

А.И. Лактионов

Исследование флуоресценции растворимого органического вещества в центрифугированных пробах морской воды

Кубанский государственный университет, г. Краснодар

Поступила в редакцию 24.10.2005 г.

С целью выяснения механизма появления флуоресцирующего растворенного органического вещества в морской воде проводилось исследование флуоресценции в пробах морской воды после их центрифугирования. В результате центрифугирования выделяется большое количество растворимого флуоресцирующего вещества. Это вещество может находиться в виде нескольких гравитационных фракций, спектры возбуждения и флуоресценции которых различаются. Спектры возбуждения центрифугированных проб морской воды в зависимости от глубины и сезона изменяются. Примененный метод исследования позволил доказать наличие полос возбуждения и флуоресценции в коротковолновой области спектров исходных проб морской воды. Удалось установить, что в фотической зоне моря формируются некоторые слои органической взвеси, появление которых в морской среде связано с сезонной биопродуктивностью.

Введение

Появление флуоресцирующего растворенного органического вещества (ФРОВ) в морской среде обычно связывают с «желтым веществом», входящим в состав растворенного органического вещества (РОВ) и образующимся в морской воде (МВ) при взаимодействии углеводов с аминокислотами в результате реакции типа Мэйяра. Протекание таких реакций непосредственно в самой МВ довольно спорно, так как синтез любого вещества может успешно происходить только при обеспечении всех необходимых для протекания химических реакций нормальных условий, выполнение которых во всем диапазоне глубин морской среды практически невозможно. Наиболее благоприятные условия для выполнения химических реакций – фотическая зона. Плотность ФРОВ близка к плотности МВ, и собственная седиментация ФРОВ, обусловленная гравитационными силами, практически отсутствует. А это значит, что его молекулы могут перемещаться только вместе с морской водой. Из этого следует, что при таком механизме появления ФРОВ в морской среде в фотической зоне моря мы бы наблюдали его максимальную концентрацию. Однако, как показывают многочисленные исследования, фотическая зона характеризуется пониженными уровнями интенсивности флуоресценции (ИФ) РОВ, в то время как с глубиной она растет. Отсюда следует, что такой механизм появления ФРОВ в морской среде не может объяснить формирование экспериментально наблюдаемых вертикальных профилей ИФ РОВ.

Известно также, что в клетках органической взвеси концентрация растворимых органических веществ во много раз выше их содержания в окружающей среде и согласно [1] может превышать ее в 100–10000 раз. Взвешенный в МВ детрит состоит на 30% из углеводов, и более 50% его составляют белковые

вещества, в состав которых входят жизненно важные аминокислоты, т.е. детрит является потенциально огромным резервуаром растворимого органического вещества и биогенных элементов. Таким образом, во взвешенном органическом веществе, в специфическом микроокружении находятся все необходимые для протекания реакции Мэйяра реагенты, концентрация которых здесь во много раз выше, чем в МВ. Выделение этого растворимого органического вещества в морскую среду происходит через стенки органической взвеси, «разваливающейся» в результате старения и действия бактерий в процессе седиментации.

С помощью спектрофлуориметрического метода нами проведены исследования возможности появления ФРОВ в морской среде в результате механической деструкции органической взвеси.

Аппаратура и методика проводимых исследований

В Черном море на протяжении ряда лет осуществлялся отбор проб МВ до глубин 200 м. Отбору проб предшествовали измерения с помощью гидрологического зонда АЦИТТ вертикального распределения плотности МВ и с помощью погружного флуориметра «Variosens» – профилей интенсивности флуоресценции хлорофилла фитопланктона, которой, как известно, обладают только его живые клетки. В первом случае определялись скачок плотности МВ и возможные плотностные аномалии, во втором – область максимальной биопродуктивности моря. Наличие флуоресцирующих продуктов в составе растворимого вещества органической взвеси определялось после впервые использованного в такой практике центрифугирования проб МВ. Центрифугирование моделирует в ускоренном виде процессы деструкции органической взвеси и вымывания из нее растворимого органического вещества, происходящие

в естественных условиях при седиментации органической взвеси в морской среде. В процессе центрифугирования помимо деструкции нестойкой органической взвеси с вымыванием содержимого в раствор МВ происходит разделение по гравитационным фракциям содержимого пробы.

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 проба МВ разделялась. Пипеткой отбиралась верхняя часть центрифугированной пробы (часть «а») и сливалась ее нижняя часть («б»). Условно считалось, что в верхней части центрифугированной пробы («а») содержится, в основном, легкая фракция органического вещества, а в нижней («б») — более тяжелая и остатки органической взвеси. Исследование флуоресценции в исходных и в частях «а» и «б» центрифугированных проб МВ проводилось на установке для изучения люминесценции СДЛ-2.

Экспериментальные результаты и их обсуждение

Как показали многолетние измерения, центрифугирование проб МВ приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции РОВ. Исключение составили пробы МВ, отобранные в декабре. Это можно объяснить тем обстоятельством, что в связи с малой биопродуктивностью или ее отсутствием в этот период органическая взвесь в морской среде практически отсутствовала. А та органическая взвесь, которая была образована в весенне-летне-осенний период, или уже вся «развалилась», или опустилась гораздо глубже.

Интенсивность флуоресценции РОВ после центрифугирования проб МВ, отобранных с некоторых горизонтов моря, намного превышала ИФ в исходных пробах. В таблице, в частности, представлены нормированные на интенсивность спонтанного комбинационного рассеяния (СКР) воды интенсивности в максимуме полос флуоресценции исходных (I) и центрифугированных (I_a, I_b) проб МВ и отношения интенсивностей флуоресценции в частях «а» и «б» центрифугированных проб (ЦП) МВ к интенсивности в исходной пробе ($k_a = I_a/I$ и $k_b = I_b/I$).

H, м	Июнь					Август				
	I	I_a	I_b	k_a	k_b	I	I_a	I_b	k_a	k_b
20	0,13	0,17	0,34	1,30	2,60	0,37	0,58	0,58	1,60	1,60
35	0,16	0,27	0,42	1,70	2,60	0,29	0,59	0,28	2,00	1,00
50	0,15	0,71	0,63	4,70	4,20	0,24	0,35	0,47	1,50	2,00
80	0,14	0,19	0,27	1,40	1,90	0,32	0,60	0,92	1,90	2,90
100	0,17	0,28	1,03	1,70	6,10	0,40	1,12	0,46	2,80	1,20
150	0,25	0,45	0,49	1,80	2,00	0,53	0,70	0,88	1,30	1,70
200	0,27	0,32	0,48	1,20	1,80	0,71	0,78	1,34	1,10	1,90

Измерения флуоресценции РОВ МВ проводились при возбуждении азотным лазером ($\lambda_{\text{возб}} = 337,1$ нм) (пробы за июнь) и при выделении возбуждающего излучения через монохроматор МДР-12 с $\lambda_{\text{возб}} = 330$ нм (пробы за август). Как видно из таблицы, выделяющееся в результате центрифугирования флуо-

ресцирующее вещество может различаться по гравитационной крупности.

Согласно профилям интенсивности флуоресценции хлорофилла фитопланктона и результатам гидрологических измерений проявление аномального увеличения ИФ РОВ после центрифугирования наблюдалось в пробах МВ, взятых под зоной обитания живых клеток фитопланктона в области отсутствия пикноклина и других плотностных аномалий.

Увеличение ИФ РОВ после центрифугирования в пробах МВ нельзя объяснить перераспределением по гравитационной крупности и фракционным концентрированием флуоресцирующего вещества, присутствующего непосредственно в пробах МВ и адсорбированного на поверхности органической взвеси. Такие изменения могли быть вызваны только лишь увеличением концентрации ФРОВ в пробе МВ в результате выделения растворимого флуоресцирующего вещества из органической взвеси, претерпевшей в процессе центрифугирования механическую деструкцию. Аномальное увеличение ИФ РОВ после центрифугирования говорит о существовании в морской среде некоторых субстанций, в результате жизнедеятельности которых формируются определенные слои. Эти слои состоят из органической взвеси, которая поддается механической деструкции и содержит повышенные концентрации растворимого флуоресцирующего органического вещества. Скорее всего, в состав этой взвеси входят клетки фитопланктона, а формирование обнаруженных слоев в морской среде происходит в результате их одновременного массового отмирания после периода бурного цветения [2].

Исследование спектров флуоресценции центрифугированных проб МВ показало, что в растворе МВ появляется новое флуоресцирующее вещество, максимум в полосе флуоресценции которого смещается до $\Delta\lambda = 30$ нм в коротковолновую область относительно максимума в полосе флуоресценции исходных проб, и эти вариации смещения связаны с глубиной забора проб. На рис. 1, в частности, представлены спектры флуоресценции некоторых проб МВ до и после центрифугирования.

Полученные в результате исследования спектры возбуждения и флуоресценции ЦП МВ подтвердили наличие разных гравитационных фракций флуоресцирующего органического вещества, отличающихся своими спектральными характеристиками. На рис. 2 представлены нормированные на максимум спектры возбуждения частей «а» и «б» некоторых ЦП МВ, отобранных в марте.

На верхних горизонтах моря существуют спектральные различия в разных фракциях ЦП МВ, а, приближаясь к 200 м, состав ФРОВ, судя по спектрам возбуждения, становится более однородным. Максимум в полосе возбуждения с глубиной смещается в длинноволновую область. При сравнении спектров исходных и ЦП МВ отмечены одинаковая тенденция смещения максимумов в полосах возбуждения и флуоресценции в красную область и сближение этих спектров с глубиной, что, скорее всего, говорит о конечной стадии в трансформации

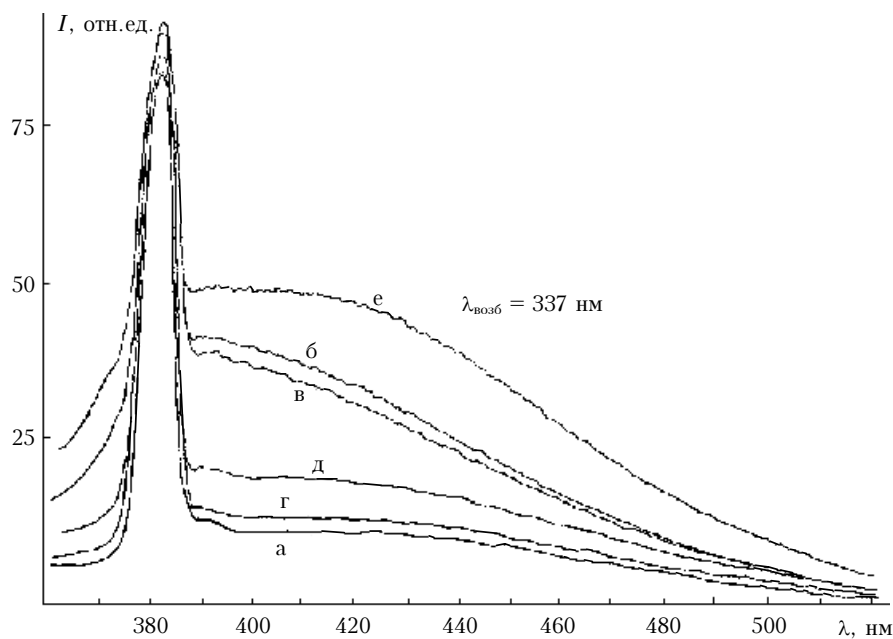


Рис. 1. Спектры флуоресценции исходных и ЦП МВ за шель: а – исходная проба МВ с 50 м; б, в – части «а» и «б» центрифугированной пробы МВ с 50 м соответственно; г – исходная проба МВ со 100 м; д, е – части «а» и «б» центрифугированной пробы МВ со 100 м соответственно

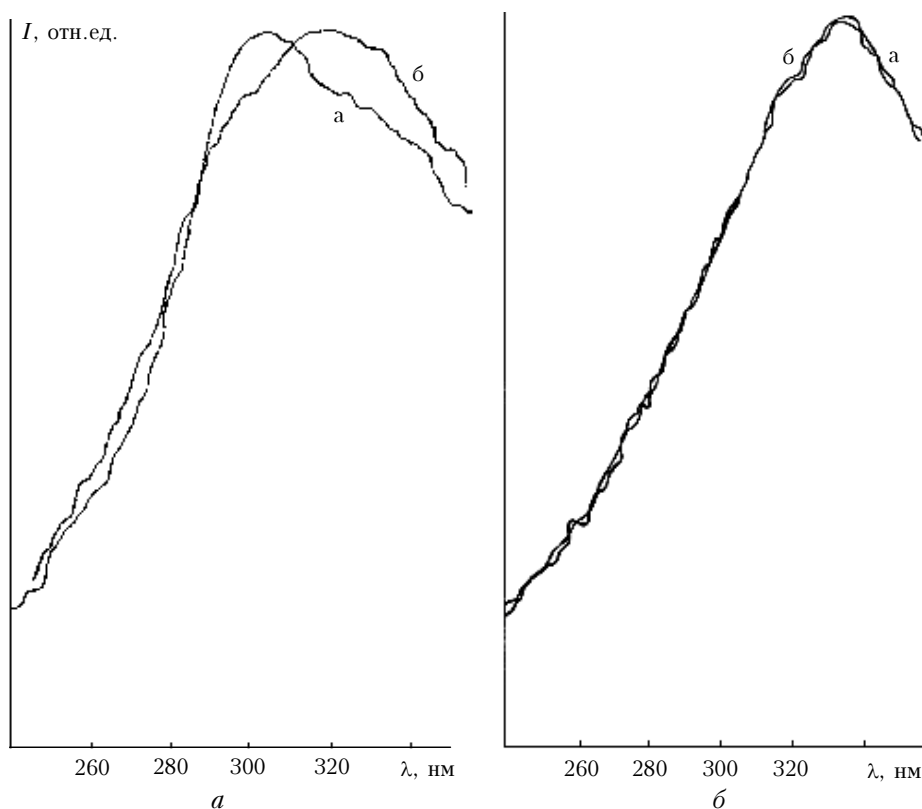


Рис. 2. Нормированные на максимум спектры возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 420 \text{ нм}$) частей «а» и «б» ЦП МВ с 20 (а) и 200 м (б)

органического вещества морской среды и его переходе в лабильное состояние. Полученный результат согласуется с данными работы [3], в которой говорится о том, что процесс формирования и разложения органической материи, в основном, происходит именно в этом диапазоне глубин.

Как показали исследования, в спектрах возбуждения ЦП МВ присутствуют два максимума: в области 285–290 и 325–330 нм, интенсивности которых в зависимости от глубины и сезона могут перераспределяться. На рис. 3 представлены спектры возбуждения ЦП МВ в зависимости от глубины и сезона.

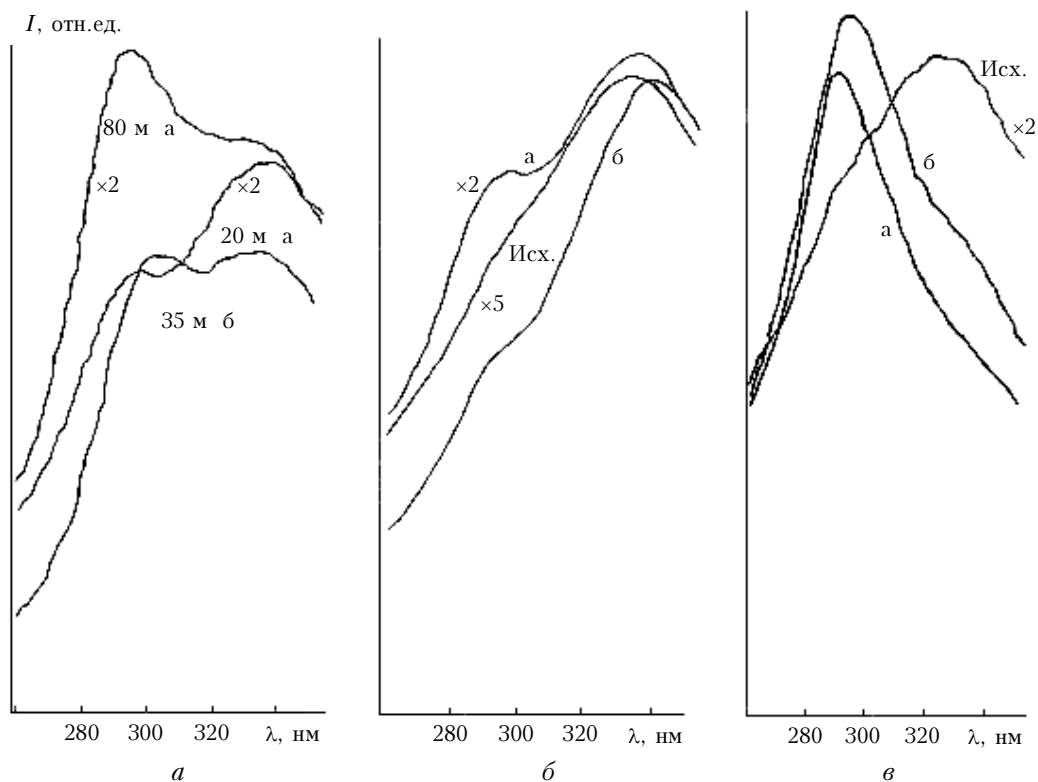


Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 420 \text{ нм}$) центрифугированных проб МВ с 20, 35 и 80 м, отобранных в июне (а); исходных и частей «а» и «б» ЦП МВ с 20 м, отобранных в июне (б) и августе (в)

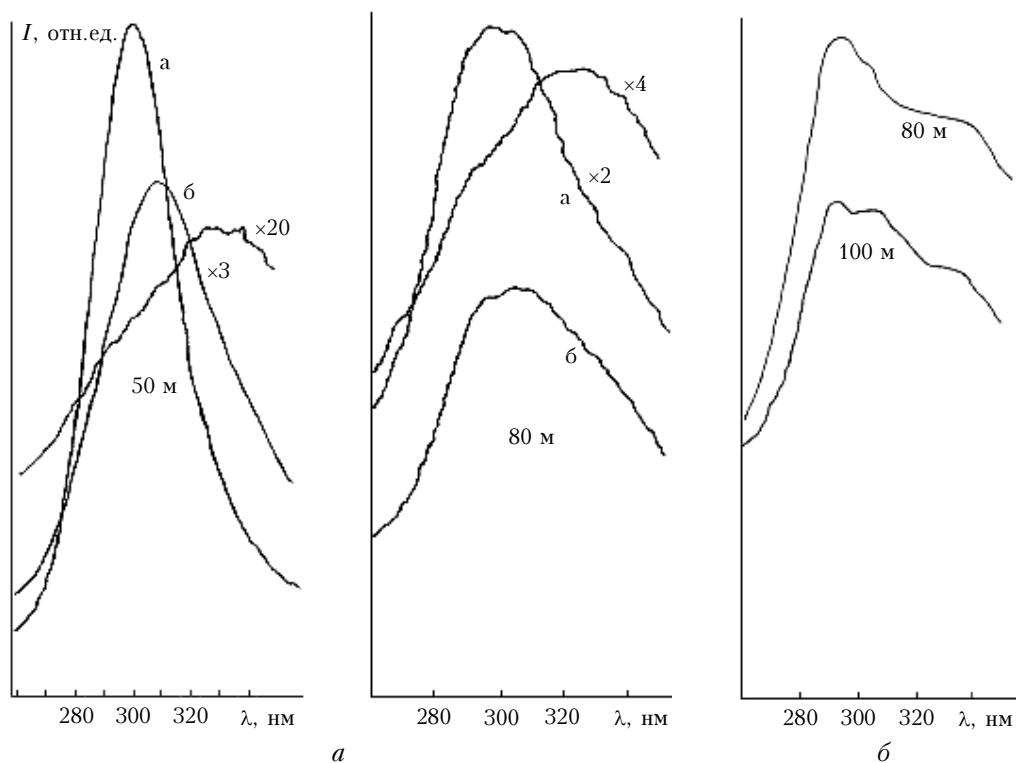


Рис. 4. Спектры возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 420 \text{ нм}$) исходных и частей «а» и «б» ЦП МВ с 50 м за июнь и с 80 м за август (а); части «а» ЦП МВ с 80 м за июнь и части «б» ЦП МВ со 100 м за август (б)

Спектрофлуориметрическое исследование центрифугированных проб МВ позволило доказать на-

личие полос возбуждения и флуоресценции в коротковолновой области спектров исходных проб МВ,

существование которых, ввиду их слабой интенсивности, было спорным (см. рис. 1, *a* и 4, *a* — спектры исходных проб).

При совместном анализе спектров возбуждения флуоресценции ЦП МВ за июнь и август было отмечено, что спектры возбуждения в частях «а» и «б» центрифугированных проб МВ с 50 м за июнь и проб МВ с 80 м за август (см. рис. 4, *a*) были одинаковы и совершенно отличались от спектров возбуждения флуоресценции в ЦП МВ, отобранных с других горизонтов (см. рис. 2 и 3, *a*). В период исследований, по данным флуориметра «Variosens», в этом диапазоне глубин живые клетки фитопланктона отсутствовали. Отсутствовал здесь и слой скачка плотности МВ, а также и другие плотностные аномалии.

Учитывая особенности спектрофлуориметрического метода анализа вещества, можно утверждать, что в обоих случаях мы брали пробы из области одной и той же оседающей субстанции. Скорее всего, в июне и августе пробы МВ были отобраны из области одного и того же оседающего слоя, состоящего из «мертвой» органической взвеси примерно одинаковых размеров и образовавшегося в морской среде повсеместно после массового отмирания фитопланктона.

Отсутствие плотностных аномалий МВ в этом диапазоне глубин позволило оценить скорость седиментации этого слоя. Она составила в среднем $\sim 0,5$ м/сут, что соответствует скорости непосредственного гравитационного осаждения биогенных частиц размером 10 мкм. Такая скорость осаждения характерна для полуживого и некоторых видов мертвого фитопланктона.

Известно, что время жизни фитопланктона составляет ~ 3 сут [2] и после бурной и массовой вспышки его цветения наступает более быстрая и такая же массовая гибель клеток, оседающих затем на дно. Используя полученную скорость оседания органической взвеси, легко посчитать, что для месячного периода цветения фитопланктона толщина слоя из его отмерших клеток, имеющих такие размеры, будет составлять не более 15 м. Исходя из дискретности отбираемых в эксперименте проб МВ по глубине и выявленным (в результате центрифугирования) нахождением этих слоев, можно предположить, что в обоих случаях регистрировался оседающий слой органической взвеси, состоящей из отмерших клеток фитопланктона примерно одинакового размера.

Аналогично, спектр возбуждения флуоресценции части «а» пробы ЦП МВ с 80 м за июнь был идентичен спектру возбуждения части «б» ЦП МВ со 100 м, отобранной в августе. В обоих спектрах выделялись три максимума: в районе 295, 305 и 330 нм (рис. 4, *b*). Данный факт может свидетельствовать о том, что в августе на глубине 100 м присутствовал слой органической взвеси, регистрировавшейся в июне на глубине 80 м. Скорость оседания этого слоя была меньше, очевидно, в связи с большей плотностью МВ в этом диапазоне глубин и, возможно, меньшими размерами оседающей взвеси.

В результате спектрофлуориметрического исследования ЦП МВ было установлено, что в разное

время года, с годовым и более периодом в морской среде присутствует органическая взвесь, содержащая флуоресцирующее вещество, спектры возбуждения и флуоресценции которого одинаковы. В частности, на рис. 5 представлены спектры возбуждения и флуоресценции частей «б» проб МВ с 35 и 50 м за февраль 1990 г., которые соответствовали таким же спектрам части «б» пробы МВ с 50 м, отобранной в июне 1987 г.

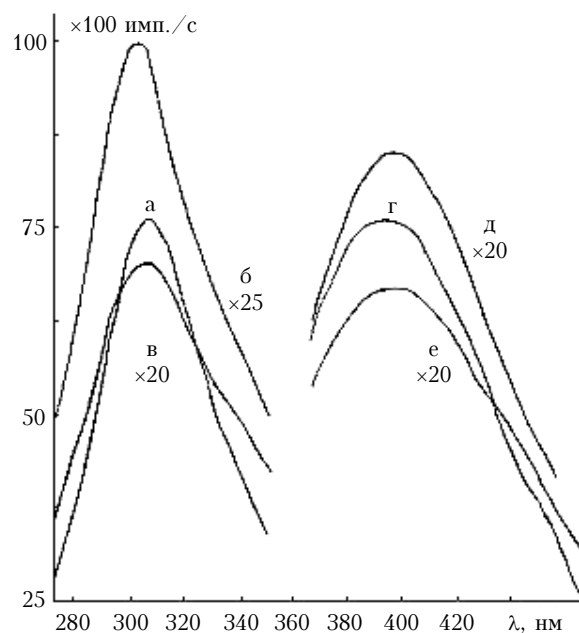


Рис. 5. Спектры возбуждения ($\lambda_{\text{пер}} = 420$ нм) и флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 300$ нм) ЦП МВ: а, г — часть «б» ЦП МВ с 50 м (июнь 1987 г.); б, д — часть «б» ЦП МВ с 35 м (февраль 1990 г.); в, е — часть «б» пробы МВ с 50 м (февраль 1990 г.)

Такое совпадение дает возможность обоснованно предположить, что если в пробах МВ, отобранных в разные сезоны и разные годы, после центрифугирования выделяются одни и те же флуорофорные группы, то источник их образования одинаков и его присутствие в морской среде связано с сезонным периодом.

На основании результатов проведенного исследования можно сделать следующий вывод. В фотической зоне моря формируются некоторые слои органической взвеси, видовое разнообразие и появление которой в морской среде связаны с сезонной биопродуктивностью.

Эта взвесь поддается механической деструкции, выделяя в раствор МВ растворимое флуоресцирующее вещество, различающееся по гравитационной крупности и составу в количествах, значительно превышающих содержание ФРОВ в морской среде. В составе этого растворимого флуоресцирующего вещества выделяются как минимум 6 групп флуорофоров, характеризующихся максимумами в полосе возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{пер}} = 420$ нм) при 295, 300, 305, 310, 330 и 335 нм. Отмеченная многокомпонентность растворимого флуоресцирующего вещества скорее всего вызвана присутствием промежуточных стадий трансформации ОВ, содержащегося

во взвеси, или это связано с сезонной разновидностью первичной продукции, образующейся в разное время года в морской среде.

В процессе седиментации, в результате биохимических преобразований, происходящих за время осаждения органической взвеси, содержащееся в ней растворимое флуоресцирующее вещество изменяется, его состав стабилизируется и становится подобным составу ФРОВ, присутствующему на больших глубинах моря.

Наличие разных фракций растворимого флуоресцирующего вещества, содержащегося в органической взвеси, возможно, связано с укрупнением его частиц в результате объединения, увеличения массы с течением времени или является результатом внешнего изменения температурно-плотностных характеристик МВ, влияющих на процесс седиментации органической взвеси.

За время проводимых исследований удалось проследить седиментацию в морской среде некоторых слоев, состоящих из нестойкой органической взвеси, и определить их примерную толщину. Невыделение обнаруженных слоев используемой погружной аппаратурой *in situ* не позволило судить об их мощности и точности отбора проб, а взятая за основу стандартная схема отбора проб по глубине, возможно, не позволила определить и другие аналогичные слои. В то же время, исходя из дискретности отбора проб, можно предположить, что толщина этих слоев небольшая – примерно 10–15 м. Скорее всего, эти слои формируются из отмерших клеток фитопланктона, появление которых в МВ обусловлено их массовым отмиранием после периода бурного цветения, что совпадает с проведенными расчетами.

В дальнейшем, в результате старения и под действием бактерий стенки органической взвеси ослабляются и разрушаются. Содержимое ОВ за счет

диффузии вымывается наружу, обогащая окружающую морскую среду растворимым флуоресцирующим органическим веществом. Это вымывание происходит в процессе седиментации органической взвеси в поле положительного градиента плотности морской воды, что согласно формуле Стокса приводит к уменьшению ее скорости осаждения. Уменьшение скорости осаждения органической взвеси в процессе седиментации увеличивает время ее пребывания в зоне осаждения, а это приводит к тому, что по мере погружения большее количество взвеси начинает разлагаться вплоть до ее полного распада с выделением растворимого органического вещества в морскую среду.

Увеличение давления с глубиной и понижение температуры МВ приводят к росту времени жизни РОВ, что способствует его накоплению на нижних горизонтах. Интенсивно погружающиеся крупные частицы взвеси в наибольшей степени способствуют вертикальному переносу ОВ, а мелкие определяют его концентрацию в МВ. Такой механизм появления ФРОВ и его распределения в морской среде является более реальным и предпочтительным, чем выполнение в МВ химической реакции типа Мэйара, тем более что он позволяет переносить растворимые флуоресцирующие вещества, обладающие малой плотностью, на большие глубины, где выполнение таких реакций довольно проблематично. Дальнейшее вертикальное распределение ФРОВ определяется уже внутренней динамикой вод моря или океана.

1. Хумтаке С. Органические вещества в водных экосистемах. Л.: Гидрометеониздат, 1986. 199 с.
2. Рябченко В.А. Параметризация источников и стоков биогенов в океане // Метеорол. и гидрол. 1990. № 2. С. 78–87.
3. Скопинцев Б.А. Органическое вещество в природных водах. Л.: Гидрометеониздат, 1950. 290 с.

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

Aiming to discover mechanism of the emergence of fluorescent DOM in the sea water, the research of fluorescence in the sea water samples after their centrifuging was conducted. Centrifuging results in emission of large amount of the dissoluble fluorescent matter which may take form of several gravitational fractions, the latter having different spectra of excitation and fluorescence. Excitation spectra of the centrifuged samples of the sea water change depending on depth and season. The applied method of research allowed proving existence of the bands of excitation and fluorescence in the short-wave range of spectra of initial samples of the sea water. It was accomplished that in photic zone of the sea some layers of organic suspension are formed, and their appearance in the sea medium is bond to the seasonal bioproductivity.