

А.И. Лактионов

Исследование УФ-флуоресценции РОВ в центрифугированных пробах морской воды

Кубанский государственный университет, г. Краснодар

Поступила в редакцию 24.10.2005 г.

Изучалась флуоресценция центрифугированных проб морской воды, отобранных с глубин 20–200 м в водах Черного моря. В результате проведенных исследований обнаружена интенсивная ультрафиолетовая флуоресценция растворенного органического вещества морской воды с двумя максимумами в районе 345 и 358 нм. Возбуждение этой флуоресценции осуществляется полосой с двумя максимумами при 260 и 290 нм. С глубиной интенсивность этой флуоресценции снижается и изменяется форма спектра флуоресценции. В фотической зоне моря характер ультрафиолетовой флуоресценции растворенного органического вещества морской воды в зависимости от сезона меняется.

Известно, что флуоресценция растворенного органического вещества (РОВ) морской воды (МВ) представляет собой широкую бесструктурную полосу полушириной 100–140 нм. Основной спектральный диапазон его флуоресценции приходится на область 360–520 нм («голубая» флуоресценция) с максимумом при коротковолновом возбуждении в районе 420–430 нм. Этот максимум смещается в зависимости от длины волны возбуждающего излучения. Стоксов сдвиг флуоресценции составляет 80–120 нм. Полоса возбуждения этой флуоресценции имеет полуширину 80–90 нм, максимум которой также смещается для разных длин волн регистрации флуоресценции. Смещения такого рода свидетельствуют о сложности состава РОВ, природа которого до сих пор мало изучена.

В работе Е. Траганзы [1] проводилось изучение флуоресцентных характеристик образцов, полученных из сконцентрированной в 40 раз взвеси планктонных организмов, присутствовавших в МВ, путем ее фильтрации. Отличительной особенностью этих спектров было наличие двух максимумов как в спектрах возбуждения (~ 282 и ~ 365 нм), так и в спектрах флуоресценции (~ 350 и ~ 450 нм).

М. Брауном [2] при возбуждении фильтрованных проб излучением ~ 285 нм в некоторых случаях в районе ~ 350 нм наблюдалось появление слабо выраженного неясного плеча флуоресценции. Его отличительной особенностью было то, что это плечо возбуждалось только в пределах узкого спектрального интервала 270–300 нм. Сравнивая свои результаты с данными Траганзы, Браун сделал предположение, что наличие пиков 280 нм в спектре возбуждения и 350 нм в спектре флуоресценции связано с присутствием протеинов, которые могли выделяться в результате деструкции клеток.

Результаты, полученные Траганзой и Брауном, представляют несомненный интерес и дают основание считать, что исследование УФ-флуоресценции

РОВ МВ позволит получить новые данные о составе и происхождении РОВ в морской среде.

Целью настоящей работы являлось продолжение изучения природы РОВ и механизма его появления в МВ с помощью спектрофлуориметрического метода.

Аппаратура и методика проводимых исследований

При постановке методики исследования было принято, что растворимое в морской воде органическое вещество, переходящее затем в РОВ, не является продуктом прижизненных выделений фитопланктона [3] и не является продуктом реакции типа Мэйара, происходящей непосредственно в морской воде, а образуется внутри органической взвеси. Его появление в морской среде происходит при выделении за счет диффузии и вымывания из распадающейся в результате старения и действия бактерий органической взвеси в процессе ее седиментации.

В настоящей работе пробы МВ отбирались в восточной части Черного моря на удалении 8–10 миль от берега с глубин 20–200 м при помощи винилпластового батометра. Перед забором проб МВ с помощью погружного флуориметра «Variosen» определялся диапазон глубин залегания живого фитопланктона.

Моделирование в ускоренном виде процесса деструкции органической взвеси и вымывания из нее растворимого органического вещества, происходящие в естественных условиях при седиментации органической взвеси в морской среде, осуществлялось при центрифугировании проб МВ.

Центрифугирование проб МВ выполнялось на медицинской центрифуге Опн-8 в пластмассовых пробирках емкостью 20 мл при скорости 8000 об/мин в течение 30 мин. После центрифугирования пипеткой отбиралась верхняя часть пробы (часть «а») и сли-

валась нижняя (часть «б»). Условно считалось, что в верхней части пробы содержится в основном легкая фракция органического вещества, а в нижней — более тяжелая и остатки органической взвеси.

Исследовались изменения в спектрах пропускания центрифугированных проб МВ, их спектры возбуждения и флуоресценции.

Дифференциальные спектры пропускания между центрифугированными (частями «а» и «б») и исходными пробами МВ записывались на комплексе КСВУ-23 с шагом сканирования 2,5 нм. При измерениях использовалась специально изготовленная 10-см кварцевая кювета.

Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции в частях «а» и «б» центрифугированных проб МВ записывались на установке СДЛ-2 в режиме счета фотонов с шагом сканирования 1 нм. Спектры возбуждения флуоресценции записывались в спектральном диапазоне 240–320 нм, а флуоресценции — 330–400 нм. Измерения проводились при комнатной температуре.

Экспериментальные результаты и их обсуждение

Как показали дифференциальные спектры пропускания, после центрифугирования в растворе проб МВ возникает широкая полоса поглощения сложной формы, расположенная в спектральной области 230–340 нм. Отличительной особенностью этой полосы было наличие максимумов поглощения при ~ 242, ~ 265 и ~ 284 нм. Сложность формы возникшей полосы поглощения и ее спектральный диапазон свидетельствуют о появлении в растворе МВ хромофорных групп молекул аминокислот, белков и их производных.

На рис. 1 представлен дифференциальный спектр поглощения между исходной и разными частями центрифугированной пробы (ЦП) МВ, отобранной в августе с глубины 20 м.

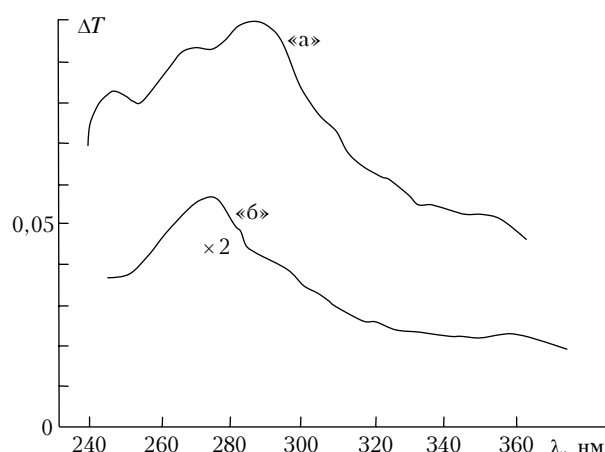


Рис. 1. Дифференциальные спектры пропускания ЦП МВ, отобранной с глубины 20 м

Подобные результаты были получены в работе [4]. Авторами с помощью микроспектрофотометра исследовалось поглощение света отдельным хлоропла-

стом. Как известно, хлоропласты содержатся в клетках фитопланктона и представляют собой органоиды, осуществляющие синтез или накопление органических веществ внутри клетки. Проведенные измерения выявили наличие максимумов поглощения в УФ-части спектра при 265 и 290 нм, которые авторы связывают с присутствием в хлоропласте протеинов.

Исследование флуоресценции центрифугированных проб МВ показало следующее. При $\lambda_{\text{возб}} = 298$ нм в центрифугированных пробах МВ с 20 м была обнаружена интенсивная УФ-флуоресценция с четко выраженной структурой. Полоса этой флуоресценции характеризовалась полушириной ~ 30 нм и двумя максимумами при 345 и 358 нм. Причем интенсивность УФ-флуоресценции превышала интенсивность в максимуме обычно регистрируемой флуоресценции РОВ МВ (при 420–430 нм) в десятки раз.

Для обоих обнаруженных максимумов в спектре флуоресценции спектры возбуждения флуоресценции были одинаковы и представляли собой интенсивную узкую, почти симметричную полосу полушириной ~ 20 нм с основным максимумом в районе ~ 290 нм и небольшим в области ~ 260 нм. Излучения при 260 и 290 нм одинаково возбуждали обнаруженную флуоресценцию. Спектры возбуждения не калибровались, что не позволило судить об истинном соотношении интенсивностей этих пиков. На рис. 2 представлены полученные спектры возбуждения и УФ-флуоресценции в центрифугированных пробах МВ.

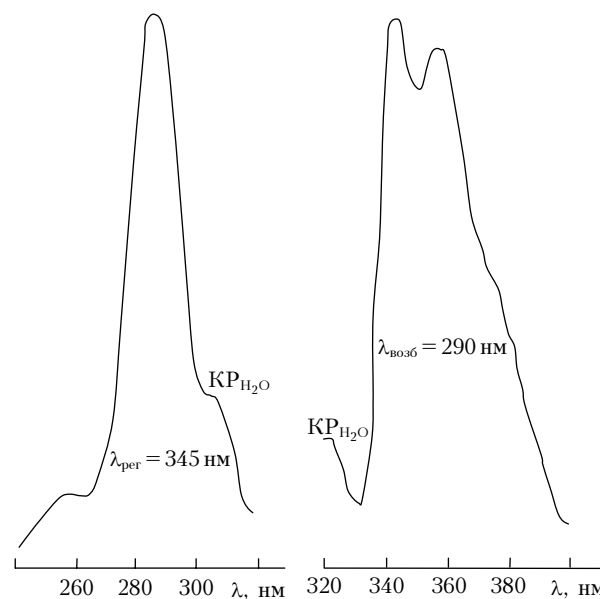


Рис. 2. Спектры возбуждения и УФ-флуоресценции в части «а» центрифугированной пробы МВ, отобранной с глубины 20 м (КР_{H₂O} — комбинационное рассеяние воды)

Спектральный диапазон полосы возбуждения и обнаруженной флуоресценции, так же как и полученные дифференциальные спектры пропускания, свидетельствует о присутствии в исследуемых пробах МВ белков и их производных.

Из изучения молекулярного состава фотосинтезирующего реакционного центра бактерий и водорослей

известно, что белок реакционного центра состоит из полипептидных субъединиц разной массы, самую тяжелую из которых можно отделить от реакционного центра в условиях мягкой денатурации [5]. Очевидно, этот факт имеет место при фильтрации и особенно при центрифугировании проб МВ.

Изучение изменения УФ-флуоресценции в ЦП МВ с глубиной проводилось в пробах МВ, отобранных в августе с глубин 20, 35, 50, 80, 100, 150 и 200 м. Как показали измерения, спектры УФ-флуоресценции с ростом глубины до сероводородной зоны (~100 м), которая определялась по характерному запаху в отобранных пробах, не изменялись. В части «а» пробы МВ со 150 м появились различия. Здесь выделялся только один небольшой по интенсивности максимум в районе ~358 нм на фоне возросшей с глубиной интенсивности флуоресценции длинноволнового крыла «голубой» флуоресценции. В пробах с 200 м флуоресценция частей «а» и «б» была подобна части «а» пробы со 150 м, причем в части «б» еще выделялось плечо при 345 нм. Интенсивность УФ-флуоресценции в спектральном диапазоне 330–370 нм на глубине 200 м уменьшилась по сравнению с интенсивностью на глубине 20 м приблизительно в 2 раза.

Изучение изменения УФ-флуоресценции в МВ в зависимости от сезона проводилось в феврале–июле. В спектрах флуоресценции ЦП МВ за февраль и июнь присутствовали два максимума при 345 и при 358 нм примерно одинаковой интенсивности. Спектры возбуждения флуоресценции также характеризовались двумя интенсивными максимумами при 258 и 290 нм. Наблюдалось плечо в районе 230–250 нм и при 284 нм.

В спектрах флуоресценции ЦП МВ, отобранных в мае, в основном превалировал один максимум в районе 345 нм, а в частях «а» проб МВ с 20 и 50 м — присутствовал только он один. В частях «б» проб МВ с 50 и 80 м, а также в обеих частях пробы со 150 м максимумы при 345 и 358 нм были одинаковой интенсивности. В части «а» пробы с 200 м максимум при 358 нм был интенсивнее максимума при 345 нм.

В спектре возбуждения для $\lambda_{\text{рег}} = 345$ нм при самом интенсивном максимуме 290 нм выделяется плечо в районе 284 нм. Интенсивность максимума при 260 нм в спектрах возбуждения была на уровне неясного плеча, в то же время интенсивность максимума в районе 230–250 нм заметно увеличилась, здесь выделялись неясные пики при 235 и 248 нм.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что в фотической зоне моря характер УФ-флуоресценции МВ в зависимости от сезона меняется. Так, в период цветения фитопланктона на верхних горизонтах моря присутствуют органические вещества, имеющие в спектре флуоресценции преимущественно один максимум (в районе 345 нм). В спектре возбуждения этой флуоресценции в основном присутствует максимум при 290 нм. Значительно снижается интенсивность возбуждающего эту флуоресценцию максимума при 260 нм, зато увеличивается в области 230–245 нм. До и после цветения фитопланктона в спектре флуоресценции присутствуют два максимума при 345 и при 358 нм,

которые возбуждаются излучением с максимумами при 260 и 290 нм.

Очевидно, вещества, обладающие флуоресценцией при 345 нм, — «короткоживущие», так как помимо сезонных изменений с глубиной происходит снижение интенсивности этого максимума в спектре флуоресценции вплоть до его полного исчезновения, в то время как максимум при 358 нм до исследованной глубины (200 м) еще присутствует. Изменения в течение сезона в спектрах УФ-флуоресценции МВ фотической зоны моря скорее всего вызваны биохимическими превращениями в фитопланктоне, происходящими в период его бурного цветения.

С целью дальнейшего изучения обнаруженной флуоресценции часть «а» ЦП МВ, отобранных в период цветения фитопланктона во второй половине мая с глубины 20 и 100 м, концентрировалась упариванием в 2–3 раза. Упаривание производилось при температуре кипения МВ и нормальном атмосферном давлении. Параллельно с упариванием через химический холодильник собирались продукты летучей фракции. В полученных образцах проводилось исследование УФ-флуоресценции.

Как показали исследования, продукты летучей фракции части «а» исследуемых проб МВ обладали подобной интенсивной флуоресценцией, в полосе которой произошел bathochromный сдвиг ~ на 10 нм. Здесь наблюдались два максимума при 355 и 370 нм и «плечо» в районе ~345 нм. Причем для пробы с глубины 20 м максимум при 355 нм намного превышал максимум при 370 нм. Для пробы с глубины 100 м интенсивности обоих максимумов были одинаковы.

Спектры возбуждения этой флуоресценции и их характер, по сравнению с исходными, не изменились. Для $\lambda_{\text{рег}} = 370$ нм спектр возбуждения характеризовался более интенсивным максимумом при ~260 нм и менее интенсивным при ~290 нм с неясным плечом при ~284 нм. В спектре возбуждения для $\lambda_{\text{рег}} = 355$ нм, наоборот, — более интенсивный максимум был при 290 нм и менее интенсивный при 260 нм. Появилось широкое плечо в области 225–245 нм, а неясное в районе 280 нм.

Спектры флуоресценции сконцентрированных проб МВ ввиду их замутнения записать не удалось. Записывались только спектры возбуждения для $\lambda_{\text{рег}} = 345$ и 358 нм. В целом спектры возбуждения флуоресценции и их характер также были одинаковы с исходными, только для максимума при 290 нм произошел bathochromный сдвиг на 10 нм. Для $\lambda_{\text{рег}} = 358$ нм в спектре возбуждения пробы с 20 м присутствовали два интенсивных максимума при 300 и 260 нм с плечом в области 230–250 нм. Для $\lambda_{\text{рег}} = 345$ нм максимум при 260 нм отсутствовал, а вместе с максимумом при 300 нм появились очень интенсивный максимум при 248 нм и плечо при 255 нм. Неясное плечо выделялось в районе 235 нм. В спектрах возбуждения сконцентрированной пробы со 100 м для $\lambda_{\text{рег}} = 358$ нм самый интенсивный максимум был при 296 нм и еще два отчетливых максимума при 260 и 245 нм. Для $\lambda_{\text{рег}} = 345$ нм был один максимум при 296 нм и еще один интенсивный максимум при 246 нм.

Таким образом, как показали проведенные исследования, при центрифугировании в раствор МВ выделяется растворимое органическое вещество, обладающее УФ-флуоресценцией, которая характеризуется максимумами при 345 и 358 нм. Эти максимумы возбуждаются в области 248, 260 и 290 нм. В районе 284 нм присутствует еще один максимум в спектре возбуждения, который из-за близости с максимумом при 290 нм выделяется как плечо. Выделенное при центрифугировании вещество имеет летучую фракцию, также обладающую УФ-флуоресценцией.

Проведенное исследование позволяет сделать вывод, что центры, ответственные за флуоресценцию при 345 и 358 нм, скорее всего разные. Об этом свидетельствуют как сезонные изменения спектров флуоресценции, так и спектры возбуждения сконцентрированных проб МВ. Исследование показало, что максимум в спектре флуоресценции при 345 нм преимущественно возбуждается в области 290 нм, а максимум в спектре флуоресценции при 358 имеет еще один довольно интенсивный пик возбуждения в области 260 нм, который в спектре возбуждения максимума при 345 нм может и отсутствовать.

Сравнение полученных спектров возбуждения флуоресценции с дифференциальными спектрами пропускания показало, что максимумы в спектрах возбуждения практически совпадают с максимумами

в спектрах пропускания (~ 242, ~ 265, ~ 284 нм), т.е. их хромофорные и флуорофорные центры близки. Совпадение максимумов в спектрах возбуждения УФ-флуоресценции (260, 290 нм), с поглощением в хлоропласте (265, 290 нм), приведенном в работе [4], дает основание считать, что выделяемое при центрифугировании органическое вещество содержится в клетках фитопланктона.

Исследованные спектры возбуждения и флуоресценции ЦП МВ подтверждают и дополняют результаты, полученные Е. Траганзой [1] и М. Брауном [2] в других морях. Схожесть полученных спектров позволяет предположить, что природа этой флуоресценции в водах морей и океанов одинакова.

1. *Traganza E.D.* Fluorescence excitation and emission spectra of dissolved organic matter in sea water // *Bull. Mar. Sci.* 1969. V. 19. P. 897–904.
2. *Brown M.* Laboratory measurements of fluorescence spectra of Baltic waters. Univ. Copenhagen, Inst. Phys. Oceanogr. Rep. 1974. V. 29. P. 31.
3. *Лактионов А.И.* О природе растворенного в морской воде органического вещества // *Оптика атмосф. и океана.* 2005. Т. 18. № 11. С. 1–5.
4. *Wolken J.J., Strother G.K.* Microspectrophotometry // *Appl. Opt.* 1963. V. 2. N 9. P. 899–907.
5. *Клейтон Р.* Фотосинтез (физические механизмы и химические модели). М.: Мир, 1984.

A.I. Laktionov. UV fluorescence of the DOM in the centrifuged samples of the sea water.

Fluorescence of the centrifuged samples of the sea water taken from the depth of 20 to 200 m in the Black Sea waters was investigated. As the result of the fulfilled research, the intensive ultraviolet fluorescence of the dissolved organic matter of the sea water with two maximums in 345 and 358 nm regions was discovered. Excitation of the fluorescence is effected with the band with two maximums at 260 and 290 nm. Depending on the depth, the intensiveness of this fluorescence decreases, and form of the fluorescence spectrum changes. In photic zone of the sea the features of the ultraviolet fluorescence of the dissolved organic matter of the sea water change depending on the season.