

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ электрофоретических ФРАКЦИЙ ВОДНЫХ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Электрофорез в 10 % полиакриламидном геле в присутствии денатурирующих агентов с последующей детекцией геля в видимом и ультрафиолетовом свете (312 нм) был использован для анализа гуминовых веществ (ГВ), выделенных из рек Ока (Россия) и Сувани (США). В УФ свете обнаружено несколько фракций ГВ, различающихся по электрофоретической подвижности, цвету и интенсивности флуоресценции. Полученные результаты помогут расширить современные представления о механизмах флуоресценции природных водных экосистем.



Введение

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой гетерогенную смесь окрашенных органических макромолекул сложного мономерного состава, содержащихся в водных и почвенных экосистемах, где они являются эффективным резервуаром углерода (до 60-70 % общего углерода почв и 60-90 % общего углерода, растворенного в природных водах). ГВ различного генезиса образуют комплексы с ксенобиотиками и ионами тяжелых металлов, участвуя в их возможном распространении в экосистеме [1]. При очистке и обеззараживании питьевой воды хлорированием и другими галогенидами присутствие ГВ в природных водах может приводить к образованию канцерогенов и тератогенов, создающих опасность здоровью человека [2]. Из-за наличия ГВ водные растворы природного происхождения хорошо поглощают ультрафиолетовый свет (УФ) и флуоресцируют в УФ и видимом световом диапазоне [3–6], что с успехом используется при решении таких важных задач, как контроль чистоты природных водных экосистем и технологических водных сред [7, 8]. Принимая во внимание отсутствие информации о структуре макромолекул ГВ, весьма трудно представить и описать точный механизм флуоресценции, а также идентифицировать интегральные структурные компо-

О.А.Трубецкой*,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Д.В. Дёмин,
младший научный сотрудник, Институт фундаментальных проблем биологии РАН

О.Е. Трубецкая,
кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Филиал Института биорганической химии РАН

ненты и хромофоры водных ГВ. Одним из подходов для решения этих проблем является разделение ГВ на фракции, имеющие различные флуоресцентные свойства.

Недавно с использованием разработанного нами метода электрофореза в полиакриламидном геле (ЭПАГ) с идентификацией результатов в видимом свете нам удалось разделить почвенные ГВ различного генезиса на несколько стабильных и хорошо идентифицируемых электрофоретических фракций, различных по молекулярной массе, интенсивности флуоресценции и функциональной активности [9-11]. Однако для водных ГВ метод ЭПАГ с идентификацией результатов в видимом свете даёт менее выразительные, хотя и визуально наблюдаемые результаты [12-14] из-за значительно более слабой естественной окраски водных ГВ по сравнению с почвенными.

Целью данной работы было исследование различных по генезису водных ГВ с помощью разработанного нами метода ЭПАГ с последующей детекцией полиакриламидного геля в УФ свете для визуальной демонстрации наличия нескольких флуоресцирующих фракций. Следует отметить, что хотя ЭПАГ с последующей детекцией полиакри-

* Адрес для корреспонденции: olegi03@yahoo.com

ламидного геля в УФ свете – достаточно рутинная техника при исследовании белков и нуклеиновых кислот [15], однако для идентификации флуоресцирующих компонентов природных водных ГВ такое сочетание ранее не применялось.

Материалы и методы исследования

Гуминовые вещества из природного водного источника (р. Ока, недалеко от г. Пущино, Московская обл.), были выделены по методике, рекомендованной Международным обществом по исследованию гуминовых веществ (IHSS). В июне 2010 г. из реки отобрано 40 л воды, которая была немедленно профильтрована через нитроцеллюлозные фильтры с размером пор 0,45 микрон. С помощью соляной кислоты рН воды доводили до 2,0 и наносили воду на колонку (2,5×40 см) с гидрофобной смолой XAD-8. При этом ГВ, растворенные в воде, адсорбировались на смоле. Воду пропускали через колонку со скоростью 100 мл/час до тех пор, пока верхняя треть колонки не становилась бледно-коричневого цвета, что указывало на адсорбцию ГВ на носителе. Затем ГВ, адсорбированные на колонке, смывали раствором 0,1 М NaOH. Раствор ГВ пропускали через катионообменную колонку в H⁺-форме для удаления из раствора ионов Na⁺, далее раствор ГВ лиофилизировали и использовали для дальнейших анализов. В р. Оке концентрация ГВ составляла 2 мг/л.

В качестве сравнительного водного образца был использован стандарт Международного общества гуминовых веществ (1R101N), выделенный из воды р. Сувани, штат Джорджия, США (более подробную информацию можно найти на сайте www.ihss.gatech.edu). Содержание ГВ в р. Сувани составляет 38-40 мг/л.

Фракционирование ГВ электрофорезом в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии денатурирующих агентов мочевины и додецилсульфата натрия проводили по ранее описанной методике [9, 10]. Акриламид (9,7 %) и бисакриламид (0,3 %) растворяли в 89 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 1 мМ ЭДТА and 7М мочевины. Для полимеризации к 40 мл раствора акриламида/бисакриламида добавляли 0,014 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина и 0,4 мл 10 % раствора персульфата аммония. В качестве электродного буфера использовали 89 мМ трис-боратный буфер (рН 8,3), содержащий 1 мМ ЭДТА. Электрофорез проводили на приборе (LKB 2001 Vertical Electrophoresis, Швеция) с вертикальным

расположением пластинки геля размером 20×20 см и толщиной 3 мм. Электрофорез проводили в течение 1 часа при силе тока 25 мА. На гель наносили по 0,1 мг каждого образца водных ГВ, полностью растворенного в 0,1 мл 89 мМ трис-боратного буфера (рН 8,3), содержащего 7 М мочевины, 1 % додецилсульфат натрия и 1 мМ EDTA. Сразу после электрофореза гель с естественно окрашенными полосами водных ГВ помещали на трансиллюминатор (Vilber Lourmat, France) в тёмной комнате при освещении УФ светом (312 нм) и фотографировали.

Результаты и их обсуждение

Гуминовые вещества из рек Ока (Россия) и Сувани (США) были фракционированы электрофорезом в полиакриламидном геле по методике, разработанной Трубецким с соавторами [9, 10]. В видимом свете на электроферограмме из-за слабой естественной окраски исследуемых речных ГВ можно отчетливо наблюдать только две желтовато-коричневые окрашенные зоны с близкими электрофоретическими подвижностями в нижней части геля (рис. 1, левая часть).

Однако при детекции того же полиакриламидного геля в ультрафиолетовом свете ($\lambda = 312$ нм) было обнаружено, что исследуемые речные ГВ в электрическом поле разделя-

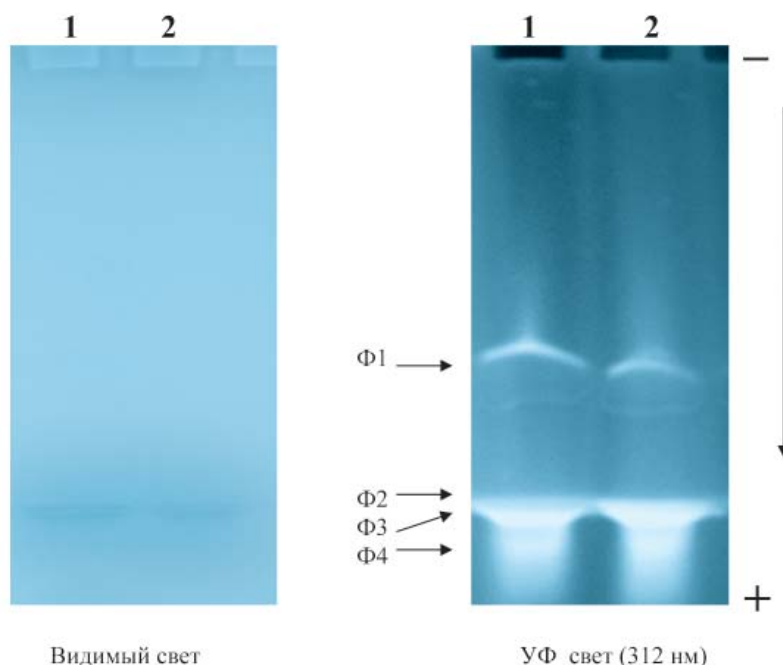


Рис. 1. Электрофорез в 10 % полиакриламидном геле 0.1 мг ГВ, выделенных из р. Оки (1) и р. Сувани (2) с детекцией геля в видимом и УФ свете. Знаками (-) и (+) обозначены катод и анод, стрелкой показано направление движения молекул ГВ в электрическом поле в процессе электрофореза.



лись на несколько дискретных электрофоретических зон, обладающих флуоресценцией различной окраски и степени интенсивности: Ф1 – узкая синяя флуоресцирующая зона в средней части геля с наименьшей электрофоретической подвижностью; Ф2 и Ф3 – узкие желтовато-голубые флуоресцирующие зоны с близкими электрофоретическими подвижностями, совпадающие по положению в геле с естественно окрашенными зонами, детектируемыми при освещении видимым светом; Ф4 – расплывчатая зона, обладающая наибольшей электрофоретической подвижностью и интенсивной голубой флуоресценцией (рис. 1, правая часть). Так как электрофоретическая подвижность одинаково обозначенных фракций была идентична в обоих исследованных образцах ГВ, то можно предположить, что генезис водных ГВ не оказывает определяющего влияния на количественный состав флуорофорных групп. Однако соотношение содержания флуорофоров в различных по генезису водных ГВ может различаться, так как интенсивность флуоресценции зоны Ф1 в препарате ГВ, выделенного из р. Ока заметно ниже, чем соответствующей зоны в препарате ГВ из р. Сувани. Принимая во внимание, что вся флуоресценция обнаружена во фракциях, вошедших в поры 10 % полиакриламидного геля, можно предположить, что флуоресцирующие фракции имели номинальную молекулярную массу менее 100 кДа [16]. Предположения о наличии нескольких флуорофоров в составе как почвенных, так и водных ГВ высказывали многие исследователи [6, 17-19], однако до сих пор идентифи-

кация и выделение индивидуальных флуорофоров не осуществлены. Предлагаемый метод ЭПАГ с детекцией результатов в УФ свете может быть эффективным для разделения ГВ с целью получения фракций, содержащих индивидуальные флуорофоры.

Заключение

Очевидно, что для установления химической природы флуорофоров водных ГВ необходимо провести многие дополнительные исследования. Тем не менее обнаруженное в различных по генезису водных ГВ сходное распределение флуорофоров по нескольким электрофоретическим фракциям является важным шагом на пути понимания природы и механизмов флуоресценции природных водоисточников. Используемый в данной работе метод ЭПАГ с детекцией результатов в УФ свете может быть полезным в качестве тест-экспресс-системы для мониторинга экологического состояния природных водоемов в процессе сезонных изменений и мероприятий по очистке воды.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-05-00243-а.

Литература

1. Stevenson F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. 1994. 2nd ed. Wiley, New York.
2. Kļaviņš M. Aquatic humic substances: characterization, structure and genesis. ISBN 9984-516-52-0, 1997. Riga, 234 p.
3. Пацаева С.В. Влияние температуры и УФ излучения на спектрально-люминесцентные характеристики растворенного органического вещества / С.В. Пацаева, В.В. Фадеев, Е.М. Филиппова, В.В. Чубаров, В.И. Южаков // Вестник Московского университета. Сер. 3. Физика. Астрономия. 1991. Т.32. № 6. С. 71–75.
4. Patsayeva S. New methodological aspects of the old problem: laser diagnostics of dissolved organic matter // EARSel Advances in Remote Sensing. 1995. V. 3. № 3. P. 66–70.
5. Милуков А.С. Флуоресценция наночастиц растворенного органического вещества в природной воде / А.С. Милуков, С.В. Пацаева, В.И. Южаков, О.М. Горшкова, Е.М. Пращикина // Вестник Московского университета. Сер. 3. Физика. Астрономия. 2007. № 6. С. 34–38.
6. Горшкова О.М. Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды

/ О.М. Горшкова, С.В. Пацаева, Е.В. Федосеева, Д.М. Шубина, В.И. Южаков // Вода: химия и экология. 2009. № 11. С. 31-37.

7. Пацаева С.В. Диагностика органических примесей в кислотах методом лазерной флуориметрии / С.В. Пацаева, В.В. Фадеев, Е.М. Филиппова, В.В. Чубаров, В.И. Южаков // Известия РАН. Сер. Физическая. 1992. Т. 56. № 12. С. 145–149.

8. Лактионов А.И. Исследование УФ-флуоресценции РОВ в центрифугированных пробах морской воды // Оптика атмосферы и океана. 2007. Т. 20. № 10. С. 872-875.

9. Trubetskoj O.A. Characterization of soil humic matter by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of denaturing agents / O.A. Trubetskoj, L.Yu. Kudryavceva, L.T. Shirshova // Soil Biology & Biochemistry. 1991. V. 23. P. 1179-1181.

10. Trubetskoj O.A. Polyacrylamide gel electrophoresis of soil humic acid fractionated by size-exclusion chromatography and ultrafiltration / O.A. Trubetskoj, O.E. Trubetskaya, G.V. Afanas'eva, O.I. Reznikova, C. Saiz-Jimenez // J. Chromatography A. 1997. V. 767. P. 285-292.

11. Трубецкая О.Е. Гуминовые вещества как природные фотоиндукторы, осуществляющие деградацию пестицидов в окружающей среде / О.Е. Трубецкая, О.И. Резникова, О.А. Трубецкой // Доклады РАН. 2006. Т. 406. № 4. С. 567-569.

12. Peuravuori J. SEC-PAGE characterization of lake aquatic humic matter isolated with XAD-resin and tangential membrane ultrafiltration / J. Peuravuori, K. Pihlaja, O.E. Trubetskaya, G.V. Afanas'eva, O.I. Reznikova, O.A. Trubetskoj // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2001. V. 80. P. 141-152.

Ключевые слова:

водные гуминовые вещества, электрофорез, УФ-детекция

13. Трубецкой О.А. Сравнительный электрофоретический анализ почвенных, речных и озерных гуминовых веществ / О.А. Трубецкой, О.Е. Трубецкая // Почвоведение. 2004. № 11. С. 1321-1324.

14. Трубецкой О.А. Фотохимическая активность и флуоресценция электрофоретических фракций водных гуминовых веществ / О.А. Трубецкой, О.Е. Трубецкая, К. Ришар // Водные ресурсы. 2009. № 5. С. 543-550.

15. White A. Principals of Biochemistry / A. White, P. Handler, L.E. Smith, R.L. Hill, I.R. Lehman. New-York: McGRAW-HILL BOOK COMPANY, 1981. 349 p.

16. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука 1981. 286 с.

17. Alberts J.J. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms / J.J. Alberts, Takács M. Organic Geochemistry. 2004. V. 35. P. 243-256.

18. Sierra M.M.D. 3D-Fluorescence Spectroscopic Analysis of HPLC Fractionated Estuarine Fulvic and Humic Acids / M.M.D. Sierra, M. Giovanela, E. Parlanti and E.J. Soriano-Sierra // J. Braz. Chem. Soc. 2006. V.17. № 1. P. 113–124.

19. Murphy K.R. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy / K.R. Murphy, C.A. Stedmon, T.D. Waite, G.M. Ruiz // Marine Chemistry. 2008. V.108. P. 40–58.

O.A. Trubetskoj, D.V. Diomin, O.E. Trubetskaya

ELECTROPHORETIC FRACTION FLUORESCENCE OF WATER HUMIC SUBSTANCES

Electrophoresis in 10% polyacrylamide gel in the presence of denaturants with further gel detection in visible-UV light (312 nm) was used for humic substances analysis, taken from the Oka river (Russia) and the

Suvan river (USA). In UV-light several fractions of humic substances have been revealed. They have different electrophoretic migration, colour, and fluorescence intensity. The data obtained may extend modern view on

fluorescence mechanisms of water ecosystems today.

Key words: water humic substances, electrophoresis, UV-detection