

О корреляции свечения байкальской воды с флуоресценцией хлорофилла

В.И. Добрынин*

Физико-технический институт
Иркутского государственного технического университета
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Поступила в редакцию 27.12.2010 г.

Обнаружена корреляция интенсивности спонтанного свечения байкальской воды с флуоресценцией проб при $\lambda = 680$ нм. Основным источником свечения на глубинах 0, 5 и 50 м по данным эксперимента является взвесь, содержащая хлорофилл.

Ключевые слова: Байкал, метод счета фотонов, свечение, флуоресценция, хлорофилл; Baikal, the method of photons counting, luminescence, fluorescence, chlorophyll.

Введение

Вопрос о природе источников свечения вод оз. Байкал [1] остается открытым. Обзор результатов предыдущих исследований приведен в работе [2], где высказана гипотеза о биохимическом механизме генерации источников излучения в водной среде озера. В ряде натуральных и модельных экспериментов наблюдалась корреляция интенсивности свечения байкальской воды с концентрацией микроорганизмов [2–4, 6]. Вместе с тем поиск биолюминесцентных в составе байкальских микробиоценозов не дал ожидаемых результатов [2–5]. Актуальность исследования характеристик и природы свечения байкальской воды обусловлена необходимостью уточнения фоновых условий регистрации мюонов и нейтрино в глубоководном нейтринном телескопе [6], разработки методик изучения динамических процессов в оз. Байкал с использованием свечения в качестве природной метки [2, 4] и современными возможностями в области высокочувствительных фотоприемников и микропроцессорной техники [7, 8].

В настоящей статье описывается первый эксперимент по измерению интенсивности спонтанного свечения проб байкальской воды для ряда глубин (0, 5, 50 м; дата отбора – 17.11.2010 г.) с параллельным определением уровня флуоресценции под действием возбуждающего излучения с $\lambda_{\text{ex}} = 480$ нм. Показано, что интенсивность спонтанного свечения в области спектральной чувствительности используемого фотоэлектронного умножителя ФЭУ-143 (360–650 нм) и уровень флуоресценции байкальской воды при $\lambda = 680$ нм коррелируют между собой.

Отбор проб проводился гидробиологами с борта НИС «Профессор Кожов» при помощи тросовой ле-

бедки и 5-литрового батометра с глубин: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 м. Место отбора проб располагается в Южном Байкале, на расстоянии 2,7 км от берега ($51^{\circ}52'48''$ с.ш., $105^{\circ}05'02''$ в.д.) напротив биостанции НИИ биологии при ИГУ (пос. Большие Коты). Пробы воды в затемненных пластиковых бутылках объемом 1,5–2 л, термостатированные при $6-7^{\circ}\text{C}$, в течение 6–8 ч доставлялись в Физико-технический институт ИрГТУ.

Интенсивность свечения проб определялась по методу счета фотонов на лабораторном фотометре, разработанном в ФТИ ИрГТУ [8]. Для измерений использовался один из каналов фотометра с ориентированным вертикально вверх фотоэлектронным умножителем ФЭУ-143. На расстоянии 1 см от фотокатода ФЭУ в интегрирующую сферу фотометра устанавливалась стеклянная колба объемом 1000 мл с пробами байкальской воды, термостатированными при 7°C .

Между колбой и фотокатодом был расположен шторный затвор, периодически закрываемый и открываемый электродвигателем постоянного тока. Управляемый шторный затвор дает возможность оперативно контролировать темновые шумы ФЭУ I_{dc} в процессе измерений. Уровень фона, обусловленный свечением дистиллированной воды и колбы I_{dw} [7], измерялся дополнительно. Интенсивность свечения байкальской воды I_{bw} определялась по разности значений потоков одноэлектронных импульсов при открытом I_{t} и закрытом затворе I_{dc} с поправкой на свечение колбы и дистиллята: $I_{\text{bw}} = I_{\text{t}} - I_{\text{dc}} - I_{\text{dw}}$.

Для уменьшения статистических флуктуаций производилось усреднение измеряемых потоков однофотонных импульсов ФЭУ за 10^3 с. Аппаратурный дрейф фотометра периодически контролировался при помощи стабильного источника света на основе зеленого светодиода (LD) с яркостью $I_{\text{LD}} \sim 50000 \text{ c}^{-1}$. За все время эксперимента

* Виктор Иванович Добрынин (dvi12345@yandex.ru).

регистрируемый поток фотоэлектронов от искусственного источника света изменялся в пределах $\pm 1,5\%$ среднего значения I_{LD} .

После установки пробы в интегрирующую сферу в течение часа наблюдался медленный рост интенсивности I_t (от 20 до 50%) с дальнейшей стабилизацией. Такое поведение мы интерпретируем как осаждение взвешенного вещества на дно колбы, приближение источников к фотокатоду и соответствующее повышение эффективности регистрации свечения. Включение вибратора (встряхивание пробы) приводит к подъему взвеси и уменьшению регистрируемого потока фотонов. В расчетах использовались результаты измерений после стабилизации показаний фотометра вблизи максимума.

Люминесценция байкальской воды в диапазоне $\lambda = 500 \div 750$ нм измерялась на спектрофлуориметре RF-5301PC Shimadzu Corporation. Длина волны возбуждающего излучения $\lambda_{ex} = 480$ нм выбрана из соображений ее близости к минимуму поглощения байкальской воды [9]. Наибольшая проникающая способность света с длинами волн 480–500 нм обеспечивает фотосинтез в Байкале на глубинах до 250 м [10]. Флуоресцентный анализ проводился для наиболее ярко светящихся проб воды с глубин 0, 5, 50 м.

При измерении флуоресценции байкальской воды применялись следующие методические приемы. Для подавления рассеянного излучения в измерительный канал флуориметра устанавливался стеклянный светофильтр марки ОС11, отсекающий свет с длиной волны менее 530 нм. Щели монохроматоров возбуждения и излучения устанавливались на ширину 5 нм. Измерения проводились при средней скорости развертки спектров с шагом 1 нм. Перед проведением измерений с природной водой для тех же установок RF-5301PC измерялся спектр люминесценции кварцевой кюветы с дистиллятом.

Для проверки отсутствия приборного дрейфа в процессе измерений осуществлялся 5-кратный набор спектров, полученные данные усреднялись. Дополнительно проводились две серии измерений с 10-кратной повторностью для эталонного образца дистиллированной воды фирмы Perkin-Elmer. Значимых расхождений между сериями, а также спектрами эталона и используемого дистиллята не наблюдалось. В качестве эталонных флуоресцентных источников использовались образцы Ovalene ($\lambda_{max} = 482$ нм) и Rhodamine B ($\lambda_{max} = 573$ нм) из набора Fluorescence Intensity Samples (Perkin-Elmer). Отклонения измеренных на RF-5301PC максимумов спектров образцов от значений, приведенных в каталоге, не превышало 1 нм.

Спектры флуоресценции байкальской воды измерялись с 3–5-кратной повторностью для оценки дисперсии в каждой точке спектра и усреднялись с целью уменьшения флуктуаций. Спектры нормировались на величину пика комбинационного рассеяния (КР) в воде с максимумом при $\lambda_{KR} = 575$ нм. Процедура нормировки предусматривала вычитание из экспериментальных данных «педестала» — среднего значения результатов измерений по диапазонам 550–560 и 590–600 нм, и умножение получае-

мой разности на соответствующие коэффициенты для выравнивания амплитуды пиков КР. Нормированные таким образом спектры $F(\lambda)$ для дистиллята и пробы байкальской воды с глубины 5 м приведены на рис. 1, а. Обрезание спектров при $\lambda < 530$ нм обусловлено пороговым светофильтром ОС11. Аналогичные спектры были получены для проб воды с глубин 0 и 50 м.

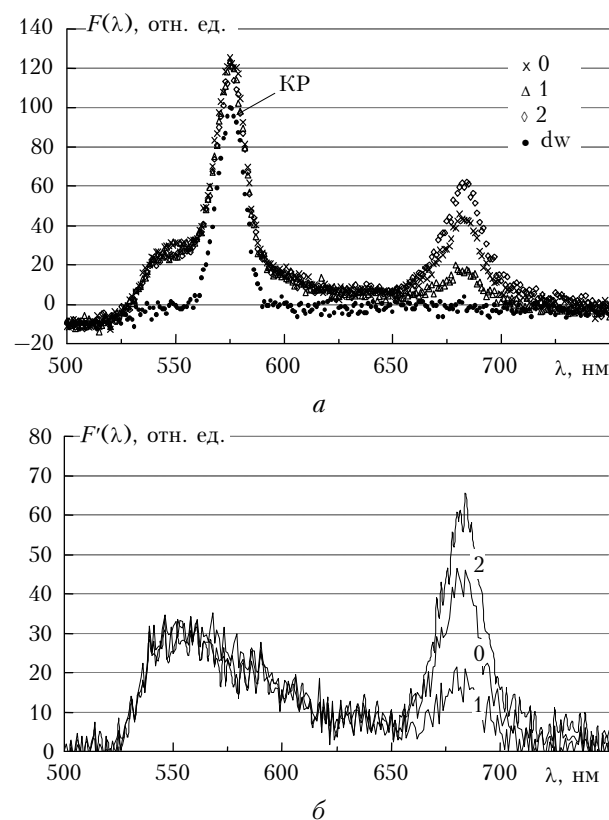


Рис. 1. Спектры флуоресценции: 0 — байкальская вода с глубины 5 м; 1 — «обедненная»; 2 — «обогащенная» фракции; dw — дистиллят; а — спектры $F(\lambda)$, нормированные на пик комбинационного рассеяния в воде; б — разностные спектры $F'_j(\lambda)$, $F'_j(\lambda) = F_j(\lambda) - F_{dw}(\lambda)$ ($j = 0, 1, 2$)

Разделение на фракции проводилось путем центрифугирования проб в течение 15–20 мин при частоте вращения 1000 об./мин (3–5 г). При этом происходило ускоренное осаждение взвеси. Центрифуга охлаждалась проточной водой для поддержания температуры вблизи 7 °С. После остановки центрифуги байкальская вода разделялась на две фракции («обедненную» и «обогащенную» взвесью) в объемном соотношении 3 : 1.

Интенсивность свечения «обедненной» фракции I_1 измерялась в течение 1 ч непосредственно сразу после центрифугирования. Свечение небольшого объема «обогащенной» фракции I_2 измерялось в течение 15 мин с целью получения оценки I_2 . Затем объем пробы при помощи «обедненной» фракции доводился до 1000 мл и проводилось измерение интенсивности свечения смеси фракций I_3 . Параллельно с этим измерялись спектры флуоресценции исходной пробы, фракций и смеси. Общее время проведения

комплекса измерений с одной пробой составляет 3–4 ч.

Спектры флуоресценции примесей $F(\lambda)$ (рис. 1, б) рассчитаны как разность нормированных результатов измерений с байкальской и дистиллированной водой $F'(\lambda) = F(\lambda) - F_{\text{дв}}(\lambda)$. Спектры $F(\lambda)$ и $F'(\lambda)$ для смеси фракций не приводятся ввиду их близости к соответствующим спектрам для исходной пробы. В области $\lambda < 650$ нм спектры примесей практически совпадают и значимо различаются выше этой границы. Флуоресценция для $\lambda < 650$ нм обусловлена растворенными органическими веществами (РОВ) [11]. Гладкая форма разностных спектров в районе пика КР указывает на корректность процедуры нормировки и вычитания. Максимумы вблизи $\lambda = 680$ нм и различия спектров в диапазоне 660–750 нм обусловлены хлорофиллом, локализованным во взвеси, и различной его концентрацией в исходной пробе и фракциях.

Для оценки концентрации хлорофилла во взвеси $C_{\text{хл}}$ (в относительных единицах) мы используем величину пика флуоресценции примесей при $\lambda = 680$ нм за вычетом экстраполированного из области $\lambda < 650$ нм значения интенсивности флуоресценции растворенного вещества:

$$C_{\text{хл}} \sim \Delta F = F'(680 \text{ нм}) - F'_{\text{РОВ}}(680 \text{ нм}).$$

Флуоресценция проб байкальской воды с глубин 10, 25, 100, 150, 200, 250 м в максимуме излучения хлорофилла была мала ($\Delta F_0/\sigma \sim 1 \div 3$). Это не позволило провести полноценный корреляционный анализ данных. Интенсивность спонтанного свечения проб меньше 150 с^{-1} . Вместе с тем центрифугирование воды с указанных выше горизонтов также приводит к фракционированию. Отношение интенсивностей свечения «обогащенной» и «обедненной» фракций для них находилось в диапазоне 3–6. Аналогичный результат получен также для проб, отобранных со стандартного набора глубин 07.12.2010 г., с начальной интенсивностью свечения $33\text{--}115 \text{ с}^{-1}$.

Для количественных оценок мы использовали результаты измерений флуоресценции и интенсивности свечения проб с глубин 0, 5, 50 м с высоким отношением сигнал-шум: $\Delta F_0/\sigma > 10$, $I_0 > 250 \text{ с}^{-1}$ (таблица).

Статистическая погрешность измерений интенсивности свечения не превышает $\pm 1 \text{ с}^{-1}$, положение максимумов I_j определяется не хуже $\pm 5 \text{ с}^{-1}$ (в таблице не указаны). Объем «обогащенной» фракции для разных проб составил 300–400 мл. Для получения сопоставимых данных необходимо пересчитать измеряемое значение интенсивности свечения «обогащенной» фракции \tilde{I}_2 на стандартный объем. При этом погрешность определения I_2 , обусловленная неопределенностью параметров эксперимента (коэффициента и характера отражения интегрирующей сферы, спектрального поглощения в стекле колбы и водной среде, угловой чувствительности фотокатода ФЭУ, геометрии) может достигать 30–50%. Поэтому данные по I_2 в таблице приведены только для полноты представления и в дальнейших оценках не используются.

Во второй строке таблицы, относящейся к каждой глубине, приводятся отношения измеренных величин к начальным значениям. В круглых скобках даны ожидаемые по результатам измерений ΔF_1 , ΔF_2 относительные значения интенсивности флуоресценции смеси $-\Delta F_3/\Delta F_0$:

$$\Delta F_3 = (V_1\Delta F_1 + V_2\Delta F_2)/(V_1 + V_2),$$

где V_1 и V_2 – объемы смешиваемых фракций.

Относительная статистическая погрешность флуоресцентных измерений $\sigma/\Delta F_0 \sim 10\%$. Отклонения измеренных и рассчитанных по объемным пропорциям значений $\Delta F_3/\Delta F_0$ лежат внутри доверительного интервала и не превышают 5%, что говорит о надежности представленных данных.

Анализ материалов таблицы позволяет сделать следующие выводы:

– интенсивность свечения «обедненной» фракции уменьшается до 27–46% исходного значения интенсивности свечения байкальской воды; после смешивания фракций интенсивность свечения повышается до 58–86% уровня, т.е. увеличивается примерно в 2 раза;

– диапазон изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла во фракциях для условий центрифугирования и разделения составляет 0,14–1,85 от первоначального значения;

Значения в пике флуоресценции хлорофилла ΔF ($\lambda = 680$ нм) и интенсивность свечения байкальской воды I

Глубина, м	ΔF_j , отн. ед.				I_j , с^{-1}			
	$(\Delta F_j/\Delta F_0)$, отн. ед.				(I_j/I_0) , отн. ед.			
	$j = 0$	1	2	3	$j = 0$	1	2	3
0	33,1 ± 3,2	15,9 ± 2,9	56,3 ± 3,3	34,3 ± 3,3	255	117	(290)	219
	1,00	0,48	1,70	1,04 (1,03)	1,00	0,46	1,13	0,86
5	43,5 ± 3,5	19,9 ± 3,5	64,4 ± 2,1	40,7 ± 2,8	616	254	(720)	401
	1,00	0,46	1,48	0,94 (0,98)	1,00	0,41	1,17	0,65
50	37,4 ± 2,8	5,4 ± 2,5	69,0 ± 5,3	29,0 ± 4,2	318	85	(420)	185
	1,00	0,14	1,85	0,78 (0,79)	1,00	0,27	1,32	0,58

Примечание. 0 – исходная проба; 1 – «обедненная» фракция; 2 – «обогащенная» фракция; 3 – смесь фракций. В круглых скобках приведены расчетные значения.

– интенсивность свечения коррелирует с флуоресценцией хлорофилла в исследованных образцах байкальской воды с коэффициентом $r = 0,92 \pm 0,04$.

Соответствующее уравнение линейной регрессии для данных, нормированных на начальные значения (рис. 2), имеет вид

$$I/I_0 = (0,81 \pm 0,05)\Delta F/\Delta F_0 + (0,08 \pm 0,04).$$

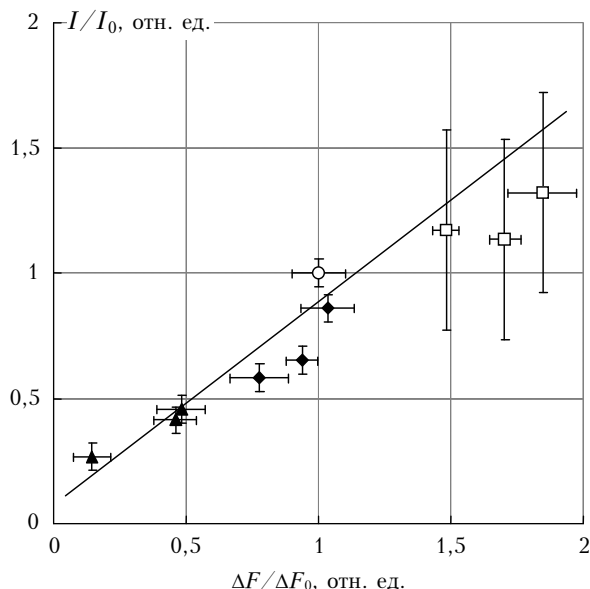


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности спонтанного свечения фракций байкальской воды от уровня флуоресценции взвеси при $\lambda = 680$ нм. Кружки – исходные пробы с глубин 0, 5, 50 м; треугольники – «обедненная», квадраты – «обогащенная» фракции (значения I/I_0 для «обогащенной» фракции получены оценочным путем); ромбы – смесь фракций; прямая – аппроксимация данных непосредственных измерений (диапазон $I/I_0 \leq 1$) по методу наименьших квадратов

При вычислении коэффициентов уравнения регрессии использованы результаты измерений интенсивности свечения проб в идентичных условиях (I_0, I_1, I_3). Как можно видеть на рис. 2, оценочные значения I_2 , полученные по результатам измерений свечения малых объемов «обогащенной» фракции, в целом согласуются с видом функциональной зависимости (в пределах погрешности оценки).

Результаты эксперимента позволяют предположить, что основной вклад (~80%) в свечение исследованных проб воды вносят источники, ассоциированные с взвесью, содержащей хлорофилл. Отклонение значения правой части уравнения от единицы при $I = I_0$ и $\Delta F = \Delta F_0$ на величину -2σ может объясняться неконтролируемой в длительном эксперименте дезактивацией части источников свечения при проведении процедур переливания, центрифугирования, извлечения и смешивания фракций.

Статистический характер зависимости $I(\Delta F)$ не позволяет в настоящее время сделать однозначный вывод об источниках наблюдаемого в эксперименте свечения байкальской воды. Это могут быть процессы, обратные разделению зарядов в тилакоидных

мембранах хлоропластов водорослей, выделение ими активных форм кислорода под действием стрессовых факторов и запуск хемилюминесцентных реакций, свечение сапрофитных бактерий, питающихся отмершими водорослями. Можно утверждать только, что источники свечения локализованы во взвеси, поскольку глубина фракционирования увеличивается со временем осаждения при центрифугировании проб.

Таким образом, впервые экспериментально обнаружена взаимосвязь интенсивности спонтанного свечения байкальской воды с флуоресценцией взвеси для $\lambda = 680$ нм. Уточнение функциональной зависимости $I(\Delta F)$, а также проведение измерений с использованием стандартизированных методов определения концентрации хлорофилла и видового состава фитопланктона планируются в серии совместных экспериментов с гидробиологами Лимнологического института СО РАН и Иркутского государственного университета.

Автор благодарит Н.А. Иванову за всемерную поддержку данного направления исследований, Н.М. Буднева за постоянное внимание к работе, С.Н. Кирюхина за разработку конструкции и изготовление управляемого штормового затвора фотометра, Д.И. Стома за организацию регулярной доставки проб байкальской воды, Е.В. Евсюнину за техническую помощь при подготовке экспериментов, И.К. Петрушенко за содействие в освоении RF-5301PC, А.Э. Ржещичко за ценные предложения и полезные обсуждения полученных результатов.

Работа поддержана в рамках выполнения проекта № П1433 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

1. Безруков Л.Б., Буднев Н.М., Гальперин М.Д., Добрынин В.И., Дудкин Г.Н., Зурбанов В.Л., Кохомский А.Г., Никифоров С.А., Полещук В.А., Шерстянкин П.П., Шестаков А.А. О свечении глубинных вод оз. Байкал // Докл. АН СССР. 1984. Т. 277, № 5. С. 1240–1244.
2. Добрынин В.И. Свечение водной среды озера Байкал и экологический мониторинг // Мониторинг и оценка состояния Байкала и Прибайкалья. Л.: Гидрометеоиздат, 1991. С. 79–85.
3. Добрынин В.И. Свечение водной среды как источник фона для нейтринных телескопов на озере Байкал: Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М.: Ин-т ядерных исследований РАН, 1993. 132 с.
4. Безруков Л.Б., Буднев Н.М., Гресс О.А., Гуштан Н.М., Дудкин Г.Н., Добрынин В.И., Максимов В.Н., Максимова Э.А., Поколев П.А. Свечение водной среды оз. Байкал – инструмент исследования динамики озера // Изв. РАН. Физ. атмосф. и океана. 1998. Т. 34, № 1. С. 97–103.
5. Добрынин В.И., Евсюнина Е.В., Быбин В.А. Люминесценция некоторых групп микроорганизмов // Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М. Кожова: Тез. докл. Междунар. науч. конф. (Иркутск, 20–25 сентября 2010 г.). Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. С. 405.
6. Белолепников И.А., Безруков Л.Б., Борисовец Б.А., Буднев Н.М., Виебуш К., Вишневыски Р., Гапоненко О.Н., Гарус А.А., Гресс О.А., Гресс Т.И., Данильченко И.А., Джилкибаев Ж.А.М., Добрынин В.И., Домогацкий Г.В.,

- Дорошенко А.А., Игнатьев С.Б., Карле А., Клабуков А.М., Климов А.И., Климушин С.И., Кошечкин А.П., Кулепов В.Ф., Кузмичев Л.А., Ловцов С.В., Лубсандоржиев Б.К., Максимов В.Н., Максимова Э.А., Миленин М.Б., Миколайски Т., Миргазов Р.Р., Мосейко Н.И., Мороз А.В., Никифоров С.А., Осипова Э.М., Павлов А.А., Панфилов А.И., Парфенов Ю.В., Петухов Д.П., Поколев П.А., Почейкин К.А., Похил П.Г., Розанов М.И., Рубцов В.Ю., Синеговский С.И., Сокальский И.А., Таращанский Б.А., Тон Т., Фиалковский С.В., Хойкенкамт Г., Ченский А.Г., Шпиринг К., Штрайхер О. О нестационарности потоков глубинных байкальских вод по данным нейтринного телескопа // Изв. РАН. Физ. атмосфер. и океана. 1998. Т. 34, № 1. С. 90–96.
7. Добрынин В.И. Сверхслабая люминесценция природных вод // Пятая Верещагинская байкальская конф.: Тез. докл. и стендовых сообщений (Иркутск, 4–9 октября 2010 г.). Иркутск: Изд-во «АСПРИНТ», 2010. С. 221–223.
8. Добрынин В.И., Краснояров А.Е., Ченский А.Г. Лабораторный фотометр для исследования слабого свечения водных сред // Вестн. ИрГТУ. 2010. № 5. С. 341–345.
9. Буднев Н.М., Коханенко Г.П., Миргазов Р.Р., Таращанский Б.А. Численное моделирование аномальных пространственных распределений освещенности, получаемых в ходе измерений показателя поглощения света байкальской водой // Оптика атмосф. и океана. 2006. Т. 19, № 4. С. 351–359.
10. Измestьева Л.Р., Шимараева С.В. Многолетние изменения содержания хлорофилла в пелагиали Южного Байкала в период прямой температурной стратификации // Экосистемы и природные ресурсы горных стран. Новосибирск: Наука, 2004. С. 77–81.
11. Горшкова 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. 31–37.

V.I. Dobrynin. Correlation of Baikal water luminescence with chlorophyll fluorescence.

A correlation of Baikal water spontaneous luminescence intensity with the water samples fluorescence at $\lambda = 680$ nm is discovered. The main luminescence source at depths of 0, 5, and 50 m according to experimental data is a suspended substance containing chlorophyll.