

## ОПТИКА КЛАСТЕРОВ, АЭРОЗОЛЕЙ И ГИДРОЗОЛЕЙ

УДК 535.372

# Флуоресценция растворенных органических веществ в дальневосточных морях при многочастотном возбуждении

П.А. Салюк<sup>1</sup>, И.М. Дорошенко<sup>2</sup>, К.С. Клюгер<sup>2</sup>, О.А. Букин<sup>3</sup>,  
В.А. Крикун<sup>1</sup>, А.Ю. Майор<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН  
690041, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43

<sup>2</sup>Морской государственный университет им. адмирала Г.И. Невельского  
690059, г. Владивосток, ул. Верхнепортовая, 50а

<sup>3</sup>Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН  
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 5

Поступила в редакцию 28.01.2013 г.

Представлен анализ пространственного распределения параметров, характеризующих флуоресценцию растворенных органических веществ различного типа в морской воде. Пробы отобраны в водах Японского и Охотского морей различной тропности, а также в районах, подверженных речному стоку и/или антропогенному воздействию. Измерения проведены на многочастотном гиперспектральном флуориметре Varian Cary Eclipse сразу после отбора проб в спектральном диапазоне 230–500 нм по длинам волн возбуждения и 240–750 нм по длинам волн испускания. Проанализированы соотношения между интенсивностями флуоресценции при всевозможных комбинациях длин волн возбуждающего и испускаемого излучений. Выделены сигналы флуоресценции пигментов фитопланктона, гуминовых соединений, белковых соединений, загрязняющих веществ. Проведен корреляционный анализ полученных сигналов, дано объяснение возможно-го источника их происхождения, и определены спектральные области, подверженные наибольшему влиянию каждого из рассматриваемых типов флуоресценции.

*Ключевые слова:* многочастотный метод флуоресценции, растворенное органическое вещество; excitation emission matrix, dissolved organic matter.

### Введение

В последнее десятилетие получили широкое развитие методы определения типов растворенных органических веществ (РОВ) из трехмерных спектров флуоресценции морской воды, где интенсивность флуоресценции зависит от двух переменных — длин волн испускаемого и возбуждающего излучений. О необходимости таких измерений говорилось еще в 80-х гг. XX в. [1], но развитие технологий позволило начать активные исследования в данной области лишь с середины 90-х [2, 3]. Из спектров возможно определение гуминовых и белковых соединений в морской воде, для которых характерны различные диапазоны возбуждающего и испускаемого излучения флуоресценции [4, 5]. Кроме того, возможно определить источники поступления РОВ в морскую воду и оценить стадии разложения органических веществ при совместном анализе с гидро-

логическими параметрами морской воды и параметрами, характеризующими работу фотосинтетического аппарата клеток фитопланктона [6–9].

Основными проблемами при исследовании трехмерных спектров флуоресценции РОВ являются: наличие спектральных диапазонов, однозначно не отнесенных к тому или иному типу РОВ; методы, разделяющие сигналы различного происхождения, требуют улучшений [10, 11]; необходимо повышение чувствительности в зеленой области спектра [8].

Цель нашей работы заключается в выделении и идентификации регулярно наблюдаемых пиков флуоресценции РОВ в морских водах различного типа и определении тех спектральных диапазонов, в которых преобладает влияние данных пиков. Используются методика обработки трехмерных спектров флуоресценции морской воды, выделения спектральных особенностей и результаты анализа пространственно-временного распределения РОВ различного типа в морской воде.

Решение представленной задачи важно при разработке методов оперативного анализа морской воды, основанных на флуориметрических измерениях, и необходимо для получения знаний о том, какие компоненты морской воды дают вклад в регистрируемый сигнал при использовании различных пар длин волн возбуждающего и испускаемого излучений.

\* Павел Анатольевич Салюк (pavel.salyuk@gmail.com); Иван Михайлович Дорошенко (doroshenkov\_ivan@mail.ru); Константин Сергеевич Клюгер (kluger\_k\_s@mail.ru); Олег Алексеевич Букин (o\_bukin@mail.ru); Владимир Александрович Крикун (kv99@mail.ru); Александр Юрьевич Майор (mayor@iacp.dvo.ru).

## 1. Аппаратура и методы измерений

Измерения проводились на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse. Возбуждение флуоресценции морской воды осуществлялось импульсной ксеноновой лампой (частота импульсов 85 Гц, пиковая мощность 75 кВт, длительность импульса 2 мкс). Шаг сканирования монохроматоров возбуждающего и испускающего излучений составлял 5 нм, в области комбинационного рассеяния (КР) воды шаг регистрации испускаемого излучения — 2 нм. Диапазон длин волн возбуждающего излучения составлял 230–500 нм, испускаемого — 240–750 нм. Регистрация каждого отчета интенсивности флуоресценции проводилась с помощью ФЭУ Hamamatsu R928 в течение 0,1 с. Общее время измерения одного спектра около 20 мин.

Пример трехмерного спектра флуоресценции морской воды приведен на рис. 1.

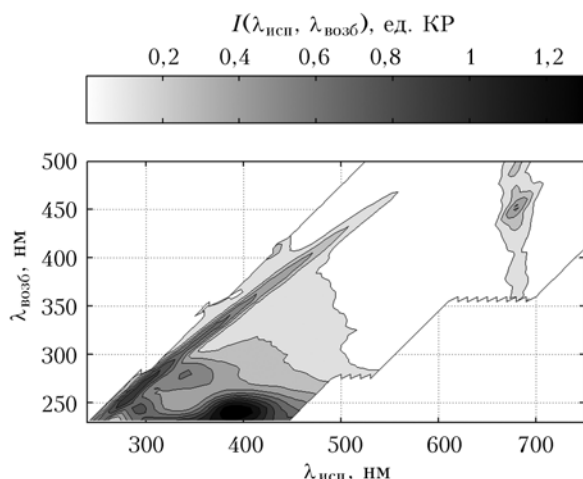


Рис. 1. Трехмерный спектр флуоресценции РОВ в морской воде

Все значения флуоресценции нормировались на сигнал КР воды при возбуждении излучением на длине волны 355 нм. Пик КР воды аппроксимировался функцией Гаусса с добавлением фонового сигнала, описываемого прямой линией. Длина волны 355 нм выбрана из тех соображений, что в этом спектральном диапазоне достигалась минимальная относительная ошибка определения интенсивности КР воды.

Измерения проб морской воды осуществлялись в течение 30 мин после их отбора без какой-либо предварительной подготовки. Для дальнейшего анализа использовались только те спектры, у которых значения флуоресценции в пределах ошибки совпали с измерениями *in situ* флуоресценции, выполненными с помощью погружаемых датчиков WetLabs и/или проточного лазерного флуориметра со световой приставкой.

## 2. Используемые данные и районы исследований

Анализ свойств флуоресценции РОВ был проведен для проб морской воды, отобранных в ходе

лабораторных экспериментов и во время натурных исследований.

Лабораторный эксперимент заключался в наблюдении за развитием диатомовой водоросли *Pseudo-Nitzschia* в искусственно созданных условиях. Пробы морской воды были отобраны на всех стадиях развития водорослей. Всего был получен 21 спектр трехмерной флуоресценции морской воды.

Натурные исследования были проведены в принципиально разных районах, содержащих воды с различными источниками поступления РОВ в морскую воду (рис. 2).

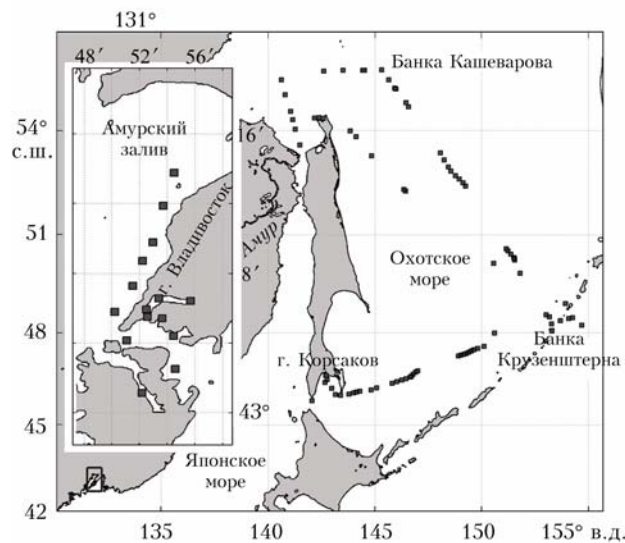


Рис. 2. Географическое положение мест отбора проб морской воды

Это воды, подверженные антропогенному влиянию г. Владивосток и Корсаков (Амурский залив, бухта Золотой Рог, залив Анива); воды, подверженные стоку рр. Амур и Раздольная (Сахалинский залив, Амурский залив); олиготрофные и мезотрофные воды открытых частей Японского и Охотского морей; эвотрофные воды в районах интенсивного развития фитопланктонных сообществ (зоны апвеллинга около банок Круженштерна и Кашеварова, период цветения водорослей в заливе Петра Великого).

Отбор проб осуществлялся с поверхности, а в некоторых районах на различных глубинах в диапазоне 0–100 м. Всего для дальнейшего анализа был выбран 171 спектр трехмерной флуоресценции морской воды, отобранной в естественных условиях.

Общий массив анализируемых данных, полученных от различных источников поступления РОВ в морскую воду: терригенных, антропогенных и биологических, составил 192 спектра.

## 3. Результаты

Из рис. 1 видно, что в рассматриваемом спектральном диапазоне наблюдаются различные пики флуоресценции, которые связаны с растворенными органическими веществами различного происхождения или с пигментами клеток фитопланктона.

Для определения того, в каких областях обычно наблюдались пики, использовано два подхода. В первом анализировались положения локальных максимумов в трехмерном пространстве, амплитуда которых превышала в 2 раза уровень шума. Во втором подходе в скользящем окне рассчитывался коэффициент корреляции между зарегистрированным сигналом и модельными значениями, описываемыми двумерной функцией Гаусса с ширинами на полувысоте 50 нм и максимумом в центре скользящего окна. На рис. 3 показан результат работы обеих процедур.

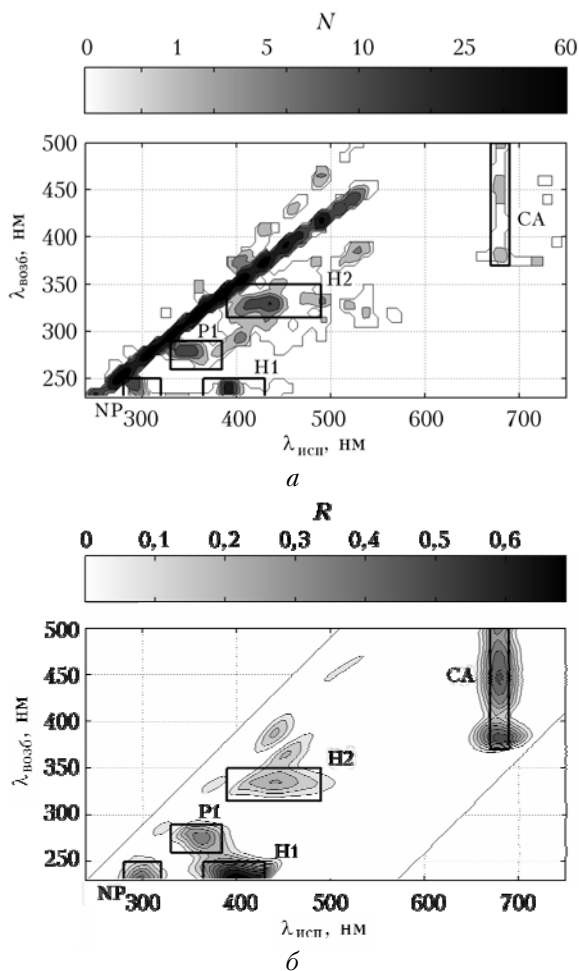


Рис. 3. Области наиболее вероятного положения пиков флуоресценции: *a* – двумерная гистограмма положения локальных максимумов трехмерных спектров флуоресценции морской воды, *N* – количество локальных максимумов; *b* – значения положительных коэффициентов корреляции *R*, усредненных по всем спектрам

На основе рис. 3 выделены спектральные области наиболее вероятного положения пиков, которые четко отделяются обеими используемыми процедурами. Из анализа литературы спектральная область H1 и H2 – это флуоресценция гуминовых соединений, область P1 – флуоресценция белковых соединений, область NP – неидентифицированный пик, который в некоторых работах рассматривается как флуоресценция белковых соединений; область CA –

флуоресценция хлорофилла *a*, основного пигмента фитопланктона. В табл. 1 приведены положение полученных областей, их обозначение и идентификация.

Таблица 1

Положение наиболее часто встречающихся пиков флуоресценции в рассматриваемом спектральном диапазоне в водах Японского и Охотского морей

Область	Спектральный диапазон возбуждающего/испускаемого излучений, нм	Идентификация
NP	230–250/270–310	Неустановленный пик
P1	260–300/320–380	Белковые соединения
H1	230–250/350–450	Гуминовые соединения
H2	320–350/400–500	Гуминовые соединения
CA	380–600/670–690	Хлорофилл <i>a</i>

Для того чтобы определить весь спектральный диапазон, на который влияет каждый из выделенных пиков, был рассчитан коэффициент корреляции между интенсивностями в пределах спектральных диапазонов (табл. 1) и интенсивностями из всех остальных участков спектра. Анализ был проведен для всех полученных спектров. В областях максимумов флуоресценции выбирались интенсивности *I* для заданных значений  $\lambda_{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{исп}}$ , после чего вычислялся коэффициент корреляции Спирмена с *I* при всевозможных значениях  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}}$ . Таким образом, была получена матрица значений корреляции, которая характеризует, насколько связаны рассматриваемые спектральные области с выбранным пиком флуоресценции. Для увеличения достоверности полученных результатов в каждой заданной области выбиралось четыре точки, после чего полученные корреляционные матрицы усреднялись. Результаты анализа представлены на рис. 4 (вклейка) и в табл. 2.

Таблица 2

Значения корреляций *R* между рассматриваемыми сигналами флуоресценции

<i>R</i>	Лабораторный эксперимент	Амурский залив	Золотой Рог	Охотское море	Общий результат
CA–P1	<b>0,57</b>	<b>0,91</b>	<b>0,79</b>	0,46	<b>0,53</b>
CA–NP	<b>0,58</b>	0,23	0,23	–0,11	0,06
CA–H1	–0,06	<b>0,8</b>	<b>0,67</b>	0,06	0,4
CA–H2	–0,2	<b>0,86</b>	<b>0,75</b>	0,12	0,4
P1–NP	<b>0,69</b>	0,17	0,22	0,07	0,1
H1–H2	–0,03	<b>0,94</b>	<b>0,81</b>	<b>0,77</b>	<b>0,87</b>
H1–P1	–0,3	<b>0,88</b>	<b>0,91</b>	0,42	<b>0,73</b>
H1–NP	0,06	0,28	0,34	<b>0,60</b>	0,35

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые коэффициенты корреляции.

#### 4. Обсуждение результатов

Основные источники поступления РОВ в океан – это фитопланктон [13], а в некоторых районах – сток рек и/или антропогенные выбросы [14]. О природе флуоресценции РОВ можно судить по связи

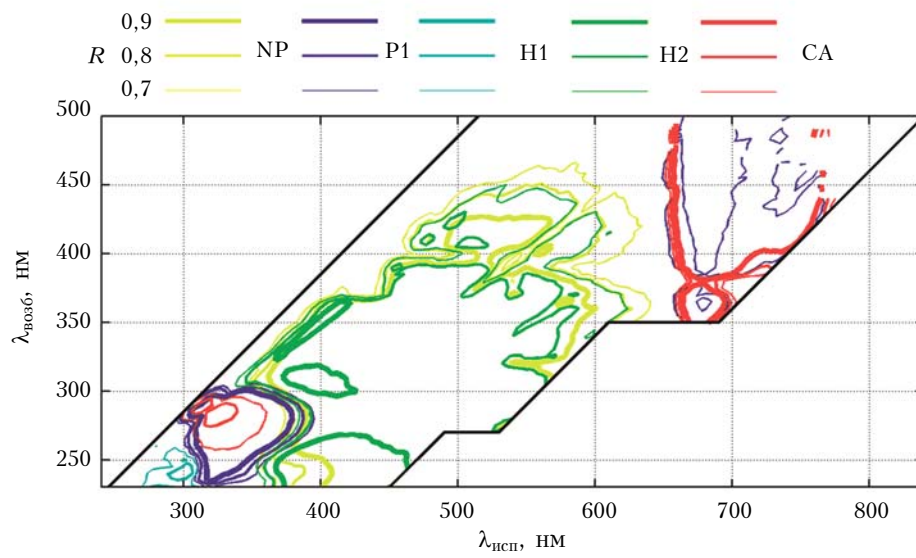


Рис. 4. Спектральные области, в которых преобладают рассматриваемые сигналы флуоресценции:  $R$  – коэффициент корреляции между рассматриваемым пиком и остальными спектральными диапазонами. Толщина линий определяется значением  $R$

между пиками флуоресценции, определяемыми пигментами клеток фитопланктона, и пиками, определяемыми содержанием РОВ в морской воде, либо по связи пиков флуоресценции с соленостью морской воды. Кроме того, важно рассмотреть взаимосвязи между всеми выделенными пиками. Наличие значимой корреляции между двумя различными спектральными диапазонами может быть объяснено двумя причинами: 1) присутствием вещества, дающего вклад во флуоресценцию из двух разных спектральных областей в силу особенностей своего молекулярного строения и расположения энергетических уровней; 2) наличием в воде двух разных веществ, концентрации которых идентично изменяются под действием какого-либо процесса.

Из результатов, представленных в табл. 2 и на рис. 4, видно, что содержание РОВ белковых соединений P1 линейно связано с содержанием хлорофилла *a* практически вне зависимости от оптического типа вод. РОВ гуминовых соединений H1 и H2 не имеют статистически значимых отличий в районах исследований и в целом слабо коррелируют с P1 и СА, имея различные коэффициенты наклона на диаграммах рассеяния для разных районов. Пик NP не имеет значимых линейных связей ни с одним из рассматриваемых пиков, что говорит о необходимости уточнения его природы.

По всей видимости, РОВ белковых соединений P1 тесно связаны с жизнедеятельностью фитопланктона и являются частью его клеток или входят в продукты его жизнедеятельности. Важно, что вид линейной связи между интенсивностью пиков P1 и СА оставался практически неизменным для всех районов исследований и даже данные, полученные в лабораторном эксперименте по выращиванию водоросли *Pseudo-Nitzschia*, описываются общей линейной регрессией. Кроме того, в лабораторном эксперименте линейная связь между интенсивностью пика P1 и общим количеством клеток фитопланктона была сильнее по сравнению с линейной связью между P1 и СА.

Как уже было отмечено, пики H1 и H2 практически не имеют статистически значимых отличий при анализе взаимосвязи, тем не менее их максимумы находятся в разных спектральных диапазонах, и на рис. 4 спектральные области, подверженные влиянию H1 и H2, имеют характерные различия. Возможно, различия связаны с наличием слабой корреляции между пиком NP и спектральным диапазоном положения максимума H1.

Несмотря на то что коэффициент корреляции, рассчитанный по всем спектрам, между пиками гуминовых соединений и пиками, связанными с жизнедеятельностью фитопланктона, не значительно отличается от нуля, в отдельных районах наблюдались значимые линейные зависимости, но с разным наклоном. Линейная зависимость между гуминоподобными пиками H1, H2 и флуоресценцией хлорофилла *a* может быть объяснена либо опреснением вод за счет стока рек (в этом случае линейная связь присутствует, но наклон соответствующей линейной регрессии меняется в зависимости от стока реки и содержания в ней органических веществ и фито-

планктона), либо тем, что наблюдаемые гуминоподобные вещества получены за счет жизнедеятельности фитопланктона и являются «новыми», т.е. находятся на начальных стадиях разложения. Отсутствие линейной корреляции между пиками H и СА может наблюдаться в тех случаях, когда гуминоподобные вещества находятся на конечных стадиях разложения и не связаны с фитопланктонным сообществом, функционирующим в рассматриваемый момент.

Природа пика NP точно не определена. Можно утверждать, что пик не связан с содержанием белковых соединений в морской воде, как отмечается в некоторых источниках [2, 12], так как значимые линейные корреляции отсутствуют во всех проанализированных районах. Кроме того, пик чуть сдвинут в коротковолновую область по сравнению с приведенными в [2, 12] положениями пиков (230/305 нм). При этом пик вообще не связан со всеми другими рассматриваемыми спектральными особенностями, есть лишь слабая корреляция с областью максимума H1. Предположительно, исходя из предварительного анализа пространственного распределения, можно сказать, что пик определяется наличием загрязняющих веществ в морской воде, так как его повышенные значения наблюдались в придонных слоях Амурского залива в районах городских сбросов и активного судоходства.

Таким образом, весь проанализированный спектральный диапазон можно разделить на пять основных областей (см. рис. 4), в которых преобладают следующие сигналы флуоресценции: 350–500/670–750 нм – пигменты фитопланктона; 230–450/370–660 нм – гуминовые соединения РОВ; 230–400/300–380 нм – белковые соединения РОВ, связанные с жизнедеятельностью фитопланктона; 230–250/250–300 нм – не связанные с жизнедеятельностью фитопланктона и наличием гуминовых соединений.

## Заключение

Были проанализированы соотношения между интенсивностями флуоресценции при всевозможных комбинациях длин волн возбуждающего и испускаемого излучений. Определены положения наиболее часто встречающихся пиков флуоресценции растворенных органических веществ в водах Японского и Охотского морей. Выделены спектральные области, подверженные наибольшему влиянию каждого из рассматриваемых типов флуоресценции.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке любых оптических методов исследований морской среды в спектральном диапазоне, так как можно определять природу фонового регистрируемого сигнала, который в большинстве случаев обусловлен флуоресценцией каких-либо РОВ. Кроме того, можно отделить часть РОВ, поглощающую в видимой области спектра, и остальную часть РОВ, что важно в задачах по разработке биооптических моделей распространения света в морской воде и развитию алгоритмов восстановления содержания РОВ из данных пассивного оптического зондирования. Полученные результаты позволяют также исследовать процессы воспроизводства РОВ

клетками фитопланктона, процессы трансформации РОВ и решать задачи идентификации типов РОВ в морской воде.

Работа выполнена на оборудовании, уникальных стендах и установках Центра коллективного пользования «Лазерные методы исследований конденсированных сред, биологических объектов и мониторинга окружающей среды» в рамках ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, а также при поддержке фонда РФФИ (гранты № 12-05-31148 и 12-05-33702).

1. *Карабашев Г.С.* Флуоресценция в океане. Л.: Гидрометеоиздат, 1987. 200 с.
2. *Coble P.G., Green S.A., Blough N.V., Gagosian R.B.* Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy // *Nature*. (Gr. Brit.) 1990. V. 348, N 6300. P. 432–435.
3. *Babichenko S., Kaitala S., Leeben A., Poryokina L., Seppala J.* Phytoplankton pigments and dissolved organic matter distribution in the Gulf of Riga // *J. Mar. Syst.* 1999. V. 23, N 1–3. P. 69–82.
4. *Coble P.G.* Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy // *Mar. Chem.* 1996. V. 51, N 4. P. 325–346.
5. *Горишкова О.М., Пацаева С.В., Федосеева Е.В., Шубина Д.М., Южаков В.И.* Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды // *Вода: химия и экология*. 2009. № 11. С. 31–39.
6. *Matthews B.J.H., Jones A.C., Theodorou N.K., Tudhope A.W.* Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs // *Mar. Chem.* 1996. V. 55, N 3–4. P. 317–332.
7. *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 // *Org. Geochem.* 2000. V. 31, N 12. P. 1756–1781.
8. *Букин О.А., Голик С.С., Салюк П.А., Бауло Е.Н., Ластовская И.А.* Изменение спектров лазерной индуцированной флуоресценции морской воды в процессе деградации растворенного органического вещества // *Ж. прикл. спектроскопии*. 2007. Т. 74, № 1. С. 103–107.
9. *Букин О.А., Салюк П.А., Майор А.Ю., Павлов А.Н.* Исследование процессов воспроизводства органического вещества клетками фитопланктона методом лазерной индуцированной флуоресценции // *Оптика атмосф. и океана*. 2005, № 18. № 11. С. 871–878.
10. *Tomasi G., Bro R.* PARAFAC and missing values // *Chemometr. and Intelligent Labor. Systems*. 2005. V. 75, N 2. P. 163–180.
11. *Jiang F., Sen-Chun Lee F., Wang X., Dai D.* The application of Excitation/Emission Matrix spectroscopy combined with multivariate analysis for the characterization and source identification of dissolved organic matter in seawater of Bohai Sea, China // *Mar. Chem.* 2008. V. 110, N 1–2. P. 109–119.
12. *Mopper K., Schultz C.A.* Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components // *Mar. Chem.* 1993. V. 41, N 1–3. P. 229–238.
13. *Виноградов М.Е.* Биологическая продуктивность океанических экосистем // *Новые идеи в океанологии / Под ред. М.Е. Виноградова, С.С. Лаппо*. М.: Наука, 2004. Т. 1. С. 237–263.
14. *Романкевич Е.А., Ветров А.А., Пересыпкин В.И.* Органическое вещество мирового океана // *Геол. и геофиз.* 2009. Т. 50, № 4. С. 401–411.

*P.A. Saluk, I.M. Doroshenkov, K.S. Kluger, O.A. Bukin, V.A. Krikun, A.Yu. Maior.* **Fluorescence of dissolved organic matters of Far-East seas under multifrequency excitation.**

The spatial distribution analysis of parameters characterized fluorescence of dissolved organic matters (DOM) of various types in seawater are presented. Samples were taken in the Japan (East) Sea and in the Sea of Okhotsk in the areas of different nutrient status and in the areas influenced by rivers and/or anthropogenic activity. The measurements were carried out by hyperspectral multiwavelength fluorometer Varian Cary Eclipse immediately after sampling. Spectral ranges of measurements were 230–500 nm for excitation radiation and 240–750 nm for emission radiation. The relationships between fluorescence intensities at different excitation and emission wavelengths were analyzed. The signals of phytoplankton-like, protein-like, humic-like, and anthropogenic fluorescence were identified. The correlation analysis was carried out, explanation of possible DOM origins was done, and the spectral ranges impacted by each fluorescence type were determined.