

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова**

Кафедра химии почв

**Применение флуоресцентной спектроскопии для изучения органических
веществ речных вод (на примере Москвы реки)**

*Using of Fluorescence Spectroscopy to Study Organic Substances
in the River Water (Exemplified by the Water of Moscow River)*

Выполнил: студент 4-го курса факультета
почвоведения Коновалов Алексей.

Научный руководитель:

К.б.н., доцент Караванова Елизавета Ильинична.

Москва, 2015 г.

1. АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

Метод флуоресцентной спектроскопии является прогрессивным методом исследования, который применяется в самых разных областях науки и находит широкое практическое применение (биоиндикация, мониторинг загрязнения водных объектов, гидрогеологические исследования, оценка состояния растений, эффективности процессов фотосинтеза).



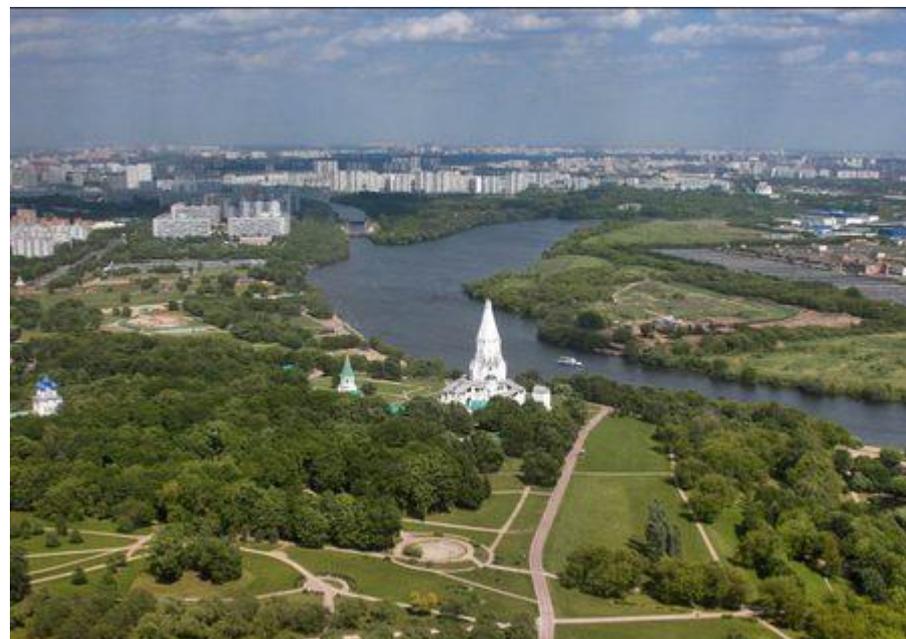
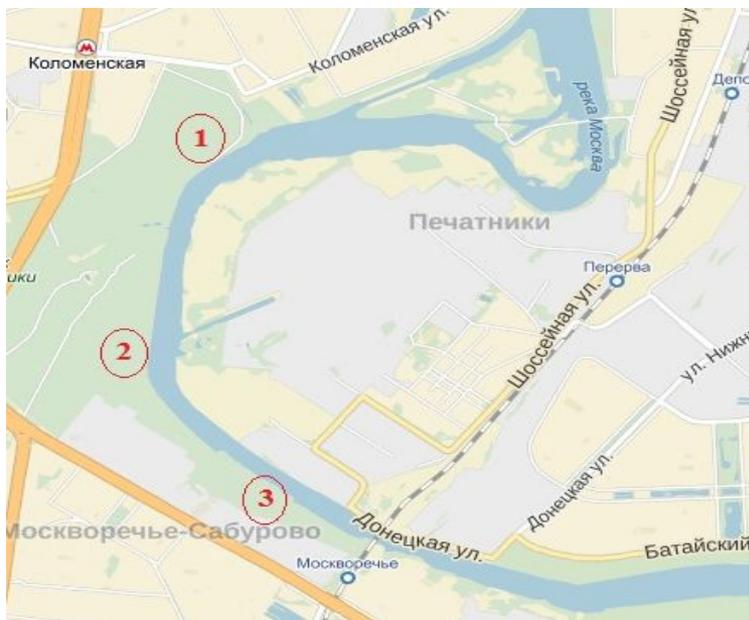
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью работы является оценка возможностей использования метода флуоресцентной спектроскопии (ФС) для изучения ОВ поверхностных вод (на примере Москвы реки).

Задачи:

1. Установить возможность определения присутствия в речной воде веществ белковой природы, являющихся диагностическим признаком примеси сточных вод коммунально-бытового происхождения на основе анализа модельных смесей «фоновая речная вода-сточная вода».
2. Исследовать в динамике воды р. Москвы в районе Коломенское и с помощью спектров флуоресценции оценить степень их загрязнения протеиносодержащими веществами.
3. Выявить связи между некоторыми диагностическими показателями загрязнения (ХПК, БПК, содержание аммонийного азота, фосфат-ионов) и параметрами флуоресценции речных вод (интенсивностью и диапазонами длин волн).

Объекты: воды Москвы-реки в районе Московского Государственного Объединённого Музея-Заповедника “Коломенское”.



Расположение точек пробоотбора.

Образцы отбирались в трёх створах: условно фоновом (т.1), в районе сброса очищенных вод с Курьяновской Станции Аэрации (т.2), и ниже места сброса по течению (т.3).

Общее число проб: 19.

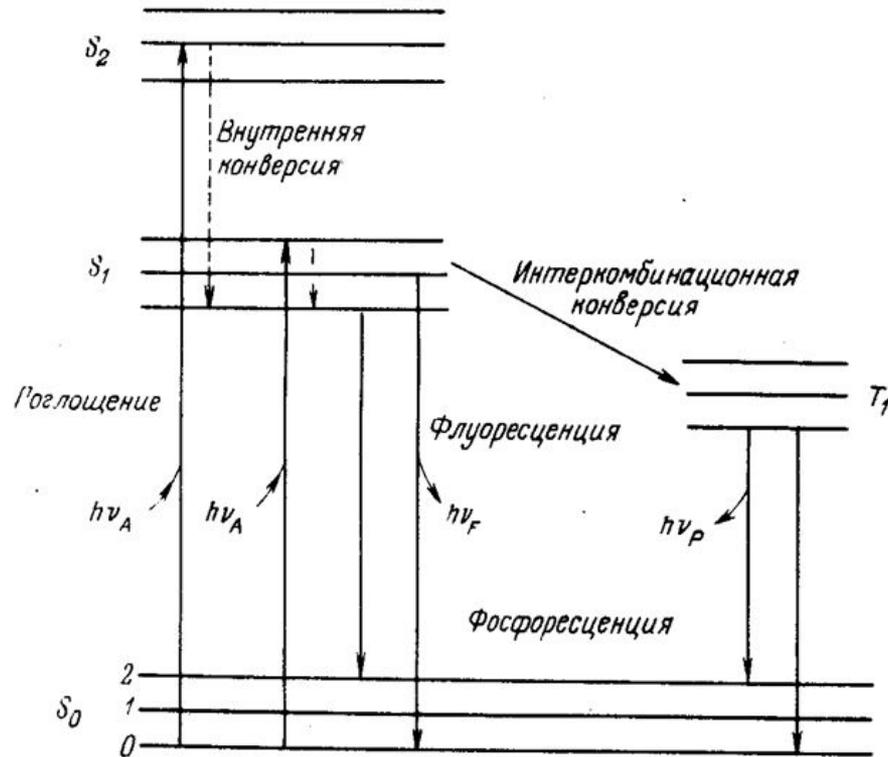
Период пробоотбора: с 12.10.14 по 16.11.14 (еженедельно).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Флуоресценция – свечение вещества после воздействия на него излучением, возникающее при возвращении в основное состояние возбуждённых электронов.

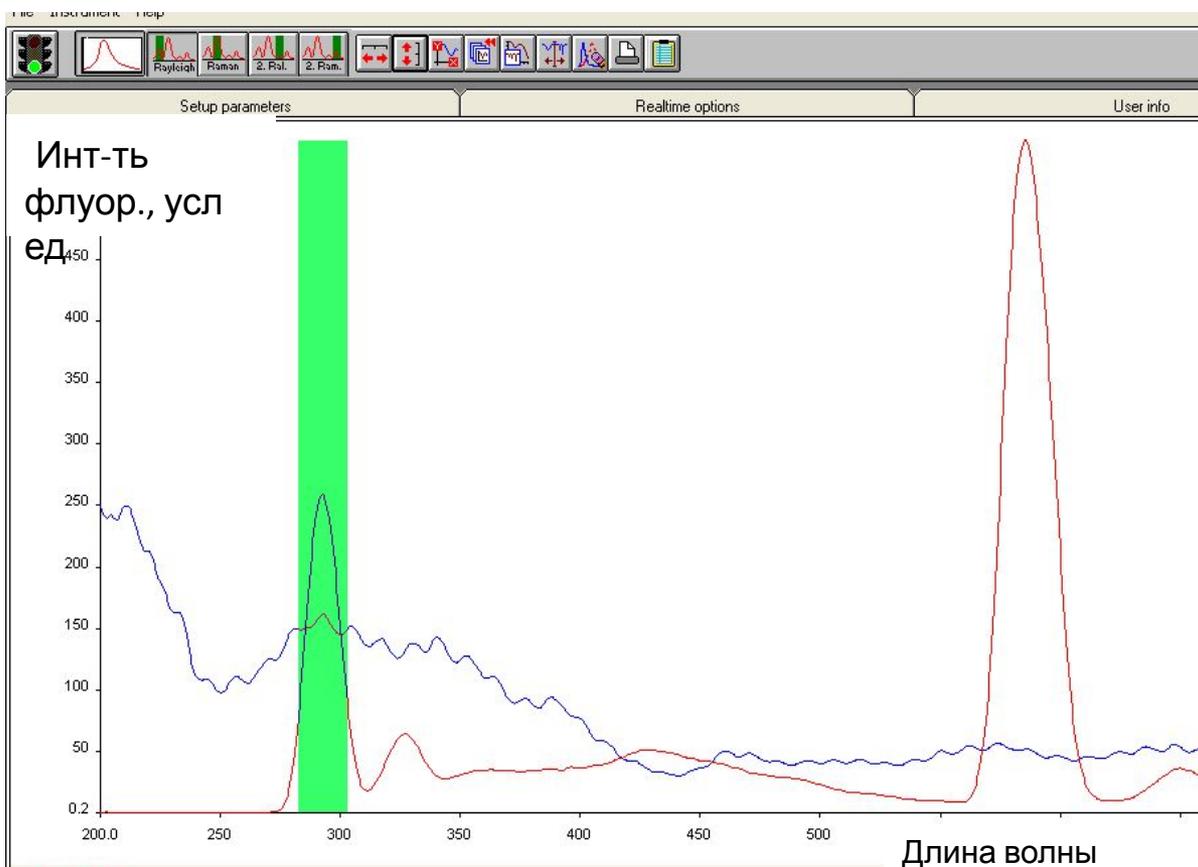
Наиболее склонны к флуоресценции вещества, имеющие систему сопряжённых связей, простые ароматические соединения, вещества с наличием электронодонорных соединений в бензольном кольце, а также соединения с наличием конденсированных ароматических колец.



Метод позволяет определять природу присутствующих в природной воде органических веществ, некоторые их характеристики и концентрации

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная характеристика флуоресценции - **Спектр испускания (эмиссии)** - зависимость интенсивности испускаемого света от его длины волны при фиксированной длине волны возбуждающего света.



Спектр испускания(выделен красным).

Условия съемки спектров

эмиссии: скорость развертки спектра 500 нм/мин, ширина щели монохроматоров 10 нм, область эмиссии 200-627,5 нм; длины волн возбуждения - 230, 254, 290, 310 нм

Диагностические показатели:

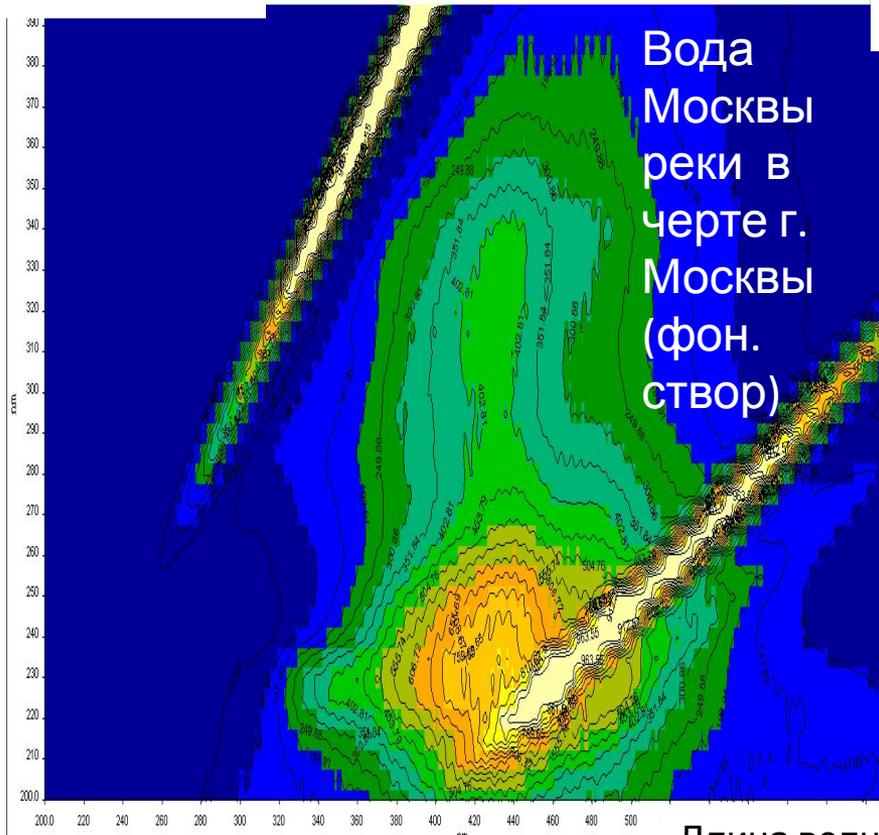
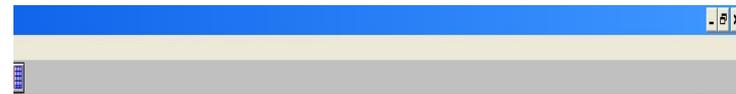
Присутствие и интенсивности флуоресценции ГК, ФК, тирозина и триптофана (А, В, С, Т1, Т2); расчетные индексы NIX, VIX

Наиболее комплексная характеристика флуоресценции вещества: матрица ЕЕМ

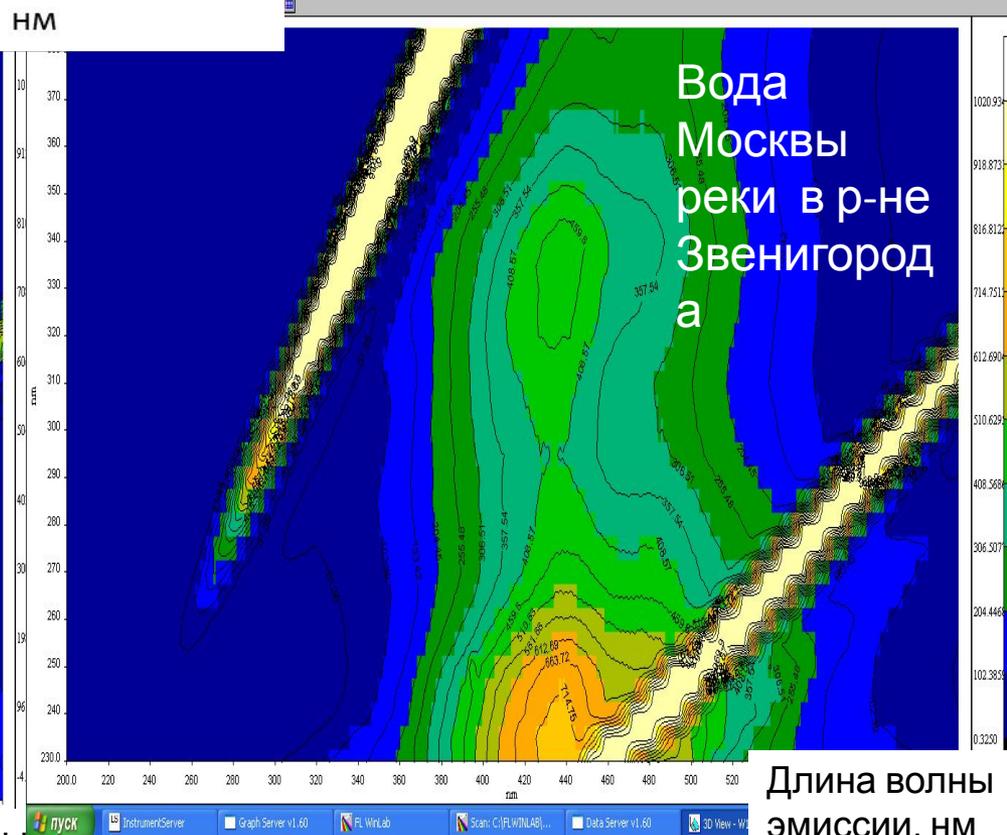
Длина волны возбуждения, нм



Длина волны возбуждения, нм



Вода
Москвы
реки в
черте г.
Москвы
(фон.
створ)



Вода
Москвы
реки в р-не
Звенигор
а

Длина волны
эмиссии, нм

Длина волны
эмиссии, нм

Разным цветом показаны области с разной интенсивностью флуоресценции

ДРУГИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. Метод молекулярной спектрометрии в УФ-видимой области спектра (определение коэффициентов экстинкции в диапазоне 254-450 нм)

3. Метод бихроматометрии (определение ХПК, (ГОСТ 31859-2012))

4. Манометрический метод (определение БПК), с помощью установки Oxitor 110

5. Метод ионообменной хроматографии (определение содержания ионов NH_4^+ и PO_4^{2-})

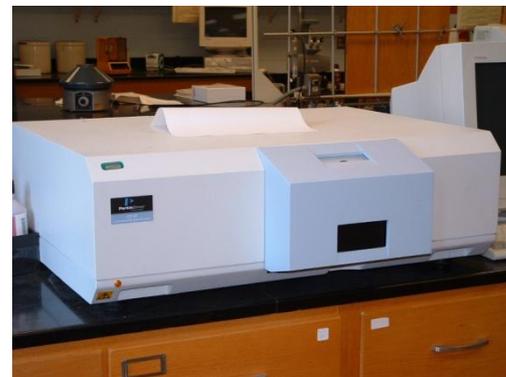
6. Метод гель-хроматографии (определение молекулярных масс органических веществ)



Установка Oxitor



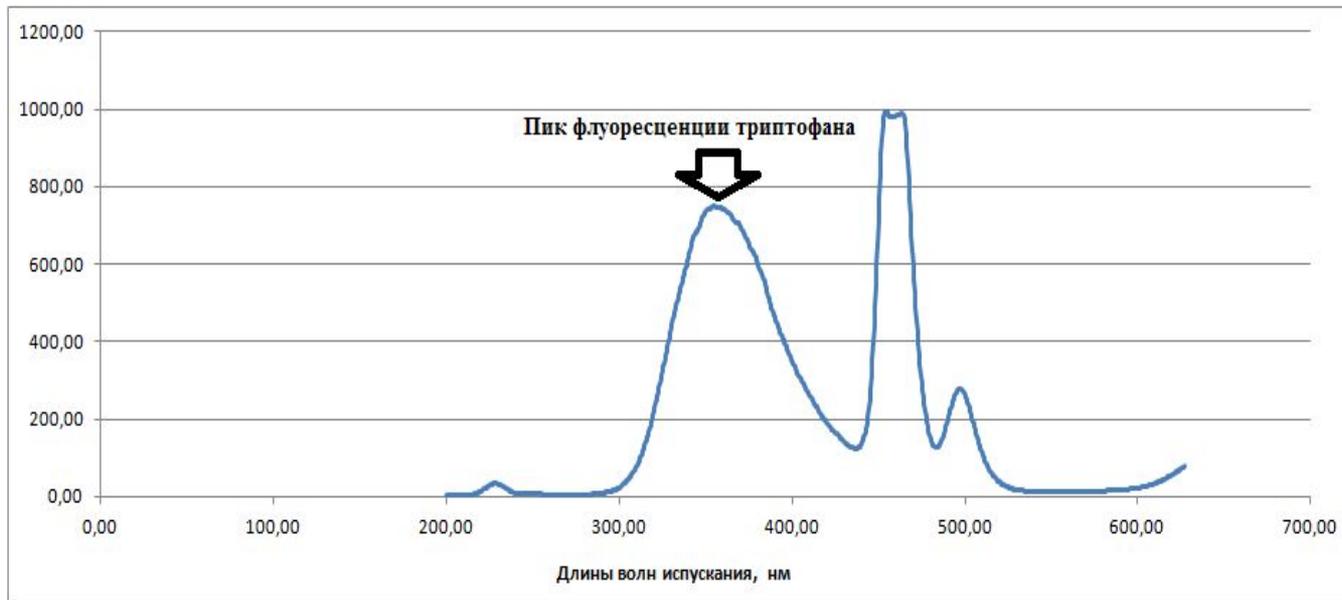
CF - 2000



Флуоресцентный спектрометр Perkin Elmer LS - 45

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ.

1. **Пик А** - связан с присутствием **гуминовых кислот** (проявляется при длине волны возбуждающего света (далее – l_{ex}) 230 нм и длинах волн испускаемого света (далее – l_{em}) 400-500нм.
2. **Пик С** – связан с присутствием **фульвокислот**, $l_{ex}/l_{em} = 350/400-500$ нм.
3. **Пик В** - связанный с присутствием аминокислоты **тирозина**: $l_{ex}/l_{em} = 230/310$ нм.
4. **T1 и T2** - пики, связанные с присутствием аминокислоты **триптофана** ; $l_{ex}/l_{em} = 290/350$ нм и $l_{ex}/l_{em} = 230/350$ нм, соответственно. T1 и T2.



Спектр испускания, полученный при $l_{ex} = 350$ nm.

ИНДЕКСЫ ГУМИФИКАЦИИ (**НИХ1**, **НИХ 2**), БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНДЕКС **БИХ**

$$\text{БИХ} = \frac{I(380)}{I(430)}$$

Биологическая активность, органическое вещество микробной природы, белковые вещества

I – интенсивность флуоресценции на указанных длинах волн

$$I_{\text{ex}} = 310\text{nm}$$

$$\text{НИХ1} = \frac{\Sigma I(435 - 480)}{\Sigma I(300 - 345)}$$

Вещества гумусовой природы и степень их гумификации

ΣI – сумма интенсивностей флуоресценции на указанных длинах волн

$$I_{\text{ex}} = 254\text{ nm}$$

БИХ > 1



БИХ < 1



НИХ > 10

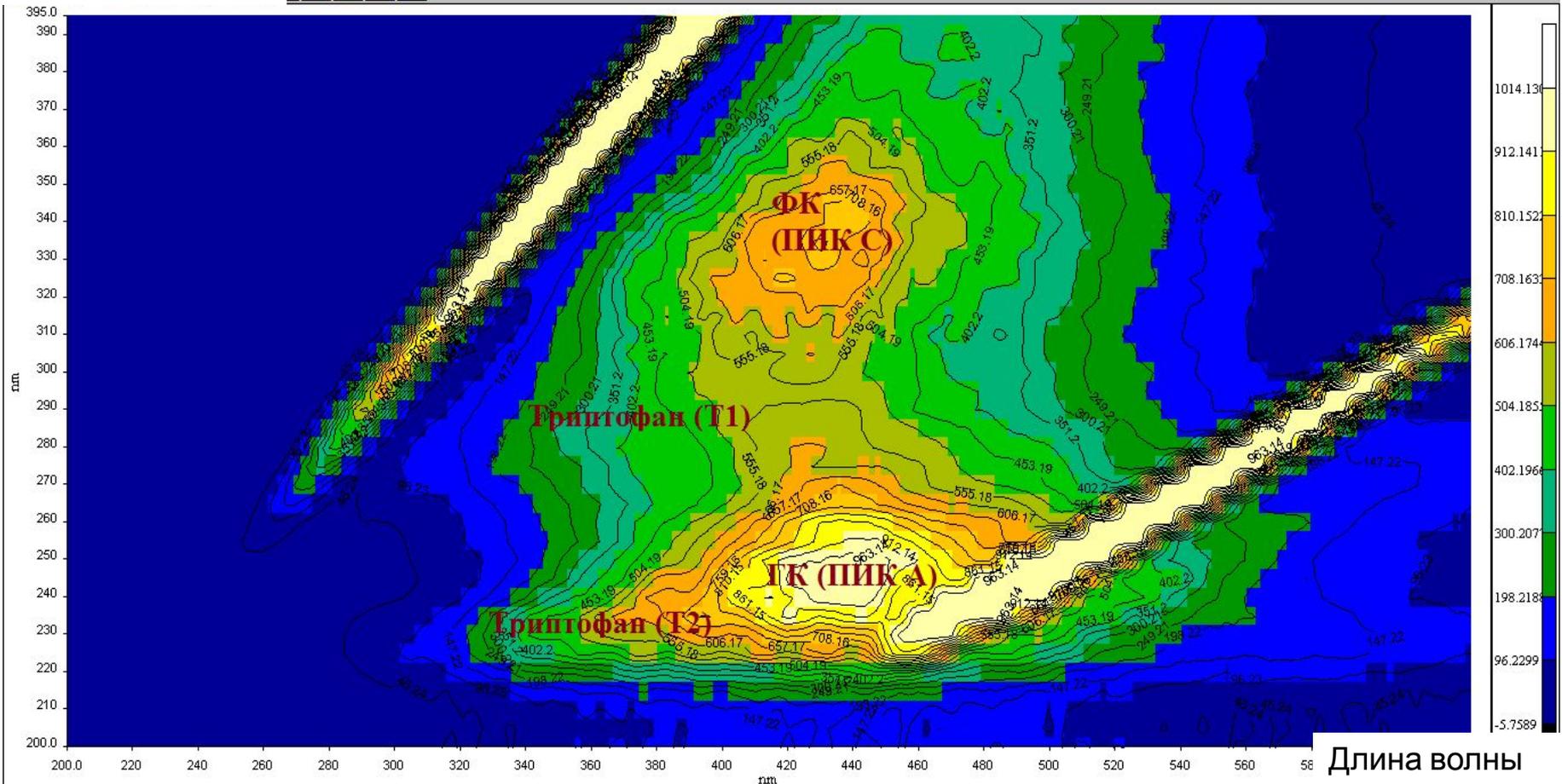


НИХ < 4



Типичные флуорофоры, присутствующие в исследуемых водах:

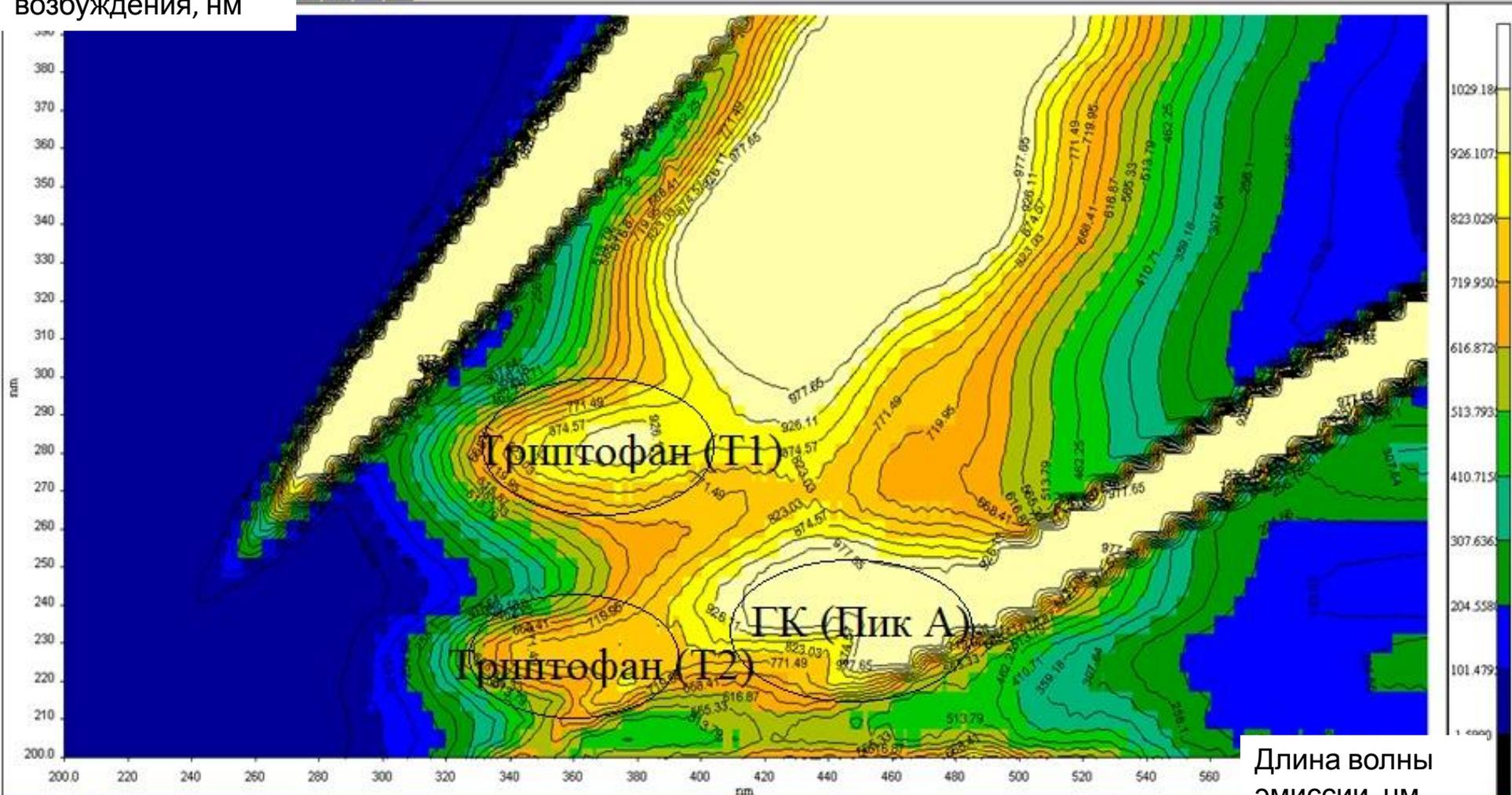
Длина волны
возбуждения, нм



Типичные флуорофоры, обнаруженные в жидкой фазе очищенного и промытого осадка сточных вод

3D View - WASHED-1.SP3

Длина волны возбуждения, нм



Длина волны ЭМИССИИ, нм

ДАННЫЕ АНАЛИЗА ГЕНЕРАЛЬНОЙ СОВОКУПНОСТИ:

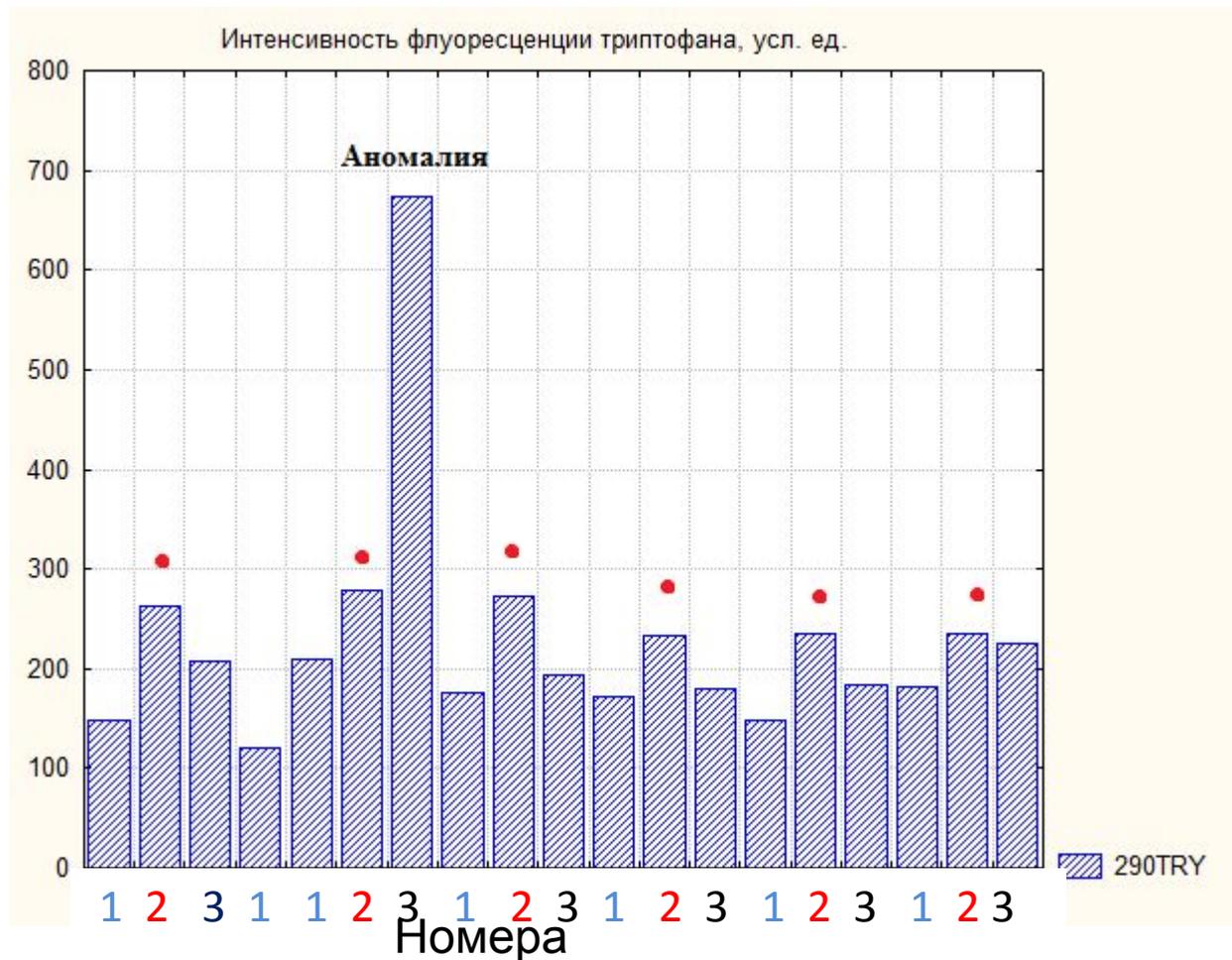
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	БПК	ХПК	С, мг/л	NH ₄	PO ₄	230Ahumic	230TIR	230TRY	290TRY	254	280	285	300	400	436	HIX 1	HIX2	BIX
1	3,6	34,35897	12,88462	0,1	0,032	746	59	360	149	0,014475	0,010144	0,009399	0,007109	0,001226	0,00073	15,41132	0,939066	0,640289
2	9	46,41026	17,40385	8,43	2,005	691	100	440	262	0,012359	0,009475	0,008895	0,007108	0,001201	0,000942	6,0556	0,858269	0,787338
3	4,2	32,82051	12,30769	2,1	0,79	739	83	410	207	0,016169	0,011862	0,011091	0,008799	0,001601	0,001056	10,63555	0,914056	0,726863
4	4,5	22,82051	8,557692	0,1	0	616	46	285	121	0,021653	0,015214	0,014151	0,01068	0,000795	0,000666	18,32704	0,948259	0,634201
5	7	20,76923	7,788462	0,1	0	855	104	542	210	0,024793	0,017449	0,015985	0,012069	0,001618	0,00086	11,51463	0,920094	0,674516
6	8,1	28,71795	10,76923	7,97	2,526	746	108	487	279	0,018896	0,013956	0,013028	0,010205	0,001996	0,001504	11,62987	0,920823	0,758227
7	11,2	43,07692	16,15385	0,1	1,122	750	103	426	674	0,011892	0,0085	0,007819	0,006048	0,000823	0,000483	12,22974	0,924413	0,713212
8	1	28,97436	10,86538	0,1	0	768	81	468	176	0,016962	0,012029	0,011081	0,008394	0,001758	0,00115	12,45091	0,925656	0,666852
9	1	28,46154	10,67308	10,92	2,264	750	126	506	273	0,019863	0,015366	0,014326	0,011534	0,00193	0,001396	10,05064	0,909507	0,78597
10	3	19,23077	7,211538	0,1	0,65	690	97	437	193	0,027692	0,020315	0,018762	0,014699	0,003647	0,002468	12,62406	0,9266	0,706622
11	0	46,15385	17,30769	0,1	0	719	99	435	171	0,01088	0,007644	0,006968	0,005344	0,000728	0,000682	8,469707	0,8944	0,663992
12	0	52,5641	19,71154	9,48	0,982	660	98	408	234	0,010101	0,007544	0,007011	0,005535	0,000685	0,000553	10,19503	0,910675	0,754126
13	1,1	52,30769	19,61538	4	0,263	685	81	406	179	0,009263	0,00675	0,006189	0,004767	0,000683	0,000336	11,35566	0,919065	0,710337
14	3,9	58,46154	21,92308	0,1	0	638	66	387	149	0,008315	0,006016	0,005506	0,004219	0,000666	0,000456	12,0157	0,92317	0,665801
15	1,7	64,87179	24,32692	13,47	1,812	672	99	442	235	0,008887	0,006926	0,006429	0,005204	0,000941	0,000765	10,13707	0,91021	0,752608
16	0,6	58,46154	21,92308	6,85	5,973	610	76	381	184	0,009579	0,00759	0,006974	0,005351	0,000958	0,000826	12,62388	0,926599	0,715372
17	0,8	64,87179	24,32692	0,1	0,374	690	78	455	182	0,006376	0,004353	0,00393	0,002803	0,000082	0,000164	10,75461	0,914927	0,671966
18	5,3	78,46154	29,42308	13,08	1,648	548	83	354	236	0,005805	0,004194	0,003864	0,002852	0,000401	0,000425	9,921694	0,908439	0,746232
19	1,7	78,97436	29,61538	8,08	1,482	575	84	384	225	0,005602	0,003995	0,003654	0,002708	0,000422	0,000338	9,957693	0,90874	0,730611

Содержание иона аммония в воде в точках ниже места сброса очищенных вод превышает ПДК как для рыбохозяйственных, так и для культурно-бытовых и хозяйственно-питьевых водоёмов (**2 мг/л**).

Содержание фосфат-иона за исключением одного образца (**5,93 мг/л**) не превышает ПДК (**3,5 мг/л**), хотя в пробах в месте сброса содержание фосфата явно повышено.

Норматив БПК для речных вод – **4 мг/л**, норматив ХПК – **30 мг/л**, эти значения также превышены в значительной части проб.

Интенсивность флуоресценции триптофана в водах (практически все максимумы – в точках сброса вод – **створ 2**)



1 – фоновый створ; 2 - створ в зоне сброса; 3- контрольный створ, 1500 м ниже по течению

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ

между показателями флуоресценции и

показателями загрязнения вод

(коэфф. Спирмена):

	БПК	ХПК	С, мг/л	NH4	PO4	230TIR	230TRY	290TRY	254	280	285	300	400	436	HIX1	HIX2	BIX
БПК	1,00																
ХПК		1,00															
С, мг/л			1,00														
NH4				1,00													
PO4				0,77	1,00												
230TIR						1,00											
230TRY						0,70	1,00										
290TRY						0,81		1,00									
254		-0,98	-0,98						1,00								
280		-0,97	-0,97						0,99	1,00							
285		-0,96	-0,96						0,99	0,99	1,00						
300		-0,96	-0,96						0,99	0,99	1,00	1,00					
400		-0,80	-0,80				0,53		0,85	0,89	0,88	0,88	1,00				
436		-0,71	-0,71				0,52		0,79	0,83	0,82	0,82	0,96	1,00			
HIX1		-0,47	-0,47	-0,62		-0,50		-0,46							1,00		
HIX2		-0,47	-0,47	-0,62		-0,50		-0,46								1,00	
BIX				0,67	0,86	0,65		0,87							-0,59	-0,59	1

ПРИНЦИПЫ ОБЪЕДИНЕНИЯ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ В ВЫБОРКИ (ОБЪЕМ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЫБОРОК)

1. **ФОН (1)** / **МЕСТО СБРОСА (2)** / НИЖЕ ПО ТЕЧЕНИЮ (3) (N1=7, N2=6, N3=6).
2. **ПЕРВЫЕ ТРИ НЕДЕЛИ ПРОБООТБОРА** / **ВТОРЫЕ ТРИ НЕДЕЛИ**
ПРОБООТБОРА (N1=10, N2=9).

Динамика содержания и свойств органических веществ в водах

- 1. Вся выборка делится на две части: **в первые три недели** для вод характерны высокие показатели БПК (Критерий Манна-Уитни $U=16, p=0,017$) и интенсивность флуоресценции гуминовых кислот ($U=8,5, p=0,003$), **во вторые три недели** выше валовое содержание углерода ($U=1,000, p=0,0003$).
- 2. БПК снижается со временем, что объясняется понижением температуры воды.
- 3. Интенсивность флуоресценции ГК (пик А) снижается в последние три недели пробоотбора одновременно с увеличением содержания Сорг в воде и снижением БПК (возможно, происходит изменение структуры и состава (соотношения) органического вещества).

Вторые 3 недели

Первые 3 недели

Первые 3 недели

Первые 3 недели

Вторые 3 недели

Вторые 3 недели

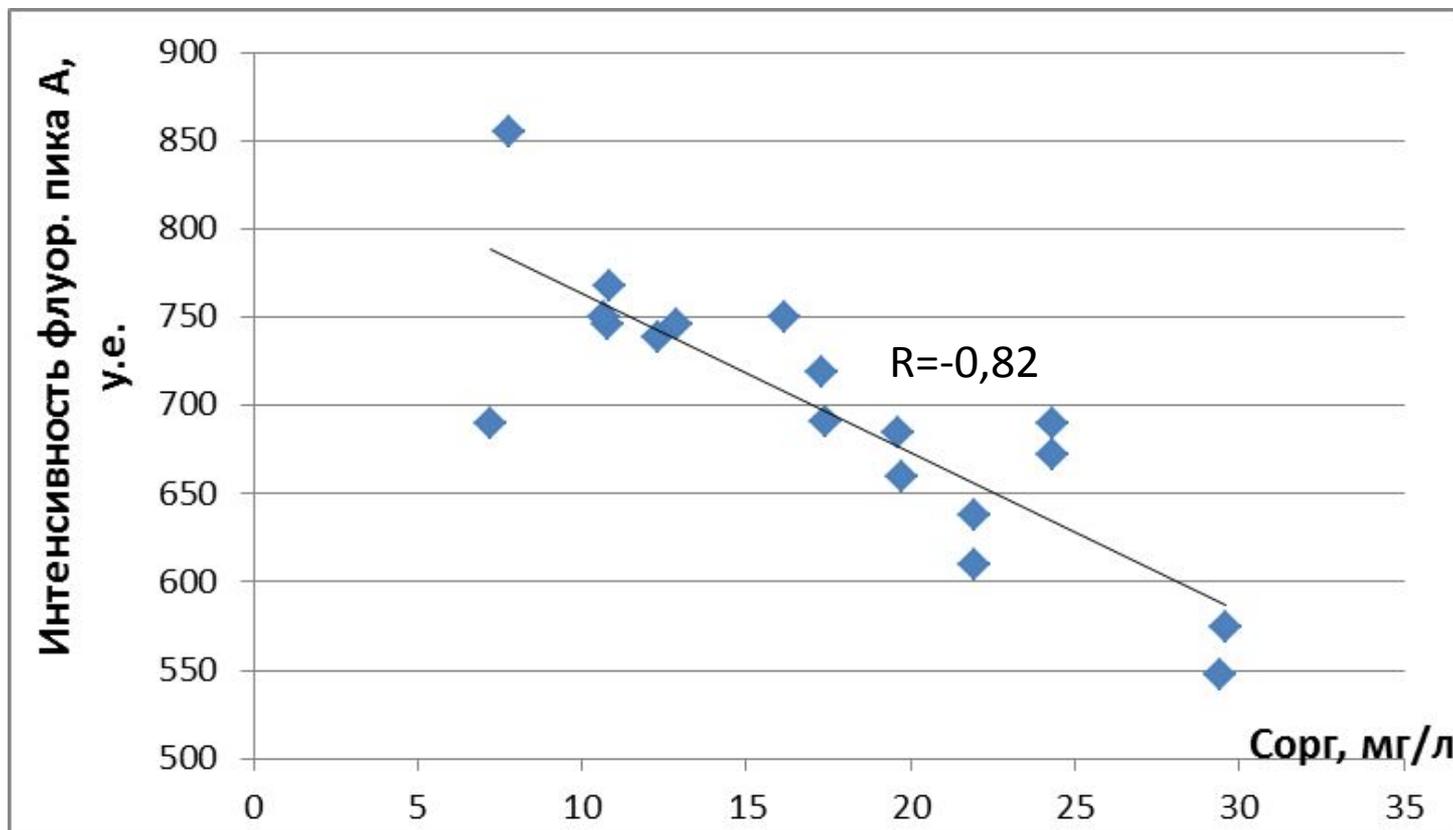
Орг. углерод

Разделители: I fluor ГК, БПК, Сорг, Еλ (λ= 254, 280, 285, 300, 400, 436 нм)

БПК, мг/л

Снижение флуоресценции ГК с увеличением общего содержания Сорг в речных водах

Обнаружены значимые отрицательные корреляции ($r=-0,82$, $N=19$, $p=0,05$) между содержанием в воде углерода и интенсивностью флуоресценции гуминовых кислот (пик А). Предположительно это связано с эффектом внутреннего фильтра (обусловленным образованием молекулярных ассоциатов или появлением других органических веществ), при котором молекулы вещества взаимно экранируют друг друга, тем самым мешая излучению.



Разделение вод по месту пробоотбора (степени загрязнения)

Выборка вод статистически значимо подразделяется на группы : **условный фон (створ 1) – место сброса (створ 2) – ниже по течению (створ 3)**, если в качестве переменных-разделителей брать содержание иона аммония, фосфата, интенсивность флуоресценции триптофана на длине волны 290 нм, а также индекс ВІХ. Это подтверждается критерием Манна-Уитни и может быть визуализировано с помощью кластерного анализа.

Зоны
загрязнени
я

Фон

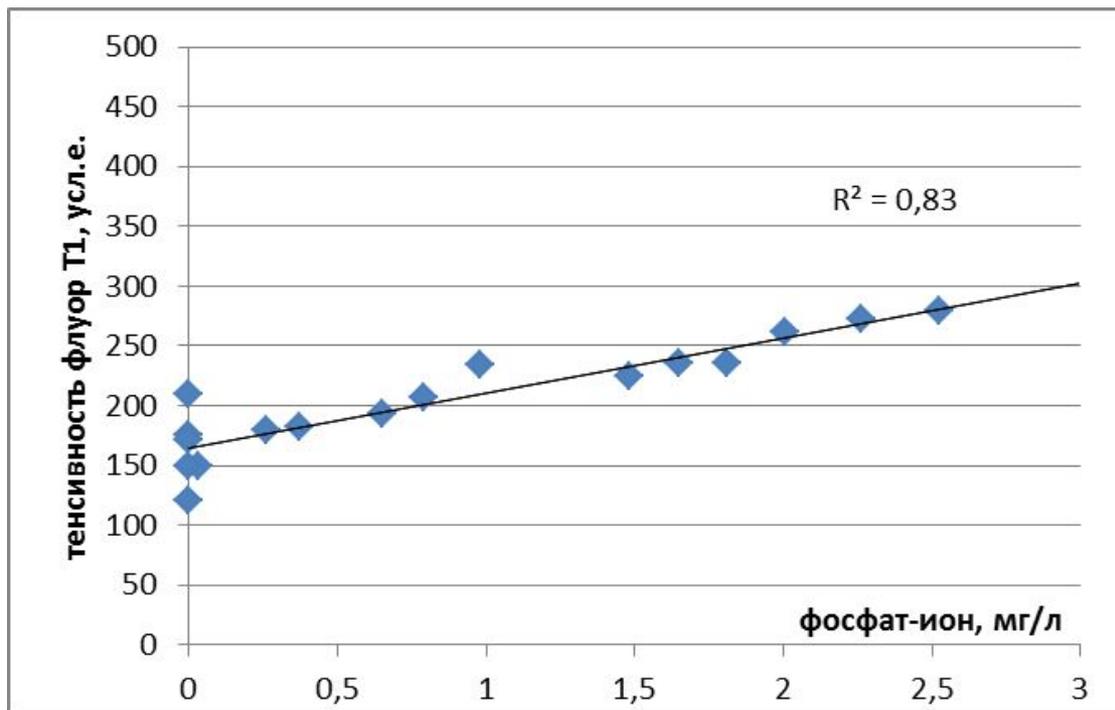
Зоны
загрязнени
я

Фон

NH₄, PO₄

ВІХ, 290 TRY

Связь между показателями флуоресценции (Т1) и содержанием фосфатов в речной воде



Выявлены также статистически значимые корреляции между флуоресценцией (интенсивностями пика Т и биологическим индексом ВІХ ($r=0,87$, $p=0,05$)), содержанием азота и фосфатов в воде ($p=0,05$, $r=0,87$): все эти параметры ощутимо выше в точках сброса очищенной воды.

Повышенное содержание в речной воде ионов NH_4^{4+} и PO_4^{2-}

Содержание иона аммония, мг/л

Содержание фосфат-иона, мг/л

ПДК

ПДК

1 2 3 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3

Номера створов

1 2 3 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3

Номера створов

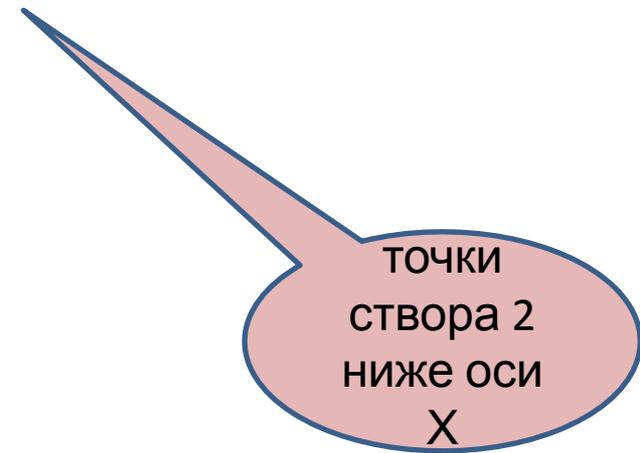
Связи показателей свойств и содержания органического вещества (1-я компонента), показателей загрязнения вод (2-я компонента) и динамики изменения свойств органического вещества в воде.

Вторые 3
недели

Первые 3
недели

Первая компонента разбивает выборку на две части: недели 1-3 и недели 1-6 (номера – недели пробоотбора)

Использование косвенных (спектральных) и прямых показателей загрязнения вод (в целом: **2-я компонента**) для диагностики источника загрязнения (места сброса).



Вторая компонента чётко выделяет из выборки все точки напротив створа сброса вод с очистных сооружений (**точки 2**)!

Оценка состояния вод по показателю А (отношение интенсивностей флуоресценции в области 300 и 425 нм)

Методика Андриановой для контроля биогенных загрязнений:
Вычисляют отношение:

$$X = \frac{I_{\text{флу}300}}{I_{\text{флу}425}}$$

для исследуемой пробы (X проба) и для фона (X фон), $\lambda_{\text{возб.}}=230 \text{ нм}$.

Загрязнение, т.е. превышение над фоном, оценивают по показателю А, превышения ПДК по иону аммония в точках сброса вод вычисляемому как

$$A = \frac{X_{\text{проба}} - X_{\text{фон}}}{X_{\text{фон}}}$$

Значение $A \leq 0$ соответствует отсутствию загрязнения, $0 < A \leq 1$ среднему загрязнению, $A > 1$ – сильному загрязнению.

Пробы, отобранные **в створах 2 и 3**, сильно биологически загрязнены: параметр $A > 1$ (для n=11 точек из 13). Факт превышения ПДК по иону аммония в точках сброса вод говорит о том, что методике **можно доверять**.

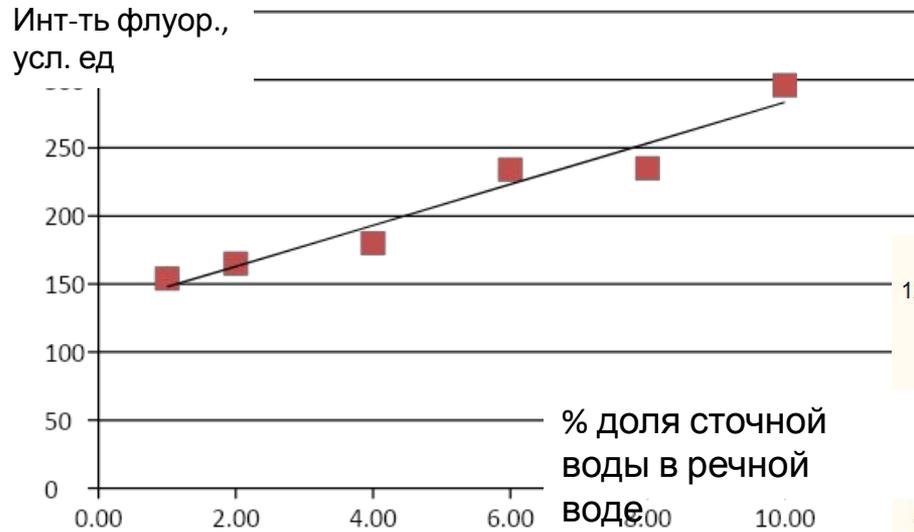


ПДК

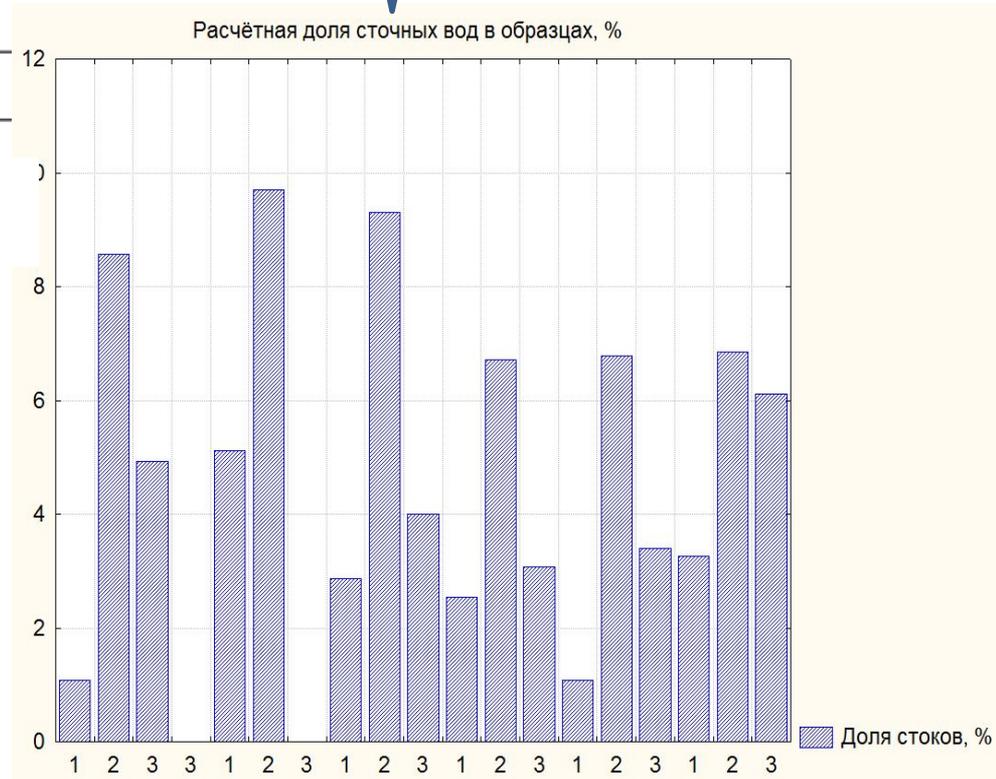
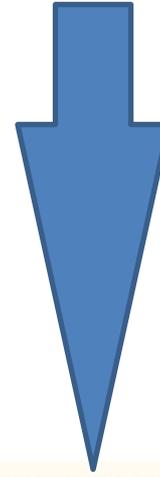
1 2 3 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3

Оценка объемной доли очищенных сточных вод в речных водах по результатам моделирования

Модельные смеси : зависимость между долей сточных вод и I_{fluor} триптофана (пика T1)



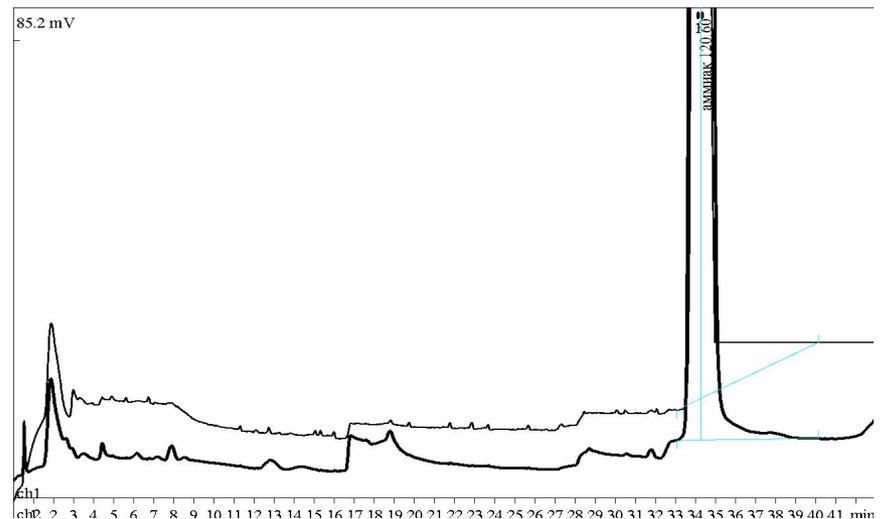
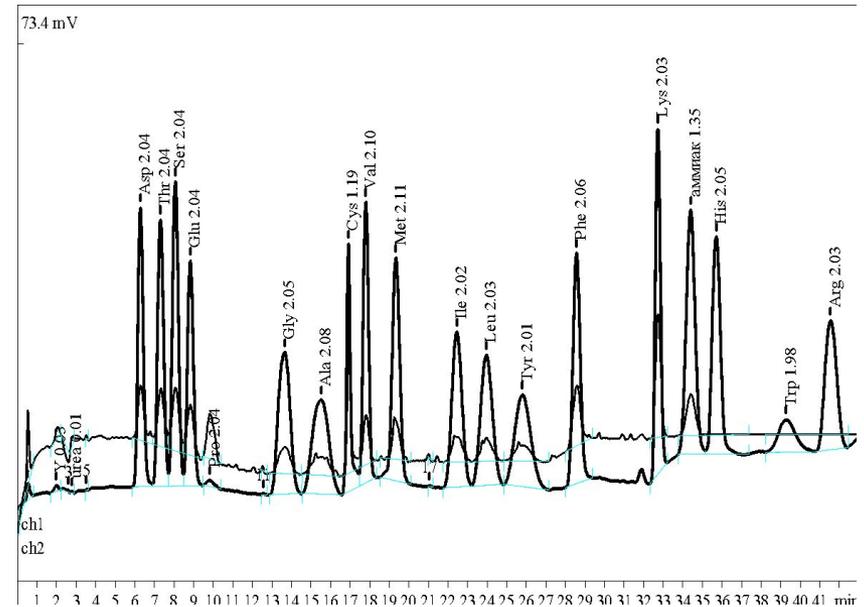
% сточн воды	Интен-ть T1
1	154
2	165
4	180
6	234
8	235
10	296



Флуоресцентная спектроскопия в ряде случаев имеет преимущества даже перед масс-спектрометрией и хроматографией

Попытка прямого определения содержания тирозина и триптофана в исследуемых водах, включая пробу очищенной сточной воды, с помощью методов ГХ-МС и ВЭЖХ не увенчалась успехом: АК этими методами не обнаруживаются; дополнительная пробоподготовка (гидролиз) может влиять на структуру исходных соединений и заметно увеличивает и без того существенную стоимость анализа (~100\$ - анализ одной пробы).

Метод флуоресценции независимо от конкретной формы нахождения в растворе вещества (триптофана) тем не менее выявляет его присутствие, и этого может быть достаточно, если иметь в виду цели сравнения и диагностики, а не точного количественного определения.



ВЫВОДЫ

1. Выявлена динамика показателей флуоресценции речных вод: с октября по ноябрь снижается интенсивность флуоресценции гуминовых кислот, что коррелирует с увеличением содержания органического углерода и уменьшением величин биологического потребления кислорода.
2. Значения БПК, ХПК в большинстве проб речной воды превышают нормативы, содержание иона аммония превышает ПДК во всех точках, приуроченных к месту сброса очищенной сточной воды.
3. Обнаружены статистически значимые корреляции между содержанием в водах азота (NH_4^+) и фосфора (PO_4^{2-}) и интенсивностью флуоресценции триптофана, максимумы которых приходятся на точки в месте сброса сточных вод.
4. Согласно индексу Андриановой речные воды в точках, приуроченных к участку сброса сточных вод, характеризуются сильным биологическим загрязнением; что согласуется с результатами, полученными на основе измерения стандартных показателей загрязнения.
5. На основе анализа модельных смесей сточной и фоновой речной воды была выявлена значимая линейная зависимость между долей сточной воды и интенсивностью флуоресценции триптофана. Доли примеси сточной воды в исследуемых пробах речной воды, рассчитанные по результатам моделирования, не превышают 10%.
6. Метод флуоресцентной спектроскопии потенциально пригоден для обнаружения примесей сточных вод в речной воде, при этом наибольшую информативность имеет показатель интенсивности флуоресценции триптофана T1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 290/350 \text{ нм}$)

Спасибо за внимание!