

Спектры и кинетика флуоресценции растворенного органического вещества в беломорской стратифицированной лагуне в зимний и летне-осенний сезоны

© Ю.Г. Соколовская¹, А.Д. Цветкова¹, Е.Д. Краснова², Д.А. Воронов³, С.А. Буриков¹, Т.А. Доленко¹, С.В. Пацаева¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

e-mail: sokolovskaja.julija@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 05.12.2024 г.

В окончательной редакции 25.12.2024 г.

Принята к публикации 07.04.2025 г.

Исследованы оптические свойства растворенного органического вещества (РОВ) природной воды стратифицированного озера Кисло-Сладкое в конце зимнего и в летне-осенний сезоны 2024 г. Проведено измерение спектров поглощения, спектров испускания флуоресценции, синхронных спектров и кинетики флуоресценции. В спектрах флуоресценции показано наличие „белковоподобной“ и гуминовой полос флуоресценции. Наибольшая интенсивность белковоподобной флуоресценции наблюдалась для проб с высокой микробной активностью: подледной и придонной воды в зимний сезон и летом — для слоя 2.4–2.5 м с массовым развитием криптофитовых водорослей. Рассчитана зависимость квантового выхода флуоресценции (КВФ) от длины волны возбуждения. Показано, что характер зависимости, а также абсолютное значение КВФ согласуются с данными, полученными ранее для других беломорских меромиктических водоемов. Построены зависимости КВФ от горизонта отбора пробы, показано различие данных зависимостей в зимний и летний сезоны. Приведены синхронные спектры флуоресценции, показано, что при разности длин волн возбуждения и регистрации 14 nm наблюдается полоса свечения флуорофоров с малым стоксовым сдвигом („белковоподобная полоса“ — свечение ароматических аминокислот, фенольных соединений и гидрохинонов). Синхронные спектры флуоресценции с большей разностью длин волн в 90 nm показывают возбуждение гуминовой полосы флуоресценции. По кинетике затухания флуоресценции рассчитаны времена жизни и соотношения амплитуд короткой и долгоживущей компонент флуоресценции РОВ. Времена жизни флуоресценции оказались очень схожими для разных горизонтов отбора проб в летний сезон, несмотря на различие гидрохимических характеристик, что позволяет сделать вывод об одинаковой природе гуминовой полосы флуоресценции РОВ в разных слоях воды данного водоема.

Ключевые слова: растворенное органическое вещество (РОВ), гуминовая флуоресценция, белковоподобная флуоресценция, природная вода, прибрежные меромиктические водоемы, спектроскопия поглощения, квантовый выход флуоресценции, синхронные спектры флуоресценции, время жизни флуоресценции.

DOI: 10.61011/OS.2025.05.60781.25-25

Введение

Растворенное органическое вещество (РОВ) является обязательным компонентом природной воды, который играет значительную роль в природных биохимических процессах и оказывает влияние на функционирование экосистем водоемов [1–3]. Большая часть РОВ относится к природным гуминовым веществам, которые демонстрируют большое разнообразие биологических эффектов [4]. Концентрация РОВ в водных экосистемах зависит от многих факторов, включая гидрологический режим, тип почвы в водосборном бассейне, климатические условия, наличие растительности, присутствие и активность микроорганизмов. Прибрежные морские

воды по сравнению с водой открытого океана отличаются заметно большей концентрацией окрашенной фракции РОВ (chromophoric dissolved organic matter, CDOM). Растворенное органическое вещество природного происхождения эффективно поглощает УФ и видимый свет, а также флуоресцирует. Поэтому в настоящее время для его качественного и количественного исследования широко применяются методы, основанные на спектроскопии поглощения света и флуоресцентной спектроскопии. Например, в экологическом мониторинге и дистанционном зондировании интенсивность сигнала флуоресценции используется для оценки концентрации РОВ в природной воде [5]. Особый интерес для исследования представляют воды субарктических регионов,

так как объем данных о РОВ в этих акваториях на сегодняшний день остается достаточно ограниченным. Так, в работах [5–9] проводилось исследование РОВ воды заливов моря Лаптевых, Карского и Белого морей, а в [10] — пресноводных озер Карелии.

Благодаря изрезанной береговой линии и продолжающемуся послеледниковому поднятию на побережье Белого моря образовалось множество полузамкнутых и замкнутых водоемов, находящихся в разной степени изоляции от моря и имеющих различную по глубине соленость [11]. Такие водоемы с устойчивой вертикальной стратификацией, которая возникает из-за различия плотности водных слоев, называются меромиктическими [11,12]. Концентрация РОВ в этих водоемах зависит от глубины и отрицательно коррелирует с соленостью воды, влияет на оптические свойства толщи воды и, как следствие, накладывает ограничения на спектральный состав проходящего солнечного света и определяет таксономический состав фотосинтезирующих организмов, населяющих водоем на различных глубинах [13]. Начиная с определенной глубины и до дна в меромиктических водоемах существует бескислородная зона, на верхней границе которой при достаточном количестве проникающего солнечного света наблюдается высокая численность анаэробных фототрофных бактерий [14].

Целью настоящей работы является исследование оптических свойств РОВ природной воды меромиктического водоема беломорского побережья — озера Кисло-Сладкое в зимний и летне-осенний сезоны. Для проб воды с различных горизонтов водной толщи проводилась регистрация спектров поглощения, спектров испускания и синхронных спектров флуоресценции, а также измерения кинетики флуоресценции. Кроме того, рассчитывался квантовый выход флуоресценции РОВ и его зависимость от длины волны возбуждения и от глубины слоя воды при фиксированной длине волны возбуждения флуоресценции.

Объекты исследования и характеристики воды

Озеро Кисло-Сладкое — это небольшая соленая лагуна глубиной 4.5 м, находящаяся в Ругозерской губе Кандалакшского залива Белого моря. Оно расположено примерно в 2 км к востоку от Беломорской биологической станции МГУ имени М.В. Ломоносова. Озеро отделено от моря каменистым порогом, высота порога такова, что вода из моря может затекать в озеро только при сизигийных приливах [15]. Несмотря на наличие периодических забросов морской воды, в летне-осенний период в озере существует устойчивая вертикальная стратификация водной толщи, обусловленная различием плотности между поверхностным частично опресненным слоем воды толщиной менее 1 м и нижележащей водной толщей с практически морской соленостью. Летом в озере существует сероводородная зона с отрица-

тельным окислительно-восстановительным потенциалом (E_h), в разные годы она может начинаться с глубины 2.4–3.5 м. Зимой водоем покрыт льдом, изолирующим его от атмосферного кислорода и защищающим от заплесков морской воды, в это время сероводород может распространяться вдоль всей толщи озера. Отбор проб в озере проводили в конце марта (31.03), конце июня (26.06) и начале сентября (04.09) 2024 г. С гидрологической точки зрения конец марта относится к зимнему сезону, а конец июня и начало сентября — к летнему. В табл. 1 приведены характеристики воды со всех исследованных горизонтов.

В марте толщина льда на озере составляла 67 см. В отличие от летнего сезона, когда редокс-переход ($E_h < 0$) находился ниже 2 м, зимой отрицательная величина окислительно-восстановительного потенциала наблюдалась, начиная с поверхностного слоя подледной воды (табл. 1). То есть сероводородная зона простиралась по всей толще водоема. Для спектрального анализа было отобрано несколько образцов воды, а также три образца льда из разных горизонтов ледового покрова. Образцы льда получены путем распиливания вертикального ледового керна на три приблизительно равные части („верхний“, „средний“ и „нижний“ лед, далее на рисунках обозначены как ice 1, ice 2, ice 3 соответственно). Растопленный при комнатной температуре лед помещали в пластиковые пробирки.

В июне и сентябре на поверхности озера присутствовал частично опресненный слой воды, причем в июне его соленость была заметно ниже (6.4 ‰ против 16.9 ‰). Начиная с глубин 1–1.5 м, соленость стремилась к значению, соответствующему беломорской воде (22–23 ‰). Редокс-переход в июне наблюдался на глубине 2.4 м, в сентябре — на 2.5 м, с этих горизонтов начиналась бескислородная область. В летне-осенний период над границей распространения сероводорода в отдельные годы появляется прослойка воды красного цвета, обусловленная цветением криптофитовых водорослей *Rhodomonas sp.* [16,17]. В год исследований мы наблюдали цветение *Rhodomonas* с июня по октябрь, в июне на глубине 2.2–2.5 м и в сентябре на 2.4–2.6 м. Отбор проб в области, близкой к хемоклину, проводился с шагом 0.1 м (табл. 1).

Спектральные измерения

Для изучения РОВ перед спектральными измерениями все пробы воды были профильтрованы через нейлоновые фильтры с диаметром пор 0.22 μm для отделения взвешенных частиц и коллоидного ОВ. Спектры поглощения РОВ природной воды регистрировали при комнатной температуре относительно дистиллированной воды на спектрофотометре Solar PB 2201 в диапазоне длин волн 200 до 800 нм с шагом сканирования 1 нм с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 3 см. Кюветы с большей длиной оптического пути обеспечи-

Таблица 1. Горизонты отбора проб и гидрохимические характеристики образцов воды из оз. Кисло-Сладкое в зимнем (март) и летнем (июнь, сентябрь) сезонах: соленость (S), pH, окислительно-восстановительный потенциал (Eh). Жирным шрифтом и серой заливкой выделены данные для глубины, где происходит редокс-переход

Глубина, m	март (31.03.24)			июнь (26.06.24)			сентябрь (04.09.24)		
	S, ‰	Eh	pH	S, ‰	Eh	pH	S, ‰	Eh	pH
0	20.6	−185	6.35	6.4	92	8.09	16.9	45	8.13
0.5	23.8	−252	6.43	16.3	106	7.63	16.9	53	8.18
1	23.5	−275	6.47	21.8	106	7.34	20.8	57	8.66
1.5	23.5	−284	6.51	22.8	90	7.18	21.4	57	8.64
2	23.6	−285	6.5	22.9	43	7.05	22.2	68	8.28
2.1	-	-	-	22.9	37	7.08	22.3	76	8.06
2.2	-	-	-	23	35	7.13	22.3	83	7.81
2.3	-	-	-	23	0	7.2	22.4	85	7.92
2.4	-	-	-	22.9	−122	7.18	22.5	70	7.6
2.5	23.6	−287	6.49	23	−220	7.07	22.5	−10	7.11
2.6	-	-	-	22.9	−270	6.93	22.5	−180	6.89
2.7	-	-	-	-	-	-	22.5	−240	6.6
3	23.6	−290	6.5	23	−310	6.7	22.6	−260	6.51
3.5	23.7	−300	6.48	22.9	−320	6.59	22.7	−270	6.53
3.7	-	-	-	-	-	-	22.7	−270	6.56
4	23.8	−312	6.47	23	−326	6.48	-	-	-

вают более точные измерения в пробах воды с низким содержанием РОВ. В дальнейшем оптические плотности приводили к длине оптического пути 1 см. Спектры испускания флуоресценции РОВ измеряли на спектрофлуориметре Solar CM 2203 при длинах волн возбуждения флуоресценции λ_{ex} от 250 до 500 nm с шагом 10 nm. Регистрацию спектров флуоресценции проводили в диапазоне от 260–515 nm до 700 nm (в зависимости от длины волны возбуждения: от 260 до 700 nm при $\lambda_{ex} = 250$ nm и от 515 до 700 nm при $\lambda_{ex} = 500$ nm) с шагом 1 nm. Для измерения флуоресценции использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Диапазоны длин волн возбуждения и регистрации для спектров испускания флуоресценции выбраны, исходя из известной информации о типичных полосах флуоресценции для гуминовой и белковой составляющей РОВ [18,19]. Размеры входной и выходной щели монохроматора составляли 5 nm. Измеренные спектры флуоресценции были скорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра как $I = I_0 \cdot 10^{(D_{ex}+D_{em})/2}$ (где D_{ex} и D_{em} — оптические плотности на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции, соответственно). Синхронные спектры флуоресценции измеряли в диапазоне возбуждения 230–500 nm с разностью длин волн $\Delta\lambda$ между длиной волны возбуждения и регистрации 14 и 90 nm.

Информативной величиной для исследования флуоресценции является квантовый выход флуоресценции (КВФ). Квантовый выход флуоресценции для молекул окрашенного РОВ показывает вероятность того, что флуорофор будет излучать свет, возвращаясь в основное состояние после возбуждения светом, и будет определяться как отношение количества испущенных фотонов

к количеству поглощенных фотонов [20]. В состав РОВ природной воды входят соединения, как испускающие флуоресценцию в результате поглощения фотона, так и поглощающие свет, но не флуоресцирующие. Поэтому можно сказать, что большой КВФ характерен для РОВ с большим содержанием ароматических групп. Отметим, что природа флуоресценции природных гуминовых веществ еще не до конца выяснена, поэтому для РОВ, являющегося набором различных органических соединений, КВФ корректнее называть кажущимся или „эффективным“ квантовым выходом флуоресценции [21,22]. Квантовый выход флуоресценции РОВ Φ рассчитывали по спектрам испускания флуоресценции и спектрам поглощения с использованием метода эталонных растворов [20,23,24]. В качестве эталонного раствора был взят водный раствор сульфата хинина. Расчеты выполняли по формуле

$$\Phi = \Phi_{qs} \frac{K}{K_{qs}},$$

где Φ — квантовый выход флуоресценции образца, K и K_{qs} — отношения интегральной по спектру интенсивности флуоресценции к оптической плотности на длине волны возбуждения для образца воды и эталонного раствора, соответственно, $\Phi_{qs} = 0.546$ — квантовый выход флуоресценции хинин-сульфата [23].

Измерения кинетики флуоресценции РОВ проведены на установке на базе спектрофлуориметра OmniFluo-900 (Zolix Instruments, Китай), возбуждение осуществлялось с помощью импульсного пикосекундного лазера CNI Laser SSP-MD-PSL-375.55-30-2 (длина волны 373 nm, мощность 139.9 mW, длительность импульса 200–1000 ps), регистрация — с помощью ФЭУ

PMTR13456, работающего в режиме счета фотонов. Спектры флуоресценции записаны в диапазоне 385–700 nm с шагом 0.5 nm. Установка позволяла проводить измерения кинетических кривых затухания люминесценции в режиме времякоррелированного счета фотонов (TCSPC — time-correlated single photon counting), блок сбора данных DCS900PC. В качестве аппаратной функции прибора (IRF — instrument response function) выступала кинетическая кривая, полученная для сигнала упругого рассеяния света дистиллированной водой на длине волны возбуждения 373 nm. Обработка кинетических кривых осуществлялась с помощью программного пакета Omni-Inv. 1.2.37 и представляла собой деконволюцию кривой затухания флуоресценции исследуемого объекта и аппаратной функции прибора. Наилучшее согласие экспериментальной кинетики и модели получалось в приближении двух временных компонент.

Экспериментальные результаты и их обсуждение

Спектры поглощения света РОВ

Спектры поглощения света РОВ с различных горизонтов оз. Кисло-Сладкое приведены на рис. 1. Левая ось ординат соответствует оптической плотности, приведенной к длине кюветы 1 см, правая — коэффициенту поглощения света, пересчитанному из оптической плотности и выраженному в обратных сантиметрах. Видно, что оптическая плотность уменьшается с ростом длины волны, что типично для РОВ [25], при этом около 260–270 nm заметно характерное для природной воды „плечо“ [26,27], причиной возникновения которого является присутствие фенольных групп или ароматических аминокислот в образце РОВ. В марте (рис. 1, *a*) большим поглощением и, следовательно, большей концентрацией гуминовых веществ отличались пробы приповерхностных горизонтов 0 m и 0.5 m (заметим, что для поверхностного слоя 0 m соленость 20.6 ‰ несколько ниже, чем для остальных горизонтов). Спектры поглощения света в пробах воды из нижележащих слоев от 1 до 2.5 m различаются весьма слабо, что согласуется с гидрологическими характеристиками (по солености, Eh и pH вся толща, начиная с 1 m, практически однородна). В пробах талого льда (рис. 1, *b*) оптическая плотность значительно меньше, чем в воде, так как в нем содержится гораздо меньше РОВ.

В июне и сентябре (рис. 1, *c, d*) характер спектров оптической плотности довольно схож, за исключением того, что в июне наибольшее поглощение наблюдалось в поверхностном слое (0 m) с желтовато-коричневым оттенком воды, поступающей из окрестных болот, а в сентябре максимальное поглощение уже соответствует слою 2.4 m (слой над редокс-переходом, до фильтрации имеющий розовый окрас вследствие массового развития криптофитовой водоросли *Rhodomonas*).

Значения оптической плотности D , измеренные на длинах волны возбуждения флуоресценции, далее были использованы для расчета КВФ.

Спектры испускания РОВ: белковоподобная и гуминовая флуоресценция

Спектры флуоресценции РОВ для длин волн возбуждения 270 и 355 nm в пробах, отобранных в марте, июне и сентябре, представлены на рис. 2, *a–f*. При возбуждении излучением с длиной волны 270 nm спектр испускания флуоресценции РОВ представляет собой две частично перекрывающиеся полосы флуоресценции: „белковоподобную“ УФ полосу свечения с максимумом 300–350 nm [28] и гуминовую — с длиной волны 450–500 nm [21,26]. Отметим, что белковоподобная флуоресценция не является именно флуоресценцией белков в чистом виде (термин „белковоподобная“, или protein-like, означает флуоресценцию, похожую на спектры испускания белков), она соответствует фенольным соединениям или ароматическим аминокислотам в составе РОВ. При возбуждении светом с длиной волны 355 nm белковоподобная флуоресценция не наблюдается, вторая, более длинноволновая гуминовая полоса соответствует веществам, представляющим собой органические кислоты с карбоксильными и фенольными группами, возникающие как остаточные продукты деградации биомолекул, так и путем конденсации их фрагментов. При длине волн возбуждения флуоресценции 270 nm в зарегистрированных спектрах также замечен сигнал комбинационного рассеяния света (КРС) молекулами воды — в виде небольшого пика на коротких длинах волн (~ 290 nm). При длине волны возбуждения 355 nm сигнал КРС практически сливается с основной полосой флуоресценции РОВ.

Из полученных спектров видно, что в марте полоса белковоподобной флуоресценции заметна в поверхностной (подледной, 0 m) и придонной воде (4 m), а в пробах талого льда имеет очень малую амплитуду и слабо заметна в спектрах. Белковоподобная флуоресценция ярче всего проявляется в сентябрьских пробах РОВ, на глубинах 2.4 и 2.5 m, между которыми находится редокс-переход. В июне данная полоса также имеет наибольшую амплитуду для глубин 2.4 и 2.5 m, а также для глубины 0 m. Большая интенсивность белковоподобной флуоресценции РОВ, то есть в фильтрованных пробах воды без клеток микроорганизмов, обусловлена свечением растворенных белков или фенольных соединений и соответствует повышенной микробной активности в отмеченных слоях воды.

Квантовый выход флуоресценции РОВ

На рис. 3, *a* приведены зависимости $\Phi(\lambda_{\text{ex}})$ ($\lambda_{\text{ex}} = 250–500$ nm) для РОВ на двух глубинах, соответствующих началу хемоклина (чуть ниже редокс-перехода, Eh < 0) в июне и сентябре. Поскольку

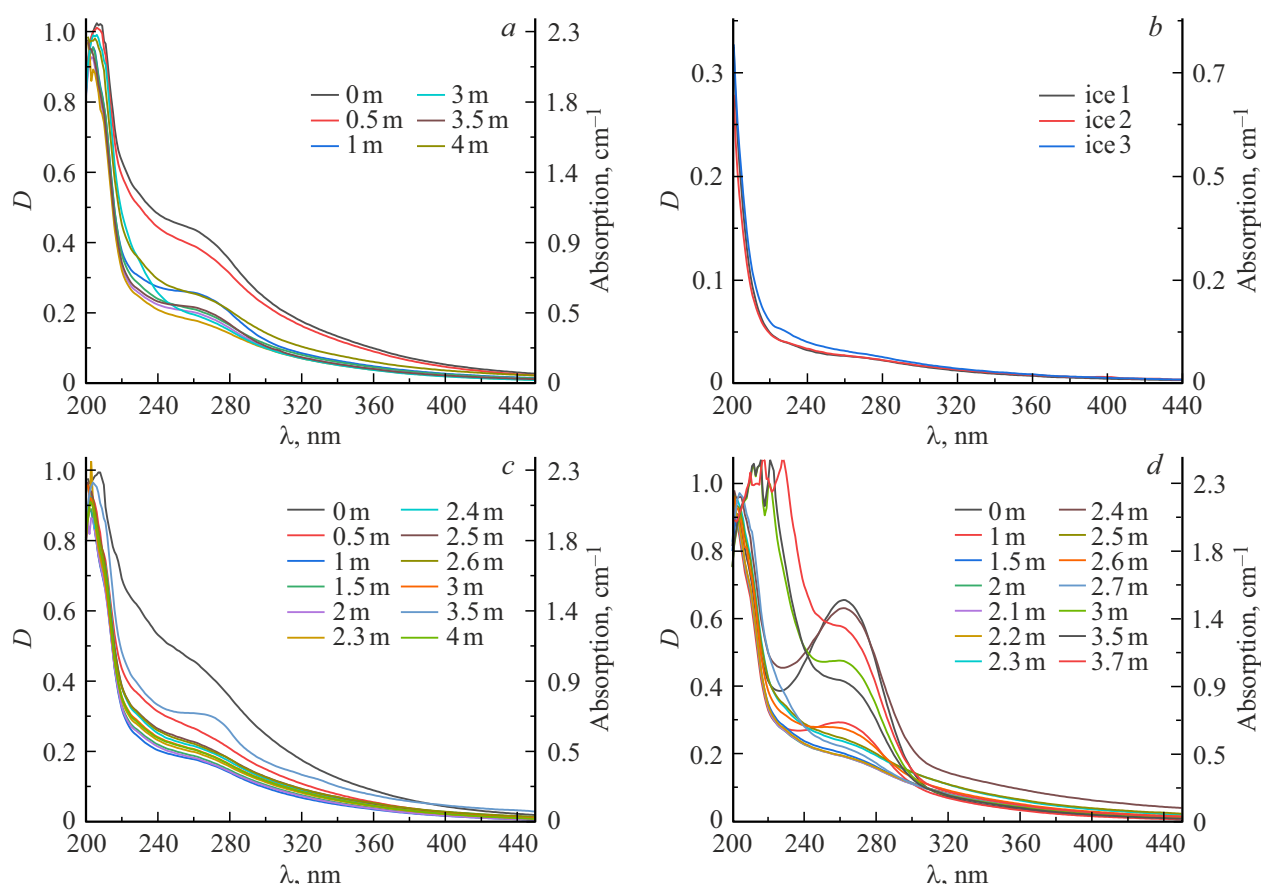


Рис. 1. Спектры поглощения света РОВ для различных горизонтов в марте (a) и (b), июне (c), сентябре (d).

глубина редокс-перехода в июне и сентябре отличалась на 0.1 м, эти глубины (2.4 и 2.5 м) можно считать эквивалентными. Видно, что для этих двух глубин одинаков не только характер зависимостей $\Phi(\lambda_{\text{ex}})$, но и практически совпадают значения КВФ. Зависимость КВФ от длины волны возбуждения немонотонна, в области 250–500 нм она имеет по два локальных максимума и минимума: минимумы наблюдаются при $\lambda_{\text{ex}} \sim 290\text{--}300\text{ нм}$ и $\lambda_{\text{ex}} \sim 360\text{ нм}$, а максимумы при $\lambda_{\text{ex}} \sim 340\text{ нм}$ и $370\text{--}390\text{ нм}$.

Сопоставим значения КВФ с полученными ранее. В работе [24] были измерены значения КВФ для РОВ и его фракций, выделенных из Москва-реки, усредненные значения по всем пробам при возбуждении длиной волны 355 нм составили 1.75% (для РОВ) и 2.07% (для низкомолекулярной фракции РОВ). Значения КВФ возрастают в ряду изменения длины волны возбуждения 270–310–355 нм. В отличие от природных гуминовых веществ, коммерческие гуминовые препараты показали меньшие значения КВФ (от 0.15 до 1.10) и иную зависимость КВФ от длины волны возбуждения: с ростом длины волны возбуждения от 270 до 355 нм для препаратов из торфа или сапропеля КВФ увеличивается или остается постоянным, а для гуминовых препаратов из углефицированных материалов КВФ уменьшается [29].

Зависимости КВФ от длины волны возбуждения в широком диапазоне были получены для прибрежной зоны Карского моря [30] и моря Лаптевых [31]. В работах [32–34] также было показано существование двух максимумов КВФ для РОВ природной воды в диапазонах длин волн возбуждения флуоресценции 340–355 нм и 370–400 нм.

Значения КВФ для диапазона возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 250\text{--}500\text{ нм}$ ранее были рассчитаны авторами данной статьи и для других меромиктических водоемов беломорского побережья, находящихся на разных стадиях изоляции от моря: озер Еловое, Трехцветное [24], Лагуны на Зеленом мысе [35], искусственно отделенного водоема (Федосеевский плес губы Канда), а также для морской части губы Канда, не являющейся меромиктическим водоемом [22]. В этих водоемах зависимость имеет качественно такой же характер, отличаясь абсолютными значениями КВФ. Сравним абсолютные значения КВФ с данным предыдущих исследований. В озерах Трехцветное и Еловое минимум КВФ (соответствующий 290–300 нм) примерно равен 0.8%, в Лагуне на Зеленом мысе — примерно 1%, в губе Канда — 1.6%, а абсолютный максимум (на 380 нм) равен 2.1 и 2.8% в Трехцветном и Еловом соответственно, и почти 3% в Лагуне на

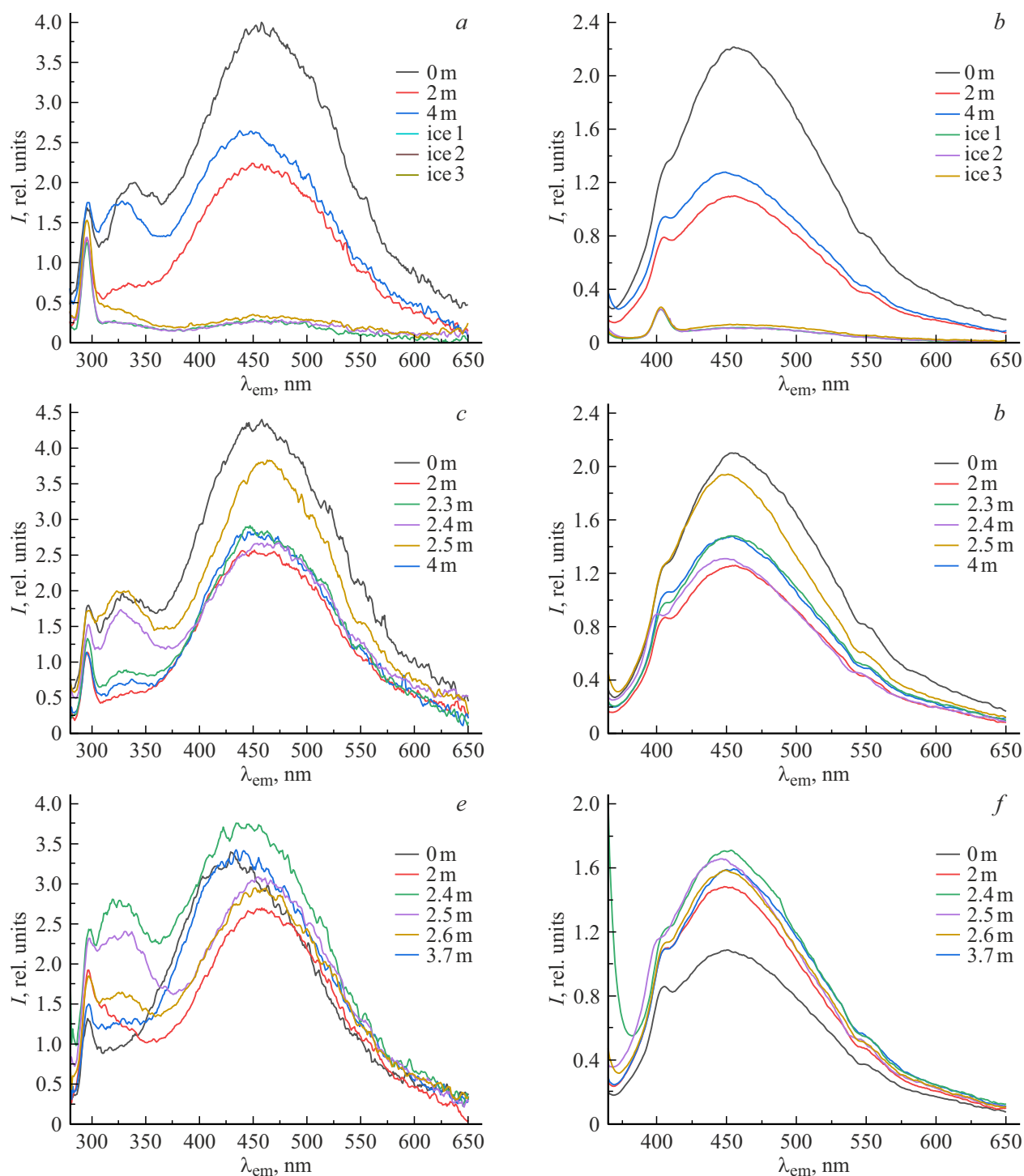


Рис. 2. Спектры испускания флуоресценции РОВ: март, $\lambda_{\text{ex}} = 270$ (a), 355 nm (b); июнь, $\lambda_{\text{ex}} = 270$ (c), 355 nm (d); сентябрь, $\lambda_{\text{ex}} = 270$ (e), 355 nm (f).

Зеленом мысе и морской части губы Канда. Для рассматриваемого в данной работе озера Кисло-Сладкое минимум КВФ равен примерно 1%, а максимум 2.4%, что укладывается в диапазон значений для других беломорских меромиктических водоемов.

Рис. 3, b–d показывают зависимости КВФ для длин волн возбуждения 270, 310 и 355 nm от глубины отбора

воды. Видно, что в марте зависимость совсем иная, нежели летом, так как бескислородная зона в зимнем сезоне начиналась сразу подо льдом. „Отрицательные“ глубины на рисунке соответствуют пробам, взятым из трех слоев керна льда. В июне и сентябре минимальный КВФ наблюдался на глубине 2.4–2.5 m (чуть выше хемоклина или начало хемоклина), что соответствует

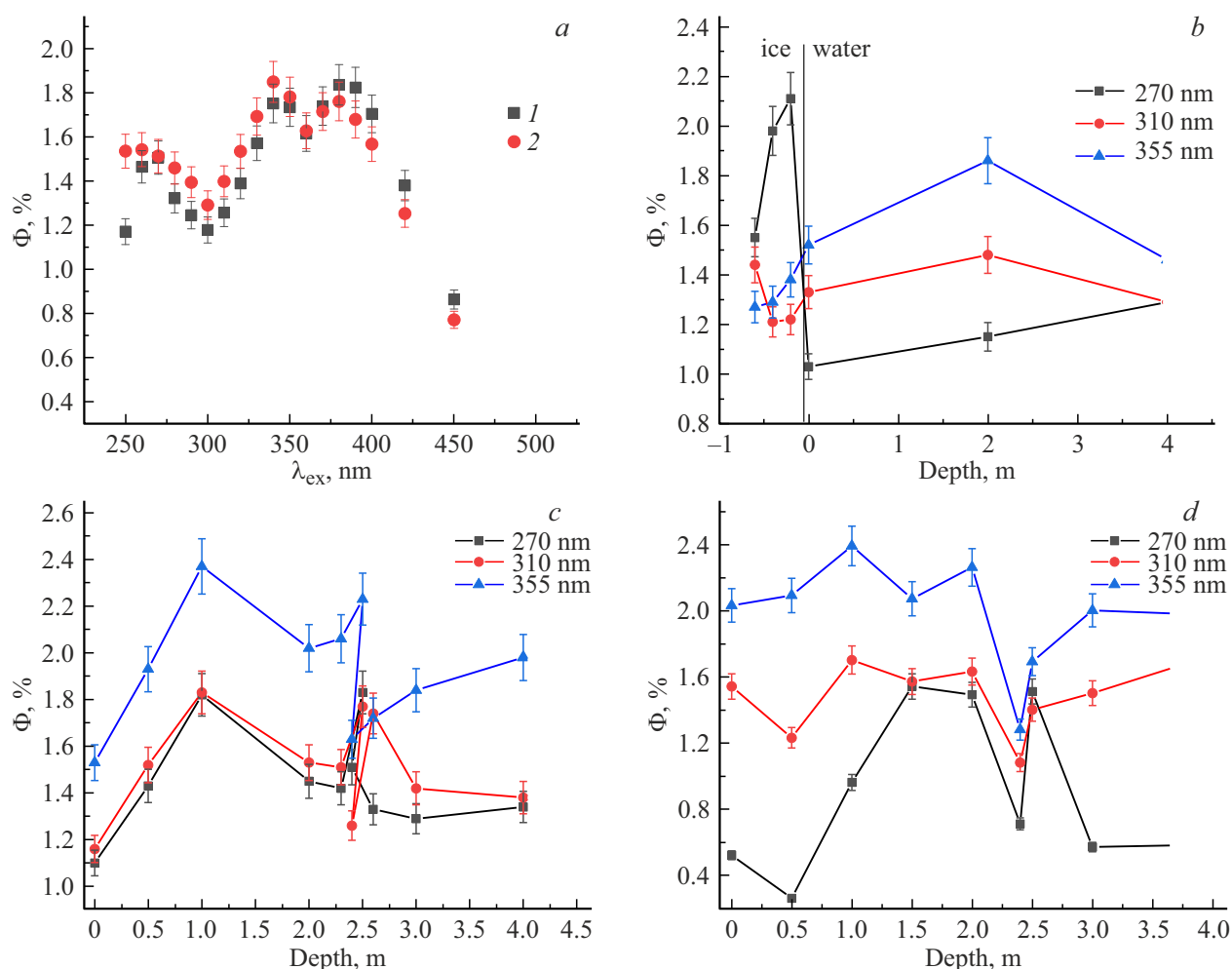


Рис. 3. Зависимость КВФ от длины волны возбуждения (а) (1 — 2.4 м, июнь; 2 — 2.5 м, сентябрь). Зависимость КВФ от глубины для марта (b), июня (c), сентября (d).

слою с массовым развитием криптофитовых водорослей. В спектрах испускания и синхронных спектрах флуоресценции именно на этих глубинах наблюдаются самые интенсивные по сравнению с остальными глубинами полосы белковоподобной флуоресценции, а на спектрах поглощения лучше всего проявляется „плечо“ в области 270 nm. Это соответствует повышенной микробной активности в этом слое воды и присутствию молекул, поглощающих УФ свет, но не флуоресцирующих, что, вероятно, и приводит к падению рассчитанного КВФ.

Синхронные спектры флуоресценции РОВ

В работе также были измерены так называемые синхронные спектры флуоресценции РОВ, то есть спектры с постоянной разностью длины волны возбуждения и регистрации $\Delta\lambda$ (рис. 4, а–f). Для РОВ беломорских прибрежных стратифицированных водоемов подобное сделано впервые. Синхронные спектры флуоресценции с разностью длин $\Delta\lambda = 14$ nm дают представление о длинах волн, на которых возбуждается свечение флу-

орофоров с малым Stokes-сдвигом. Как видно из рис. 4, а, с, е, такое свечение будет возбуждаться при 275–290 nm и 310–315 nm. Это соответствует белковоподобной флуоресценции, к которой, помимо белков, можно отнести и флуоресценцию ароматических аминокислот, фенольных соединений и гидрохинонов. Подобный пик наблюдался в работе [36] для проб талого льда и воды озера острова Канадского арктического архипелага (Ellesmere Island) с разницей в том, что авторами наблюдался наиболее интенсивный пик для талой воды из ледового покрова озера, в то время как в случае озера Кисло-Сладкое данный пик является самым интенсивным для проб воды из хемоклина в летний сезон и придонной воды в зимний. Вероятно, это связано с различием состава РОВ по глубине для двух водоемов.

Отметим различие максимумов возбуждения белковоподобной флуоресценции в синхронных спектрах с малым Stokes-сдвигом $\Delta\lambda = 14$ nm для воды конца зимнего сезона — непосредственно подо льдом (0 m) максимум полосы приходится на 310–315 nm, а в придонной воде (4 m) максимум возбуждения более

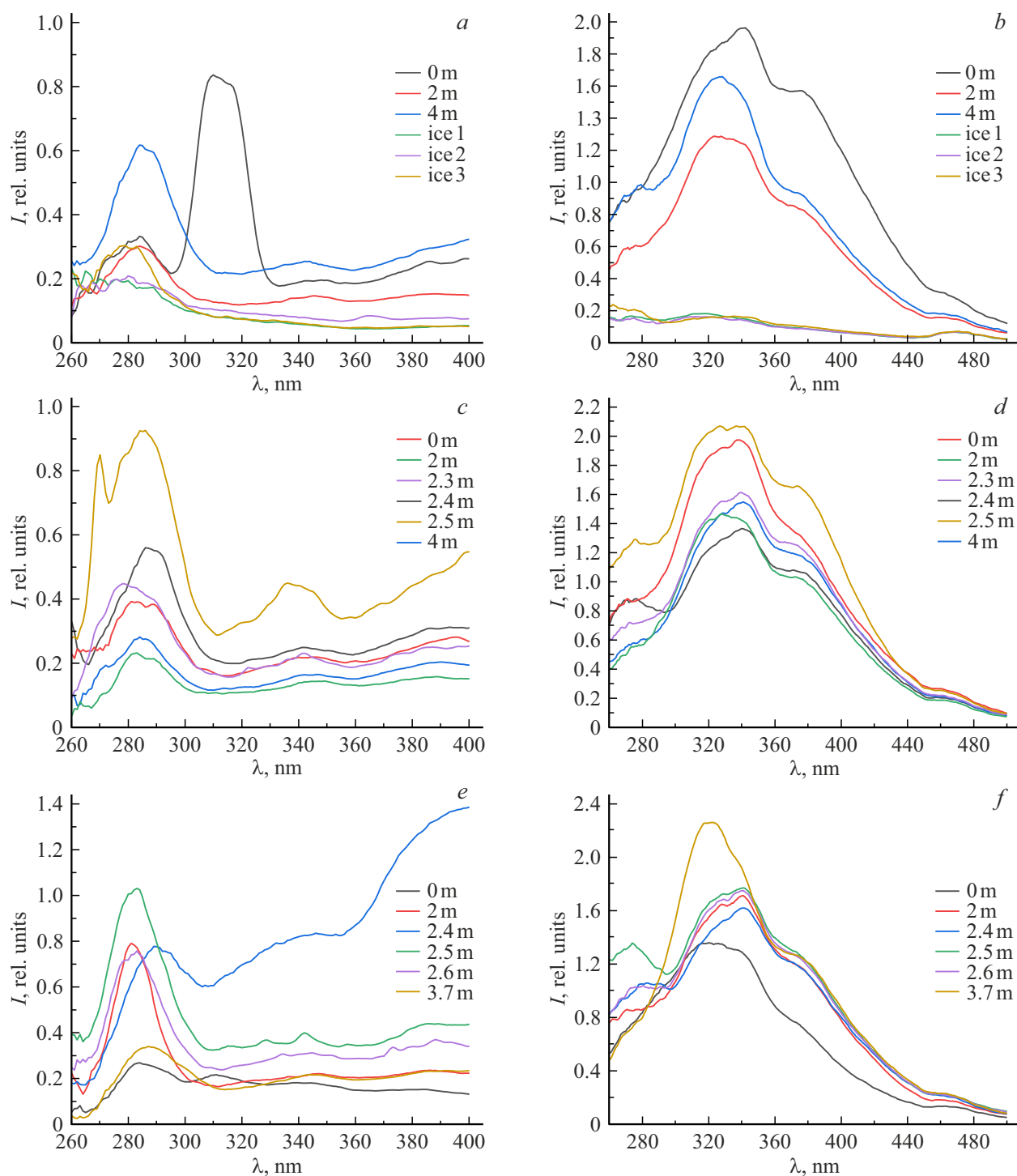


Рис. 4. Синхронные спектры флуоресценции РОВ: март, $\Delta\lambda = 14$ (a), 90 nm (b); июнь, $\Delta\lambda = 14$ (c), 90 nm (d); сентябрь, $\Delta\lambda = 14$ (e), 90 nm (f).

коротковолновый, 275–290 nm. Мы уже отмечали ранее, что не только белки, но и фенольные соединения могут давать вклад в белковоподобную флуоресценцию, поэтому данное различие максимумов синхронных спектров говорит о разной природе флуорофоров, ответственных за так называемую белковоподобную флуоресценцию в УФ области.

Синхронные спектры флуоресценции с большим Stokesовым сдвигом, $\Delta\lambda = 90$ nm, представленные на рис. 4, b, e, f, показывают возбуждение гуминовой флуоресценции. Полосы возбуждения при 340 и 375 nm на полученных спектрах представлены в виде особенностей спектра (главный максимум и „плечо“ на спаде). Соотношение их интенсивностей в разных пробах раз-

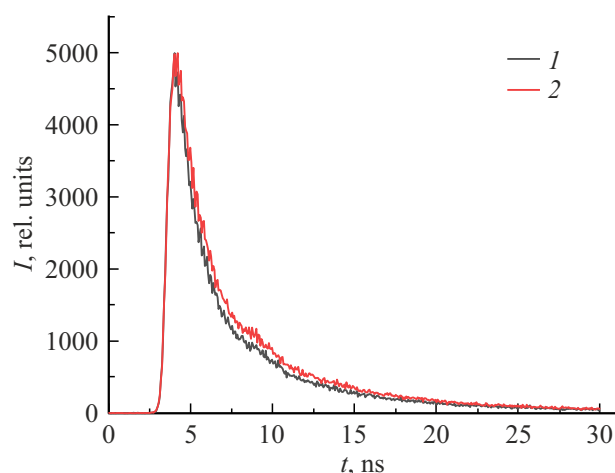


Рис. 5. Кинетика затухания флуоресценции РОВ при лазерном импульсном возбуждении (1 — 0 м, 2 — 2.4 м, сентябрь).

личается, что говорит о разном флуорофорном составе гуминовых веществ. Для тех же длин волн были зарегистрированы максимумы в зависимости КВФ от длины волны возбуждения (рис. 3, а).

Кинетика флуоресценции и время жизни флуоресценции РОВ

Измерения кинетики РОВ проводили при возбуждении светом с длиной волны 373 nm и регистрацией на 470 nm, то есть для гуминовой полосы флуоресценции и возбуждении в одном из максимумов заисимости КВФ от длины волны. Кинетика затухания флуоресценции РОВ при лазерном импульсном возбуждении показана на рис. 5.

Рассчитанные времена жизни компонент спектра гуминовой флуоресценции для избранных проб РОВ приведены в табл. 2. Для расчета были выбраны все горизонты в июне, поверхностная вода, хемоклин и придонная вода в сентябре, поверхность, близкий к поверхности слой и придонная вода в марте. Главная компонента кинетики имеет времена жизни флуоресценции около 2 ns. Более медленная компонента имеет время жизни флуоресценции около 9 ns, причем по амплитуде она составляет примерно 10% от более быстрой компоненты. Погрешности измерения времени жизни составили 0.1 ns для короткой компоненты и 0.2 ns для более длительной компоненты. Погрешности оценки амплитуды составили 5%.

Эксперимент показал, что в летне-осенний сезон (июнь и сентябрь) времена жизни и соотношения амплитуд короткой (2.0–2.2 ns) и долгоживущей компоненты (8.8–9.4 ns) гуминовой флуоресценции практически не зависят от горизонта отбора проб, хотя вода из разных слоев оз. Кисло-Сладкое различается по гидрологическим характеристикам и, как было показано выше, существуют заметные различия в спектрах флуоресценции

Таблица 2. Рассчитанные времена жизни двух компонент кинетики флуоресценции РОВ t_1 и t_2 , относительная доля амплитуды A_1 и площади S_1 первой компоненты

Глубина, m	t_1 , ns	t_2 , ns	A_1 , %	S_1 , %
март				
0.5	2.33	9.94	91.4	71.4
1	2.32	9.71	89.9	67.9
4	2.22	9.66	91.4	70.9
июнь				
0	1.84	8.78	89.5	64
0.5	2.00	9.04	88.3	62.4
1	2.02	9.07	87	59.9
1.5	2.09	8.92	86.4	59.9
2	2.10	9.00	87.1	61.1
2.3	2.04	8.91	87.4	61.2
2.4	2.07	9.29	87.6	61.2
2.5	2.04	9.02	87.2	60.6
2.6	2.08	9.12	87.2	60.7
3.5	2.16	9.4	87.5	61.6
3	2.06	9.04	86.7	59.9
4	2.12	9.21	86.5	59.6
сентябрь				
0	2.01	9.00	91.1	69.5
2.4	2.12	8.87	91.2	71.1
2.5	2.22	9.07	90.4	69.7
3.7	2.16	8.92	91.9	73.3

(например, по соотношению белковоподобной и гуминовой флуоресценции и по КВФ). Только для одной пробы с пониженной соленостью (поверхностная вода 0 м, июнь) время жизни короткой компоненты флуоресценции было чуть меньше 2 ns и составило 1.84 ns. Поскольку погрешности измерения времени жизни составили не менее 0.1 ns, мы не трактуем такое отличие от остальных значений как значительное. Для РОВ в конце зимнего сезона, то есть подо льдом, значения времени жизни для обеих компонент были чуть больше, чем летом, и составили 2.2–2.3 ns и 9.7–9.9 ns. Возможно, это связано с большей концентрацией сероводорода подо льдом, так как незначительное увеличение времени жизни наблюдалось и для некоторых горизонтов анаэробной зоны в летне-осенний период (2.07 и 9.29 ns для горизонта 2.4 м в июне; 2.22 и 9.07 ns для горизонта 2.5 м в сентябре, а также придонной воды), однако зависимость времени жизни флуоресценции РОВ от наличия сероводорода в воде еще требует дополнительных исследований.

Найденные значения времени жизни флуоресценции РОВ находятся в хорошем согласии с известными временами флуоресценции по литературным данным [37,38]. Согласно работе [37] существуют три основных компоненты кинетики флуоресценции РОВ. Затухание флуоресценции может быть аппроксимировано экспоненциальной функцией с тремя составляющими времени жизни порядка 0.5–0.8, 2–3 и 6–9 ns. Соотношение

амплитуд этих трех компонент и точные времена жизни зависят от разных факторов: образца РОВ, pH воды, длины волны возбуждения и длины волны испускания. В работе [39] для водных растворов гуминовых кислот найдены две компоненты кинетики флуоресценции с временами 0.4 и 2.0 ns. Одна из этих компонент дает близкие значения к временам жизни флуоресценции, измеренным в нашей работе для РОВ природной воды. Более короткую компоненту в наших экспериментах мы не смогли изучить из-за особенностей параметров лазерного флуориметра. Тем не менее, времена жизни для наносекундной компоненты (2.0–2.3 ns), полученные в нашей работе, хорошо согласуются с приведенными в научной литературе.

Таким образом, времена жизни флуоресценции РОВ оз. Кисло-Сладкое в летне-осенний сезон оказались очень схожими для разных горизонтов отбора проб, несмотря на различие гидрохимических характеристик, что позволяет сделать вывод об одинаковой природе гуминовой полосы флуоресценции РОВ в разных слоях данного водоема.

Заключение

Впервые проведено комплексное исследование оптических свойств РОВ природной воды стратифицированной лагуны под названием озеро Кисло-Сладкое. Измерены спектры поглощения света (200–800 nm), спектры испускания и синхронные спектры флуоресценции, а также исследована кинетика затухания флуоресценции. В летне-осеннем сезоне для исследования взяты пробы воды с различных глубин, в зимнем — пробы воды и талого льда. Приведены спектры испускания флуоресценции, показано, что при длине волны возбуждения 270 nm можно наблюдать „белковоподобную“ полосу флуоресценции, которая соответствует ароматическим аминокислотам, фенольным соединениям и гидрохинонам, а также гуминовую полосу флуоресценции. Наибольшая интенсивность белковоподобной флуоресценции в фильтрованных пробах наблюдалась в пробах с высокой микробной активностью: в подледной и придонной воде в зимний сезон и в слое 2.4–2.5 m с массовым развитием криптофитовых водорослей летом. При возбуждении длиной волны 355 nm наблюдается только полоса гуминовой флуоресценции.

Рассчитанная зависимость КВФ от длины волны возбуждения имеет немонотонный характер с двумя минимумами и двумя максимумами (340 и 375 nm). Длина волны минимумов и максимумов, а также абсолютное значение КВФ согласуется с данными, полученными ранее для других меромиктических водоемов беломорского побережья. Построены зависимости КВФ от горизонта отбора воды, показано различие данных зависимостей в зимнем и летнем сезонах, что определяется различием гидрохимических характеристик (разная соленость и глубина редокс-перехода).

Синхронные спектры флуоресценции с разностью длин волн возбуждения и регистрации $\Delta\lambda = 14$ nm дают представление о спектральных диапазонах, на которых возбуждается свечение флуорофоров с малым стоксовым сдвигом, что соответствует флуоресценции ароматических аминокислот, фенольных соединений и гидрохинонов (275–280 nm и 310–315 nm). Синхронные спектры флуоресценции с $\Delta\lambda = 90$ nm показывают возбуждение флуоресценции гуминовых веществ („плечи“ в спектре на 340 и 375 nm, которые соответствуют максимумам в зависимости КВФ от длины волны возбуждения). Исследование кинетики затухания флуоресценции показало, что времена жизни и соотношения амплитуд коротко- (2.2 ns) и долгоживущей (9 ns) компонент флуоресценции не зависят от горизонта отбора проб, несмотря на различие гидрохимических характеристик, отмечено согласие времен затухания с литературными данными.

Таким образом, мы заключаем, что в спектрах флуоресценции РОВ мы видим проявления автохтонного ОВ, образованного в толще воды с повышенной микробной активностью (подледная и придонная вода зимой, вода с массовым развитием криптофитовых водорослей в июне и сентябре). Растворенное органическое вещество автохтонного происхождения приводит к появлению белковоподобной флуоресценции и полосы поглощения при 270 nm, а также снижению КВФ за счет поглощения света нефлуоресцирующим ОВ. Однако основная гуминовая полоса, скорее всего, имеет аллохтонное, то есть терригенное происхождение за счет гуминовых веществ, поступающих с водосбора. Для гуминовой флуоресценции характерны не зависящие от глубины (и, соответственно, солености, pH и Eh) положения максимумов в зависимости КВФ от длины волны возбуждения и в синхронных спектрах флуоресценции с большим стоксовым сдвигом, а также постоянство времени жизни гуминовой флуоресценции.

Благодарности

Авторы благодарят администрацию Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова за поддержку экспедиционных работ. Часть экспериментальных результатов, использованных в настоящей работе, получена с помощью системы высокоскоростного анализа кинетики затухания люминесценции веществ, закупленной по Программе развития МГУ (соглашение № 231 от 06.06.2023).

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00008 <https://rscf.ru/project/24-24-00008/>

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Е.А. Романкевич, А.А. Ветров, В.И. Пересыпкин. Геология и геофизика, **50** (4), 401 (2009). [E.A. Romankevich, A.A. Vetrov, V.I. Peresypkin. *Rus. Geol. Geophys.*, **50** (4), 291 (2009)].
- [2] Е.А. Романкевич. *Геохимия органического вещества в океане* (Наука, М., 1977).
- [3] А.И. Лактионов. Оптика атмосф. и океана, **18** (11), 983 (2005). [A.I. Laktionov. *Atmosph. Oceanic Opt.*, **18** (11), 886 (2005)].
- [4] V.A. Terekhova, E.V. Fedoseeva, M.I. Panova, S.N. Chukov. *Eurasian Soil Science*, **55** (7), 868 (2022).
- [5] А.Н. Дроздова. Опт. и спектр., **126** (3), 383 (2019). [A.N. Drozdova. *Opt. Spectrosc.*, **126** (3), 303 (2019)]. DOI: 10.1134/S0030400X19030068
- [6] А.Ф. Зайцева, И.В. Конюхов, Ю.В. Казимирко, С.И. Погосян. *Океанология*, **58** (2), 251 (2018). [A.F. Zaitseva, I.V. Konyukhov, Y.V. Kazimirko, S.I. Pogosyan. *Oceanology*, **58** (2), 233 (2018)]. DOI: 10.1134/S0001437018020169
- [7] О.В. Копелевич, И.В. Салинг. *Фундаментальная и прикладная гидрофизика*, **13** (2), 16 (2020). DOI: 10.7868/S2073667320020021
- [8] О.В. Копелевич, И.В. Салинг, С.В. Вазюля, Д.И. Глуховец, С.В. Шеберстов, В.И. Буренков, П.Г. Каралли, А.В. Юшманова. *Биооптические характеристики морей, омывающих берега западной половины России, по данным спутниковых сканеров цвета 1998–2017 гг. (монография)* (Институт океанологии Российской академии наук, М., 2018).
- [9] V.A. Glukhov, Y.A. Goldin, O.V. Glitko, D.I. Glukhovets, E.A. Aglova, M.A. Rodionov. *Oceanology*, **63** (Suppl 1), 119 (2023). DOI: 10.1134/S0001437023070044
- [10] Д.А. Хунджа, С.В. Пацаева, О.А. Трубецкой, О.Е. Трубецкая. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 3: Физ., астр.*, **1**, 66 (2017). [D.A. Khundzhua, S.V. Patsaeva, O.A. Trubetskoy, O.E. Trubetskaya. *Moscow Univ. Phys. Bull.*, **72** (1), 68 (2017)]. DOI: 10.3103/S0027134907060082
- [11] Е.Д. Краснова. *Водные ресурсы*, **48** (3), 323 (2021). [E.D. Krasnova. *Water Resour.*, **48** (3), 427 (2021)]. DOI: 10.1134/S009780782103009X
- [12] М.В. Мардашова, Д.А. Воронов, Е.Д. Краснова. *Зоологический журнал*, **99** (7), 819 (2020).
- [13] Е.Д. Краснова, В.И. Лобышев, Е.А. Лабунская, Д.А. Воронов, Ю.Г. Соколовская, А.А. Жильцова, С.В. Пацаева. *Оптика атмосферы и океана*, **37** (04), 307 (2024). [E.D. Krasnova, V.I. Lobyshev, E.A. Labunskaya, D.A. Voronov, Yu.G. Sokolovskaya, A.A. Zhiltsova, S.V. Patsaeva. *Atmospheric and Oceanic Optics*, **37** (04), 307 (2024)]. DOI: 10.15372/AOO20240407
- [14] А.А. Жильцова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, Ю.Г. Соколовская, С.В. Пацаева. *Опт. и спектр.*, **132** (3), 238 (2024). [A.A. Zhiltsova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, Yu.G. Sokolovskaya, S.V. Patsaeva. *Opt. Spectr.*, **132** (3), 214 (2024)]. DOI: 10.61011/OS.2024.03.58143.22-24
- [15] Д.А. Иванова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, И.Г. Радченко. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16: Биология*, **79** (2), 129 (2024). [D.A. Ivanova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, I.G. Radchenko. *Moscow Univ. Biol. Bull.*, **79** (2), 86 (2024)]. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2-5
- [16] Е.Д. Краснова, А.Н. Пантюлин, Д.Н. Маторин, Д.А. Тодоренко, Т.А. Белевич, И.А. Милютин, Д.А. Воронов. *Микробиология*, **83** (3), 346 (2014). [E.D. Krasnova, A.N. Pantyulin, D.N. Matorin, D.A. Todorenko, T.A. Belevich, I.A. Milyutina, D.A. Voronov. *Microbiology*, **83** (3), 270 (2014)].
- [17] Д.Н. Маторин, Д.А. Тодоренко, Д.А. Воронов, С.Н. Горячев, Л.Б. Братковская, Е.Д. Краснова. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16: Биология*, **77** (3), 180 (2022). [D.N. Matorin, D.A. Todorenko, D.A. Voronov, S.N. Goryachev, L.B. Bratkovskaya, E.D. Krasnova, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **77** (3), 165 (2022)]. DOI: 10.3103/S0096392522030075
- [18] О.А. Трубецкой, О.Е. Трубецкая. *Водные ресурсы*, **46** (4), 428 (2019). [O.A. Trubetskoy, O.E. Trubetskaya. *WaterResour.*, **46** (4), 605 (2019)]. DOI: 10.1134/S0097807819040171
- [19] Г.С. Карабашев. *Флюоресценция в океане* (Гидрометеозидат, Л., 1987).
- [20] Дж. Лакович. *Основы флуоресцентной спектроскопии* (Мир, М., 1986).
- [21] U. Wunsch, K. Murphy, C. Stedmon. *Front. Marin. Sci.*, **2**, 1 (2015). DOI: 10.3389/fmars.2015.00098
- [22] Ю.Г. Соколовская, Н.А. Демиденко, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, А.С. Саввичев, С.В. Пацаева. *Опт. и спектр.*, **132** (4), 374 (2024). [Yu.G. Sokolovskaya, N.A. Demidenko, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, A.S. Savvichev, S.V. Patsaeva. *Opt. Spectr.*, **132** (4), 344 (2024)]. DOI: 10.61011/OS.2024.04.58215.25-24
- [23] D.F. Eaton. *Pure & Appl. Chem.*, **60** (7), 1107 (1988).
- [24] А.С. Милуков, С.В. Пацаева, В.И. Южаков, О.М. Горшкова, Е.М. Пращикина. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 3: Физ., астр.*, **6**, 34 (2007). [A.S. Milyukov, S.V. Patsaeva, V.I. Yuzhakov, O.M. Gorshkova, E.M. Prashchikina. *Moscow Univ. Phys. Bull.*, **62** (6), 368–372 (2007)]. DOI: 10.3103/S0027134907060082
- [25] К.С. Шифрин. *Введение в оптику океана* (Гидрометеозидат, Л., 1983).
- [26] Ю.Г. Соколовская, А.А. Жильцова, Е.Д. Краснова, Д.А. Воронов, С.В. Пацаева. *Опт. и спектр.*, **131** (6), 872 (2023). [Yu.G. Sokolovskaya, A.A. Zhiltsova, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, S.V. Patsaeva. *Opt. Spectr.*, **131** (6), 824 (2023)]. DOI: 10.21883/OS.2023.06.55924.111-23
- [27] О.М. Горшкова, С.В. Пацаева, Е.В. Федосеева, Д.М. Шубина, В.И. Южаков. *Вода: химия и экология*, **11**, 31 (2009).
- [28] S. Patsayeva, R. Reuter. *Global Process Monitoring and Remote Sensing of the Ocean and Sea Ice*, **2586**, 151 (1995).
- [29] О.Ю. Гостева, А.А. Изосимов, С.В. Пацаева, В.И. Южаков, О.С. Якименко. *ЖПС*, **78** (6), 943 (2011). [O.Yu. Gosteva, A.A. Izosimov, S.V. Patsaeva, O.S. Yakimenko, V.I. Yuzhakov. *J. Appl. Spectr.*, **78** (6), 884 (2012)]. DOI: 10.1007/s10812-012-9548-8
- [30] А.Н. Дроздова, С.В. Пацаева, Д.А. Хунджа. *Океанология*, **57** (1), 49 (2017). [A.N. Drozdova, S.V. Patsaeva, D.A. Khundzhua. *Oceanology*, **57** (1), 41–47 (2017)]. DOI: 10.1134/S0001437017010039
- [31] А.Н. Дроздова, М.Д. Кравчishина, Д.А. Хунджа, М.Р. Фрейдкин, С.В. Пацаева. *Int. J. Remote Sens.*, **39** (24), 9356 (2018). DOI: 10.1080/01431161.2018.1506187

- [32] S.A. Green, N.V. Blough. *Limnol. Oceanogr.*, **39** (8) 1903 (1994). DOI: 10.4319/lo.1994.39.8.1903
- [33] R. Zepp, W. Sheldon, M.A. Moran. *Marine Chem.*, **89** (1–4), 15 (2004). DOI: 10.1016/j.marchem.2004.02.006
- [34] R. Del Vecchio, N.V. Blough. *Marine Chem.*, **89** (1–4), 169 (2004).
- [35] Yu.G. Sokolovskaya, E.D. Krasnova, D.A. Voronov, D.N. Matorin, A.A. Zhiltsova, S.V. Patsaeva. *Photonics*, **10** (6), 672 (2023). DOI: 10.3390/photonics10060672
- [36] C. Belzile, W.F. Vincent, J.A.E. Gibson, P. Van Hove. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **58** (12), 2405 (2001). DOI: 10.1139/f01-187
- [37] C.D. Clark, J. Jimenez-Morais, G. Jones, E. Zanardi-Lamardo, C.A. Moore, R.G. Zika. *Marine Chem.*, **78** (2–3), 121 (2002).
- [38] J. Liu, R. Zhou, X. Zhang. *Water*, **13**, 2182 (2021). DOI: 10.3390/w13162182
- [39] Д.А. Хунджуа, В.И. Южаков, Б.Н. Корватовский, В.З. Пащенко, Л.С. Кулябко, К.А. Кыдралиева, С.В. Пацаева. *Вестн. Моск. ун-та. Серия 3: Физ., астр.*, **6**, 55 (2018). [D.A. Khundzhua, V.I. Yuzhakov, B.N. Korvatovskiy, V.Z. Paschenko, L.S. Kulyabko, K.A. Kydralieva, S.V. Patsaeva. *Moscow Univ. Phys. Bull.*, **73** (6), 632 (2018)]. DOI: 10.3103/S0027134918060152