

Использование спектров лазерной индуцированной флуоресценции для исследования процессов деградации растворенного органического вещества

Букин О.А. ([o bukin@mail.ru](mailto:obukin@mail.ru)) (1), Голик С.С. (1), Салюк П.А. (1),
Бауло Е.Н.(2), Ластовская И.А.(1)

(1) Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН
(2) Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет

Исследование спектров лазерной индуцированной флуоресценции (ЛИФ) растворенного органического вещества (РОВ) вызывает интерес в связи с созданием оперативных количественных методов анализа РОВ, исследованием процессов преобразования РОВ при его деградации, а так же при изучении темпов воспроизводства РОВ клетками фитопланктона в океане [1-4]. РОВ, воспроизводимое клетками фитопланктона, в процессе фотосинтеза, деградирует от сложных органических комплексов к более простым молекулярным соединениям [5,6]. Необходимо отметить, что процессы деградации органического вещества в океане слабо изучены, достаточно сказать, что, к настоящему времени, только около 20% всех составляющих РОВ в океане идентифицированы как известные органические комплексы [7,8].

Вклад «молодого» РОВ (т.е. РОВ, воспроизводимого живыми клетками фитопланктона и находящегося на начальной стадии биохимического разложения [9-11]) в общее РОВ различно в зависимости от темпов его воспроизводства клетками фитопланктона. Этот вклад является максимальным в период цветения водорослей, т.е. когда концентрации хлорофилла «А» достигают наибольших величин. В этот период нами наблюдалась линейная зависимость между концентрацией хлорофилла «А» и интегральной интенсивностью флуоресценции РОВ, при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 532 нм, в наиболее биопродуктивных районах Мирового океана. [1,2]. Это свидетельствует о том, что вклад в сигнал флуоресценции от «молодого» РОВ в этот период становится заметным на фоне сигнала флуоресценции от общего РОВ.

II. Эксперимент

В настоящей работе описаны лабораторные эксперименты, в которых исследуется динамика интенсивностей ЛИФ спектров РОВ и хлорофилла «А» в процессе гибели клеток фитопланктона. Процесс гибели клеток и последующее разрушение сложных

органических комплексов вызывались нагреванием проб морской воды, отобранных на акватории залива Петра Великого в период цветения водорослей.

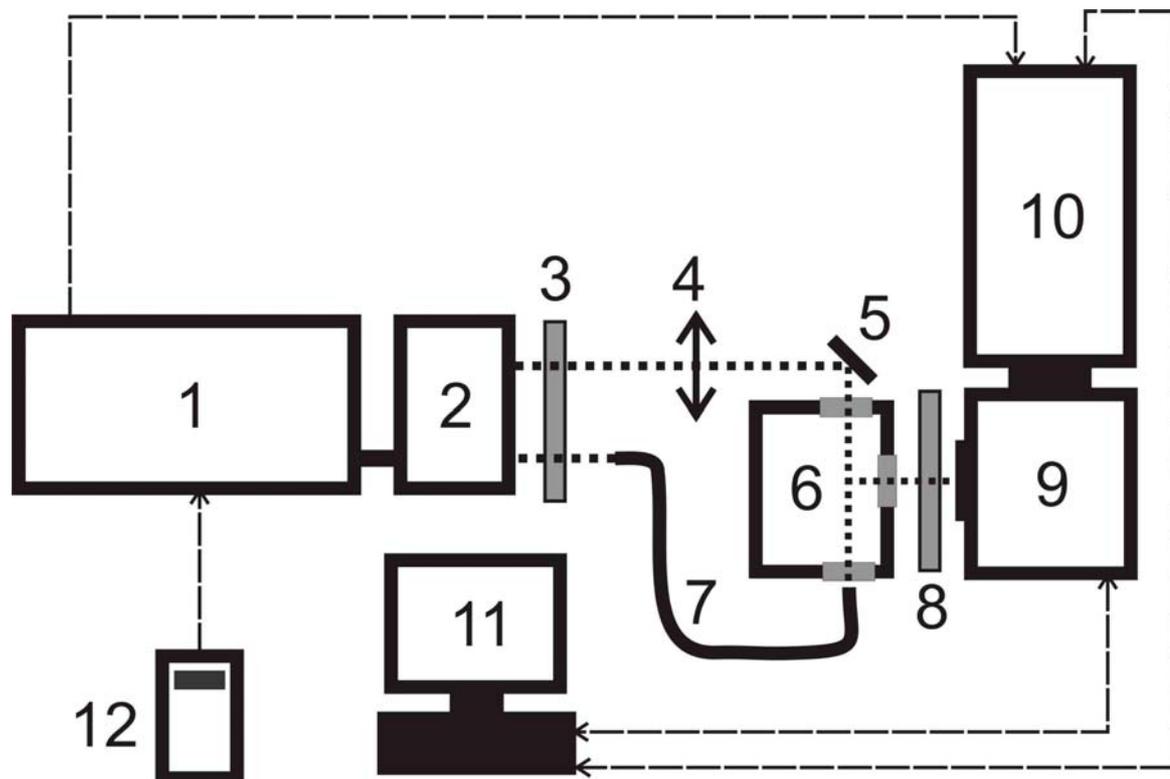


Рис.1. Схема лабораторного ЛИФ спектрометра.

В приведенной на рис. 1 схеме экспериментальной установки использовались два канала возбуждения, второй и третьей гармоникой излучения Nd: YAG лазера с длинами волн 532 нм и 355 нм, соответственно (1 - лазер Lotis ТП LS2135, производство республики Беларусь, длительность импульса 15 нс, энергии в импульсе до 40 и 180 мДж для $\lambda=355$ и 532 нм, соответственно). Регистрация спектра флуоресценции проводилась с использованием многоканального анализатора «Flame Vision Pro System», состоящего из монохроматора «SpecrtaPro 150», фирмы Acton Research (решетка 1200 штрих/мм), и двумерной 12 разрядной камеры с оптическим усилением яркости DiCAM PRO, фирмы PCO, GMBH (Германия).

Излучение лазера (1) проходя через блок преобразования частоты (2) преобразовывалось во вторую $\lambda=532$ нм и третью гармонику $\lambda=355$ нм. Далее третья гармоника, через систему фильтров (3), линзу (4) и металлическое поворотное зеркало (5) направлялось в кварцевое окно оптической кюветы (6). Излучение второй гармоники направлялось в ту же кювету по световоду (7). Кювета представляла собой емкость из не

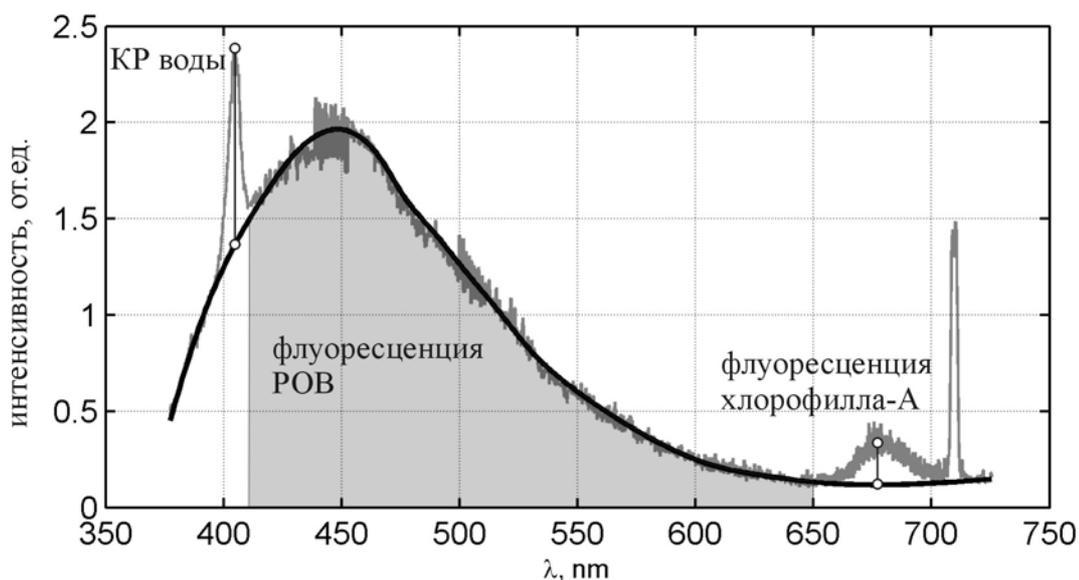
ржавяющей стали, объемом 400 мл, с одним стеклянным (для $\lambda=532$ нм) и двумя кварцевыми окнами (для $\lambda=355$ и выхода на регистрацию) размерами 15*14 мм².

ЛИФ спектры проб морской воды возбуждались поочередно излучением второй и третьей гармоники лазера. Переключение между каналами возбуждения осуществлялось металлической заслонкой.

Сигнал флуоресценции морской воды, возбуждаемый излучением с длинами волн лазера 355 нм и 532 нм (с одинаковой энергией в кювете, равной $E = 20$ мДж и одинаковым диаметром лазерного пучка $D = 9$ мм), проходя через светофильтр (8) и монохроматор (9) регистрировался камерой (10). Синхронизация камеры осуществлялась от импульса затвора модуляции добротности лазера (1), накопление сигнала флуоресценции производилось по 50 лазерным импульсам, частота посылок лазерных импульсов составляла 5 Гц, время экспозиции камеры 300 нс, ширина аппаратной функции монохроматора составляла 20 А.

Спектры флуоресценции проб морской воды при возбуждении лазерным излучением на длинах волн 355 нм и 532 нм представлены на рис.2а и рис.2б, соответственно. На рис.2а на длине волны 405 нм наблюдается максимум комбинационного рассеяния - КР воды ($I_{КР}^{355}$), в спектральном диапазоне 440-460 нм наблюдается максимум интенсивности флуоресценции РОВ [12,13,3], а на длине волны 675 нм флуоресцирует хлорофилл-А [14-17] ($I_{ХА}^{355}$). На рис. 2б интенсивность флуоресценции хлорофилла «А» обозначена $I_{ХА}^{532}$, максимум КР воды наблюдается на 650 нм ($I_{КР}^{532}$).

a



б

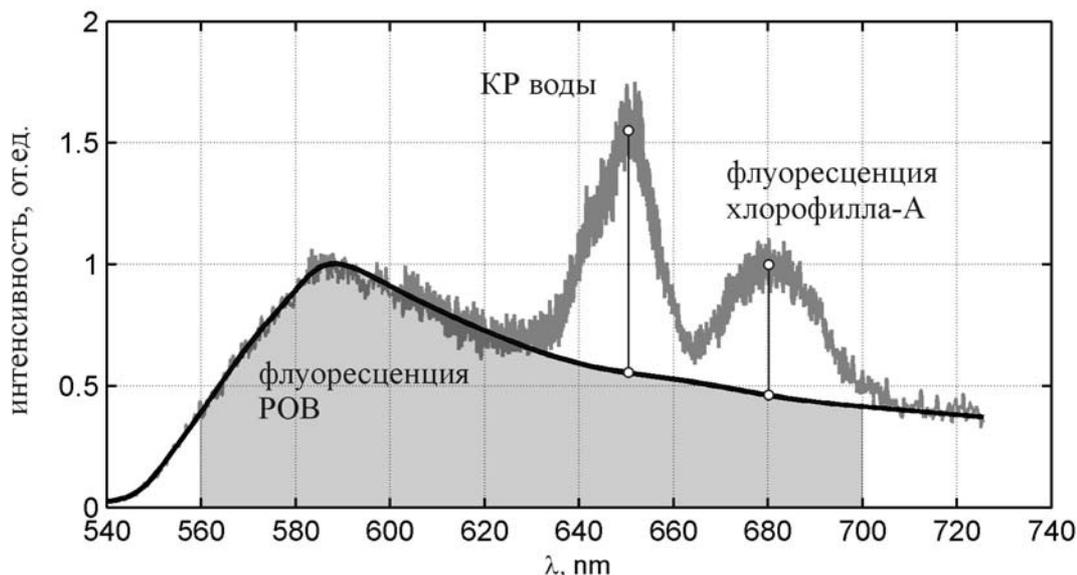


Рис.2. Спектр флуоресценции морской воды при возбуждении лазерным излучением длиной волны 355 нм (а) и 532 нм (б). Интенсивность сигнала на разных длинах волн нормирована на интенсивность КР воды.

Для того чтобы оценить интенсивность флуоресценции РОВ при возбуждении лазерным излучением 355нм и 532 нм, введены параметры Q_{355} и Q_{532} , как площадь (нормированная на интенсивность КР воды и единичный спектральный интервал) под огибающей спектра флуоресценции РОВ [Букин ОАО]:

$$Q_{355}^* = q_{355} \cdot Q_{355} = q_{355} \cdot \int_{410}^{650} \frac{I^{355}(\lambda)}{I_{кр}} d\lambda \tag{1}$$

$$Q_{532}^* = q_{532} \cdot Q_{532} = q_{532} \cdot \int_{560}^{700} \frac{I^{532}(\lambda)}{I_{кр}} d\lambda \tag{2}$$

где q_{355} и q_{532} – коэффициенты, которые переводят размерность ИФРОВ в рассматриваемом спектральном диапазоне к размерности концентрации РОВ в мкг/л (Q_{355}^* и Q_{532}^*).

III. Обсуждение результатов

Флуоресценция РОВ в диапазоне 440-460 нм при возбуждении излучением длиной волны 355 нм во многих работах относится к флуоресценции «гуминоподобных» веществ [3,4]. Но практически нет анализа того, какое РОВ флуоресцирует при возбуждении зеленым излучением. Это вызвано во многом тем, что обычно в экспериментах, по измерению спектров флуоресценции с многоволновым возбуждением, используют

ламповые излучатели, которые имеют недостаточную интенсивность света в зеленой области спектра для возбуждения интенсивной флуоресценции РОВ [3,4,9]. Скорее всего, при увеличении длины волны возбуждающего излучения увеличивается доля флуоресценции более сложных молекул. Очевидно, что наиболее сложными молекулы РОВ являются на стадии своего появления и уже, потом, в процессе трансформации и деградации их химическая структура упрощается. Т.е. можно предположить, что по мере трансформации и деградации РОВ максимум в его спектре флуоресценции смещается в более коротковолновую область. Подтверждение этому, можно найти и в других работах. Так, в работе [20] показано, что спектр свечения одноклеточных водорослей по мере естественного отмирания тускнеет и меняет свой цвет, таким образом, как если бы его спектр смещался в коротковолновую область. У производных хлорофилла, образующихся при переваривании водорослей зоопланктонами максимум свечения приходится на 616 нм [9], его положение смещено примерно на 60 нм в коротковолновую область от максимума флуоресценции хлорофилла «А» (675нм). В работе [21] говорится о том, что для конденсированных ароматических углеводов по мере возрастания числа бензольных колец и сопряженных связей в цепи молекулы наблюдается тенденция к длинноволновому смещению полос поглощения и люминесценции.

Таким образом, вероятно, что при возбуждении зеленым излучением большой вклад во флуоресценцию дает «молодое» РОВ. А при возбуждении ультрафиолетовым излучением флуоресцирует практически все РОВ и относительный вклад флуоресценции «молодого» РОВ в суммарную интенсивность значительно уменьшается.

Для подтверждения предположения о большем вкладе «молодого» РОВ в сигнал флуоресценции при возбуждении зеленым излучением проведен лабораторный эксперимент, в котором было исследовано формирование спектров лазерной индуцированной флуоресценции морской воды в процессе гибели фотосинтезирующих клеток и деградации растворенного органического вещества. Гибель клеток была инициирована постепенным повышением температуры воды до кипения. далее в течение двух недель измерялись следующие параметры: I_{XA}^{355} , I_{XA}^{532} , Q_{355} и Q_{532} . Результаты эксперимента показаны на рис.3.

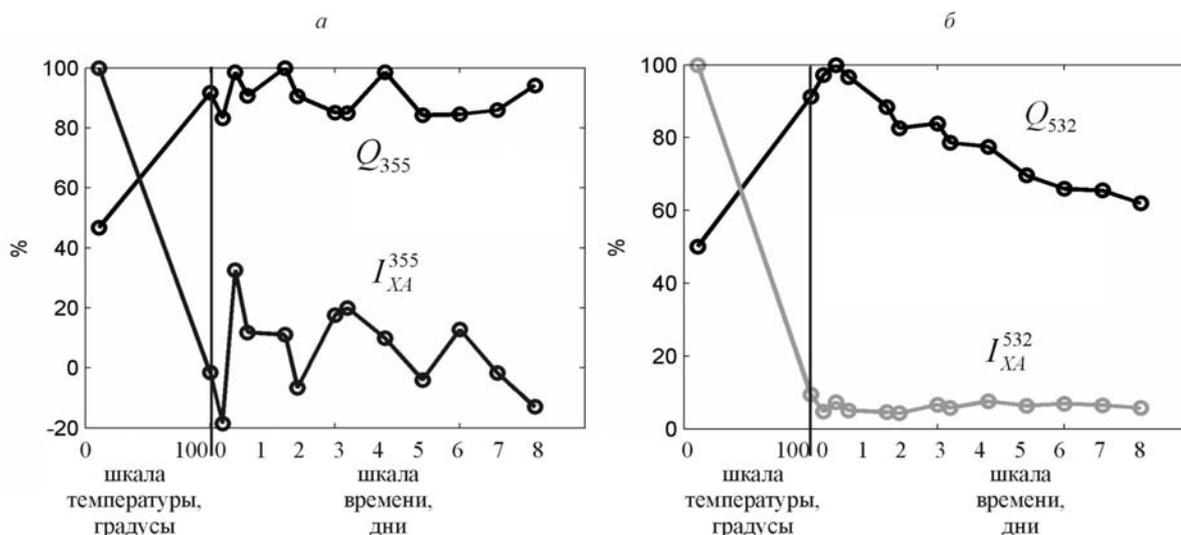


Рис.3. Эксперимент по деградации РОВ.

При возбуждении лазерным излучением длиной волны 355 нм (а) и 532 нм (б). Значения интенсивностей флуоресценции хлорофилла «А» нормированы на интенсивность КР воды, как и в случае параметра Q (см. формулу 1 и 2). По шкале ординат даны изменения исследуемых величин в % от максимально наблюдаемого значения. Первая точка на графиках 3а и 3б соответствует исходной пробе измеренной после 2 часов после забора проб, при температуре воды в месте забора равной 11° С. Последующие точки соответствуют измерениям, выполненным в пробе после ее кипячения, измерения проводились в течении двух недель, температура проб соответствовала 23°С. Кроме одноразового кипячения в течении двух минут, проба воды не подвергалась далее никакой обработке. Вода, после облучения лазерным излучением выливалась, так что каждый раз в эксперименте использовалась не облученная проба.

В обоих случаях в результате кипячения флуоресценция хлорофилла «А» падает до нуля (вследствие гибели клеток фитопланктона под действием температуры), при этом ИФРОВ₃₅₅ и ИФРОВ₅₃₂ возрастают одинаково, примерно в два раза. Видно, что ИФРОВ₅₃₂ за исследуемый период времени плавно снижается, а ИФРОВ₃₅₅, наоборот находится примерно на одном уровне. Такое поведение может быть объяснено тем фактом, что сразу после кипячения в воде присутствует большая доля «молодого» РОВ (вследствие гибели клеток фитопланктона), затем по мере «старения» РОВ, т.е. упрощения его химической структуры, ИФРОВ₅₃₂ падает, а ИФРОВ₃₅₅ не изменяется. Это соответствует тому предположению, что УФ излучение возбуждает флуоресценцию всего РОВ, включая и старый РОВ не селективным образом. И при последующем разложении ИФРОВ₃₅₅ остается практически на постоянном уровне в пределах ошибки измерения. Поведение ИФРОВ₅₃₂ отличается тем, что сразу после процесса кипячения наблюдается максимум, который соответствует увеличению молодого РОВ, образованного за счет органического

материала клеток фитопланктона. Этот максимум фиксируется в течении первых суток после нагревания пробы. Затем на протяжении двух недель наблюдается монотонный спад ИФРОВ₅₃₂, который по видимому соответствует процессу деградации РОВ к более простым комплексам.

IV. Заключение

Процесс гибели клеток фитопланктона и следующая за ним деградация РОВ, вызывались, в наших экспериментах, нагреванием проб морской воды до кипения, это существенно отличается от деградации РОВ, вызванной естественными процессами, протекающими в океане. Тем не менее, полученные результаты позволяют определить основные особенности, которые возникают в динамике ИФРОВ при возбуждении лазерным излучением с различными длинами волн. Если предположить, что в первые часы, после гибели клеток (когда линия флуоресценции хлорофилла «А» полностью исчезает) большая часть РОВ, представляет собой не деградированное РОВ, то повышение ИФРОВ, возбуждаемой 355 нм и 532 нм связывается с повышением его концентрации в пробах морской воды. Различное поведение ИФРОВ₃₅₅ и ИФРОВ₅₃₂, которое наблюдается затем в течении двух недель, свидетельствует о том, что при использовании в качестве возбуждающей длины волны 532 нм, возможно выделить временной интервал, в течении которого регистрируется «молодое» РОВ. При возбуждении УФ излучением вклад «молодого» РОВ невозможно выделить на фоне общего сигнала флуоресценции РОВ. Отличие в динамике ИФРОВ при воздействии УФ и более длинноволновым излучением следует объяснять различными механизмами возбуждения сложных органических комплексов, которое представляет «молодое» РОВ и более простых молекул, образующихся в процессе деградации. Регистрация флуоресценции «молодого» РОВ делает возможным постановку исследований процессов воспроизводства органического вещества фитопланктонными сообществами с использованием ЛИФ спектроскопии.

Работа выполнена при поддержке грантов ДВО РАН: 06-I-П16-060; 06-III-B-07-290; 06-III-B-07-300 и РФФИ № 06-05-96105

Литература

1. Букин О.А., Пермяков М.С., Салюк П.А., Майор А.Ю., Буров Д.В., Хованец В.А., Голик С.С., Подопригора Е.Л. Особенности формирования спектров лазерной индуцированной флуоресценции морской воды в период цветения водорослей в различных районах Мирового океана // Оптика атмосферы и океана. – 2004. – т. 17, № 9. – С. 742-749.

2. Букин О.А., Салюк П.А., Майор А.Ю., Павлов А.Н. Исследование процессов воспроизводства органического вещества клетками фитопланктона методом лазерной индуцированной флуоресценции // Оптика атмосферы и океана. – 2005. – № 11. – С. 976-983.
3. Coble P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy // Marine Chemistry. 1996. V. 51. P. 325-346.
4. Parlanti E., Worz K., Geoffroy L., Lamotte M. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs // Organic Geochemistry. 2000. V. 31. P. 1756-1781.
5. Скопинцев Б.А. Новые данные о природе органического вещества океанических вод и его энергетические ресурсы // Океанология. 1981. Т. 21. № 5. С. 821-830.
6. Атлантический океан /Под ред. О.К. Леонтьева. М.: Мысль, 1977. 296 с.
7. Hopkinson Jr. C.S., Joseph J.V., Amy N. Decomposition of dissolved organic matter from the continental margin // Deep-Sea Research II. 2002. V.49. P. 4461-4478.
8. Munster. Concentrations and fluxes of organic carbon substances in the aquatic environment // Antonie van Leeuwenhoek. 1993. V. 63. № 3. P. 243-274.
9. Карабашев Г.С. Флуоресценция в океане. Л.: Гидрометеиздат, 1987. 200 с.
10. Norman B., Zweifel U.L., Hopkinson Jr. C.S., Fry B. Production and utilization of dissolved organic carbon during an experimental diatom bloom // Limnol. Oceanogr., 1995, V.40, №5, P.898-907
11. Sondergaard M., Williams P.J.B., Cauwet G., Reimann B., Robinson C., Terzic S., Woodward E.M.S., Worm J. Net accumulation and flux of dissolved organic carbon and dissolved organic nitrogen in marine plankton communities // Limnol. Oceanogr., 2000, V.45, №5, P.1097-1111
12. Clark C.D., Jimenez-Morais J., Jones G., Zanardi-Lamardo E., Moore C.A., Zika R.G. A time-resolved fluorescence study of dissolved organic matter in a riverine to marine transition zone // Marine Chemistry. 2002. V.78. P.121–135.
13. Determann S., Reuter R., Wagner P., Willkomm R. Fluorescence matter in the eastern Atlantic Ocean: part 1. Method of measurement and near-surface distribution // Deep-Sea Research. – 1994. v. 41. – P. 659-675.
14. Brown J.S. Forms of chlorophyll in vivo // Ann. Rev. Plant Physiol. 1972. V.23. p.73-86.

15. Hoge F.E., Swift R.N. Airborne simultaneous spectroscopic detection of laser-induced water Raman backscatter and fluorescence from chlorophyll a and other naturally occurring pigments // *Applied Optics*. 1981. V. 20. № 18. P. 3197-3205.
16. Barbini R., Colao F., Fantoni R., Palucci A., Ribezzo S.. Differential lidar fluorescensor system used for phytoplankton bloom and sea water quality monitoring in Antarctica. *Int. Journal of remote sensing*. V.22, #2-3, 2001. P.369-384.
17. Фадеев В.В. Дистанционное лазерное зондирования фотосинтезирующих организмов. – *Квантовая электроника*, 1978, Т.5, №10, с.2221-2226.
18. Bristow M., Nielsen D., Bundy D., Furtek R. Use of water Raman emission to correct airborne laser fluorosensor data for effects of water optical attenuation. *Applied Optics*. 1981. v. 20. N 17, p. 2889-2906.
19. Salyuk P.A., Bukin O.A., Permyakov M.S. Using of laser induced fluorescence method for phytoplankton communities describing // *SPIE proceedings*. – 2005. – Vol. 5851. – P. 232-236.
20. Горюнова С.В. Особенности процессов автолиза у диатомовых водорослей. – *Труды института микробиологии АН СССР*, 1958, т.5, с. 53-62.
21. Глушков С.М., Фадеев В.В., Филиппова Е.М., Чубаров В.В. Проблемы лазерной флюорометрии органических примесей в природных водах // *Оптика атмосферы и океана*. 1994. Т. 7. № 4. С. 433-449.