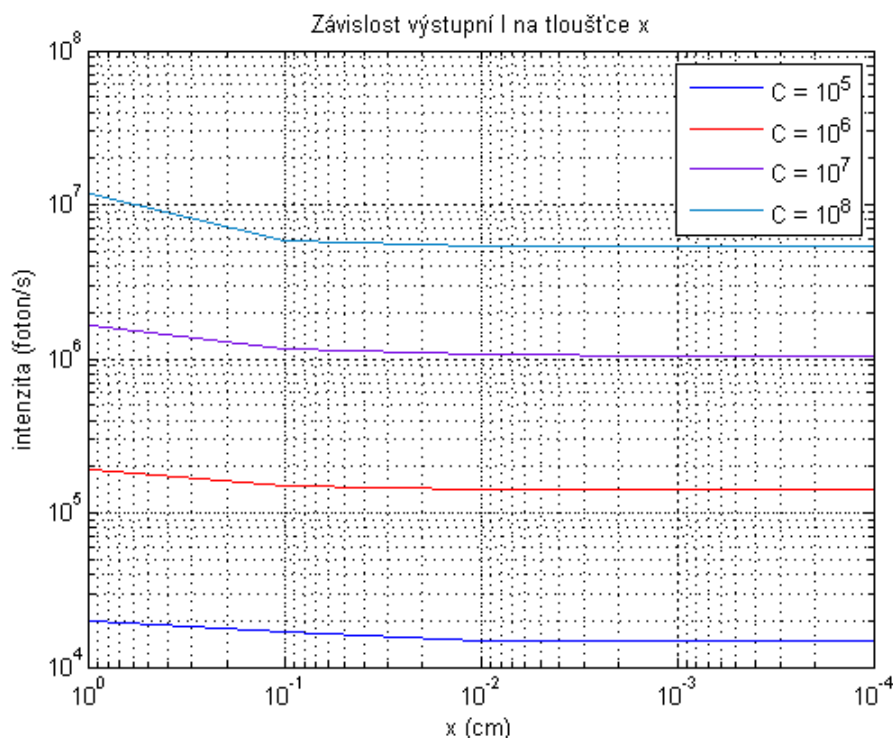
Při známé koncentraci buněk v roztoku  $C$  (buněk/ml) pak lze vypočítat vyzářený výkon ve wattech podle vztahu (14).

$$P = C \cdot I_W (W) \quad (14)$$

### 3.2 Výsledky modelu

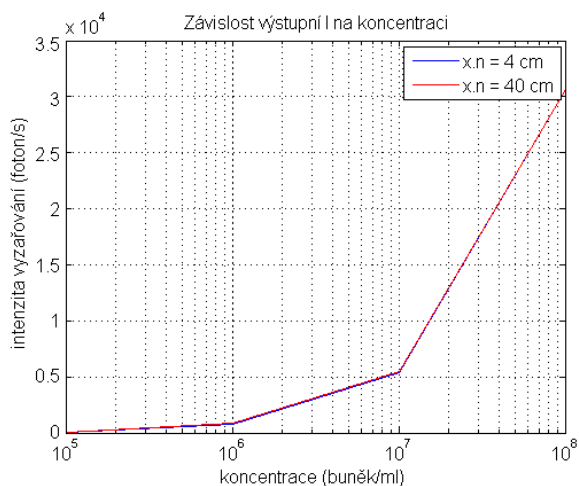
Pro přiblížení výsledků diskrétního modelu spojitému modelu, respektive reálnému chování, je nutné zužování základní vrstvy ve směru uvažované osy vyzařování. K prvnímu přiblížení byl rozměr  $x$  roven  $1 \text{ cm}$ . Z vypočtených dat na obrázku 4 je vidět, že postačující zúžení v rozměru  $x$  je na  $10 \text{ }\mu\text{m}$  vzhledem k chybě výpočtu. Tento rozměr není závislý na ostatních parametrech modelu, jako je například intenzita vyzařování jedné buňky nebo celková délka vzorku.

Výsledky výpočtu výstupní intenzity vyzařování z obrázku 5 ukazují, že v závislosti na rostoucí koncentraci buněk v roztoku v mezích  $10^5 \div 10^8 \text{ buněk/ml}$  dochází k nárůstu výstupní intenzity vyzařování. V logaritmických souřadnicích lze lépe pozorovat vliv absorpance buněk. Na nižších koncentracích v kratším vzorku vychází výstupní vyzářený výkon nižší než ve vzorku delším. Na vyšších koncentracích již vliv délky vzorku není patrný, jelikož vlivem útlumu absorpací se vyzařování účastní pouze několik posledních vrstev.

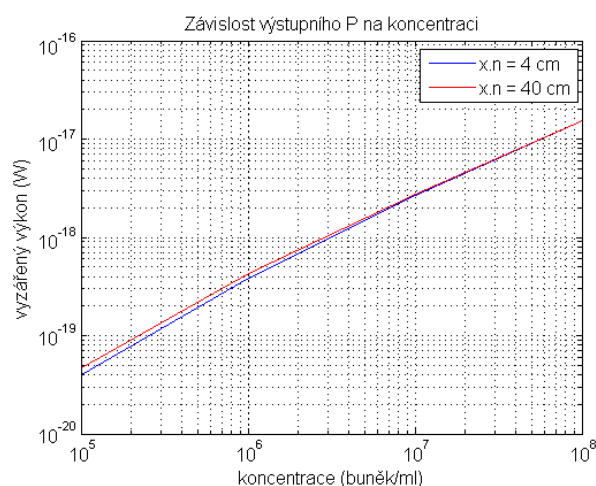


Obrázek 4: Závislost výstupní intenzity vyzařování na zužování elementární vrstvy pro různé koncentrace buněk ve vzorku C (buněk/ml)

Na intenzitě vyzařování jedné buňky je závislá celková výstupní intenzita vyzařování, potažmo celkový vyzářený výkon. Základní předpoklad pro modelování byl, že se intenzita vyzařování  $I_b$  pohybuje v intervalu  $10^{-5} \div 10^{-1}$  foton/(s.buňka). V tomto rozmezí proběhl výpočet pomocí navrženého modelu. Výsledky tohoto výpočtu jsou znázorněny na obrázku p.2.1 a p.2.2 v příloze 2. Ze známých naměřených reálných hodnot intenzity vyzařování, které se pohybují v řádech  $10^2 \div 10^3$  foton/(s.cm<sup>2</sup>), lze porovnáním s vypočtenými hodnotami přibližně určit intenzitu vyzařování jedné buňky pro další výpočty a další modelování. Dle vypočtených hodnot by se intenzita vyzařování buňky měla pohybovat v rozmezí  $10^{-5} \div 10^{-4}$  foton/(s.buňka). Hodnota intenzity vyzařování jedné buňky je velmi proměnlivá a je silně závislá na procesech uvnitř buňky, na prostředí, ve kterém se buňka nachází, a na dalších vlivech. Proto se výsledky naměřené a vypočtené intenzity vyzařování mohou lišit i v rozmezí řádů.



a)



b)

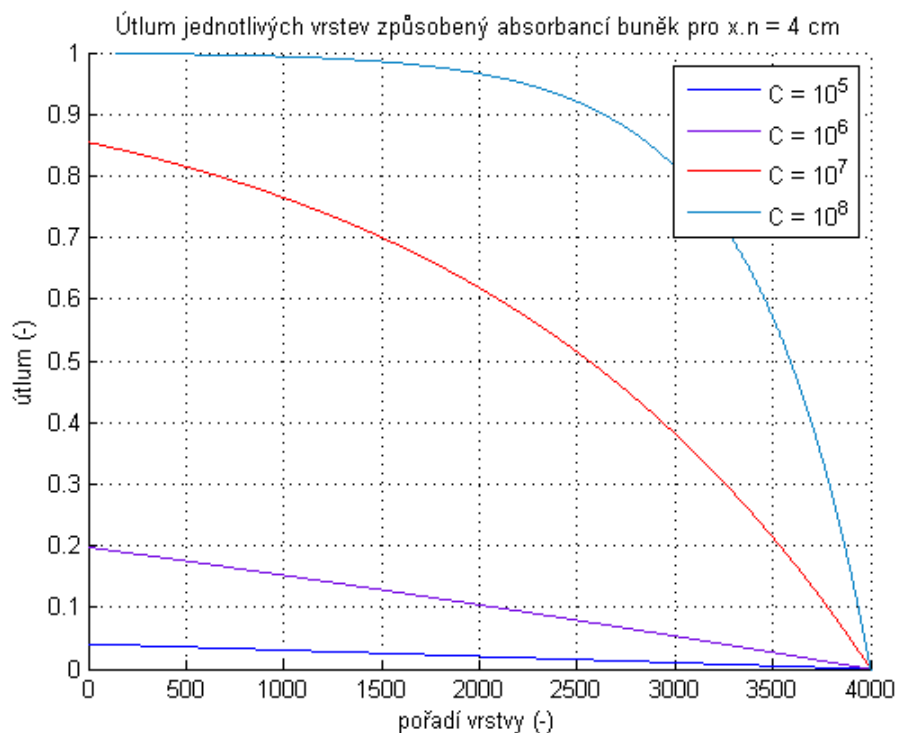
**Obrázek 5:** a) Závislost výstupní intenzity vyzářování na koncentraci buněk pro dvě délky vzorku  
b) Závislost výstupního vyzářeného výkonu na koncentraci buněk pro dvě délky vzorku  
(x.n = 4 cm, x = 10<sup>-3</sup> cm, I<sub>b</sub> = 10<sup>-3</sup> foton/(s.buňka), model s aproximací rovinné vlny)

### 3.3 Srovnání modelů

Modelování útlumu vyzářování v závislosti na vzdálenosti zdroje záření od detektoru je nutné v blízké zóně detektoru korigovat, jelikož v této zóně není možné použít aproximaci šíření kulové vlny.

Přístup k modelování byl zvolen dvojitý. Jeden z modelů používá aproximaci, která na hranici, která je určena rozměry detektoru, přechází z aproximace šíření kulové vlny na aproximaci šíření vlny rovinné. Další přístup je takový, že na hranici blízké zóny detektoru dochází k vypuštění členu modelující útlum šířením v prostoru a do výpočtu je zahrnutý pouze útlum způsobený absorbcí buněk. Dochází tak ke skokové změně výstupní intenzity vyzářování na hranici blízké zóny detektoru. Útlum jednotlivých vrstev způsobený pouze absorbcí buněk je pro rozměr x.n = 4 cm znázorněný na obrázku 6.

Výsledná intenzita vyzářování modelu s přechodem dvou aproximací je zobrazena na obrázku p.2.1 v příloze 2. Výhodnější pro zobrazení výsledků je logaritmické měřítko jak osy x tak i osy y. Toto zobrazení je znázorněné na obrázku p.2.2. Na dalším obrázku p.2.3 je zobrazena normovaná intenzita vyzářování na jednotku objemu, která byla zvolena 1 ml, a graf na obrázku p.2.4 zobrazuje výsledek přepočtu intenzity vyzářování na celkový vyzářený výkon.



**Obrázek 6: Závislost útlumu způsobeného absorbcí buněk pro jednotlivé vrstvy vzorku pro různé koncentrace buněk ve vzorku  $C$  (buněk/ml) ( $x.n = 4$  cm,  $x = 10^{-3}$  cm)**

Výsledky modelu se skokovou změnou intenzity vyzařování je lepší zobrazit v porovnání s předchozím modelem. Lze tak pozorovat odchylku výpočtu výstupní intenzity vyzařování dle použitého přístupu k modelování útlumu v blízkosti detektoru. Závislost pro oba modely je zobrazena na grafu na obrázku 7. Další charakteristikou zobrazenou na obrázku 7 je charakteristika modelu, který útlum způsobený šířením vlny prostorem neuvažuje vůbec. Tento model zahrnuje pouze útlum způsobený absorbcí buněk a to i ve větších vzdálenostech od detektoru.

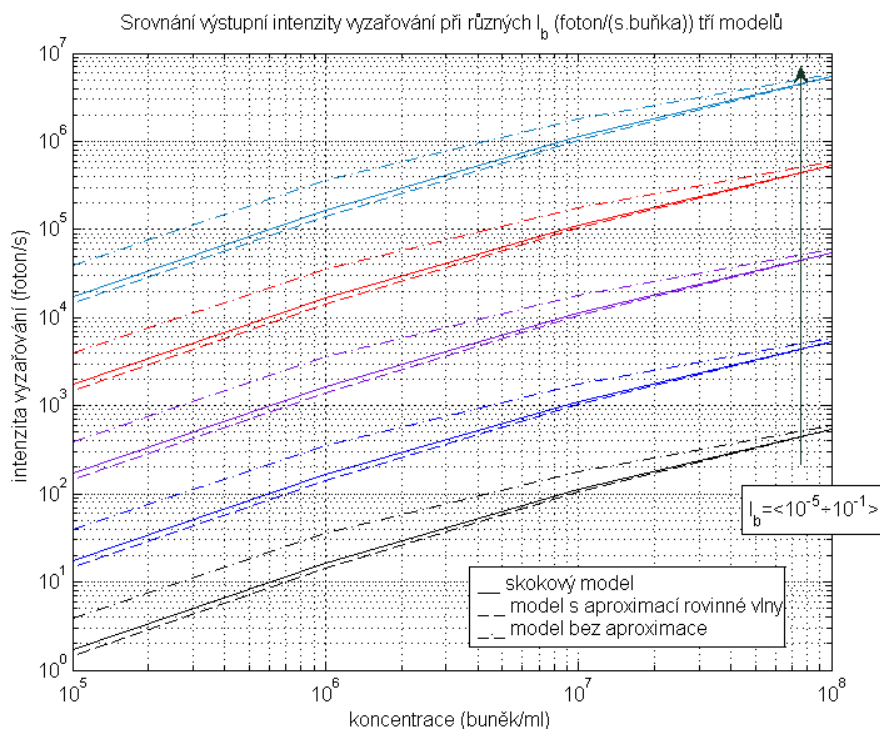
Z vyobrazených průběhů na obrázku 7 je patrné, že se oba způsoby modelování příliš neliší. Výsledné vypočtené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 2. Na nízkých koncentracích buněk v roztoku je odchylka výpočtu vyšší, naopak na vysokých koncentracích buněk v roztoku je výsledek výpočtu obou modelů shodný. Z výsledků uvedených v tabulce 2 i z grafu na obrázku 7 je patrné, že největší odchylka je při koncentraci buněk v roztoku  $10^5$  buněk/ml. Číselně je tato maximální odchylka rovna 15,11 %. Důvod snižování odchylky se zvyšující se koncentrací buněk je pozorovatelný na průbězích dílčích příspěvků jednotlivých vrstev k výsledné intenzitě vyzařování. Tyto průběhy jsou zobrazeny na obrázcích p.2.1 až p.2.4 v příloze 2. Na nízkých koncentracích je zřejmý

větší rozdíl příspěvků jednotlivých vrstev na konci hranice blízké vzdálenosti k detektoru. Oproti tomu jsou na vysokých koncentracích buněk v roztoku průběhy téměř nebo úplně shodné, jelikož i v blízkosti detektoru má dominantní vliv na útlum jednotlivých vrstev útlum způsobený absorbcí buněk. K porovnání vlivu útlumu způsobeného šířením záření prostorem jsou na obrázcích p.2.1 až p. 2.4 vyobrazeny i dílčí příspěvky vrstev modelu, který vliv tohoto druhu útlumu neuvažuje.

**Tabulka 2: Srovnání parametrů navržených modelů**

$I_b = 10^{-5}$ foton/(s.buňka)			
Koncentrace buněk v roztoku (buněk/ml)	Výsledná intenzita vyzařování (foton/s)		Odchylka výpočtu (%)
	Skokový model	Model s aproximací rovinné vlny	
$10^5$	1,7310	1,4695	15,11
$10^6$	16,5143	14,1301	14,44
$10^7$	112,0011	104,6871	6,53
$10^8$	539,2354	539,2354	0,00
$I_b = 10^{-4}$ foton/(s.buňka)			
$10^5$	17,3104	14,6950	15,11
$10^6$	165,1432	141,3011	14,44
$10^7$	1120,0112	1046,8714	6,53
$10^8$	5392,3538	5392,3538	0,00
$I_b = 10^{-3}$ foton/(s.buňka)			
$10^5$	173,1036	146,9500	15,11
$10^6$	1651,4321	1413,0110	14,44
$10^7$	11200,1115	10468,7145	6,53
$10^8$	53923,5378	53923,5378	0,00
$I_b = 10^{-2}$ foton/(s.buňka)			
$10^5$	1731,0359	1469,4998	15,11
$10^6$	16514,3207	14130,1095	14,44
$10^7$	112001,1152	104687,1447	6,53
$10^8$	539235,3780	539235,3780	0,00
$I_b = 10^{-1}$ foton/(s.buňka)			
$10^5$	17310,3586	14694,9981	15,11
$10^6$	165143,2075	141301,0954	14,44
$10^7$	1120011,1518	1046871,4468	6,53
$10^8$	5392353,7796	5392353,7796	0,00

Intenzita vyzařování jedné buňky nemá vliv na odchylku výpočtu uvedených modelů. Má vliv pouze na konečnou hodnotu výsledné intenzity vyzařování, která se zvyšující se intenzitou vyzařování jedné buňky úměrně roste.



**Obrázek 7: Závislost výstupní intenzity vyzařování na použitém modelu, koncentraci buněk a intenzitě vyzařování jedné buňky ( $x.n = 4 \text{ cm}$ ,  $x = 10^{-3} \text{ cm}$ )**

## 4. Experimentální část

### 4.1 Úvod k experimentům

Experimentální ověření výsledků navrženého modelu bylo provedeno nejdříve pomocí chemické luminiscence a následně na vzorcích biologického původu.

Prvotní ověření pomocí chemické luminiscence bylo zvoleno z důvodu vyšší stability vyzařování a možnosti predikovatelnějšího chování než v případě měření na vzorcích biologického původu. Základní myšlenkou experimentu je, že se vytvoří roztok látky emitující fotony a látky, která bude mít definovanou absorbanci. Lze tak napodobit vyzařovací vlastnosti, které mají vzorky biologického původu a jsou použity jako výchozí data pro navržený model.

Základní látkou emitující fotony bude roztok luminolu ( $C_8H_7N_3O_2$ ) od firmy Serva Electrophoresis, který vyzařuje fotony na vlnové délce kolem 400 nm (428 nm). Do roztoku bude přimícháván turbiditní standard 4000 NTU vyrobený firmou RTC (Resource Technology Corporation) s definovanou absorbancí a velikostí částic. Jako

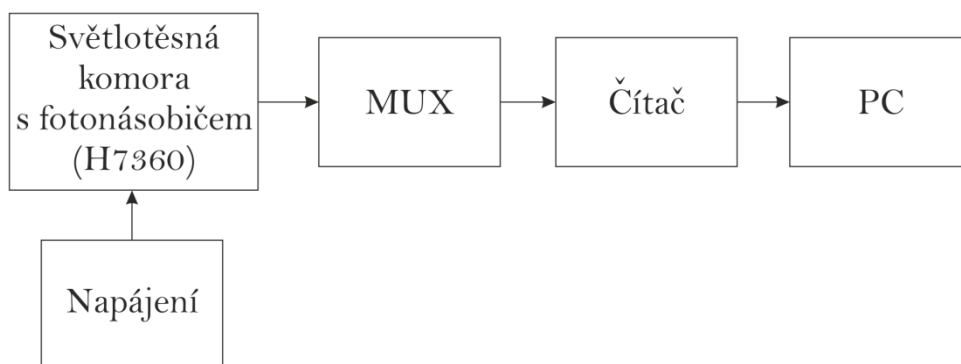
výchozí pufr byl použit 5 mM roztok hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ) od firmy Penta.

## 4.2 Schéma měřicího systému

Měření probíhalo v laboratoři pro měření elektrodynamických biosignálů na ÚFE AV ČR. K měření byla využita měřicí soustava s fotonásobičem H7360-01 ve světlotěsné komoře. Datasheet k fotonásobiči H7360-01 je v příloze 10.

Měřicí systém pracuje v režimu počítání výstupních impulzů. Výstup z fotonásobiče je připojený k diskriminátoru. Diskriminátor vybírá a upravuje výstupní impulzy z fotonásobiče. Komparační úroveň pro výběr platných impulzů je volitelná. Správným nastavením této úrovně lze potlačit rušení na výstupu diskriminátoru. Postup nastavení je rozepsaný v příloze 1. Výstup diskriminátoru je připojený k multiplexoru, za kterým je zapojený čítač impulzů. Čítač obsahuje komunikační rozhraní pro odesílání naměřených dat na počítač, na kterém dochází k jejich zpracování. Uvedená měřicí soustava nedisponuje prvky pro stabilizaci teploty v měřicí komoře. Teplota při měření byla pokojová, udržovaná pouze klimatizací v místnosti kolem hodnoty 20 °C. Blokové schéma měřicí soustavy je zobrazené na obrázku 8.

Příprava roztoků k měření probíhala za mírně sníženého osvětlení. Namíchané roztoky byly mezi jednotlivými měřeními skladovány v lednici. Tento druh skladování prodlužuje přípravu k měření, jelikož měřené vzorky by měly mít kvůli možnosti srovnání jednotlivých měření stejnou, tedy pokojovou teplotu. Před každým měřením je kvůli získání pokojové teploty nutné nechat vzorky odstát.



Obrázek 8: Blokové schéma měřicí soustavy s fotonásobičem H7360



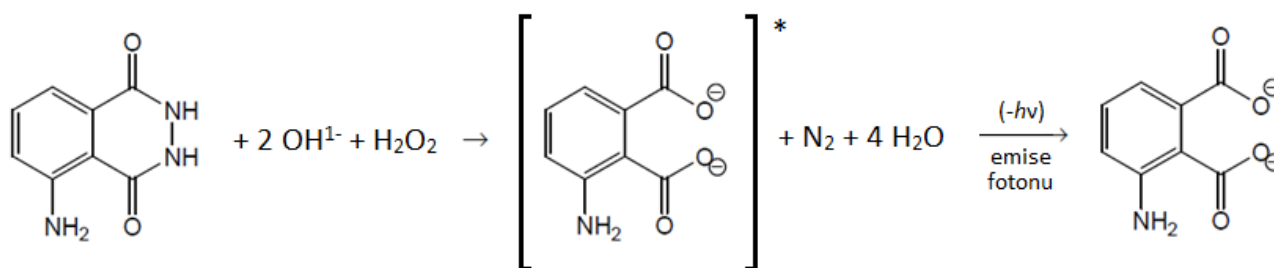
Při vkládání a vyndávání měřených vzorků z a do měřicí světlotěsné komory je nutné snížit osvětlení v místnosti na minimum, aby nedošlo k oslepení fotonásobiče. Snížení osvětlení v místnosti je nutné i v případě instalace fotonásobiče do stojanu. Umístění fotonásobiče ve stojanu a schematický náčrt měřicího systému uvnitř světlotěsné komory je vyobrazen na obrázku 16.

### 4.3 Měření se vzorky chemického původu

#### 4.3.1 Mechanizmy vyzařování luminolu

Jelikož je při následujících experimentech nutné ovlivňovat intenzitu vyzařování luminolu, je vhodné alespoň stručně popsat chemiluminiscenční reakce, díky kterým tato látka emituje fotony.

Chemiluminiscenční reakce luminolu jsou všechny oxidativní, avšak jsou rozdílné podle druhu rozpouštědla, ve kterém je luminol rozmíchán. Rozpouštědlo může být protické nebo aprotické. V aprotických médiích je k chemiluminiscenci zapotřebí kyslík. V protických médiích, jejichž nejběžnější představitel je voda, musí být k provedení reakce přítomné ještě oxidační činidlo a katalyzátor, například peroxid vodíku [12]. Peroxid vodíku je rozložen na kyslíkové radikály, které způsobují oxidaci luminolu. Rychlost rozkladu peroxidu vodíku nezávisí na pH roztoku. Na pH roztoku je však závislá celková intenzita vyzařování chemiluminiscence [13].



Obrázek 9: Schéma reakce luminolu vedoucí k chemiluminiscenci (podle [12,14])

Při experimentech provedených v souvislosti s touto prací byl luminol rozpuštěn v ultračisté vodě, jedná se tedy o případ s protickým rozpouštědlem. Výsledkem chemické reakce probíhající v aprotických médiích je 3-aminoftalát. V případě protických rozpouštědel nastávají reakce velmi intenzivní, takže pak nastává degradace vzniklého aminoftalátu. Předpokládá se však, že reakce probíhají stejně. V obou

případech se výsledný produkt (iont aminoftalátu) nachází v elektronicky excitovaném stavu a při přechodu do základního stavu je zodpovědný za emisi fotonů [12]. Vyzařování v protickém médiu probíhá v oblasti modré barvy, tedy na vlnových délkách kolem 425 nm. Schéma chemické reakce je zobrazené na obrázku 9.

### 4.3.2 Příprava roztoku

V první fázi experimentu bylo nutné zjistit vhodnou koncentraci luminolu a peroxidu vodíku, aby docházelo k vyzařování fotonů z roztoku o správných intenzitách. Výchozí hodnotou koncentrace luminolu pro měřený roztok je 5  $\mu\text{M}$ . Tato hodnota vychází z dřívějších pokusů s danou látkou. K výpočtu hmotnosti potřebné k rozmíchání roztoku o požadované koncentraci v daném objemu použijeme vztah (15). Objem roztoku je 50 ml. Uvedená hodnota byla zvolena zaprvé z důvodu snadnější manipulace při nastavování různých koncentrací látek, zadruhé s ohledem na vybavení laboratoře a zatřetí kvůli spotřebě roztoku při různých měřeních a pokusech.

$$m = M_r \cdot c \cdot V \quad (15)$$

Kde  $m$  je výsledná hmotnost látky (mg),

$M_r$  je molární hmotnost látky (mg/mM),

$c$  je molární koncentrace (molarita) látky (mM/ml),

$V$  je objem výsledného roztoku (ml).

Po dosazení hodnot do vztahu (15) dostáváme hodnotu 0,044 mg.

$$m = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 177,16 \cdot 50 = 0,044 \text{ mg} \quad (16)$$

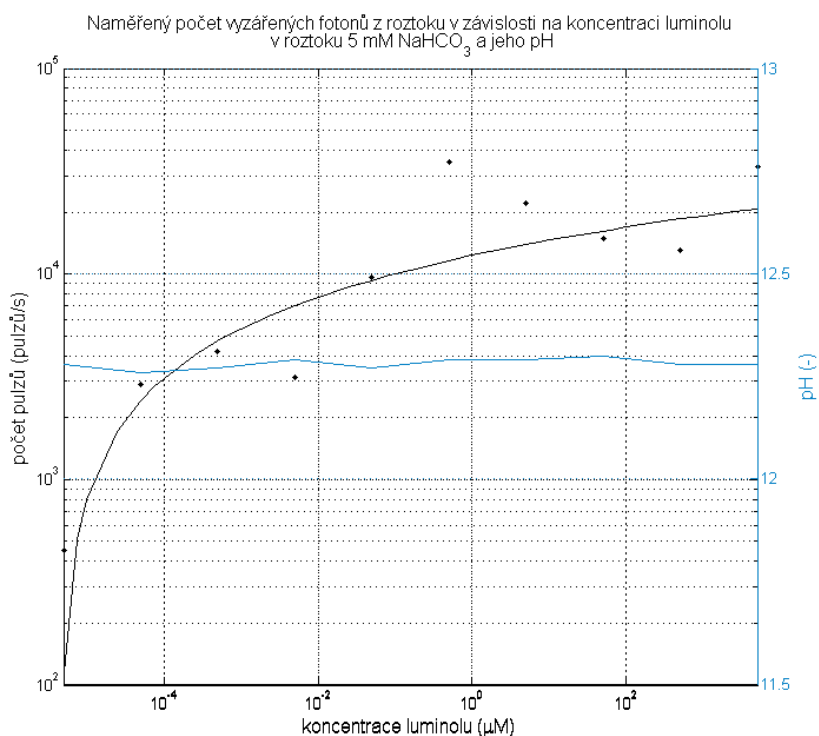
Luminol je rozpuštěný v ultračisté vodě s vodivostí  $5 \cdot 10^{-6} \text{ S/m}$ . Pro dobré rozpuštění luminolu je nutné zvýšit pH kapaliny, ve které se má luminol rozpouštět, například pomocí hydroxidu sodného (NaOH). Hydroxid sodný použitý ve všech následujících experimentech pochází od firmy Penta.

Z důvodu velmi nízké hmotnosti potřebné k získání roztoku o koncentraci 5  $\mu\text{M}$  je nutné navázat několikanásobek vypočtené hodnoty a pak ve stejném poměru zředit namíchaný roztok. Nižší koncentrace, se kterými se pracuje při ověřování modelu, jsou získány

dalším ředěním namíchaného roztoku. Vyzařování fotonů z měřeného roztoku nesmí být příliš silné, aby nedošlo k saturaci a oslepení, popřípadě i poškození měřicího fotonásobiče. Výchozí roztok k ředění obsahoval luminol o koncentraci 5 mM. Hmotnost naváženého luminolu byla 44,3 mg.

Měření pro zjištění vhodné koncentrace luminolu probíhalo v rozmezí koncentrací  $5 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^3 \mu\text{M}$ . K usnadnění výpočtů a ulehčení práce je výhodné pracovat s desetinásobky koncentrací původních hodnot. Během měření bylo udržováno konstantní pH kolem hodnoty 12,25. Do roztoku nebylo přidáno žádné oxidační činidlo, které by způsobilo urychlení reakce vedoucí k vyzařování fotonů. Graf zachycující měření je zobrazen na obrázku 10.

Z měření vyplývá, že při uvedených koncentracích se naměřená intenzita světla pohybuje v rozmezí  $10^2 \div 10^4$  pulzů/s a že se zvyšováním koncentrace luminolu dochází ke zvyšování počtu vyzářených fotonů. Odchytky od trendu, tedy od zvyšování intenzity vyzařování se zvyšující se koncentrací, jsou způsobeny především krátkou dobou měření. V počáteční fázi měření se totiž silně projevují vlivy rozmíchání roztoku. Tyto odchytky jsou výrazné hlavně při vyšších koncentracích luminolu v roztoku. Změřené hodnoty intenzit záření se pohybují v mezích, které jsou vhodné pro měření fotonásobičem.



**Obrázek 10:** Graf závislosti počtu vyzářených fotonů na koncentraci luminolu v roztoku při konstantním pH (V = 3 ml, měřeno na Petriho misce)

### 4.3.3 Faktory ovlivňující intenzitu vyzařování luminolu

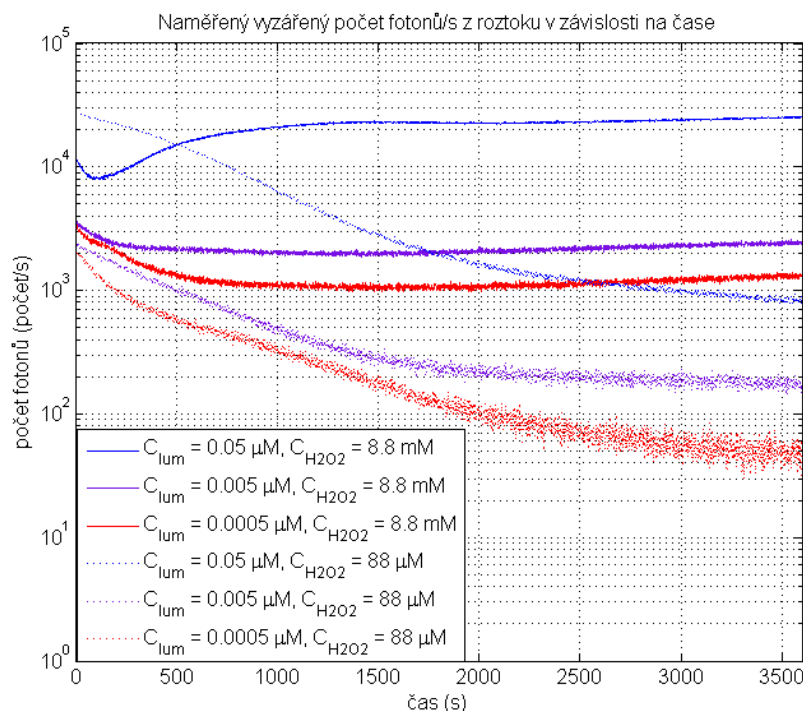
Hlavními faktory, kterými se nastavuje výsledná intenzita vyzařování měřeného vzorku, jsou koncentrace luminolu a koncentrace peroxidu vodíku při konstantní hodnotě pH v měřeném vzorku. Tyto a další faktory ovlivňující počet vyzářených fotonů budou rozebrány níže.

Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím vyzařování fotonů ze vzorku je koncentrace oxidačního činidla. V tomto případě je jako oxidační činidlo použit roztok peroxidu vodíku o dané koncentraci. V laboratoři je k dispozici jako výchozí roztok 30 % roztok peroxidu vodíku od firmy Penta. Pro přepočítání z procentuální na molární koncentraci je nutný předpoklad, že 1 % = 10 mg/ml. Podle vzorce (17) při znalosti molární hmotnosti peroxidu vodíku lze vypočítat koncentraci výchozího roztoku v molech. Po dosazení do vztahu (17) vychází hodnota 8,82 M. Podle dříve měřených dat by se měla koncentrace peroxidu vodíku v roztoku pohybovat v řádech mM. Požadované koncentrace peroxidu vodíku v roztoku lze tedy dosáhnout ředěním výchozího 30 % roztoku.

$$c = \frac{m}{M_r} (M) \quad (17)$$

$$c = \frac{300}{34,01} = 8,82 M \quad (18)$$

Na grafu na obrázku 11 jsou vyobrazené časové závislosti vyzářeného počtu fotonů pro jednotlivé kombinace koncentrací luminolu a peroxidu vodíku ze vzorku o objemu 3 ml měřeného na Petriho misce. Z grafu je dobře pozorovatelný vliv peroxidu vodíku na vyzařování luminolu. Při stonásobném zvýšení koncentrace  $H_2O_2$  (z 88  $\mu M$  na 8,8 mM) v roztoku dojde ke zvýšení počtu vyzářených fotonů přibližně desetkrát. Podle těchto naměřených dat z obrázku 11 bude pro další měření vhodná koncentrace 8,8 mM  $H_2O_2$ . Jedná se tedy o tisíckrát zředěný výchozí 30 % roztok. K dosažení výše zmíněné koncentrace je nutné do výchozího objemu 49,5 ml přidat 0,5 ml 3 % roztoku peroxidu vodíku.

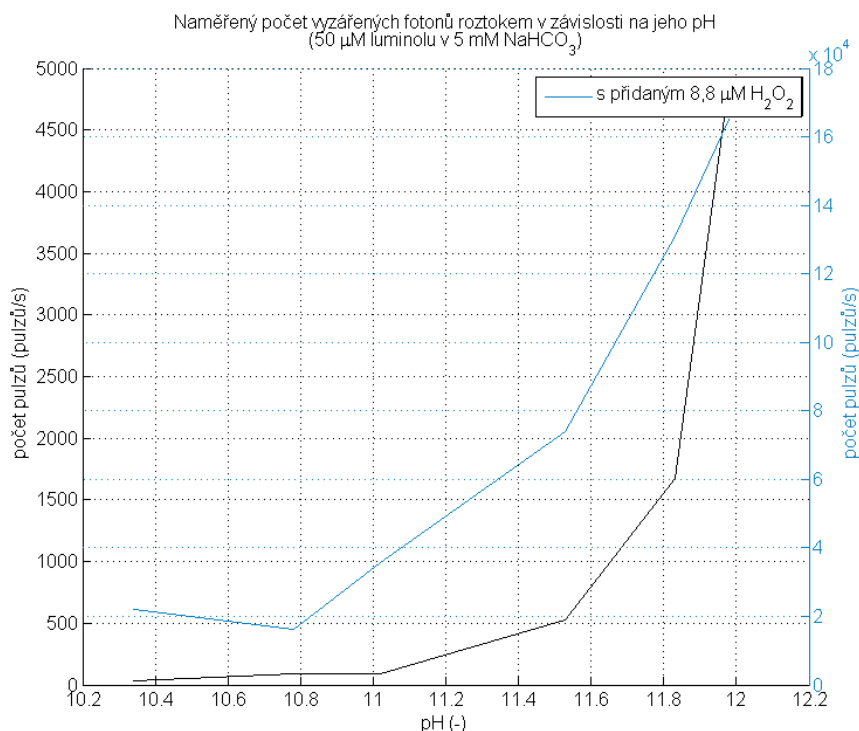


**Obrázek 11:** Graf zobrazující časovou závislost vyzářených fotonů z roztoku o dané koncentraci luminolu a dané koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $V = 3 \text{ ml}$ , měření na Petriho misce)

Výtěžek vyzařování fotonů luminolem je dále závislý na pH měřeného vzorku. Naměřené závislosti pro konstantní koncentraci luminolu  $50 \mu\text{M}$  v roztoku a různé pH jsou vyobrazeny na grafu na obrázku 12. Z naměřených hodnot je patrné, že při zvyšujícím se pH roste intenzita vyzařování měřeného vzorku. Tento jev nastává jak pro vzorek bez přidaného oxidačního činidla, tak pro vzorek s přidáním peroxidu vodíku.

Pro nastavení a udržení konstantního pH v měřeném vzorku je použit roztok hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ) a jako výchozí pufr je použit roztok  $5 \text{ mM}$  hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ). Pufr je rozmícháván ředěním z  $50 \text{ mM}$  roztoku  $\text{NaHCO}_3$ , na který bylo potřeba rozmíchat v  $50 \text{ ml}$  ultračisté vody  $210 \text{ mg}$  hydrogenuhličitanu sodného. Podle vztahu (19) po dosazení do výrazu (15). Hodnota pH, se kterou se bude pracovat je poměrně vysoká (přibližně 12,3). Je to z toho důvodu, že luminol se v roztoku s vyšším pH lépe rozpouští.

$$m = 5 \cdot 10^{-2} \cdot 84,01 \cdot 50 = 210,03 \text{ mg} \quad (19)$$

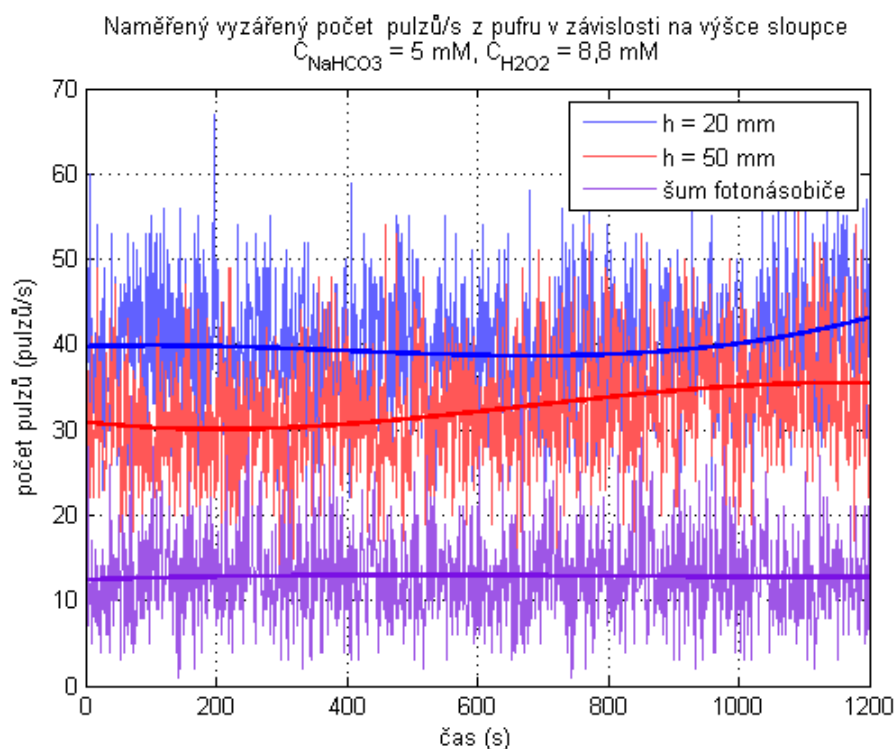


**Obrázek 12:** Graf vyzářování fotonů v závislosti na pH měřeného roztoku pro vzorek bez a s přidaným peroxidem vodíku ( $V = 3$  ml, měřeno na Petriho misce)

#### 4.3.4 Faktory ovlivňující výsledky měření

Faktory, které ovlivňují výsledky měření, můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. Jednou skupinou bude ovlivňování výsledků měření samotnou měřicí soustavou (systematická chyba měření) a do druhé skupiny budou zařazeny vlivy samotného měřeného vzorku (náhodná chyba měření).

Dominantním vlivem měřicí soustavy na výsledky měření bude šum fotonásobiče. Naměřený průběh šumu fotonásobiče v závislosti na čase je pro sedmiminutový měřený interval zobrazený na grafu na obrázku p.3.1 v příloze 3. Měření probíhá tak, že ve světlotěsné komoře není umístěn žádný vzorek. Délka měření není nutná příliš dlouhá, pokud dojde v průběhu měření (mezi jednotlivými měřeními) ke kontrole a ověření šumových vlastností měřicí soustavy. Průměrná hodnota šumu měřicího fotonásobiče se pohybuje v rozmezí  $12 \div 16$  pulzů/s. Hodnota šumu je relativně nízká, takže bude mít vliv na výsledky pouze při měření velmi nízkých intenzit vyzářování.



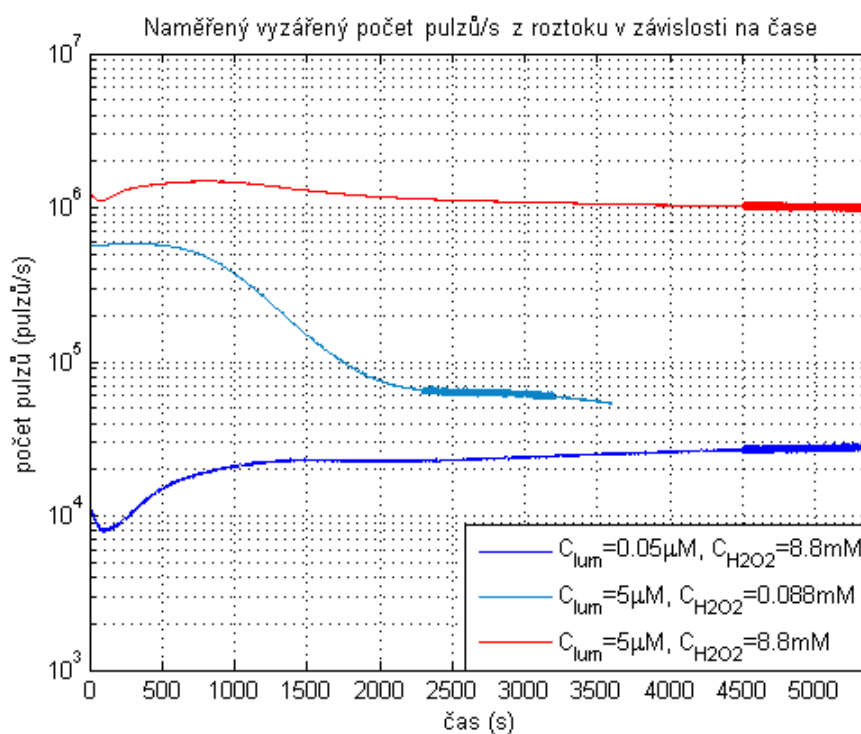
**Obrázek 13:** Naměřená závislost vyzářování fotonů pozadím (pufrům) v uzavřené zkumavce pro dvě výšky hladiny pufru

Pokud bychom chtěli striktně sledovat pouze vyzářování rozmíchaného luminolu s přispěním peroxidu vodíku ke zvýšení výtěžku vyzářování, museli bychom od naměřených výsledků odečíst vlastní svícení pozadí neboli vyzářování pufru, ve kterém je luminol rozmíchan. Teoreticky by se tato hodnota měla velmi blížit šumu měřícího fotonásobiče, jelikož se nepředpokládá, že by roztok  $\text{NaHCO}_3$  s ultračistou vodou emitoval fotony. Z naměřených výsledků zobrazených na obrázku 13 lze vidět, že jistá úroveň vyzářování fotonů z pozadí ( $20 \div 30$  pulzů/s) je při experimentu přítomná. Při měření nízkých intenzit se musí tato úroveň brát na zřetel stejně jako šum fotonásobiče.

**Tabulka 3:** Procentuálně vyjádřená stabilita různých roztoků

Koncentrace v roztoku	Interval (s)	Délka intervalu (s)	Přírůstek / úbytek vyzářování (%)
$C_{\text{lum}} = 0,05 \mu\text{M}$ , $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 8,8 \text{ mM}$	4500 - 5400	900	6,03
$C_{\text{lum}} = 5 \mu\text{M}$ , $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,088 \text{ mM}$	2300 - 3200	900	-9,90
$C_{\text{lum}} = 5 \mu\text{M}$ , $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 8,8 \text{ mM}$	4500 - 5400	900	-3,37

Důležitým faktorem ovlivňujícím výsledky měření z oblasti vlivů měřeného vzorku je časová stabilita vyzařování namíchaného roztoku. Na obrázku 14 jsou vyobrazeny naměřené hodnoty pro několik koncentrací luminolu a peroxidu vodíku zatím bez přidaného turbiditního standardu. Na naměřených průbězích je dobře znatelný vliv koncentrace luminolu na množství vyzářených fotonů (se zvyšující se koncentrací luminolu dochází ke zvýšení počtu vyzářených fotonů) a dále vliv koncentrace oxidačního činidla na rychlost ustálení intenzity vyzařování. Vyšší koncentrace peroxidu vodíku vede zaprvé ke zvýšení počtu vyzářených fotonů (v ustálené části přibližně o desetinásobek) a zadruhé k již zmíněné vyšší rychlosti stabilizace intenzity vyzařování. Silně vyznačené úseky jsou části, ve kterých již došlo k relativně dobré stabilizaci počtu vyzářených fotonů. Stabilitu lze vyjádřit procentuálně. Pro názornost jsou vypočtené hodnoty pro uvedené úseky z naměřených průběhů shrnuté v tabulce 3.



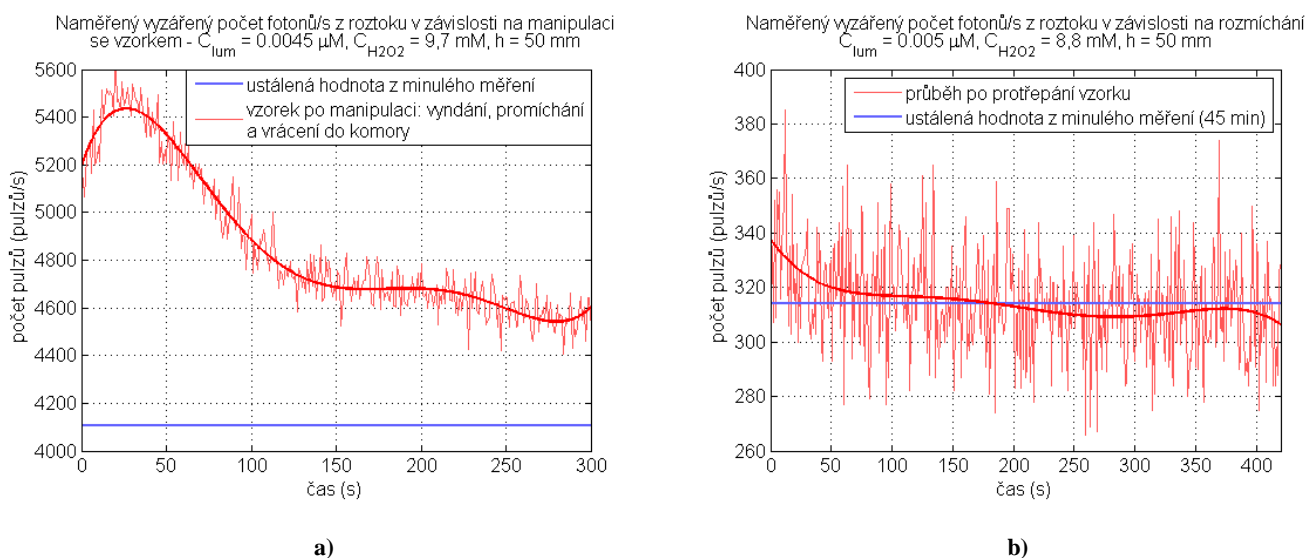
Obrázek 14: Naměřená závislost vyzařování fotonů v závislosti na čase (stabilita vyzařování) pro různé kombinace koncentrací luminolu a  $H_2O_2$  ( $V = 3$  ml, měřeno na Petriho misce)

Měření je nutné provádět v delším časovém kroku, jelikož ke stabilizaci intenzity vyzařování dochází až po několika desítkách minut. Průměrně se tato doba ustálení pohybuje kolem 40 minut. Poté už se vyzařování fotonů stabilizuje nebo dochází k velmi malému a velmi pomalému poklesu intenzity vyzařování. Zmíněná hodnota času



potřebného k ustálení je dobře čitelná na obrázku p.4.1 v příloze 4, na kterém je zobrazený graf dlouhodobého měření vzorku. Z grafu jsou dále pozorovatelné mírné fluktuace počtu vyzářených fotonů, které jsou zapříčiněny mírným kolísáním teploty v místnosti. Celková doba měření byla přes 20 hodin. Pokud je potřeba k měření kratší časový úsek, je nutné nechat vzorek nejprve ustálit mimo měřicí komoru a měřit až po určité době. Lze tak dosáhnout velmi stabilního počtu vyzářovaných fotonů v závislosti na čase, jak lze vidět například na obrázku 18b.

Ustálení vyzářování fotonů je ovlivněno mnoha faktory - teplotou, rozmícháním nebo manipulací s roztokem, koncentrací oxidačních činidel v okolí a ve vzorku nebo osvětlením měřeného vzorku. Oxidačními činidly v okolí vzorku jsou zřejmě především blíže neurčené reaktivní kyslíkové formy, které se nacházejí v okolní atmosféře vzorku. Tyto reaktivní kyslíkové formy ovlivňují oxidační procesy ve vzorku a zapříčiňují tak zvyšování intenzity vyzářování. Vliv rozmíchání v uzavřené a otevřené měřicí nádobě je patrný z grafů na obrázku 15. Na obrázku 15a je zobrazený průběh naměřeného počtu fotonů po promíchání vzorku v otevřené kádince a na obrázku 15b je zachycený naměřený počet fotonů po promíchání vzorku v uzavřené zkumavce. Výška hladiny vzorku byla v obou případech 50 mm. Průběhy jsou porovnávány s ustálenými hodnotami z dlouhodobých měření provedených před pokusem. Z průběhů je vidět vliv ustálené okolní atmosféry v uzavřené nádobě na stabilitu vzorku. Vliv promíchání na stabilitu vyzářování měřeného vzorku pro uzavřenou nádobu je nižší než pro nádobu otevřenou.

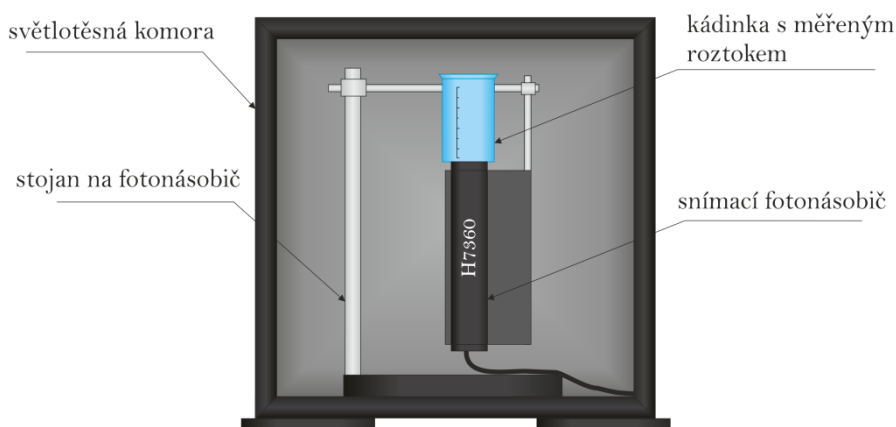


**Obrázek 15: a) Intenzita vyzářování ze vzorku v otevřené nádobě po jeho promíchání pro výšku vzorku  $h = 50 \text{ mm}$   
b) Intenzita vyzářování ze vzorku v uzavřené nádobě po jeho promíchání pro výšku vzorku  $h = 50 \text{ mm}$**

### 4.3.5 Měření s většími objemy

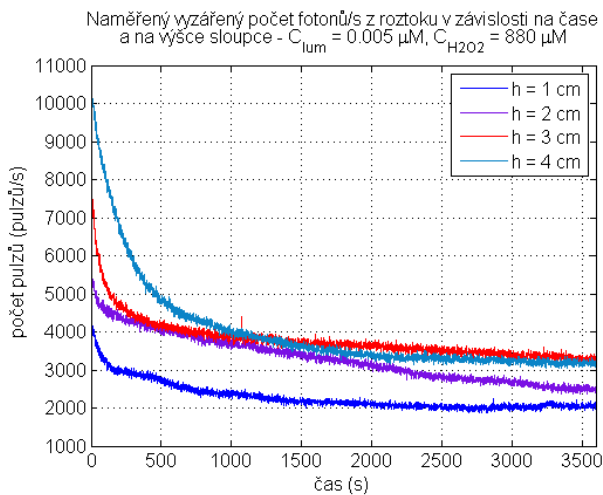
Všechna uskutečněná měření ke zjištění požadovaných koncentrací látek ovlivňujících výslednou intenzitu vyzařování byla prováděna na malém objemu vzorku (3 ml), jelikož byl vzorek umístěn do Petriho misky. Pro ověření modelu je nutné dále zjistit, jak se vzorek o daných koncentracích chová při větších objemech. Měřené objemy a geometrie měřeného vzorku by se měly pohybovat v rozmezí zadaných modelem, aby nedošlo k velké odchylce mezi měřeným vzorkem a vzorkem uvažovaným v modelu.

Jedno z prvních ověření je vliv výšky hladiny na výslednou intenzitu vyzařování. Pro první měření byla zvolena otevřená kádinka o průměru 35 mm a výšce 65 mm. Jedná se tedy o objemy v rozmezí 10 – 55 ml. Zvolení kádinky jako prvotního tvaru určujícího rozměry vzorku bylo vhodné vzhledem k instalaci do měřicí komory, která je limitována svými vnitřními rozměry. Schéma měřicího systému ve světlotěsné komoře je zobrazeno na obrázku 16.

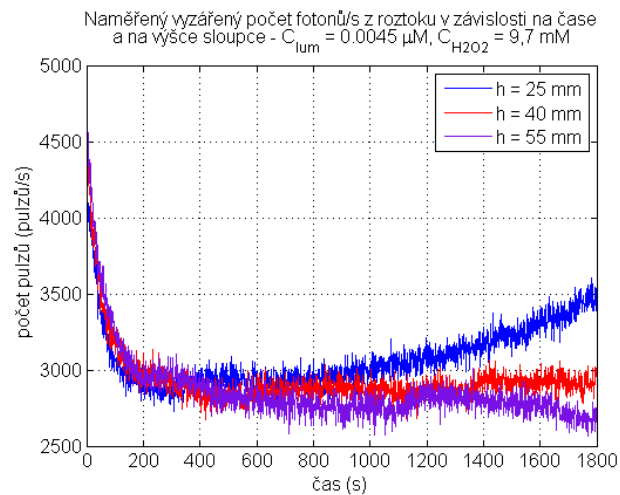


Obrázek 16: Schéma měřicího systému ve světlotěsné komoře

Vzhledem k vnějším vlivům (viz. kapitola 4.3.4) se při měření nenaplnil předpoklad snižování intenzity vyzařování se snižováním hladiny, respektive objemu měřeného roztoku. Naměřené hodnoty jsou vyobrazeny na grafech na obrázku 17. Z grafů je vidět, že zvyšování objemu měřeného vzorku, respektive zvyšování výšky jeho sloupce, nekoresponduje se zvyšováním intenzity vyzařování. V otevřené kádince se znatelně uplatňuje vliv rozmíchání a manipulace se vzorkem a to zřejmě hlavně kvůli reaktivním kyslíkovým formám v okolní atmosféře (obrázek 15a).



a)



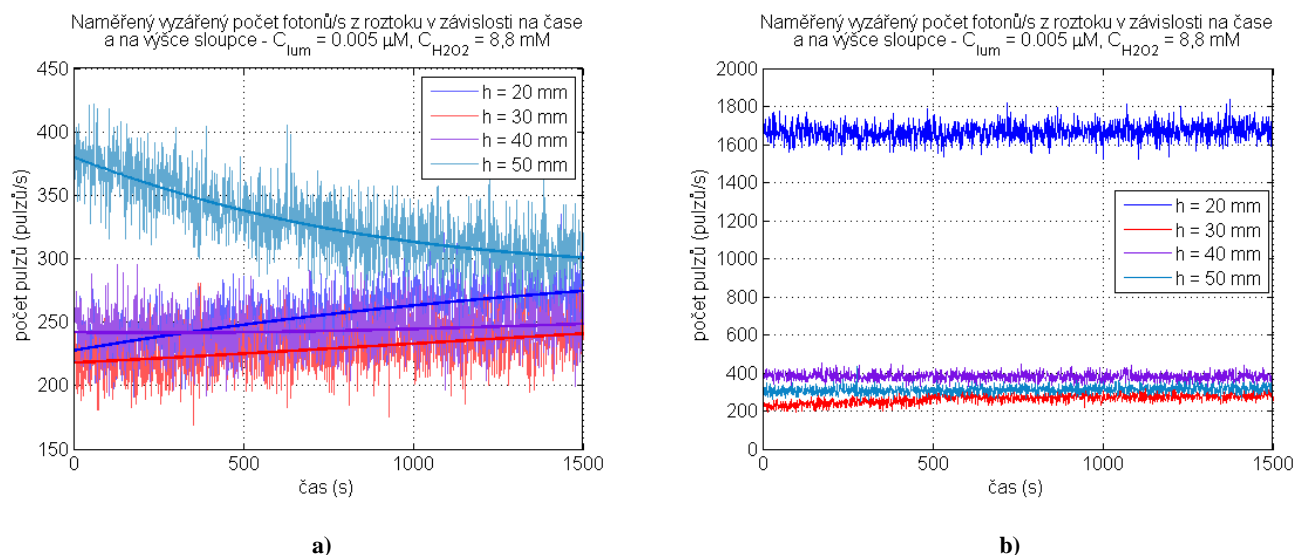
b)

**Obrázek 17: a) Graf intenzity vyzářování v závislosti na výšce sloupce měřeného vzorku při měření v otevřené kádince o rozměrech 35 x 65 mm (pro  $C_{H_2O_2} = 880 \mu M$ )  
b) Graf intenzity vyzářování v závislosti na výšce sloupce měřeného vzorku při měření v otevřené kádince o rozměrech 35 x 65 mm (pro  $C_{H_2O_2} = 9,7 mM$ )**

Z těchto důvodů byla kádinka nahrazena 50 ml zkumavkou s uzávěrem a kónickým dnem. Kvůli tvaru dna není zkumavka pro měření příliš vhodná, protože dno nedosedá celou svou plochou na měřicí detektor. Kvůli tomuto faktu došlo při měření ke snížení detekovaného počtu fotonů a to přibližně o řád. Porovnání detekovaných počtů fotonů při měření s otevřenou kádinkou a s uzavřenou zkumavkou je zobrazeno na obrázcích 17 a 18. S uzavřením měřené nádoby došlo ke stabilizaci okolní atmosféry. U vzorků s vyšší hladinou dochází ke stabilizaci rychleji, než u vzorků s hladinou nižší. Na obrázku 18 jsou zachycena měření ihned po namíchání roztoku (obrázek 18a) a měření, která proběhla dva dny po namíchání roztoku (obrázek 18b). Mezi těmito měřeními proběhlo dlouhodobé měření zmiňované v kapitole 4.3.4. Toto měření je zobrazeno v příloze 4 na obrázku p.4.1. Z obrázku 18b je dobře viditelná vysoká stabilita intenzity vyzářování. Avšak předpoklad zvyšování intenzity vyzářování s nárůstem výšky hladiny měřeného vzorku se nenaplnil ani pro roztok umístěný v uzavřené nádobě. Z důvodu ověření tohoto chování proběhlo měření i pro vyšší koncentraci luminolu v měřeném roztoku. Konkrétně šlo o hodnotu  $0,5 \mu M$ . Výsledky tohoto měření jsou zobrazené v příloze 5 na obrázcích p.5.1 a p.5.2. Výsledky měření potvrdily, že se zvyšující se hladinou vzorku nedochází ke zvyšování intenzity vyzářování.

Pro roztok s vyšší absorbcí by se tento fakt mohl vysvětlit pomocí navrženého modelu. Z výsledků modelu je totiž patrné (kapitola 3.2), že nejvyšší podíl na vyzářování fotonů

mají vrstvy, které jsou nejbližší detektoru. Z toho vyplývá, že na hloubce, respektive výšce vzorku není výsledná intenzita vyzařování příliš závislá. Měřený roztok však již od pohledu vysokou absorbancí ve viditelném spektru nevykazuje a měření absorbance měřeného roztoku luminolu s peroxidem vodíku provedené nebylo. Jedná se tak pouze o jedno z potenciálních vysvětlení.



**Obrázek 18:** a) Graf intenzity vyzařování v závislosti na výšce sloupce měřeného vzorku (ihned po namíchání roztoku)  
b) Graf intenzity vyzařování v závislosti na výšce sloupce měřeného vzorku (dva dny po namíchání roztoku)

Další možné vysvětlení uvedeného chování je takové, že vzorek vyzařuje fotony nejvíce ve vrstvě na rozhraní s okolní atmosférou, ve které se potenciálně nacházejí další oxidační činidla (reaktivní formy kyslíku) podporující vyzařování fotonů ze vzorku. Při přibližování této vrstvy k detektoru, tedy při snižování hladiny vzorku, dochází k nárůstu detekované intenzity vyzařování.

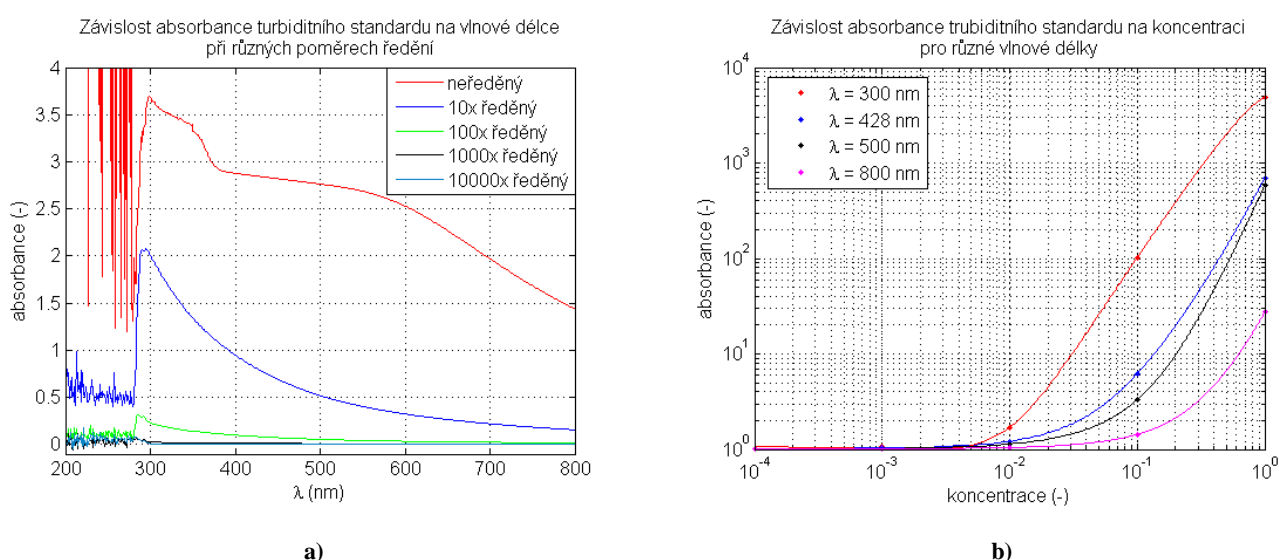
#### 4.3.6 Turbiditní standard

Pro nastavení požadované absorbance roztoku je použit turbiditní kalibrační standard 4000 NTU od firmy RTC. Obsahuje kulové částice z polymeru o velikostech kolem 230 nm. Distribuční funkce částic v 10x zředěném turbiditním standardu je zobrazena v příloze 6 na obrázku p.6.4. Měření distribuční funkce probíhalo metodou DLS (dynamic light scattering). Metoda se používá k určení střední velikosti částic obsažených v měřeném médiu. Laserem je prosvěcován měřený vzorek a následně je detekován signál rozptýlený na částicích ve vzorku. K vyhodnocení se používá autokorelační funkce vypočítaná z intenzit přijatých signálů, které se mění vlivem pohybu částic v médiu.

Částice obsažené v turbiditním standardu mají velikost přibližně  $\frac{1}{2}$  vlnové délky. Bude na nich docházet k výraznějšímu zpětnému rozptylu a v dopředném směru bude nižší jejich směrovost. Částice nejsou nijak deformovány vlivem pH ani při vysokých hodnotách. Vliv na distribuční funkci jejich velikosti nemělo ani přidání 8,8 mM roztoku peroxidu vodíku.

Naměřená závislost absorbance turbiditního standardu 4000 NTU na vlnové délce pro různé stupně zředění je zobrazena na grafu na obrázku 19a. Vzhledem k vyzařovacím vlastnostem luminolu (viz. kapitola 4.1) je důležitá oblast na vlnové délce 428 nm. Z uvedených charakteristik lze pozorovat, že správným zředěním turbiditního standardu lze dosáhnout absorbancí o stejných hodnotách, jako mají uvažované biologické vzorky. Na obrázku 19b je vyobrazena závislost absorbance na koncentraci turbiditního standardu pro vybrané vlnové délky.

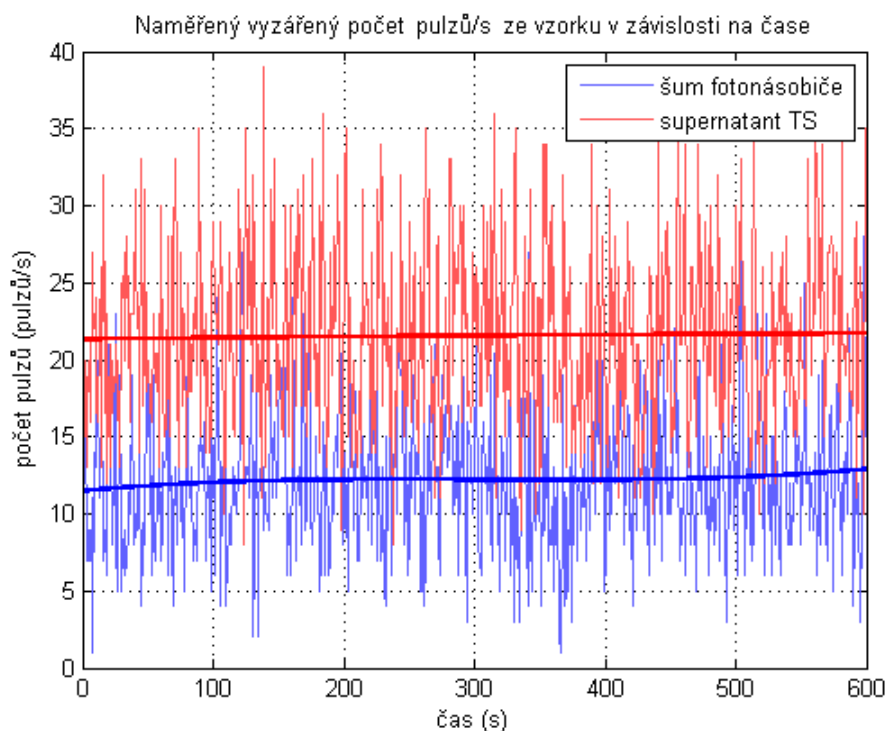
Ze závislosti absorbance na vlnové délce z obrázku 19a je dobře patrná horší propustnost turbiditního standardu, tedy vyšší rozptyl světla na nižších vlnových délkách blízkých UV záření. Na vlnových délkách v oblasti viditelného spektra dochází k exponenciálnímu poklesu absorbance směrem k vyšším vlnovým délkám. V pracovní oblasti (428 nm) je závislost absorbance na zředění turbiditního standardu přibližně exponenciální. Závislost pro zmíněnou pracovní oblast zobrazuje tmavě modrá křivka v grafu na obrázku 19b.



**Obrázek 19:** a) Absorbance turbiditního standardu 4000 NTU v závislosti na vlnové délce  
b) Absorbance turbiditního standardu pro vybrané vlnové délky v závislosti na koncentraci TS

Pro ověření vyzařovacích vlastností roztoku, ve kterém jsou rozpuštěny polymerové částice, bylo nutné provést odstředění určitého objemu turbiditního standardu a provést několik měření pouze se získaným supernatantem. Vzhledem k velikosti částic musela být pro odstředění částic použita velmi vysoká odstředivá síla. Z tohoto důvodu musely být použity velmi kvalitní vysokorychlostní centrifugační zkumavky od firmy Nalgene o objemu 50 ml vyrobené z kopolymeru polypropylenu (PPCO), jelikož běžné zkumavky určené k odstředování nevydržely. Odstředění proběhlo třikrát po sobě po 15 minutách při 13000 otáček/min. Objem výsledného supernatantu byl 30 ml.

Při měřeních byla zkoumána absorbance supernatantu, dále jeho intenzita vyzařování a vliv na intenzitu vyzařování při rozmíchání v používaném roztoku, tedy při rozmíchání v 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,005 μM luminolu a 8,8 mM peroxidu vodíku s pH kolem 12,3. Intenzita vyzařování samotného supernatantu v porovnání s šumem fotonásobiče je zobrazena na obrázku 20, jeho absorbance a vliv na vyzařování v používaném roztoku jsou vyobrazeny v příloze 6 na obrázcích p.6.1 a p.6.2.



Obrázek 20: Naměřená závislost vyzařování fotonů supernatantu z TS 4000 NTU o objemu 30 ml

### 4.3.7 Měření roztoku s turbiditním standardem

Při měření se vzorkem obsahujícím turbiditní standard je nutné brát v úvahu možnost sedimentace částic obsažených v turbiditním standardu v průběhu stabilizace intenzity vyzařování měřeného vzorku. Tedy při dlouhodobém odstátí vzorku.

Pokud jsou v roztoku přítomny částice menší než 1  $\mu\text{m}$ , jedná se o tzv. koloidní soustavu. Pro udržení částic koloidní soustavy v disperzní fázi je podstatný tzv. Brownův pohyb, který vzniká vlivem tepelného pohybu molekul disperzního prostředí. Molekuly ovlivněné tepelným pohybem narážejí do částic rozpuštěných v emulzi. Pokud jsou částice dostatečně malé, dochází k jejich pohybu vlivem těchto nárazů. Důsledkem Brownova pohybu je difuze [15]. Na chování větších částic začíná mít značný podíl i gravitační síla, pokud je významný rozdíl hustoty ve spojitě a disperzní fázi. Působení gravitační síly stahuje částice ke dnu nádoby a dochází tak k sedimentaci. Pravděpodobnost (nejedná se o matematickou pravděpodobnost), že nastane sedimentace ve vzorku, lze vyjádřit vztahem mezi gravitační silou a Brownovým pohybem podle vzorce (20) [16].

$$P(S) = \frac{r^4 \cdot \Delta\rho \cdot g}{k_B \cdot T} \quad (20)$$

Kde  $r$  je poloměr částice (m),

$\Delta\rho$  je rozdíl hustoty mezi spojitou a disperzní fází ( $\text{kg/m}^3$ ),

$g$  je gravitační zrychlení na povrchu Země ( $\text{m/s}^2$ ),

$k_B$  je Boltzmannova konstanta (J/K),

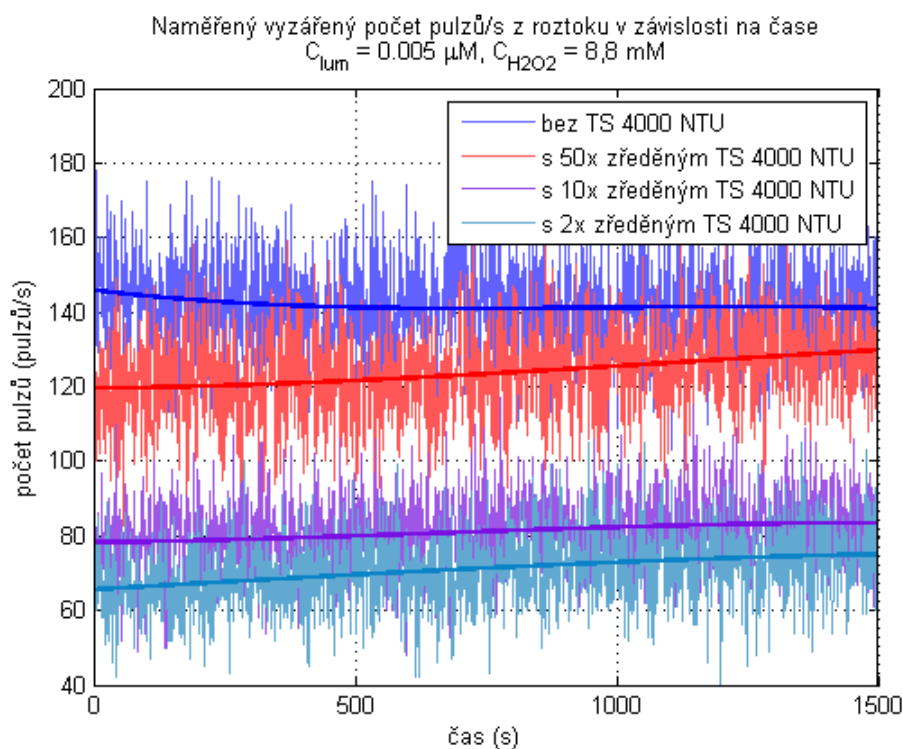
$T$  je teplota (K).

Sedimentaci částic v roztoku lze očekávat, pokud tento poměr vyjde větší než jedna. Pokud vychází menší než jedna, jedná se o stabilní soustavu, u které se sedimentace neuplatňuje [16]. Částice o velikosti kolem 100 nm jsou schopné se udržet v celém objemu disperzní fáze [15]. Pro případ turbiditního standardu rozmíchaného v roztoku luminolu s dalšími příměsemi vychází po dosazení do vztahu (20) hodnota  $1,67 \cdot 10^{-6}$ . Z uvedených poznatků vyplývá, že k výrazné sedimentaci turbiditního standardu s velikostí částic kolem 230 nm by docházet nemělo.

$$P(S) = \frac{(115 \cdot 10^{-9})^4 \cdot 4 \cdot 9,82}{1,38 \cdot 10^{-23} \cdot 298,15} = 1,67 \cdot 10^{-6} \quad (21)$$

Vlastní měření roztoku s turbiditním standardem spočívá v namíchání několika vzorků o stejném objemu, stejných koncentracích luminolu a oxidačního činidla a různých koncentracích, respektive různých stupních zředění turbiditního standardu. Koncentrace luminolu při prvním měření byla  $0,005 \mu\text{M}$ , koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$   $8,8 \text{ mM}$  a koncentrace  $\text{NaHCO}_3$   $5 \text{ mM}$ . Stejně bylo u všech vzorků i pH pohybující se kolem hodnoty  $12,35$ . Pro měření byly připraveny tři roztoky s poměry zředění turbiditního standardu  $2x$ ,  $10x$  a  $50x$  a jeden výchozí roztok, který turbiditní standard neobsahoval vůbec. Všechny roztoky měly stejný objem  $20 \text{ ml}$ .

Naměřené průběhy jednotlivých měření jsou vyobrazeny na obrázku 21. Jedná se o měření závislosti intenzity vyzařování roztoku na míře zředění obsaženého turbiditního standardu. Analogicky lze míru zředění turbiditního standardu převést na absorbanci měřeného roztoku pomocí naměřených dat z kapitoly 4.3.6. Dojde tak k převedení dat do oblasti, ve které lze naměřená data porovnávat s teoreticky vypočtenými hodnotami pomocí navrženého modelu.



**Obrázek 21:** Naměřená závislost vyzařování fotonů ze vzorků v závislosti na čase a na stupni zředění obsaženého turbiditního standardu ( $V = 20 \text{ ml}$ , v uzavřené zkumavce)

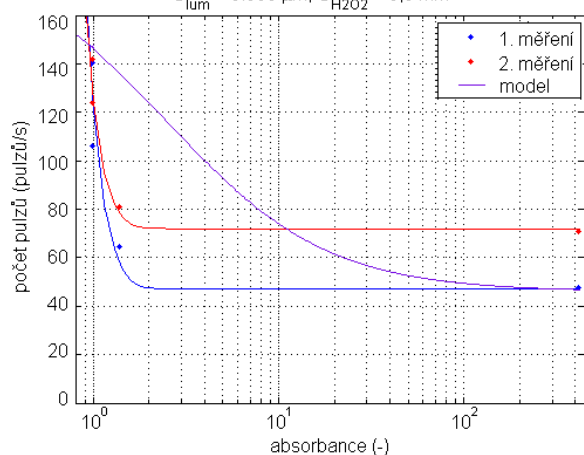


Měření pro koncentraci luminolu  $0,005 \mu\text{M}$  proběhlo dvakrát po sobě v různých měřicích dnech, kvůli potvrzení zjištěného chování. Dále bylo provedeno měření roztoků s desetinásobnou koncentrací luminolu tedy  $0,05 \mu\text{M}$ . Hodnoty zředění turbiditního standardu zůstaly shodné s hodnotami z předchozího měření. Časová závislost intenzity vyzařování z uvedeného měření je zobrazena na obrázku p.7.2 v příloze 7. Měření s vyšší koncentrací luminolu v roztocích bylo provedeno kvůli zjištění chování vyzařování roztoku při vyšším počtu vyzářených fotonů, jelikož při naměřených nízkých úrovních počtu vyzářených fotonů má vliv na výsledky měření jak šum fotonásobiče, tak i svícení pozadí.

### 4.3.8 Porovnání výsledků měření s navrženým modelem

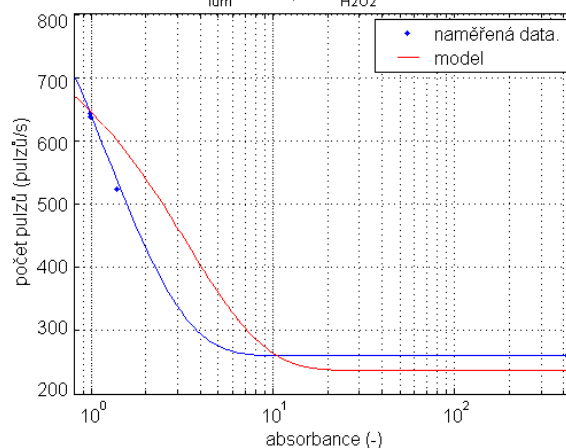
K přesnému převedení koncentrace neboli míry zředění turbiditního standardu na jeho absorbanci bylo zapotřebí doměřit jeho absorbanci při použitých poměrech zředění. Tedy pro dvojnásobné, desetinásobné a padesátinásobné zředění turbiditního standardu. Tato data jsou vyobrazena na obrázku p.6.3 v příloze 6. Kvůli výhodnějšímu zobrazení lze naměřená data absorbancí interpretovat jako exponent deseti tedy  $10^A$ . Po uvedeném přepočtu se absorbance turbiditního standardu pohybuje pro zředění 2x až 50x v rozmezí 0,98 až 414,12.

Naměřený vyzářený počet fotonů/s z roztoku v závislosti na jeho absorbanci  
 $C_{\text{lum}} = 0,005 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 8,8 \text{ mM}$



a)

Naměřený vyzářený počet fotonů/s z roztoku v závislosti na jeho absorbanci  
 $C_{\text{lum}} = 0,05 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 8,8 \text{ mM}$

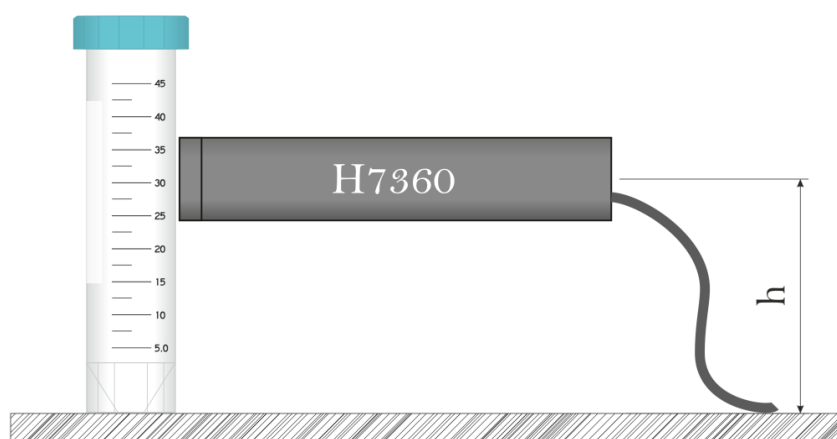


b)

Obrázek 22: a) Porovnání naměřeného počtu vyzářených fotonů a hodnot vypočtených pomocí modelu pro  $C_{\text{lum}} = 0,005 \mu\text{M}$   
 b) Porovnání naměřeného počtu vyzářených fotonů a hodnot vypočtených pomocí modelu pro  $C_{\text{lum}} = 0,05 \mu\text{M}$

Aby bylo možné porovnat naměřená data a hodnoty vypočítané pomocí modelu, bylo zapotřebí navržený model upravit. Navržený model totiž počítá s tím, že se zvyšující se koncentrací buněk dochází zaprvé ke zvyšování absorpance roztoku, což je v souladu s měřením, avšak dochází také ke zvyšování intenzity vyzařování fotonů z roztoku, jelikož se v něm nachází také více buněk (zdrojů), které přispívají k vyzařování fotonů. Při provádění experimentu se ale koncentrace luminolu zachovává konstantní, tudíž při zvyšování absorpance měřeného roztoku nedochází ke zvyšování intenzity vyzařování.

K prvnímu porovnání byl ze tří navržených modelů vybrán model, který spojitě přechází mezi aproximacemi pro šíření elektromagnetické vlny. Výsledky porovnávací hodnoty vypočtené tímto modelem a naměřená data jsou vyobrazeny na obrázku 22. Na obrázku 22a jsou zachycena data pro koncentraci luminolu  $0,005 \mu\text{M}$  a na obrázku 22b jsou data pro koncentraci luminolu 10x vyšší. V obou případech dochází k rychlejšímu poklesu počtu vyzářených fotonů u naměřených hodnot, zatímco model předpokládá úbytek vyzářených fotonů se vzrůstající absorpancí pomalejší.

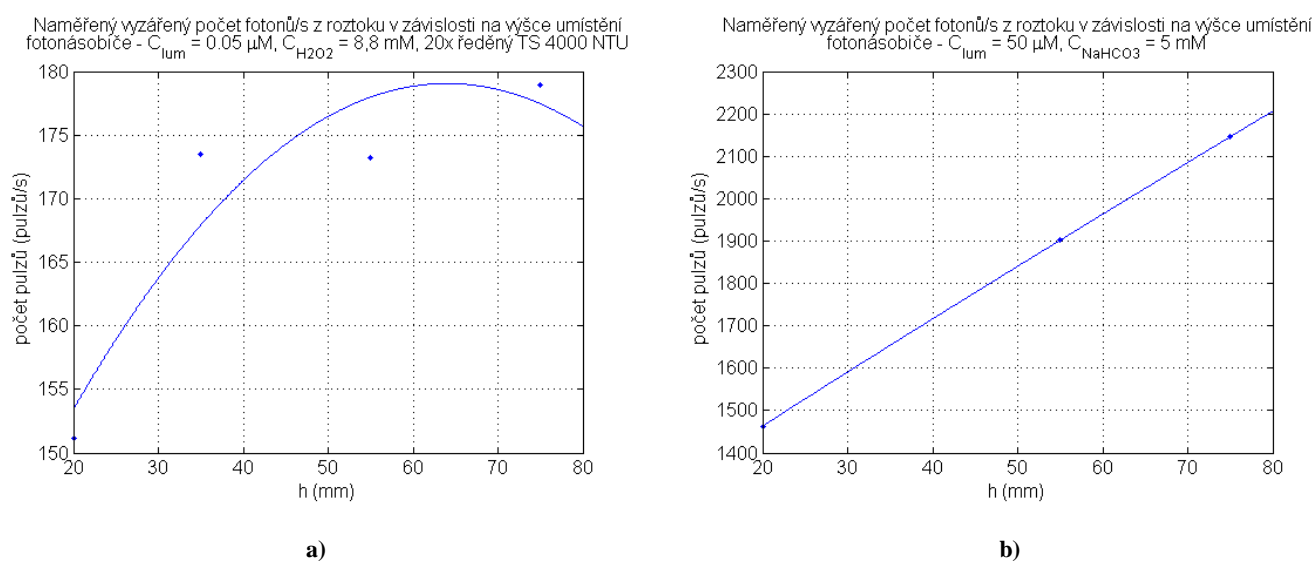


**Obrázek 23: Ilustrativní znázornění uspořádání měřicího pracoviště při měření prostorového rozložení intenzity vyzařování ze vzorku umístěného ve zkumavce**

Tento fakt vede opět k úvaze zmíněné v kapitole 4.3.5 a to sice k takové, že směrem od detektoru intenzita vyzařování roste a velkou měrou se na celkové intenzitě vyzařování podílí vrchní vrstvy vzorku. Pro ověření této teorie bylo nutné provést měření prostorového rozložení intenzity vyzařování z roztoku. Vzhledem k technickým možnostem měřicí soustavy nebylo měřicí uspořádání optimální, avšak pro orientační účely bylo postačující. Limitující je především snímací plocha fotonásobiče, která je vzhledem k výšce měřeného vzorku poměrně veliká, a dále fakt, že pro měření je

k dispozici právě jeden fotonásobič. Ideální snímací prvek pro měření prostorového rozložení intenzity vyzařování je CCD detektor nebo matice fotonásobičů (viz. kapitola 1.4). Tyto technologie bohužel nebyly pro měření k dispozici. Měření muselo probíhat sekvenčně v krocích po jednotlivých výškách umístění fotonásobiče. Tento způsob měření je vhodný pouze v případě, že měřený vzorek již vykazuje poměrně dobrou časovou stabilitu. Dále musel být fotonásobič vybaven speciální maskou pro zmenšení snímací plochy fotokatody. Otvor v mase byl obdélníkového tvaru s šířkou 1 cm a výškou 0,5 cm. Ilustrativní uspořádání měřicího pracoviště je zobrazené na obrázku 23.

Měření proběhlo pro dva různé vzorky. Parametry prvního vzorku byly:  $C_{lum} = 0,05 \mu M$ ,  $C_{NaHCO_3} = 5 \text{ mM}$ ,  $C_{H_2O_2} = 8,8 \text{ mM}$ ,  $h_{celk} = 90 \text{ mm}$  a obsahoval 20x zředěný turbiditní standard, což odpovídá přibližně absorbanci 0,5 (3,16). Parametry druhého vzorku byly:  $C_{lum} = 50 \mu M$ ,  $C_{NaHCO_3} = 5 \text{ mM}$ ,  $h_{celk} = 90 \text{ mm}$ , bez přidání  $H_2O_2$  a bez turbiditního standardu. Výsledky jsou zachycené na obrázku 24. Ze zobrazených dat je vidět, že vrstvy, které jsou blíže rozhraní roztok-vzduch se podílejí na vyzařování fotonů více, než vrstvy v blízkosti snímacího fotonásobiče. Pro roztok neobsahující turbiditní standard, tedy pro roztok s velmi nízkou absorbancí, která se blíží k nule, je závislost intenzity vyzařování vrstvy na vzdálenosti od fotonásobiče přibližně lineární a se zvyšující se absorbancí dochází k jejímu zakřivení. S tímto faktem ovšem nepočítá navržený model a je tedy nutné ho o zjištěné poznatky doplnit, aby bylo porovnání naměřených a vypočtených dat korektnější.



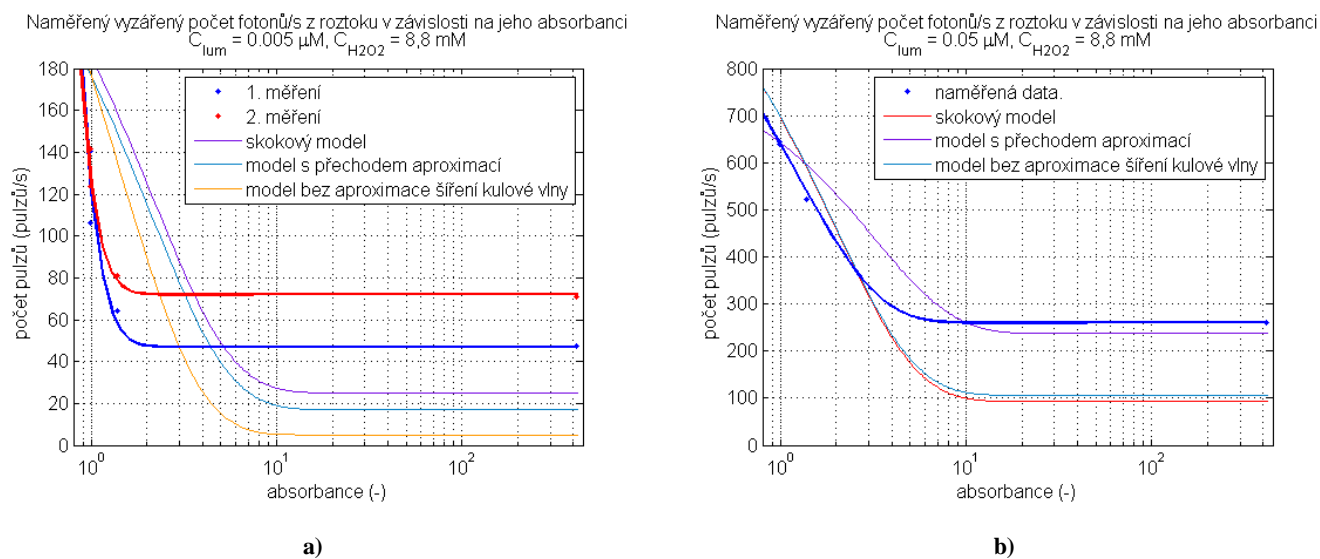
Obrázek 24: a) Závislost intenzity vyzařování na poloze měřicího fotonásobiče pro roztok s  $C_{lum} = 0,05 \mu M$ ,  $NaHCO_3 = 5 \text{ mM}$ ,  $C_{H_2O_2} = 8,8 \text{ mM}$ ,  $h_{celk} = 90 \text{ mm}$ , 20x ředěný TS 4000 NTU  
b) Závislost intenzity vyzařování na poloze měřicího fotonásobiče pro roztok s  $C_{lum} = 50 \mu M$ ,  $NaHCO_3 = 5 \text{ mM}$ ,  $h_{celk} = 90 \text{ mm}$

### 4.3.9 Doplnění modelu a porovnání s naměřenými hodnotami

O lineární úbytek intenzity vyzařování vzhledem ke vzdálenosti od snímacího fotonásobiče byly doplněny všechny tři navržené modely. Lze tak porovnat, který z modelů nejlépe zachycuje chování měřeného vzorku. Porovnání naměřených dat s jednotlivými modely je vyobrazené na obrázku 25. Výslednou intenzitu vyzařování lze tedy vypočítat podle vztahu (22). Od vztahu (11) se liší členem, modelující lineární pokles intenzity vyzařování směrem k detektoru.

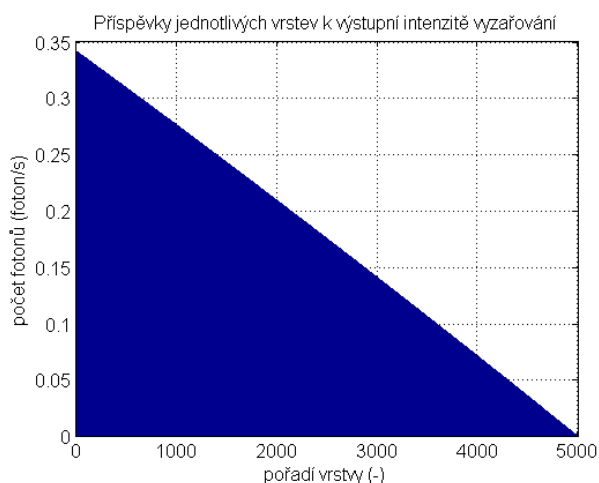
$$I = \sum_{i=0}^n I_i(x(n-i)) \frac{1}{(x(n-i))^2} e^{-A(x(n-i))} \quad (22)$$

Při nižší koncentraci luminolu je zřejmé, že naměřené hodnoty stále ubývají rychleji, než je tomu u hodnot vypočtených pomocí modelů. Nej strmější pokles vypočtených hodnot nastává u modelu, který nezahrnuje aproximaci, která modeluje ředění vyzářené energie při šíření do prostoru. Na druhou stranu má tento model největší chybu v oblasti, kde už intenzita vyzařování vykazuje stabilní chování. Při těchto hodnotách vyzářených fotonů ale svou mírou na nepřesnosti naměřených hodnot má jak vyzařování pozadí, tak i šum fotonásobiče, proto jsou pro porovnání modelů zajímavější data s vyšším počtem vyzářených fotonů, tedy s vyšší koncentrací luminolu.

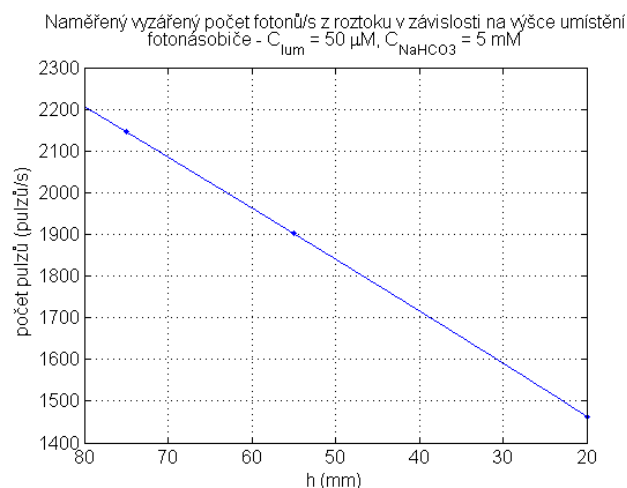


**Obrázek 25:** a) Porovnání naměřeného počtu vyzářených fotonů a hodnot vypočtených pomocí upravených modelů ( $C_{lum} = 0,005 \mu M$ )  
 b) Porovnání naměřeného počtu vyzářených fotonů a hodnot vypočtených pomocí upravených modelů ( $C_{lum} = 0,05 \mu M$ )

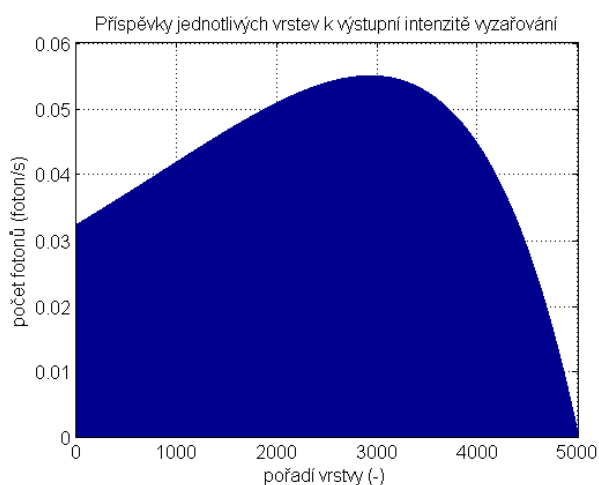
Data pro vzorek s vyšší koncentrací luminolu jsou na obrázku 25b. Ze zobrazených průběhů lze vyčíst, že ve fázi poklesu intenzity vyzařování jsou přesnější modely bez aproximace šíření vlny prostorem a skokový model. Naopak ve fázi, kde už k poklesu vyzařování neodchází, je přesnější model s přechodem aproximací.



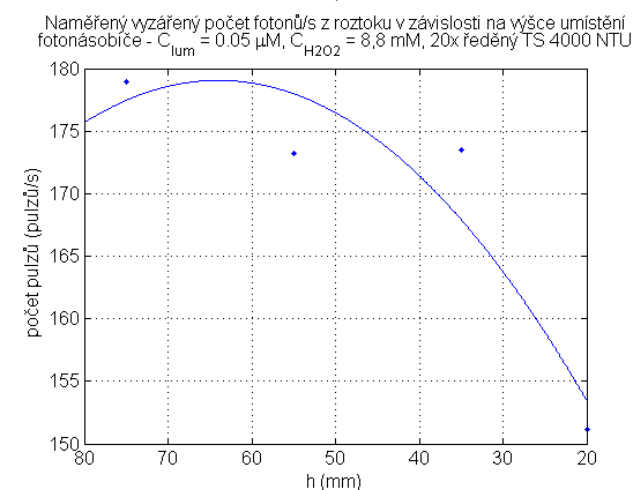
a)



b)



c)



d)

**Obrázek 26:** a) Vypočtené hodnoty prostorového rozložení intenzity pro absorpenci roztoku 1,02  
b) Naměřené hodnoty prostorového rozložení intenzity pro absorpenci roztoku 0,99  
c) Vypočtené hodnoty prostorového rozložení intenzity pro absorpenci roztoku 3,04  
d) Naměřené hodnoty prostorového rozložení intenzity pro absorpenci roztoku 3,16

Pro ověření teorie o poklesu intenzity vyzařování směrem ke snímacímu fotonásobiči byly pomocí modelu, který uvažuje pouze útlum vlivem absorpance roztoku, napočítány i příspěvky jednotlivých vrstev k výstupní intenzitě vyzařování. Tato data lze porovnat s naměřenými charakteristikami prostorového rozložení intenzity vyzařování, které jsou zobrazeny na obrázku 24. K lepšímu porovnání byla na těchto grafech převrácena osa x,

aby byla zřejmá shoda tvaru naměřených a spočítaných průběhů. Data k porovnání naměřených a vypočtených průběhů jsou zobrazena na obrázku 26.

Vypočtené a naměřené hodnoty by se měly shodovat v absorbanci, kterou má měřený roztok, popřípadě uvažovaný roztok pro výpočet. Kvůli dostupnosti dat pro výpočty tato podmínka není striktně dodržena v případě výpočtu a měření při vyšší absorbanci. Naměřený průběh na obrázku 26b je pro absorbanci roztoku 3,16 a vypočtená data z obrázku 26a jsou pro absorbanci roztoku 3,04. Odchylka v absorbancích je tedy 0,12. Rozdíl v průbězích tak může být způsoben i touto odchylkou. Pro dvojici grafů z obrázku 26c a 26d je hodnota odchylky mezi absorbancemi 0,03. Z grafů lze vyvodit, že při nízkých hodnotách absorpance roztoku je dodržen lineární pokles prostorového rozložení intenzity vyzařování směrem k detektoru. Při vyšších hodnotách absorpance začíná mít silný vliv na tvar prostorového rozložení intenzity vyzařování právě útlum způsobený absorbancí roztoku.

#### **4.4 Měření se vzorky biologického původu**

Poslední část experimentů je ověření chování vyzařování vzorků biologického původu v závislosti na jeho turbiditě. Měření proběhlo s pivními kvasinkami (*Saccharomyces cerevisiae*) a zvyšování turbidity je zajištěno opět pomocí turbiditního standardu 4000 NTU. Měření probíhalo ve větší měřicí komoře se stabilizací teploty. Schéma zapojení měřicího pracoviště se však shoduje s měřením s chemickými vzorky. Příprava vzorku pro měření i samotné měření jsou poměrně časově náročné procedury.

##### **4.4.1 Kvasinky a ultra slabá emise fotonů**

V dříve publikovaných pracích zabývajících se experimenty zaměřených na emisi fotonů z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že detekované spektrum se liší v závislosti na fázi růstu, ve které se měřené buňky nacházejí [17]. Pokud se buňky nacházely v exponenciální fázi růstu, bylo detekováno záření v UV (200 ÷ 425 nm) i ve viditelné oblasti (525 ÷ 700 nm) [18]. Po dosažení konstantní fáze se vyzařování v UV oblasti utlumilo a jeho spektrum se zúžilo kolem vlnové délky 250 nm. Vyzařování fotonů probíhalo hlavně ve viditelné oblasti v rozmezí vlnových délek 325 ÷ 525 nm [18].

V průběhu exponenciální fáze je vyzařování ve viditelném spektru přisuzováno oxidaci lipidů probíhající uvnitř buněk. Za luminiscenci jsou zodpovědné především dva procesy, které probíhají v mitochondriích. V mitochondriích probíhají neenzymatické a enzymatické procesy. Neenzymatické procesy zahrnují reakci lipidů s anorganickým fosfátem, kyslíkem a železem za vzniku excitovaných peroxidů lipidů. Enzymatické procesy zahrnují reakci volných lipidů s kyslíkem.

Vyzařování v oblasti UV záření může pocházet z různých zdrojů. Jedním z potenciálních zdrojů by mohlo být vyzařování fotonů při dělení buněk, jelikož maximum intenzity vyzařování nastává při maximální rychlosti růstu buněk. Tento jev se nazývá mitogenické záření. Dalším možným zdrojem vyzařování jsou proteiny obsahující excitovaný tryptofan a další oxidativní procesy a biochemické reakce [18]. Podrobněji je vyzařování ze struktur biologického původu rozepsáno v kapitole 1.3.

V průběhu konstantní fáze je slabé vyzařování v UV oblasti pravděpodobně zapříčiněno nekrobiotickou radiací z mrtvých buněk nebo dozívajícím mitogenickým zářením stále se dělících buněk. Emisi fotonů ve viditelné oblasti způsobuje především oxidace lipidů, které se v buňkách ke konci exponenciální fáze stále více hromadí [18].

V oblasti vyzařování fotonů z biologických vzorků bylo provedeno mnoho dalších zajímavých experimentů vedoucích k dokonalejšímu popisu tohoto jevu. Například, jak souvisí ultra slabá emise fotonů s respiračními možnostmi buněk [19], nebo vliv kosmického záření na fluorescenci vzorku [20]. Cílem této práce však není zkoumat původ emitovaných fotonů, a proto se dalšími a hlubšími popisy mechanismů vyzařování již zabývat nebude.

#### **4.4.2 Příprava vzorku**

Příprava vzorku pro měření se skládá z několika kroků. V dostatečném předstihu před měřením je nutné odebrat část ze skladovaného vzorku. Jedná se o vzorek *Saccharomyces cerevisiae* (Euroscarf collection; genetic background BY4741, *MATa*) z Mikrobiologického ústavu AV ČR, který se uchovává na agarových miskách v lednici. Příprava nové kultury probíhá za sterilních podmínek v laminárním boxu. Opálenou očkovací kličkou se z agarové misky odebere část kvasinek a ta se naočkuje do média YPD umístěného v Erlenmayerově baňce o objemu 50 ml. Tuto odebranou část je nutné nechat kultivovat, aby se rozeběhl metabolismus buněk a nastartoval se jejich růst.

Kultivace vzorku trvala 16 hodin při 30 °C a 180 otáčkách/min. Po kultivaci je nutné zjistit počet buněk ve vzorku. Počet buněk byl zjištěn pomocí přístroje Beckman Coulter Z2 Cell and Particle Counter, který umí změřit jak počet, tak velikost buněk nebo částic v rozmezí průměrů 1 ÷ 120 μm. Výchozí hodnota počtu buněk v měřeném vzorku používaná při měření v laboratoři ÚFE je  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml ve 200 ml média YPD. Je tedy nutné z kultivovaného vzorku odebrat takovou část, aby výsledná koncentrace měla výše zmíněnou hodnotu. Vzorek pro měření je umístěn v Erlenmayerově baňce o objemu 250 ml a je uzavřen špuntem s trubičkou napojenou k motoru. Takto připravený vzorek lze umístit do měřicí komory a provést na něm měření.

#### 4.4.3 Měření

Samotné měření probíhalo tak, že se čekalo na maximum vyzařování vzorku, který má určitou absorbanci. Po dosažení maxima nebo v relativně stabilní části intenzity vyzařování došlo k přidání zhuštěného turbiditního standardu 4000 NTU a sledoval se rozdíl v počtu vyzářených fotonů před a po přidání turbiditního standardu. Přidáním standardu došlo ke zvýšení absorbance vzorku, tudíž by teoreticky mělo dojít k poklesu počtu detekovaných fotonů. Proces lze několikrát opakovat. S ohledem na zásoby turbiditního standardu proběhlo měření s kvasinkami třikrát.

Zahuštěný turbiditní standard byl získán odstředěním původního turbiditního standardu. Po odstředění a po odlití většiny supernatantu byl použit pelet jako zahuštěný turbiditní standard pro zvýšení absorbance vzorku. Parametry pro odstředování byly stejné jako v kapitole 4.3.6 při získávání supernatantu TS.

Při měření byl zkoumaný vzorek neustále promícháván pomocí vzduchu, který do vzorku vháněl membránový motorek. Dělo se tak z toho důvodu, aby během měření nedošlo k sedimentaci kvasinek na dno nádoby.

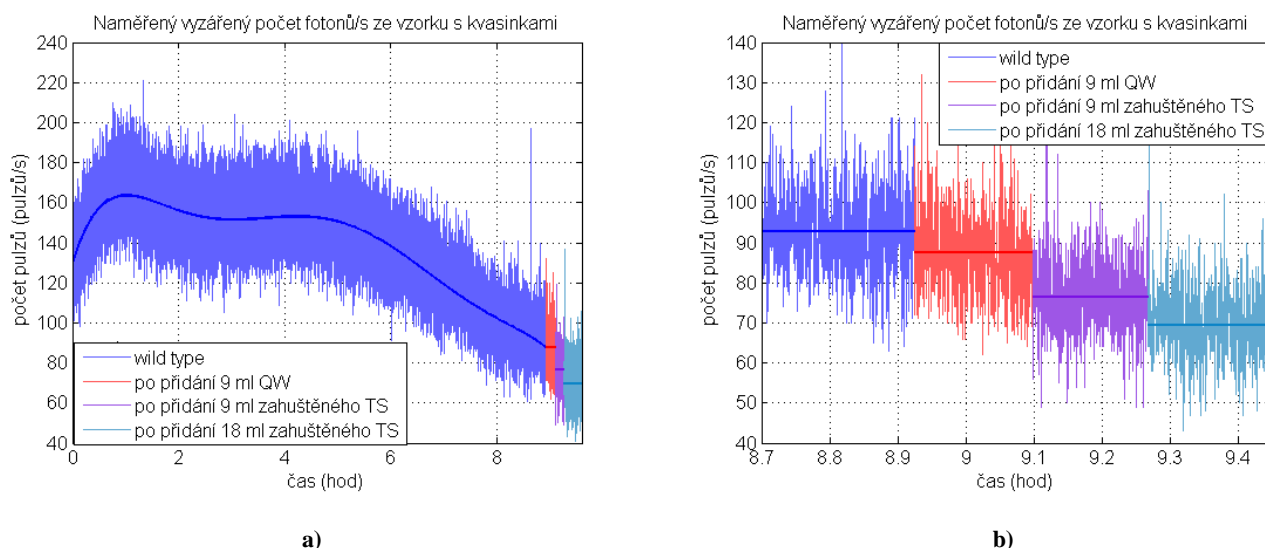
V průběhu každého měření byly odebrány vzorky pro změření absorbance aktuálně měřeného roztoku. Grafy naměřených absorbancí roztoků ze všech tří měření jsou uvedeny v příloze 8.

Pro první měření byly připraveny dva zahuštěné roztoky turbiditního standardu o objemech 9 ml. Před přidáním turbiditního standardu do měřeného vzorku bylo do vzorku nejdříve přidáno 9 ml ultračisté vody. Tímto postupem se zjišťovalo, zda na pokles



intenzity vyzařování nemá vliv i jiný faktor, než zvýšení turbidity média. Při prvním měření měl průběh intenzity vyzařování netypicky rychlý průběh a detekovaná úroveň byla relativně malá.

Grafy z prvního měření jsou zobrazené na obrázku 27. Je na nich zachycená časová závislost vyzařování fotonů ze vzorku. Na obrázku 27b jsou barevně rozlišené jednotlivé kroky měření. Tedy přidání 9 ml ultračisté vody, přidání 9 ml turbiditního standardu a opětovné přidání 9 ml turbiditního standardu. Na průběhu jsou patrné skoky v počtu detekovaných fotonů, jak při přidání vody, tak i při zvýšení turbidity. Skok způsobený přilítím ultračisté vody by se dal vysvětlovat tím, že 9 ml je relativně velký objem a došlo ke zředění vzorku, a tak k poklesu měřené intenzity vyzařování. Po jednotlivých krocích došlo k poklesu detekovaných pulzů přibližně o 15 fotonů/s.

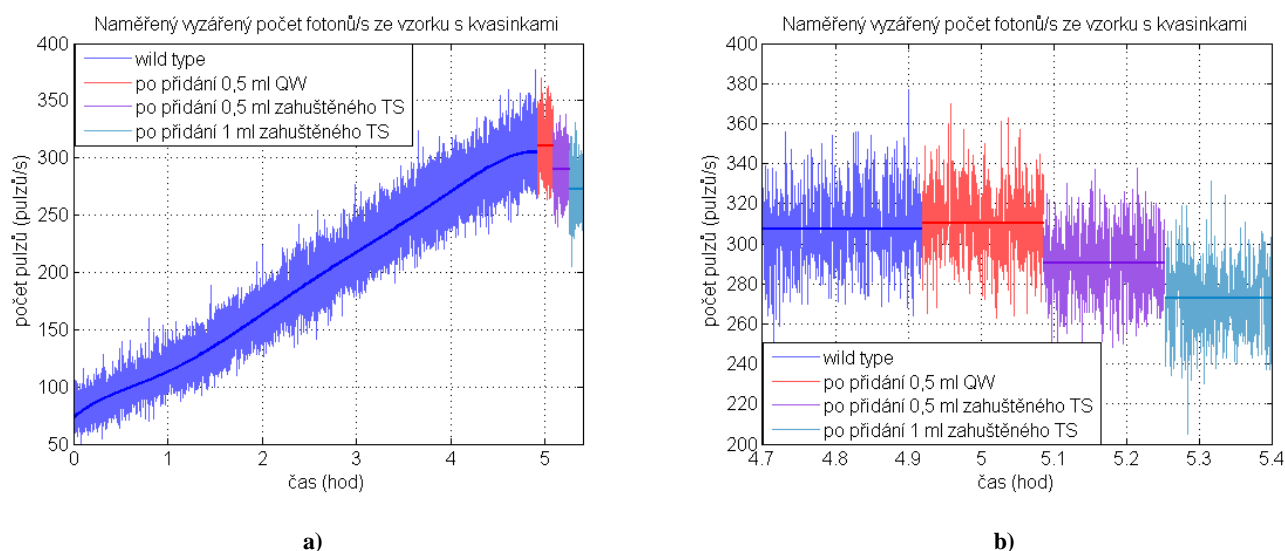


**Obrázek 27: a) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami (celý interval měření)**  
**b) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami zdůrazňující jednotlivé kroky při měření**

K provedení dalšího měření byly připraveny opět dvě dávky odstředěného turbiditního standardu. Tentokrát byl jejich objem 0,5 ml. Jednalo se tedy o více zhuštěný turbiditní standard, což je výhodnější, jelikož se tak zřejmě eliminoval vliv rozředění měřeného vzorku větším objemem ultračisté vody. Postup při měření byl shodný s postupem při prvním měření. Navíc byla při měření zaznamenávána i hodnota oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) v měřicí komoře, kvůli podezření vlivu jeho koncentrace na ultra slabou emisi fotonů.

Z grafů, které zachycují výsledky druhého měření, zobrazených na obrázku 28, je patrné, že efekt rozředění vzorku větším objemem ultračisté vody byl odstraněn. Naopak

detekovaná intenzita vyzařování po přidání ultračisté vody ještě nepatrně vzrostla. Tento jev může být způsoben tím, že se průběh vyzařování fotonů ještě nedostal do svého maxima, tudíž intenzita vyzařování stále rostla. Po přidání 0,5 ml zahuštěného turbiditního standardu však došlo k většímu poklesu detekovaných fotonů. Po prvním kroku byl pokles roven přibližně 20 fotonů/s a po druhém kroku byla průměrná hodnota naměřené intenzity vyzařování menší o dalších 18 fotonů/s.

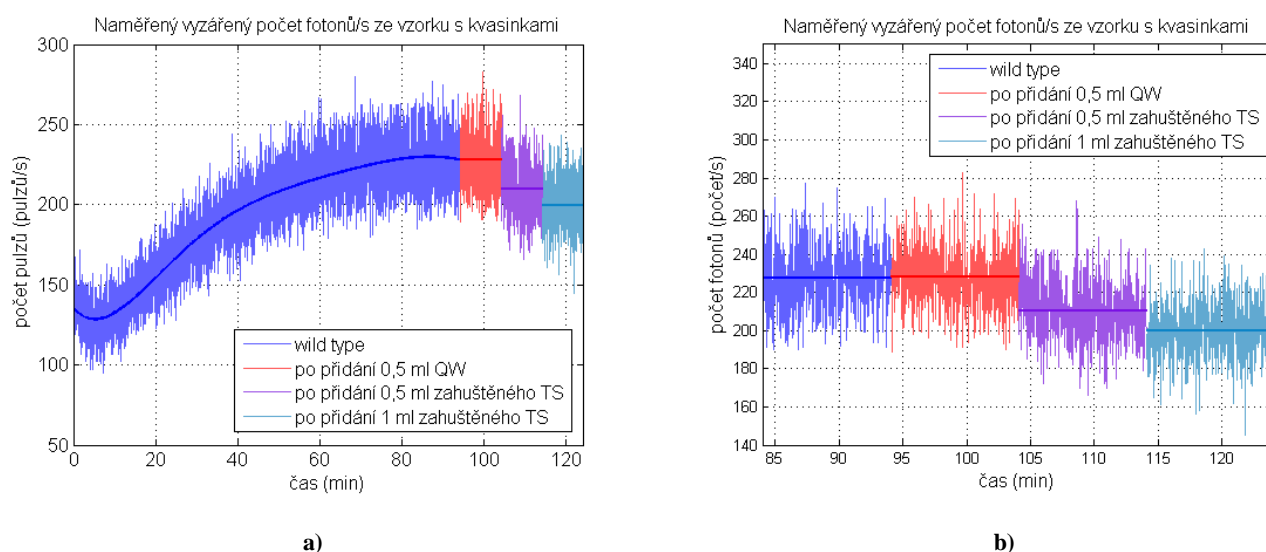


**Obrázek 28:** a) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami (celý interval měření)  
b) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami zdůrazňující jednotlivé kroky při měření

Pro třetí měření byly připraveny dva vzorky zahuštěného turbiditního standardu opět o objemech 0,5 ml, jako v případě druhého měření. Postup měření se opět opakoval. Stejně jako při prvním měření došlo k dosažení maxima vyzařování fotonů ze vzorku s kvasinkami nezvykle rychle, přibližně za hodinu a půl oproti běžným průměrným čtyřem hodinám. Pro potřeby měření však tento jev není nijak omezující, jelikož k provedení měření je nutné pouze počkat na maximum intenzity vyzařování. Při prvním měření se nepředpokládalo tak rychlý nárůst vyzářených fotonů, takže měření neproběhlo v oblasti maxima vyzařování. V případě třetího měření se již maximum intenzity vyzařování podařilo zachytit, dokonce v relativně stabilní fázi, kdy se intenzita vyzařování příliš neměnila.

Výsledky třetího měření jsou zachyceny na grafech na obrázku 29. Na obrázku 29a je vidět rychlý nárůst intenzity vyzařování a na obrázku 29b je zobrazen průběh intenzity vyzařování ze vzorku po jednotlivých krocích. Je zřejmé, že přidání 0,5 ml ultračisté

vody intenzitu vyzařování nijak výrazně neovlivnilo a že po přidání zahuštěného turbiditního standardu opět došlo ke snížení detekovaného počtu vyzařených fotonů.

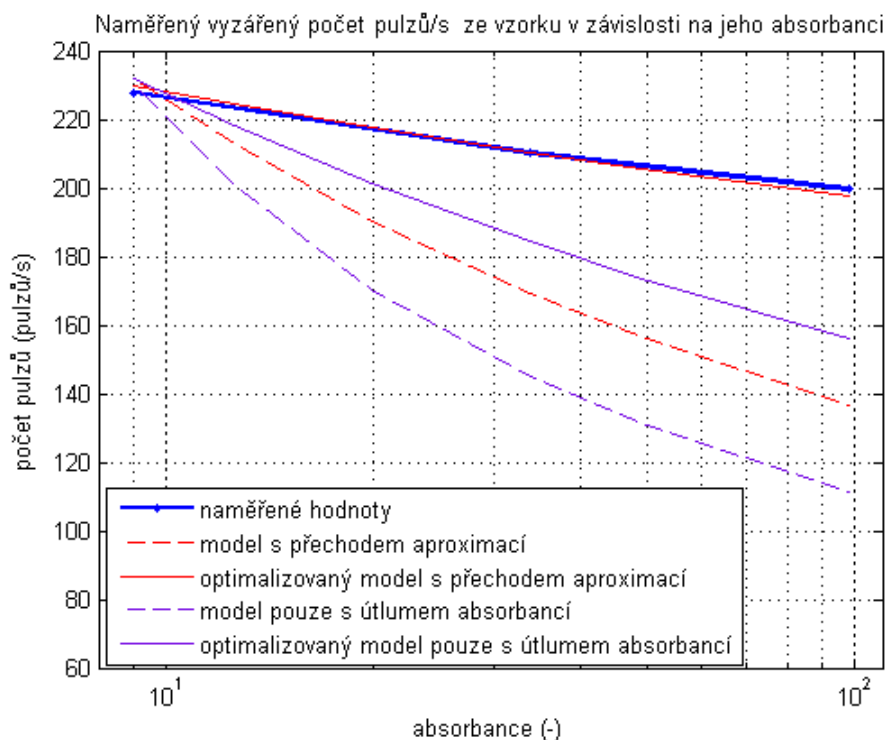


**Obrázek 29:** a) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami (celý interval měření)  
b) Intenzita vyzařování fotonů v závislosti na čase ze vzorku s kvasinkami zdůrazňující jednotlivé kroky při měření

#### 4.4.4 Porovnání výsledků měření s kvasinkami s navrženým modelem

Výsledky všech měření zachycují stejný trend poklesu detekovaných fotonů v závislosti na absorbanci měřeného vzorku. K porovnání naměřených hodnot s výsledky vypočtenými pomocí modelů budou stačit výsledky z jednoho měření. Konkrétně jde o výsledky z třetího měření, které nejvíce naplňovalo teoretický předpoklad. Tyto naměřené hodnoty a vypočítané hodnoty pomocí modelů jsou zobrazeny v grafu na obrázku 30.

K prvnímu srovnání byl vybrán původní model s přechodem aproximací bez optimalizace provedené v kapitole 4.3.9 při porovnávání hodnot s výsledky získanými měřením na chemických vzorcích. Průběh předpokládané intenzity vyzařování vypočítaný pomocí tohoto modelu je na obrázku 30 zobrazený přerušovanou červenou čarou. Při porovnání tohoto průběhu s naměřenými hodnotami je vidět, že model předpokládá výraznější úbytek detekovaných fotonů při rostoucí absorbanci vzorku. Obdobné výsledky poskytuje i model, který nepočítá s útlumem, který je způsobený ředěním energie do prostoru. Z těchto napočítaných průběhů je zřejmé, že útlum způsobený absorbancí vzorku nemá při tomto měření tak výrazný vliv, jaký předpokládají zmíněné modely.



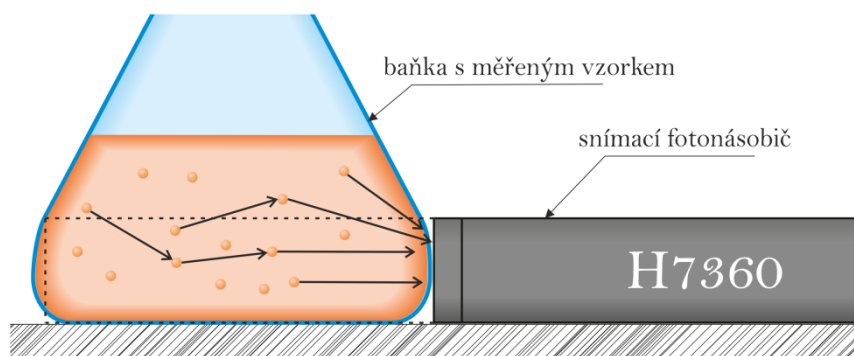
**Obrázek 30: Naměřené hodnoty detekovaného počtu pulzů ze vzorku s kvasinkami v závislosti na jeho absorbanci a jejich porovnání s výsledky vypočtenými pomocí různých modelů**

Důležitým faktorem, který by mohl vést k vysvětlení tohoto rozdílu, je ten, že geometrie měřeného vzorku nebyla stejná, jako je uvažovaná při výpočtu pomocí modelů. Celkový objem měřeného vzorku byl 200 ml. Tato hodnota je několikanásobně vyšší, než kterou uvažují numerické modely. Ty počítají s hodnotou 50 ml. Tento rozdíl by měl sice způsobit rozdíl mezi absolutními hodnotami naměřených a vypočtených hodnot, avšak absolutní hodnota intenzity není až tak podstatná, jelikož jde pouze o posun průběhu po ose y. Nyní jde o problém vystihnutí trendu naměřených hodnot.

Snížení vlivu útlumu absorbancí by mohl vysvětlovat problém rozdílné geometrie z jiného pohledu. Modely počítají se vzorkem, který je ohraničený v určitém objemu, jak je naznačeno na obrázku 3. Za hranicí vzorku se neuvažuje prostředí, na kterém by mohlo docházet k dalšímu rozptylu vyzářeného světla, ani s dalšími možnými příspěvky k množství vyzářených fotonů. Uvedený problém je ilustrativně znázorněn na obrázku 31.

Je tedy možné, že snížený vliv útlumu, který způsobuje turbidita vzorku, je zapříčiněn dalším rozptylem světla v okolí uvažované výseče, která je na obrázku 31 naznačená čárkovanou čarou. Vlivem příspěvků vyzářených fotonů z tohoto okolí dochází ke

zvýšení počtu detekovaných fotonů. Toto je jeden z vlivů, který původní model neuvažuje.



Obrázek 31: Znázornění jevu snížení vlivu útlumu absorbcí při měření s větším objemem vzorku

Modely byly proto optimalizovány pomocí korekční konstanty  $k_r$ , která sníží vliv útlumu způsobeného absorbcí. Výsledný vztah pro výpočet intenzity vyzařování ze vzorku je tak modifikován do podoby vyjádřené výrazem (23).

$$I = \sum_{i=0}^n I_i \frac{1}{(x(n-i))^2} e^{-A(x(n-i))k_r} \quad (23)$$

Hodnota korekční konstanty je v daném případě 0,2. Výsledky optimalizovaných modelů jsou na obrázku 30 zobrazené plnou fialovou (model pouze s útlumem absorbcí) a plnou červenou čarou (model s přechodem aproximací). Při porovnání těchto průběhů s naměřenými hodnotami je patrné, že výsledky optimalizovaného modelu s přechodem aproximací se velmi blíží naměřeným hodnotám a vystihují velmi dobře vliv útlumu způsobeného absorbcí měřeného roztoku.

## Závěr

Práce uvádí do problematiky ultra slabé emise fotonů, růstu mikroorganismů, mechanismů rozptylu světla a jeho měření a měření absorbance.

V rámci práce bylo navrženo několik diskrétních modelů pro výpočet intenzity vyzařování fotonů potažmo vyzářeného výkonu ze vzorku s definovanými vlastnostmi. Úkolem modelů bylo zobrazení vlivu absorbance vzorku při různých koncentracích

buněk na vyzařování fotonů z celého objemu vzorku. Z výpočtů plyne, že vliv útlumu způsobeného absorbcí zkoumaného vzorku se zvyšuje s rostoucí koncentrací buněk v roztoku. Jednotlivé modely se liší přístupem k modelování útlumu záření v závislosti na vzdálenosti zdroje záření od detektoru. Jednotlivé metody modelování se v přesnosti výpočtu celkové intenzity vyzařování ze vzorku výrazně neliší.

Dále byla provedena série experimentů s luminolem a turbiditním standardem, díky kterým byl získán roztok s nastavitelnými optickými parametry. Mezi tyto parametry patří turbidita vzorku a intenzita vyzařování fotonů. Cílem bylo získání vzorku s obdobnými optickými parametry, které mají vzorky biologického původu. Na tomto roztoku byla provedena měření. Získaná data byla srovnána s výsledky, které byly vypočteny pomocí navržených modelů. Vzhledem k odchylce numerického modelu a naměřených dat došlo k optimalizaci modelu a opětovnému srovnání výsledků. Odchylka mezi naměřenými a vypočtenými hodnotami klesla v závislosti na použitém modelu.

V další části proběhlo měření na vzorcích s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledky těchto měření byly opět porovnány s navrženými modely. Modely byly optimalizovány, aby co nejlépe zachycovaly reálné chování detekované intenzity vyzařování.

Modely pro popis chování vyzařování z chemických a biologických vzorků se nepatrně liší a to zřejmě kvůli rozdílným vlivům na emisi fotonů z biologických a chemických vzorků, které nebylo možné v rámci měření dostatečně eliminovat.

Ke zpřesnění výsledků numerických modelů by byla vhodná jejich další optimalizace a doplnění o další jevy, které ovlivňují vyzařování fotonů ze vzorků jak biologického, tak chemického původu. Optimalizaci by bylo vhodné provádět v souvislosti s dalšími možnými experimenty na vzorcích chemických i biologických.

Důležitý závěr plynoucí z celé práce je, že turbidita, především s ní spojený světelný rozptyl, vzorku chemického nebo biologického původu zřetelně ovlivňuje úroveň měřitelného počtu fotonů snímaného pomocí prvku umožňujícího jednodimenzionální snímání.

## Literatura

- [1] COLLI, L. a U. FACCHINI. Light Emission by Germinating Plants. Istituto di Fisica del Politecnico, Laboratori CISE. Milano: 1954.
- [2] COLLI, L. et al. Further Measurements on the Bioluminescence of the Seedlings. Istituto di Fisica del Politecnico, Laboratori CISE. Milano: 1955.
- [3] CIFRA, M. a P. POSPÍŠIL. Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications. *Under review in Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013.
- [4] PRASAD, A. a P. POSPÍŠIL. Photon source within the cell, *Fields of the Cell*, eds. D. Fels, M. Cifra. 2014.
- [5] WIDDEL, F. *Theory and Measurement of Bacterial Growth*. Bremen: 2010.
- [6] SADAR, M. J. Turbidity science. *Technical Information Series*. U.S.A: 1998, No. 11.
- [7] DREZEK, R. A. DUNN a R. RICHARDS-KORTUM. Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Applied Optics*. Irvine: Optical Society of America, 1. červen 1999, Vol. 38, No. 16.
- [8] KENNETH, D. A. *Light Scattering Properties of Cells*. Austin: The University of Texas at Austin, 1997.
- [9] SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY. *Beer's Law - Theoretical Principles* [online]. [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/beers1.htm>
- [10] AMRITA VISCHIVA VIDYAPEETHAM UNIVERSITY. Bacterial Growth Curve. *Bacterial Growth Curve (Theory): Microbiology Virtual Lab I: Biotechnology and Biomedical Engineering* [online]. [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>
- [11] MATLOC, B. C. et al. Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers. *Thermo Fisher Scientific*. Wilmington (U.S.A.): 2011.

- [12] ROSWELL, D. F. a E. H. WHITE. The Chemiluminescence of Luminol and Related Hydrazides. *Methods in enzymology*. 1978, Vol. 57.
- [13] LIND, J. G. MERÉNYI a T. E. ERIKSEN. Chemiluminescence Mechanism of Cyclic Hydrazides. *Journal of the American Chemical Society*. 1983, Vol. 105, No. 26.
- [14] NCSU - DEPT. OF CHEMISTRY. Lecture Demonstrations: Light and Electron Transitions. In: NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY. [online]. [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://ncsu.edu/project/chemistrydemos/Light/Luminol.pdf>
- [15] KVÍTEK, L. a A. PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 2007.
- [16] MALVERN INSTRUMENTS LTD. Stabilita suspenzí a disperzí - Proč jsou velikosti částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemagazín*. 2011, roč. 21, č. 2.
- [17] QUICKENDEN, T. I. a S. S. QUE HEE. Weak luminiscence from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the existence of mitogenic radiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974, Vol. 60, No. 2, s. 764-69.
- [18] QUICKENDEN, T. I. a S. S. QUE HEE. The spectral distribution of the luminiscence emitted during growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to mitogenic radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 1976, Vol. 23, s. 201-04.
- [19] QUICKENDEN, T. I. a R. N. TILBURY. Luminiscence spectra of exponential and stationary phase cultures of respiratory deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of photochemistry and photobiology. B. Bio*. 1991, Vol. 8, No. 2.
- [20] QUICKENDEN, T. I. a R. N. TILBURY. The Effect of Cosmic-Ray Shielding on the Ultraweak Bioluminiscence Emitted by Cultures of *Escherichia coli*. *Radiation research*. 1987, No. 112, s. 398-402.



## Seznam příloh

- Příloha 1 - Nastavení měřicího systému
- Příloha 2 - Grafy výsledků navržených modelů
- Příloha 3 - Grafy šumových vlastností fotonásobiče H7360
- Příloha 4 - Grafy dlouhodobých měření
- Příloha 5 - Časové závislosti intenzity vyzařování pro různé výšky vzorku
- Příloha 6 - Vlastnosti turbiditního standardu
- Příloha 7 - Časové závislosti intenzity vyzařování pro různé stupně zředění TS
- Příloha 8 - Naměřené hodnoty absorbancí vzorků při měření s kvasinkami
- Příloha 9 - CD-ROM s dokumenty
- Příloha 10 - Datasheet k fotonásobiči H7360

## Příloha 1: Nastavení měřicího systému

Pro správnou funkci měřicího zařízení je třeba zjistit optimální nastavení systému vzhledem k největšímu odstupu užitečného signálu od šumu. Volitelným parametrem měřicího systému je napětí pro systém dynod ve fotonásobiči a komparační úroveň diskriminátoru.

Pro získání charakteristiky SNR je nutné změření šumových vlastností systému a změření referenčního vzorku při různém nastavení měřicí soustavy. Šumové vlastnosti se měří při prázdné komoře na vzorky. Dochází tak k měření šumových vlastností fotonásobiče. Při měření reference se jako referenční vzorek slouží rostlinný olej, který vykazuje relativně konstantní vyzařování ultra slabé emise fotonů v závislosti na čase.

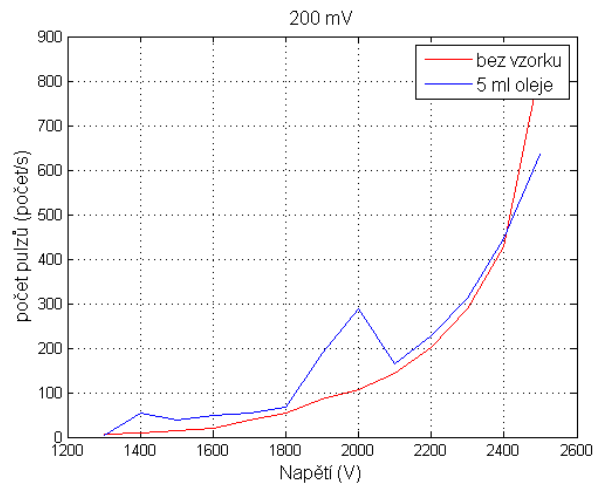
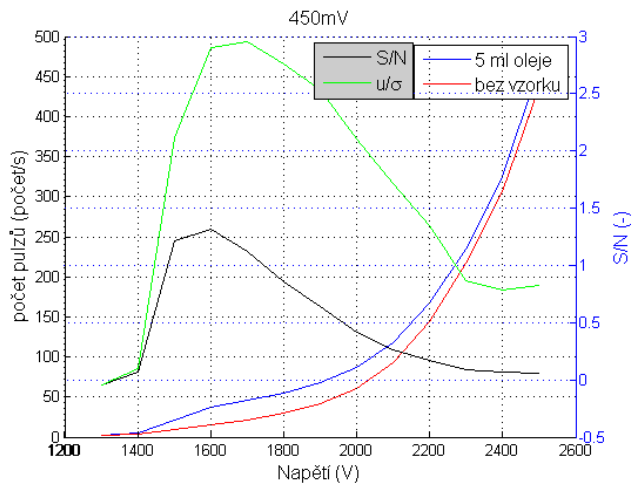
Měření charakteristik proběhlo pro komparační úroveň diskriminátoru 200 mV a 450 mV. Napájecí napětí pro fotonásobič se pohybovalo v intervalu <1300 V ÷ 2500 V>. Pro každou úroveň napětí proběhlo měření v časovém úseku 5 minut. Průměrováním naměřených dat pak byly získány hodnoty pro výsledné závislosti počtu naměřených fotonů na různých hodnotách napětí pro fotonásobič. Naměřené charakteristiky jsou vykresleny v grafech na obrázku p.1.1.

Z charakteristik naměřených pro komparační úroveň diskriminátoru 450 mV vyobrazených na obrázku p.1.1a lze spočítat poměr S/N podle (p.1.1). Z vypočtených výsledků lze odvodit optimální nastavení napájecího napětí pro fotonásobič vzhledem k nejlepšímu šumovým parametrům. Pro komparační úroveň 450 mV je optimální hodnota napájecího napětí 1600 V.

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{počet fotonů}_{Oil-5mlTube} - \text{počet fotonů}_{wit hout}}{\text{počet fotonů}_{wit hout}} \quad (\text{p.1.1})$$

$$\frac{u}{\sigma_n} = \frac{u}{\sqrt{S + N}} = \frac{S - N}{\sqrt{S + N}} = \frac{\text{počet}_{Oil-5mlTube} - \text{počet}_{wit hout}}{\sqrt{\text{počet}_{Oil-5mlTube} + \text{počet}_{wit hout}}} \quad (\text{p.1.2})$$

Na průbězích z obrázku p.1.1b je patrné rušení při měření s referenčním vzorkem, proto při komparační úrovni 200 mV není relevantní výpočet poměru užitečného signálu k šumu. Výsledky v oblasti působícího rušení by nadhodnocovaly skutečný stav poměru S/N.



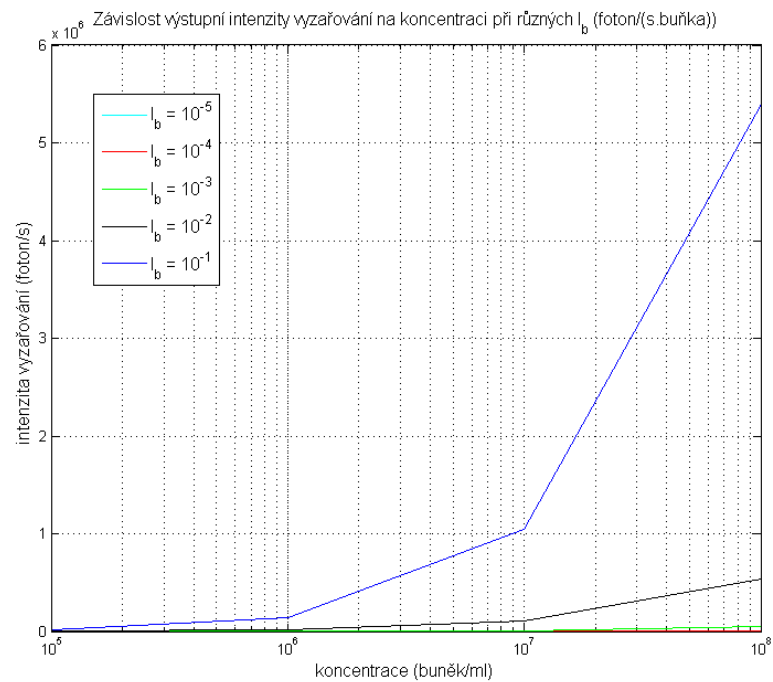
a)

b)

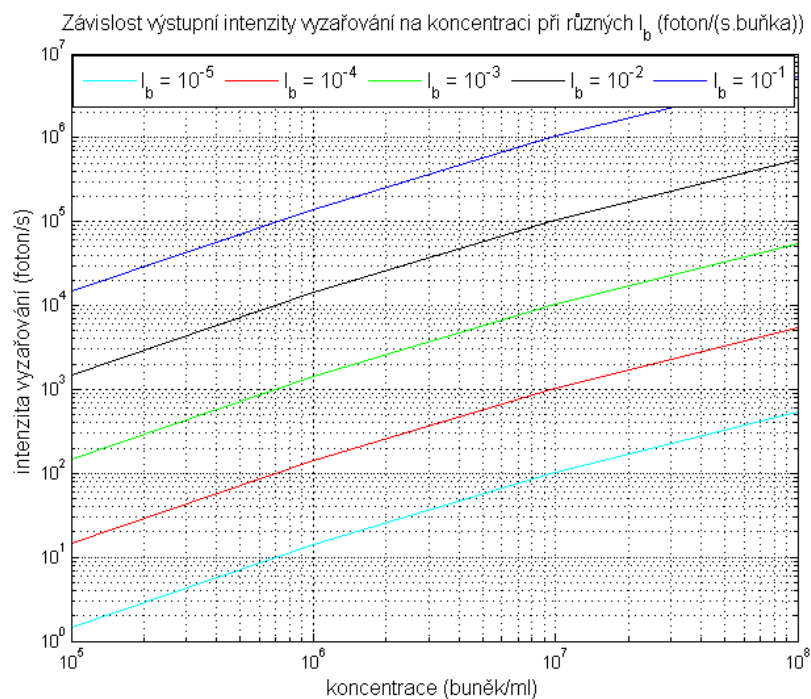
Obrázek p.1.1:

- a) Závislost naměřeného počtu pulzů na napájecím napětí PMT a průběh S/N pro komparační úroveň diskriminátoru 450mV
- b) Závislost naměřeného počtu pulzů na napájecím napětí PMT pro komparační úroveň diskriminátoru 200mV

## Příloha 2: Grafy výsledků navržených modelů

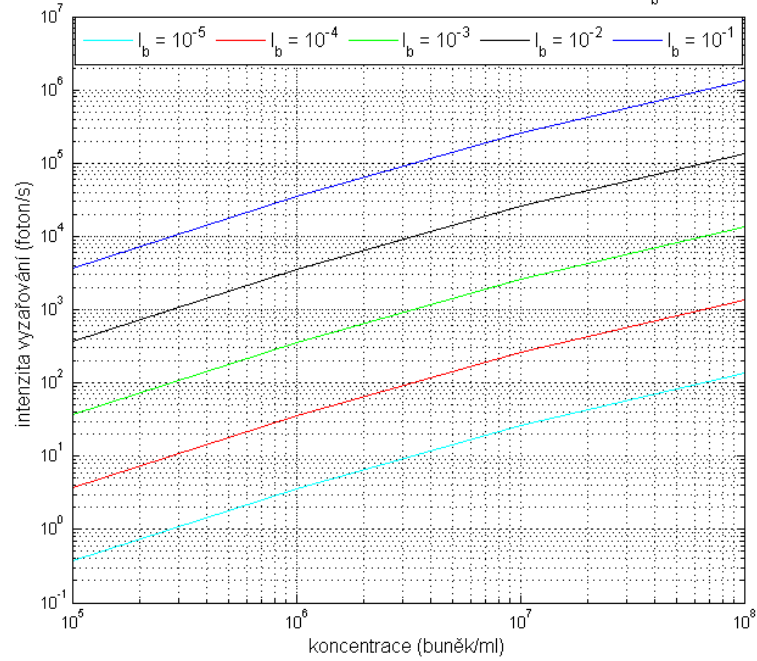


Obrázek p.2.1: Závislost výstupní intenzity vyzařování na koncentraci buněk v roztoku pro různé intenzity vyzařování jedné buňky ( $x.n = 4 \text{ cm}$ ,  $x = 10^{-3} \text{ cm}$ )



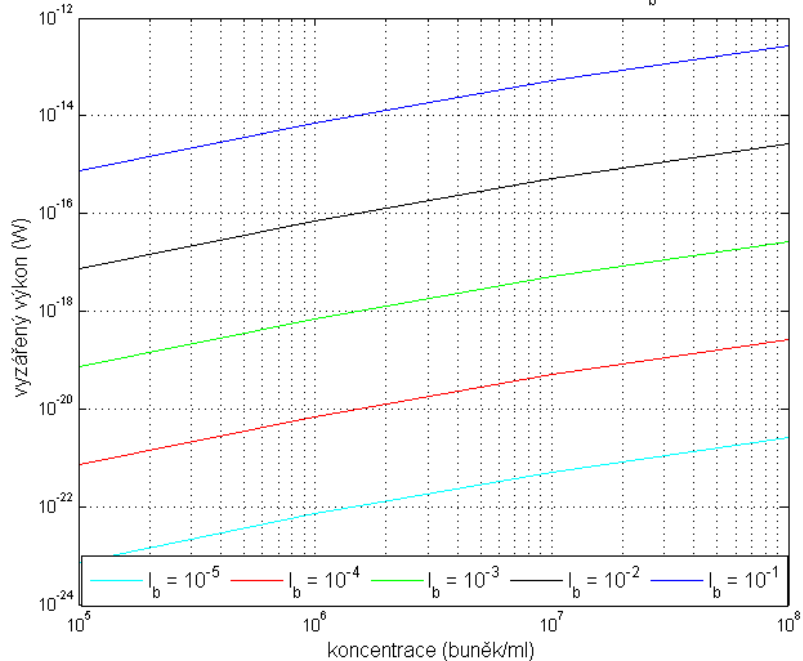
Obrázek p.2.2: Závislost výstupní intenzity vyzařování na koncentraci buněk v roztoku pro různé intenzity vyzařování jedné buňky v logaritmických souřadnicích ( $x.n = 4 \text{ cm}$ ,  $x = 10^{-3} \text{ cm}$ )

Závislost normované výstupní intenzity vyzařování na koncentraci při různých  $I_b$  (foton/(s.buňka))

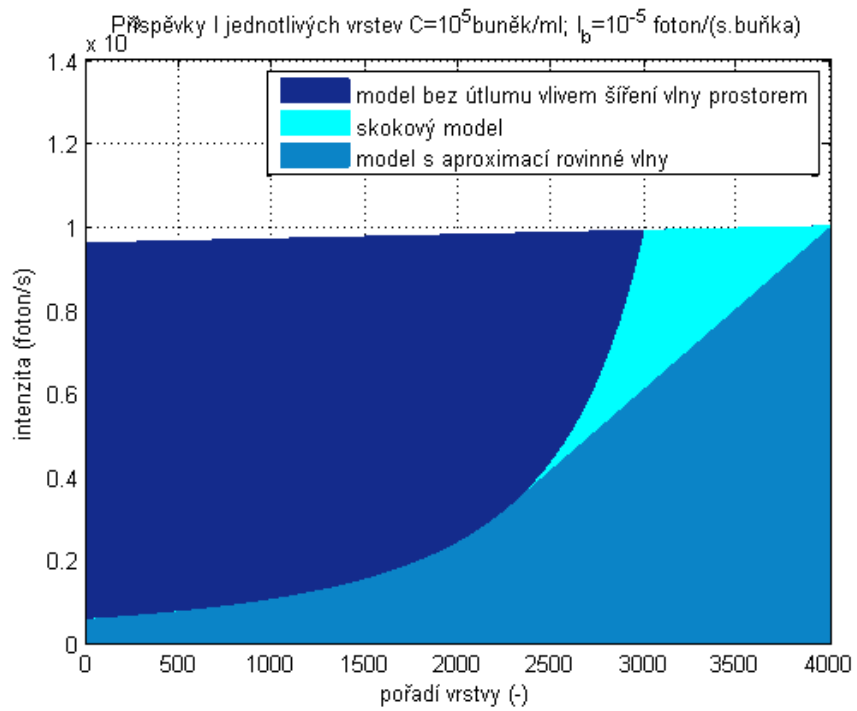


**Obrázek p.2.3:** Závislost normované výstupní intenzity vyzařování na koncentraci buněk v roztoku pro různé intenzity vyzařování jedné buňky v logaritmických souřadnicích ( $x.n = 4$  cm,  $x = 10^{-3}$  cm)

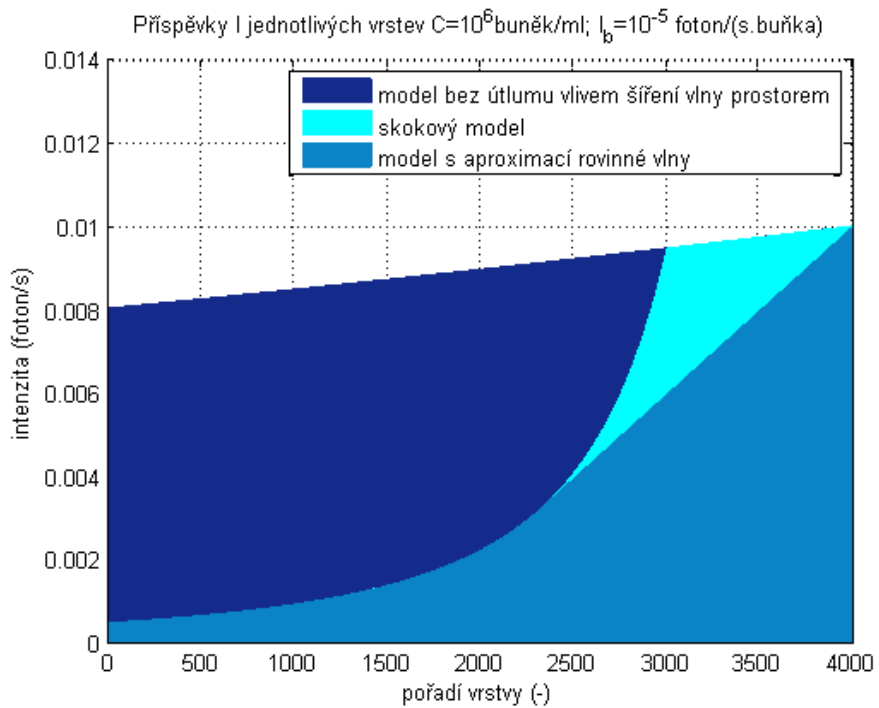
Závislost výstupního vyzářeného výkonu na koncentraci při různých  $I_b$  (foton/(s.buňka))



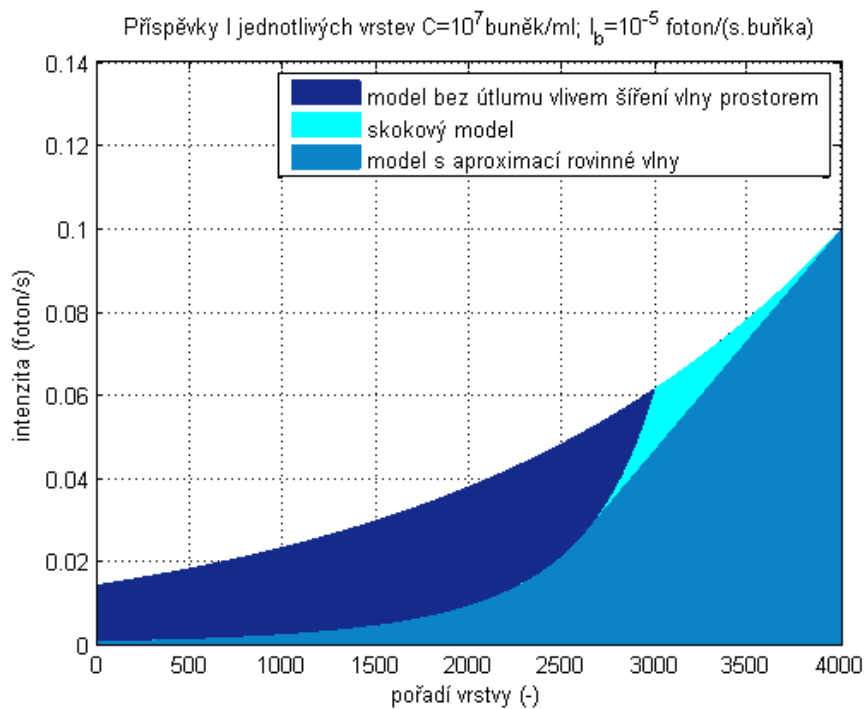
**Obrázek p.2.4:** Závislost výstupního vyzářeného výkonu na koncentraci buněk v roztoku pro různé intenzity vyzařování jedné buňky v logaritmických souřadnicích ( $x.n = 4$  cm,  $x = 10^{-3}$  cm)



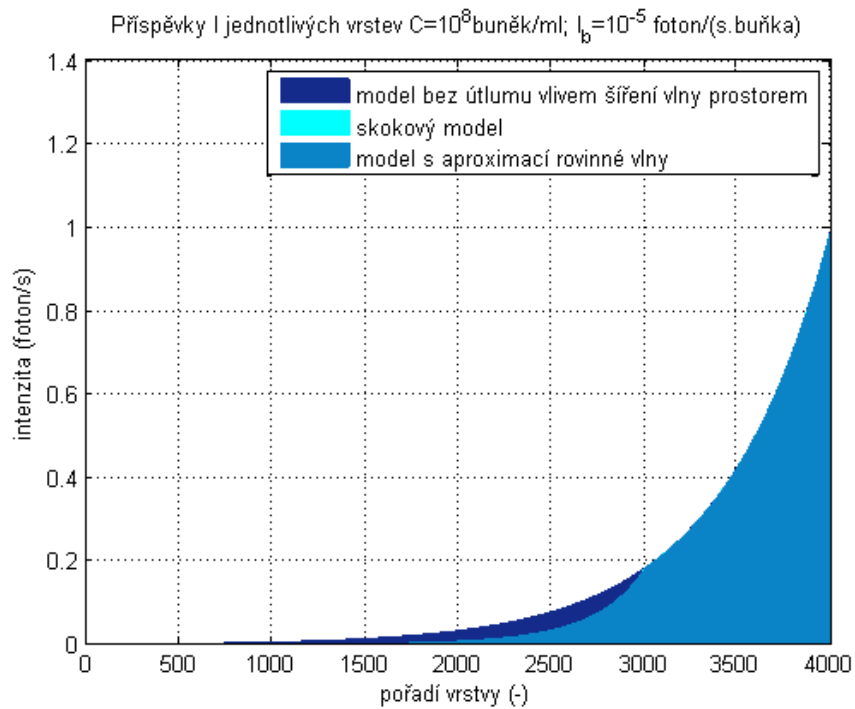
Obrázek p.2.1: Příspěvky jednotlivých vrstev k výstupní intenzitě vyzářování pro délku vzorku 4 cm a koncentraci  $C=10^5$  buněk/ml



Obrázek p.2.2: Příspěvky jednotlivých vrstev k výstupní intenzitě vyzářování pro délku vzorku 4 cm a koncentraci  $C=10^6$  buněk/ml

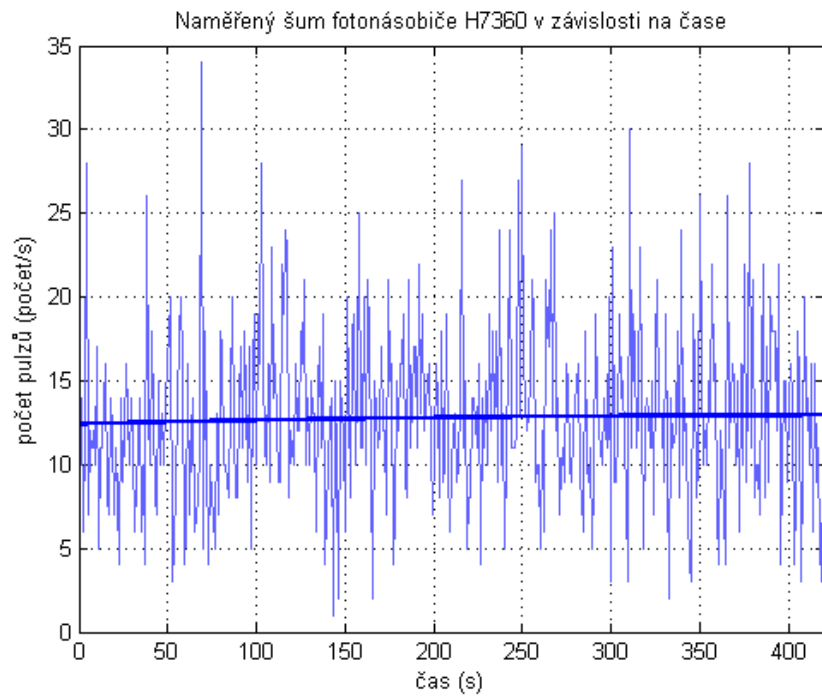


Obrázek p.2.3: Příspěvky jednotlivých vrstev k výstupní intenzitě vyzářování pro délku vzorku 4 cm a koncentraci  $C=10^7$  buněk/ml

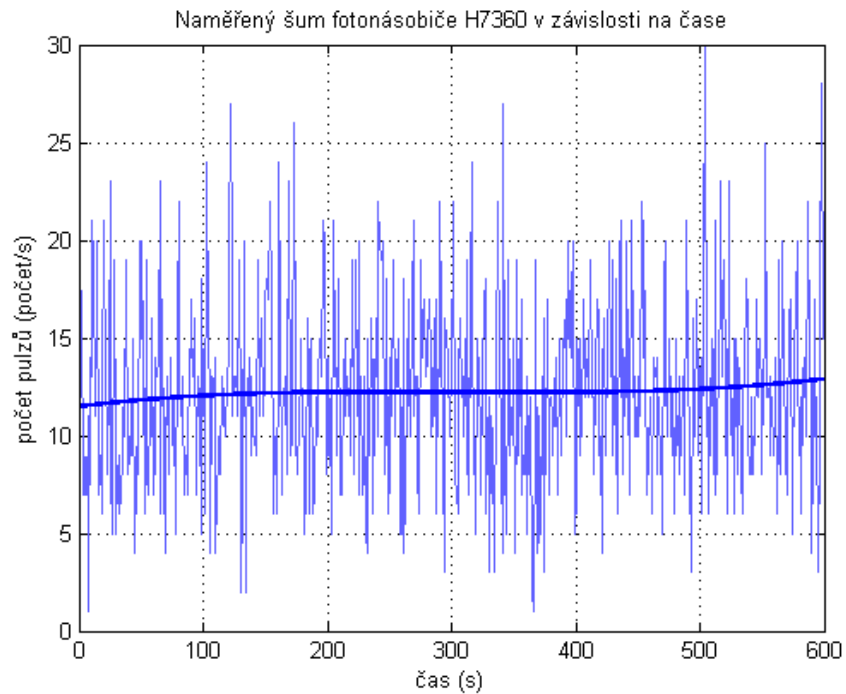


Obrázek p.2.4: Příspěvky jednotlivých vrstev k výstupní intenzitě vyzářování pro délku vzorku 4 cm a koncentraci  $C=10^8$  buněk/ml

### Příloha 3: Grafy šumových vlastností fotonásobiče H7360



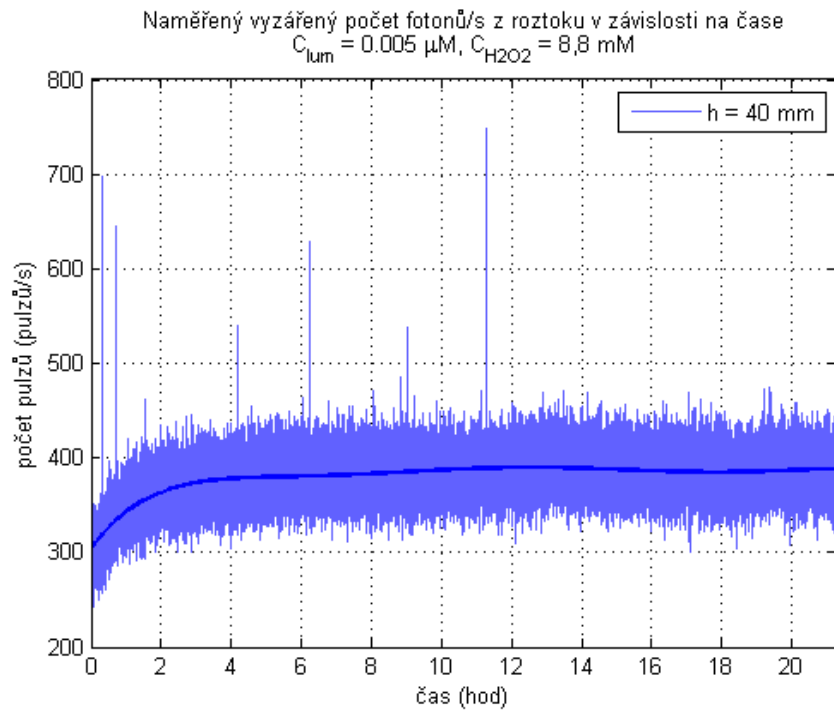
Obrázek p.3.1: Naměřený šum fotonásobiče v závislosti na čase (7 minut)



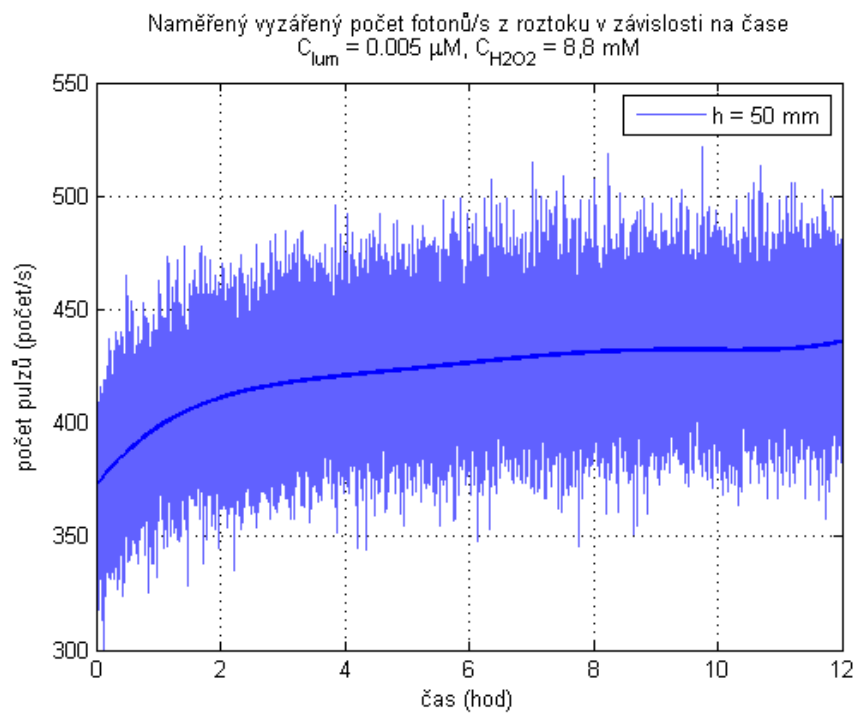
Obrázek p.3.2: Naměřený šum fotonásobiče v závislosti na čase (10 minut, jiné datum měření)



#### Příloha 4: Grafy dlouhodobých měření

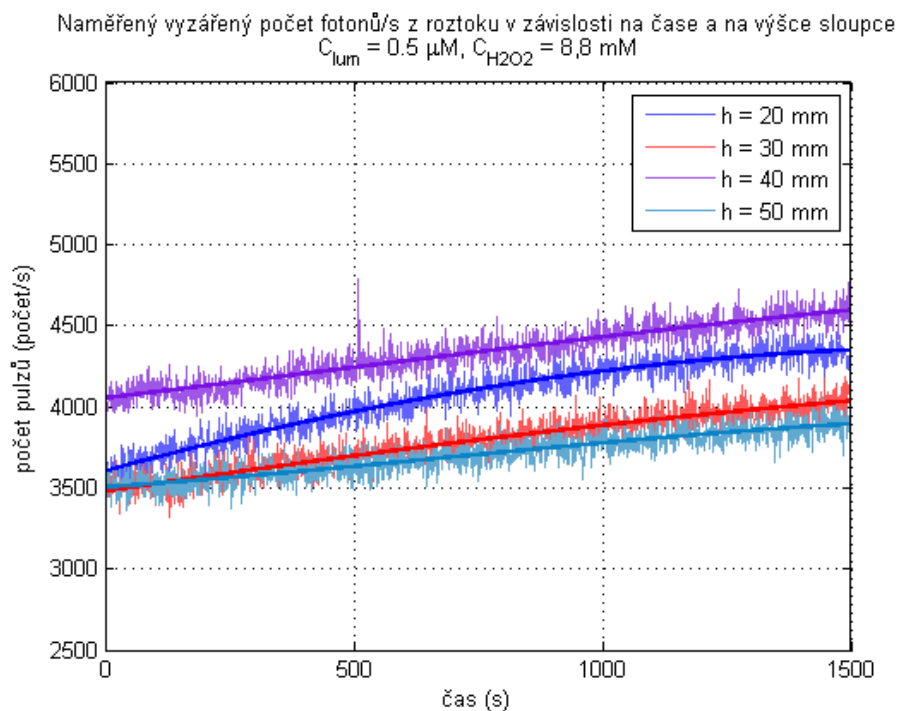


Obrázek p.4.1: Graf z dlouhodobého měření intenzity vyzářování pro zjištění stability vyzářování vzorku

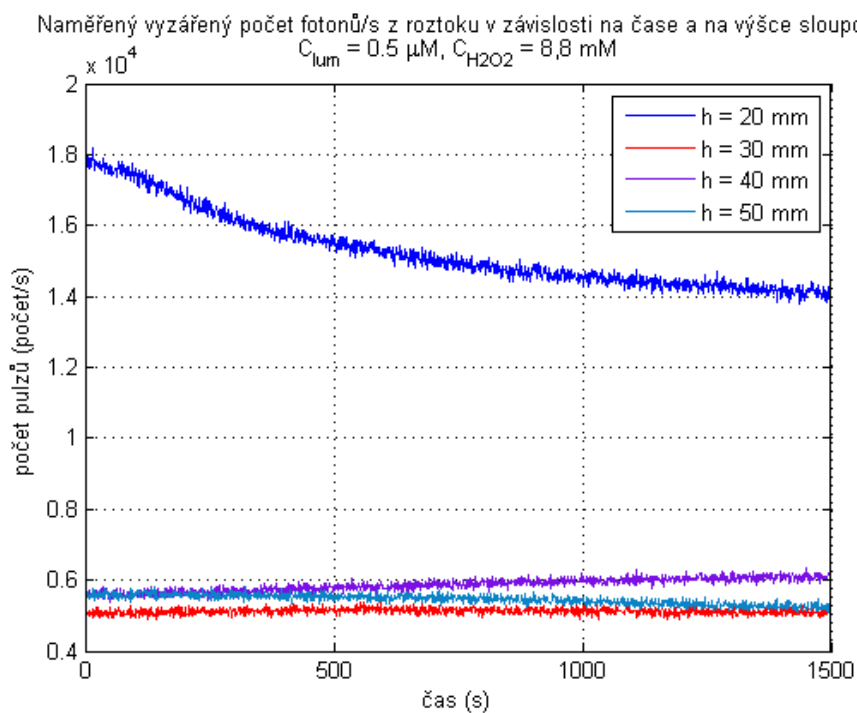


Obrázek p.4.2: Graf z dlouhodobého měření intenzity vyzářování pro zjištění stability vyzářování vzorku pro výšku sloupce 50 mm

## Příloha 5: Časové závislosti intenzity vyzářování pro různé výšky vzorku

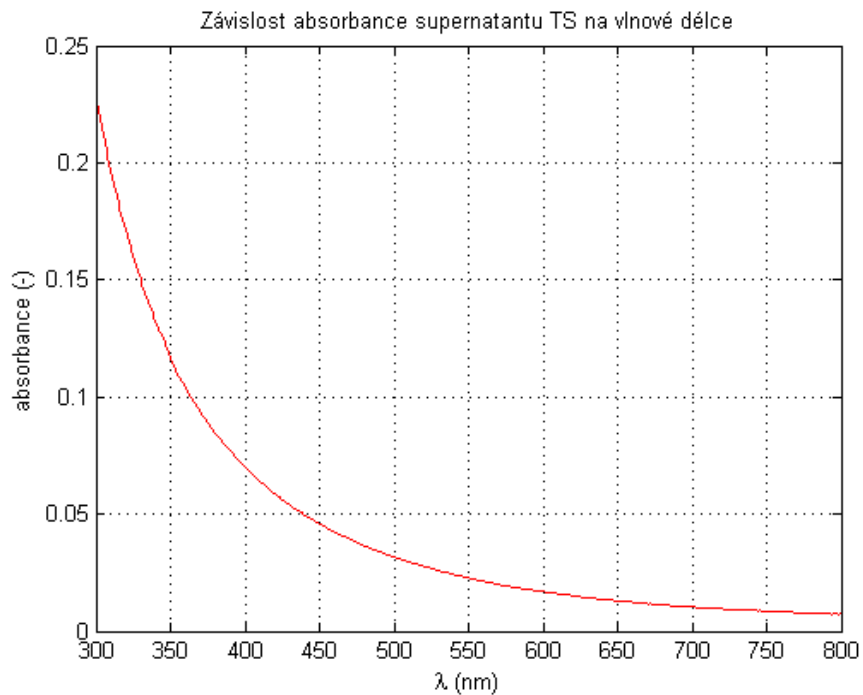


Obrázek p.5.1: Graf intenzity vyzářování v závislosti na čase a výšce sloupce roztoku v uzavřené nádobě ihned po namíchání vzorku.

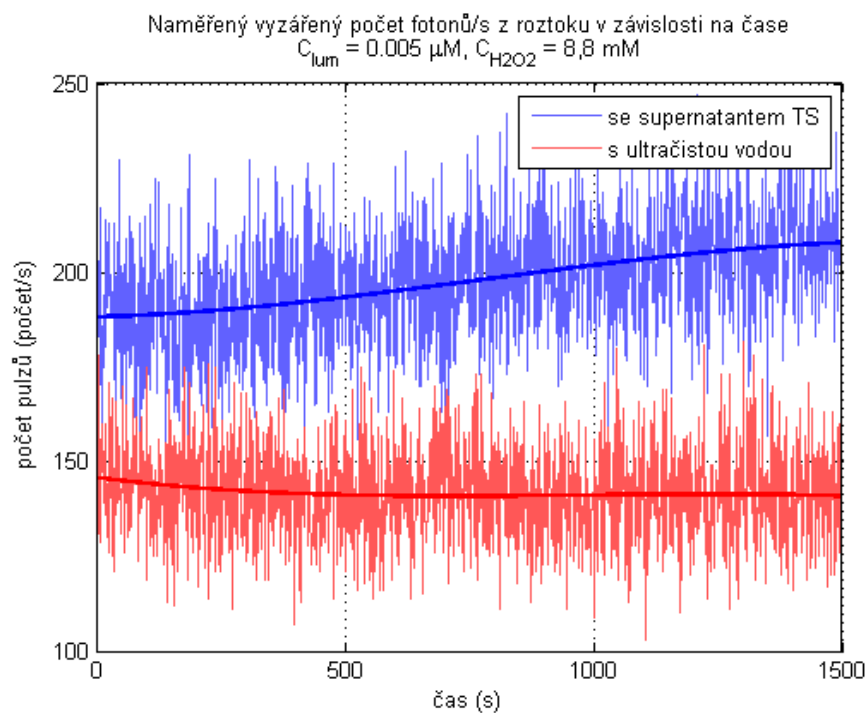


Obrázek p.5.2: Graf intenzity vyzářování v závislosti na čase a výšce sloupce roztoku v uzavřené nádobě dva dny po namíchání vzorku.

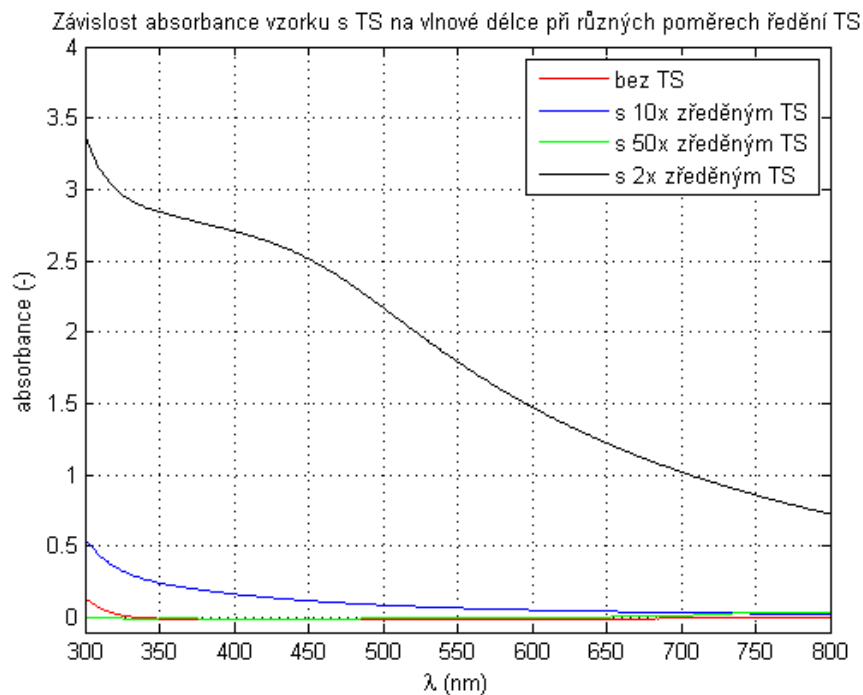
## Příloha 6: Vlastnosti turbiditního standardu



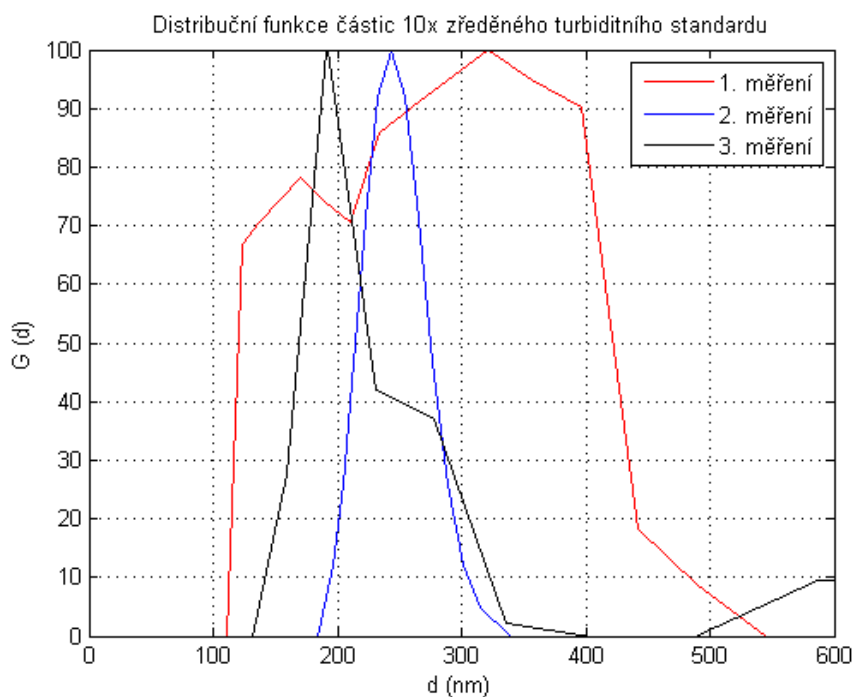
Obrázek p.6.1: Závislost absorpce supernatantu TS na vlnové délce.



Obrázek p.6.2: Graf intenzity vyzářování v závislosti na čase pro roztok rozmíchaný se supernatantem TS.

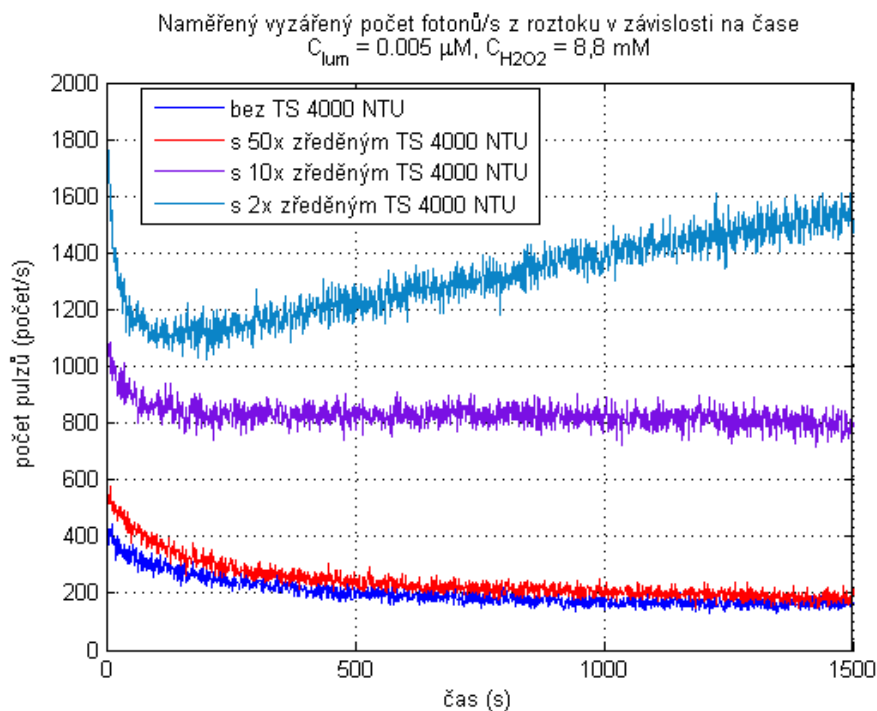


Obrázek p.6.3: Absorbance roztoku s turbiditním standardem v závislosti na vlnové délce.

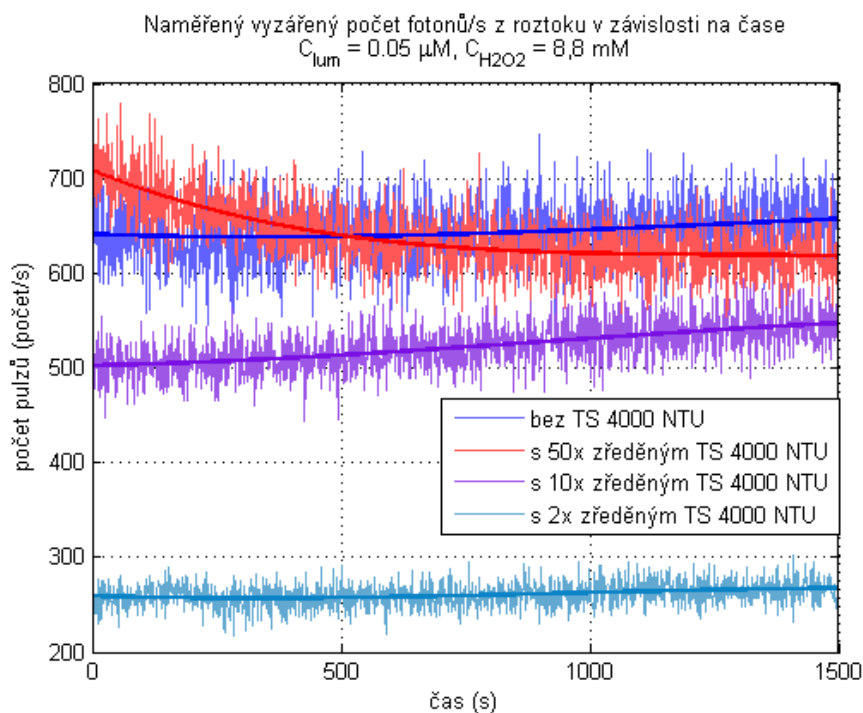


Obrázek p.6.4: Distribuční funkce částic v 10x zředěném turbiditním standardu pro tři měření

## Příloha 7: Časové závislosti intenzity vyzářování pro různé stupně zředění TS

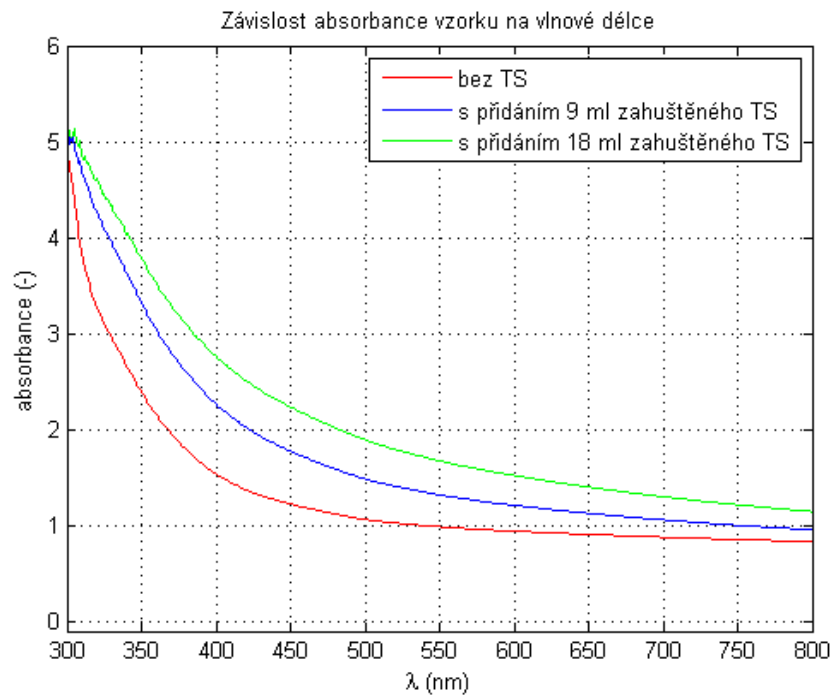


Obrázek p.7.1: Časová závislost intenzity vyzářování ze vzorku čerstvě po namíchání pro různé stupně zředění TS měřené v uzavřené zkumavce,  $V = 20 \text{ ml}$

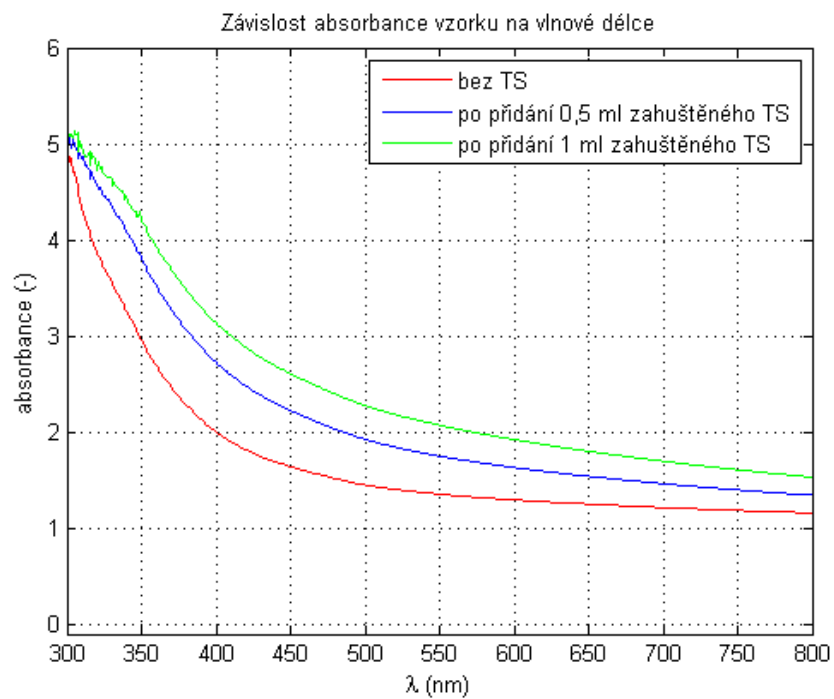


Obrázek p.7.2: Časová závislost intenzity vyzářování vzorku s vyšší koncentrací luminolu pro různé stupně zředění TS měřené v uzavřené zkumavce,  $V = 20 \text{ ml}$

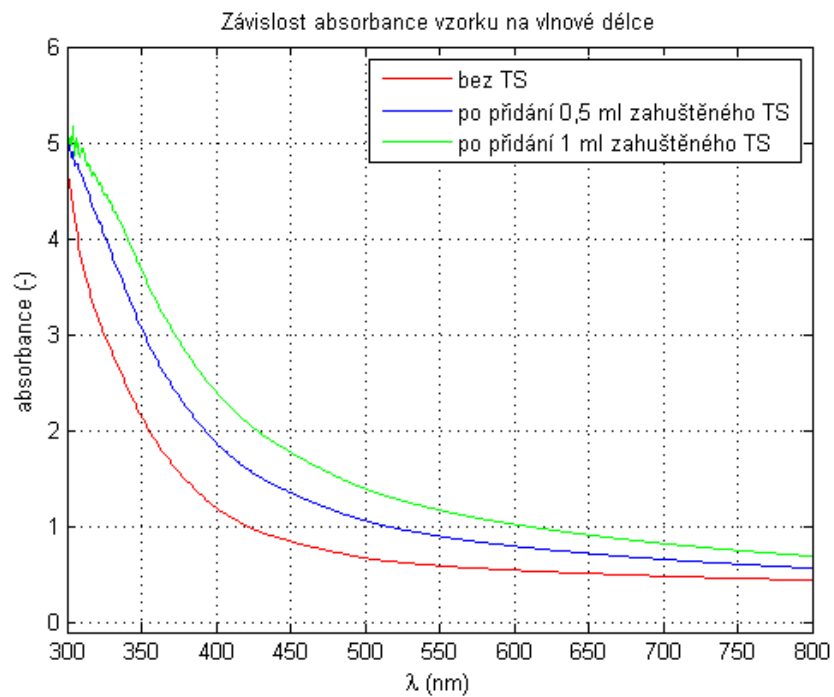
## Příloha 8: Naměřené hodnoty absorbancí vzorků při měření s kvasinkami



Obrázek p.8.1: Závislost absorpance vzorku z prvního měření s kvasinkami na vlnové délce.



Obrázek p.8.2: Závislost absorpance vzorku z druhého měření s kvasinkami na vlnové délce.



**Obrázek p.8.3:** Závislost absorbance vzorku z třetího měření s kvasinkami na vlnové délce.