

累积性发射光谱结合多元统计研究蘑菇湖水体 DOM 的特征

张广彩^{1,2}, 于会彬², 徐泽华¹, 韩 美¹, 宋永会^{2*}

1. 山东师范大学地理与环境学院, 山东 济南 250014

2. 中国环境科学研究院, 北京 100012

摘要 三维荧光光谱技术(3DEEM)因其方便迅速、灵敏度高等一系列优点, 广泛应用于表征 DOM。在实际应用中, 3DEEM 步骤较为繁琐, PARAFAC 等方法相较于寻峰法虽然更加直观可靠, 但是往往需要借助 MATLAB 等数学软件, 因此该研究希望借助一种新的方法能够更加简便迅速地表征 DOM。以蘑菇湖水体 DOM 为例, 基于累积性发射光谱(AFEs), 结合多元统计及二阶导数等方法, 对 DOM 各类荧光组分及含量进行表征。利用主成分分析(PCA)对 AFEs 进行因子载荷分析, 并确定荧光峰的类型及其含量的差异; 通过二阶导数转换, 得到二阶导数 AFEs; 通过对所有采样点二阶导数 AFEs 各荧光峰进行绝对面积积分, 分析 DOM 中各组分的含量及变化; 通过聚类分析, 分析不同点位组分的差异性 or 相似性。研究表明, 通过 AFEs 得到 5 类荧光峰, 分别为类蛋白峰、类富里酸峰、陆源类腐殖酸峰以及腐殖酸峰。基于 AFEs 及其对荧光强度之和的分析, 可以看出蘑菇湖水体中的 DOM 主要以不稳定、易被降解的、相对分子质量较小的类蛋白及富里酸为主, 腐殖化程度由滨湖区向深湖区递减。基于 AFEs 得分图, 得到 5 类荧光峰, 且荧光峰中类蛋白及类富里酸峰占主导; 基于点位得分矩阵, 可以说明各点位之间的荧光组分存在差异。二阶导数 AFEs 被分为 5 个荧光波段, DOM 以相对质量较小的有机质为主, 腐殖化程度、芳香度较小, 空间差异上不显著。通过对荧光峰面积以及采样点进行聚类分析, 荧光峰被分为 3 类, 其中富里酸含量占比较大, 且岸边采样点和位于湖心区域的采样点之间存在差异。综上研究显示, AFEs 相对简单迅速, 能够代替 3DEEM 对 DOM 进行表征。蘑菇湖水体 DOM 是以相对分子质量较小、不稳定、易被降解的类蛋白、类富里酸物质为主, 总体上腐殖化程度及相对分子质量具有由滨湖区向深湖区递减的趋势, 但空间上差异性较小。

关键词 溶解性有机质(DOM); 累积性发射光谱; 二阶导数光谱; 多元统计; 蘑菇湖

中图分类号: X524, O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)09-2873-06

引言

溶解性有机质(dissolved organic matter, DOM)是指广泛存在于各类水体中, 能够透过 0.45 μm 孔径滤膜的异质性混合物^[1]。DOM 因其分子组成中含有多种活性官能团^[2], 不仅参与重金属、无机盐、有毒有害物质的迁移转化, 影响地球的碳氮循环, 而且能够为异养型微生物提供碳源和营养, 是水生生态系统中最活跃的组分^[3]。水生生态系统中的 DOM 主要来源于陆地或水体中动植物残体腐烂分解、生物分泌物以及死亡微生物分解浸出可溶性碎屑^[4], 分子量从几千到几万道尔顿不等^[5]。因此, 不同来源及类型的 DOM, 能够用来反应及影响水生生态系统中营养盐、重金属的地球化

学过程, 从而制约水生生态系统的健康及活力。

3DEEM(三维荧光光谱)因其简便迅速、样本信息量大、灵敏度高、低成本且不破坏样品等优点, 仍然被广泛应用于表征各类水体 DOM 的结构组成及特征变化。AFEs 是从 3DEEM 中沿激发波长强度之和形成的发射光谱, 已被用于追踪废水处理过程中 CDOM 的变化, 监测特级初榨橄榄油在光照条件下的演变^[6-7]。利用 AFEs 可以放大窄带且避免宽带, 减少光谱重叠并抑制基质造成的干扰^[6], 相较于 3DEEM 减少了操作步骤, 使得表征 DOM 的方法更加简便迅速。

本研究主要目的: (1)从 DOM 的 3DEEM 中推导 AFEs, 寻找一种可以代替且更加简便的方法表征 DOM, (2)使用 PCA(主成分分析)追踪荧光成分并研究个组分在不同采样点

收稿日期: 2018-08-01, 修订日期: 2019-01-12

基金项目: 环保部工作类项目(2110105), 中国博士后科学基金特别资助项目(2013T60148)资助

作者简介: 张广彩, 1991 年生, 山东师范大学地理与环境学院硕士研究生 e-mail: 839031556@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: songyh@cracs.org.cn

的变化, (3) 利用二阶导数 AFEs 确定荧光组分及结构特征变化, (4) 通过对二阶导数 AFEs 中荧光峰的面积及采样点进行聚类分析, 确定 DOM 在空间上的差异性及其相似性。

1 实验部分

1.1 样品采集

蘑菇湖水库(85°59'12"E—86°08'13"E, 44°15'43"N—44°19'13"N)位于新疆石河子市玛纳斯河西岸自然洼地, 是一座大(II)型引水注入式平原水库。根据蘑菇湖进出水口位置、水库面积和形状, 分别在滨湖区(1, 2, 3)、浅湖区(4, 5, 6)以及深湖区(7, 8)设置 8 个采样点位(图 1)。分别在 8 个采样点位水下 50 cm 处, 使用 Van Dom(2.5 L)采集 3 个水样, 完全混合在等量容器内。将混合后的水样取适量装入避光聚乙烯水瓶中, 4 °C 下冷藏, 运回实验室后立即进行光谱检测。

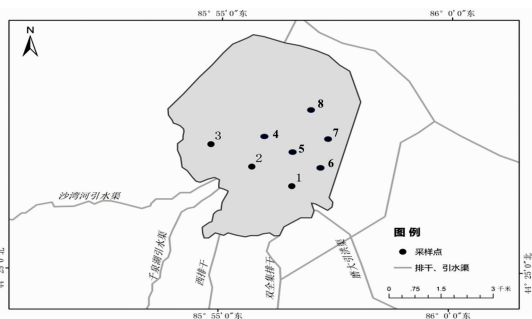


图 1 蘑菇湖采样点分布图

Fig. 1 Locations of sampling sites in Moguhu Lake

1.2 光谱检测

将采集到的水样进行抽滤(0.45 μm 孔径的醋酸纤维滤膜), 得到含有 DOM 的溶液, 其余置于冰箱内 4 °C 下避光保存待用。利用荧光分光光度计(日立 F7000)进行光谱扫描, 参数设置依照 GUO 的研究^[6]。分光光度计根据仪器的拉曼信号进行仪器自动校准, 并以奎宁硫酸盐单位标准化^[7-8]。为消除荧光检测中光谱受到瑞利散射和拉曼散射的影响, 分别采用手动数据置零、减去超纯水(Milli-Q)荧光数据的方法进行校正^[8]。

1.3 AFEs 的定义

Hernández-Sánchez 等将沿着激发波长的强度之和形成的发射光谱用于快速检测光照下特级橄榄油的演变, Guo 等基于 Hernández-Sánchez 的研究把沿着激发波长的强度之和形成的发射光谱定义为 AFEs^[6-7]。图 2 为 6# 采样点上覆水 DOM 的 3DEEM[图 2(a)]以及 AFEs[图 2(b)]。

1.4 光谱数据分析

1.4.1 二阶导数

因为导数信号的幅度与原始频谱的带宽成反比, 因此二阶导数光谱可以放大窄带且避免宽带^[6]。AFEs 经过二阶导数处理后, 其光峰变为光谷, 光谷变为光峰, 因此将二阶导数光谱的荧光强度乘负 1 进行归一化处理^[6]。本研究借助 Origin 软件实现 8 个水样的二阶导数 AFEs, 并进行光谱平

滑以消除噪声及提高分辨率。

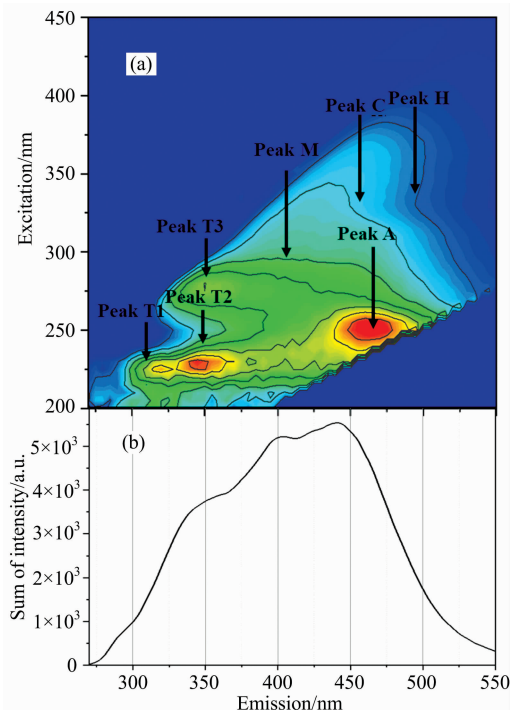


图 2 6# DOM 三维荧光光谱(a)及 AFEs(b)

Fig. 2 3D-EEM spectra (a) and AFE spectra (b) of DOM in 6#

1.4.2 统计分析

利用 PCA 对蘑菇湖水体 8 个水样的 AFEs 数据进行分析, 基于光谱载荷值进行关键因子识别, 并根据水样的不同载荷值追踪 DOM 的变化^[9]。使用离差平方法(Word 方法)对荧光峰积分面积进行变量聚类 and 样本聚类, 以欧式距离(Euclidean distance)确定不同点位荧光峰之间的差异性或其相似性。

2 结果与讨论

2.1 AFEs 特征

根据图 2(a)中 3DEEM(a), 可以得出 5 类荧光峰。Peak T₁(Ex/Em=210~230/290~325 nm)为类蛋白中的类酪氨酸荧光峰, Peak T₂(Ex/Em=215~240/325~370 nm)为类蛋白中类色氨酸峰, Peak T₃(Ex/Em=250~290/325~370 nm)有文献将其定义为长波处类色氨酸峰, 亦属于类蛋白峰^[10-11], 主要来源于微生物代谢产生的类蛋白、浮游植物等残体分解^[12]; Peak M(Ex/Em=310~330/390~410 nm)为陆源类腐殖酸峰, 亦通常指示来自农业或废水排放的结构复杂且稳定的有机物, 这类有机物不易被微生物分解, 且因为其相对分子质量较大, 易在光谱中产生红移^[13-14]; Peak C(Ex/Em=340~360/430~450 nm)为可见光区类富里酸峰^[15], 这类富里酸相对分子质量较小、荧光效率较高, Peak A(Ex/Em=240~260/430~450 nm)紫外光区类富里酸峰, 这类富里酸相对分子质量较大、有机质组成较为稳定, 两者均与 DOM 中的羰基、羧基官能团的存在有关, 用来指示外

源输入^[10, 15]; Peak H(Ex/Em=370~390/480~550 nm)为类腐殖酸峰,较为稳定,不易被微生物降解和利用^[16]。

沿着发射波长 270~550 nm 对其荧光强度进行积累,得到 AFEs[图 2(b)],其中 AFEs 的荧光强度与 DOM 的荧光峰相对应,且经过 Guo 等的验证^[6]。在 AFEs 中(图 3)总共有 5 个荧光峰,在 325 nm 处对应酪氨酸峰,350 nm 处对应色氨酸峰,400 nm 处对应陆源类腐殖酸峰,430 nm 处对应富里酸峰,在 490 nm 处对应类腐殖酸峰。由图 2(b)看出,类蛋白峰(T)包括类酪氨酸峰(Peak T₁)、类色氨酸峰(Peak

T₂)以及长波处类色氨酸峰(Peak T₃),相较于其他峰,类蛋白峰的荧光强度最大。其次为富里酸峰(A)和陆源类腐殖质(M),而类腐殖酸峰(H)最小。从不同采样点来看,除 2[#] 点位外,滨湖区(1[#], 3[#])和浅湖区(4[#], 5[#])的类蛋白峰荧光强度略高于深湖区(7[#], 8[#]),而其他的荧光峰强度在各个点位的变化较为稳定,可能蘑菇湖水体中的 DOM 主要以相对分子质量较小的、不稳定易被降解的类蛋白或类富里酸为主。

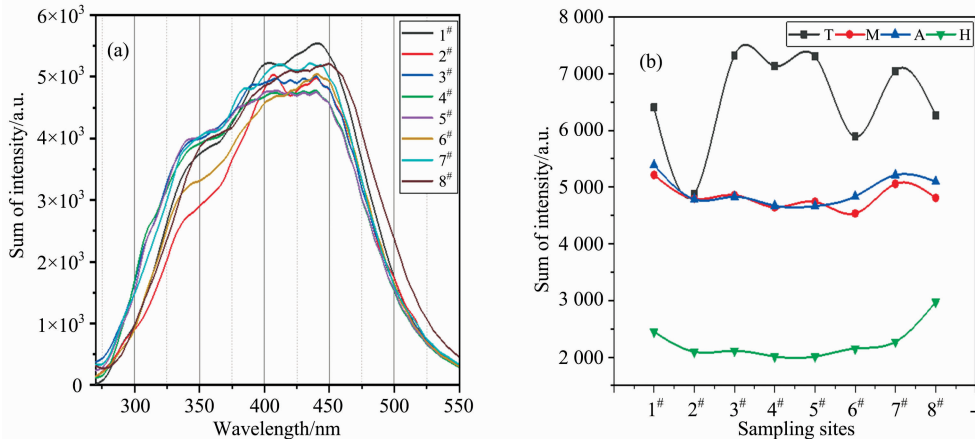


图 3 8 个采样点的 AFE 光谱(a)及各荧光峰在各采样点的强度之和(b)

Fig. 3 AFE spectrum of 8 sampling points (a) and the sum of the intensity of each fluorescent peak at each sampling point (b)

2.2 主成分分析(PCA)

基于 8 个 AFEs 进行主成分分析,得到两个主成分,解释了原始数据总方差的 96.17%。AFE 的得分图[图 4(a)]可以代表每个主成分的光谱波形,它们可以区分 AFEs 信号的方差^[9]。PC1(总方差 84.25%)呈现一个高峰(415 nm)和两个弱肩峰(280/325 nm),其中 415 nm 处的峰代表可见光区类富里酸峰,280 和 325 nm 处的峰则分别代表类蛋白峰和类腐殖酸峰;PC2(总方差 11.93%)呈现两个高峰(260/415 nm)和一个弱肩峰(380 nm),其中 260 和 415 nm 处分别代表类蛋白峰和可见光区类富里酸峰,380 nm 处的弱肩峰代表陆源类腐殖酸峰。

图 4(b)的点位得分矩阵中可以得到四个置信椭圆,其中,椭圆 A 包括 2[#] 和 3[#] (PC1 载荷值>0.85, 0.2<PC2 载荷值<0.3),椭圆 B 包括 4[#], 5[#] 和 7[#] (0.65<PC1<0.8, 0.55<PC2<0.7),椭圆 C 包括 1[#] 和 8[#] (0.4<PC1<0.5, 0.75<PC2<0.9),椭圆 D 只包括 6[#] (0.18<PC1<0.22, PC2>0.9)。椭圆之间的距离间接证明了各点位之间 DOM 中所含物质的差异,这可能与湖泊接受来水、采样点位置环境不同造成的,也可以间接的证明滨湖区、浅湖区以及深湖区 DOM 的腐殖化程度及相对分子质量可能存在差异。基于 AFEs 的得分图[图 4(a)]可以看出,上覆水 DOM 中的类蛋白、富里酸组分的含量是高于腐殖酸和陆源类腐殖质的,

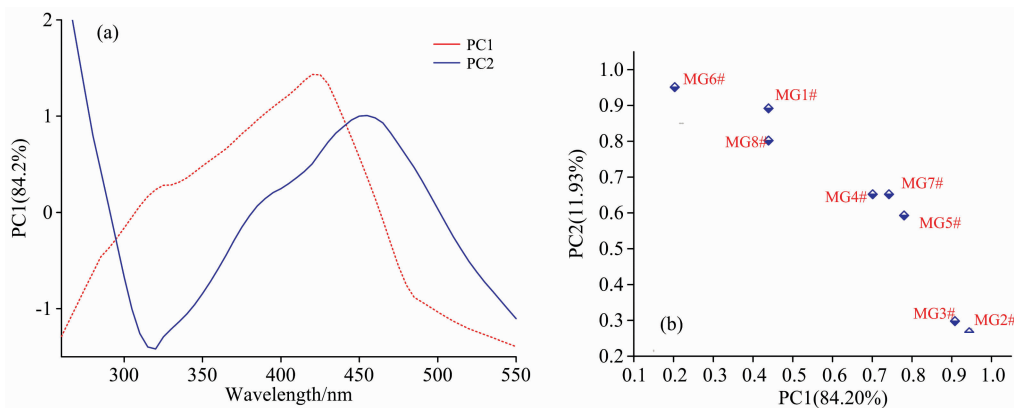


图 4 (a)为 8 个样点的累积荧光发射光谱主成分分析后 PC1 和 PC2 的载荷图, (b)为 8 个点位的得分图

Fig. 4 (a) is the load map of PC1 and PC2 after the principal component analysis of the cumulative fluorescence emission spectra of 8 samples, and (b) is the score of 8 points

说明上覆水的 DOM 是以相对分子质量较小的类蛋白和富里酸组分为主, 腐殖化程度较弱。

2.3 二阶导数分析

根据 GUO 等的研究, 二阶导数 AFEs 各荧光峰的绝对面积与相关荧光物质的浓度成比例, 且已经验证两者之间存在良好的线性相关, 因此二阶导数 AFEs 能够用来表征 DOM 的荧光物质^[6]。图 5(a) 为 4# 的 AFEs, 经过二阶导数变换得到二阶导数 AFEs 图[图 5(b)], 其中 AFEs[图 5(a)] 中的峰被分成五个峰。图 5c 是所有样品的 AFEs 经过二阶导

数变换、归一化处理后的二阶导数 AFEs。图 5(c) 中, 1# 和 2# 点位的二阶导数 AFEs 出现红移, 出现红移可能与 DOM 中苯环结构及羰基、羧基等官能团增多, 共轭结构增加有关^[17], 也有可能 1#, 2# 点位 DOM 的腐殖化程度较高, 相对分子质量较大, 因此在图 5(c) 中出现红移的现象^[11]。根据图 5(c), 270~324 nm 处光谱波段对应酪氨酸峰, 324~360 nm 处对应色氨酸峰, 360~420 nm 处对应陆源类腐殖酸峰, 420~480 nm 处对应富里酸峰, 而 480~550 nm 处对应腐殖酸峰。

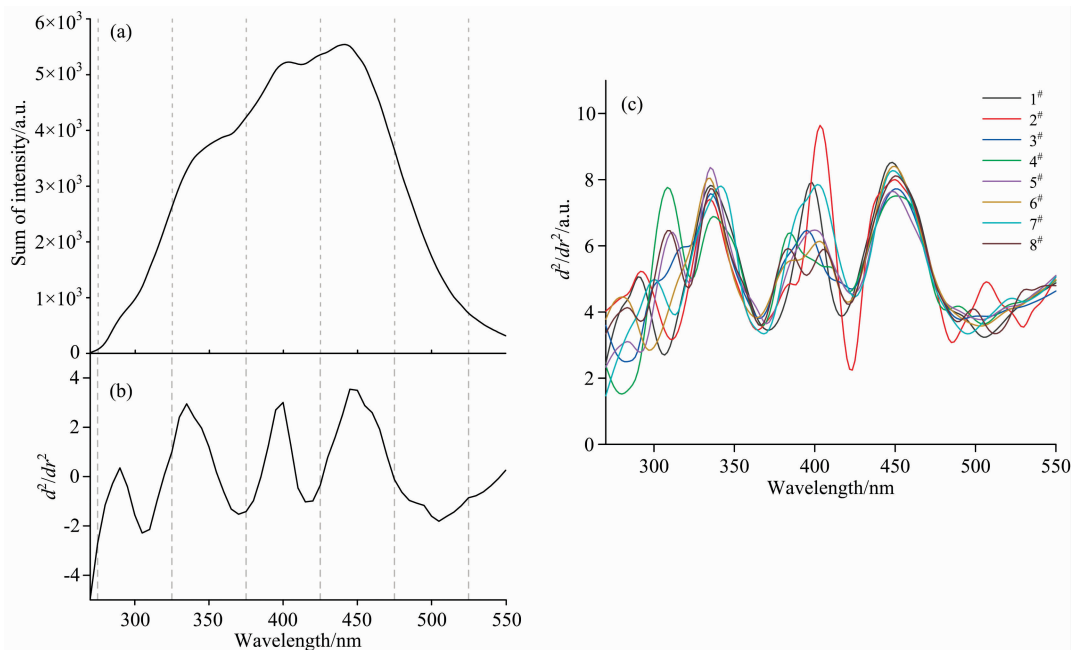


图 5 (a) 为 4# 的 AFE 光谱, (b) 为 4# 的二阶导数 AFE 光谱, (c) 为全部样点的二阶导数 AFEs

Fig. 5 (a) is the AFE spectrum of 4#, (b) is the second derivative AFEs of 4#, and (c) is the second derivative AFEs of all samples

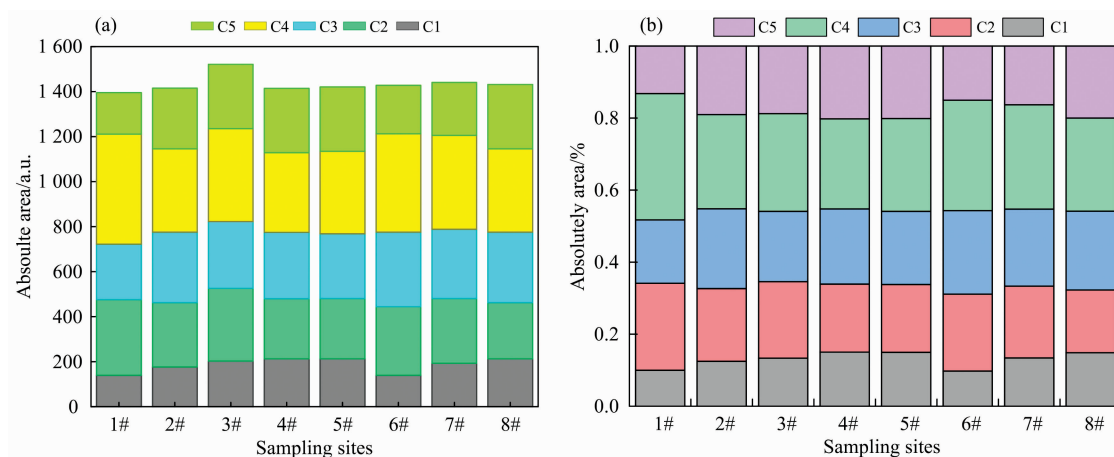


图 6 各个组分的含量(a)及占比分析(b)

Fig. 6 Contents of each fluorescent component (a) and ratio analysis (b)

通过对二阶导数 AFEs 各荧光峰的面积进行积分, 分别用 C1—C5 代替酪氨酸、色氨酸、陆源类腐殖酸、富里酸、腐殖酸荧光峰的积分面积, 并得到图 6。由图 6(a) 和图 6(b) 可

以看出, 类蛋白(C1+C2)包括类酪氨酸和类色氨酸以及富里酸(C4)所占比例较大(0.67 ± 0.01), 而陆源类腐殖酸以及腐殖酸所占比例较小(0.39 ± 0.04), 说明蘑菇湖上覆水

DOM是以相对质量较小的有机质为主,腐殖化程度、芳香度较小,这与上文研究结果相同。

2.4 聚类分析(HCA)

对8个采样点的5类荧光峰面积总共40个数据进行数据标准化,分别对荧光峰面积及采样点进行变量聚类[图7(a)]和样本聚类[图7(b)]。当欧式距离小于5时,图7(a)变量聚类中的荧光峰的积分面积被分为3类。第1类包括C2, C3和C5,第2类包括C1,第3类包括C4。这可能和水体DOM的腐殖化程度有关,结合2.3节中对各荧光物质含量的分析,富里酸(C4)的含量在各点位中的贡献较大,而色氨酸(C2)及腐殖酸(C3, C5)的含量相近,C1含量最少。当欧式距离小于5时,图7(b)采样点的样本聚类被分为4类。第1类包括2#,4#,5#和8#,第2类包括3#和7#,第3类包括1#以及第4类包括6#。根据采样点的位置(图1),可以看出DOM中荧光物质在空间上具有差异性,第1类中除2#外,4#,5#和8#位于采样点中心位置,第2类中的3#,7#和第3类中的1#以及第4类中的6#更靠近湖岸区域,可能采样点和岸边的距离以及岸边的土地利用方式等也会影响DOM向水体的输入,也有可能靠近岸边的采样点水体较为稳定的原因。

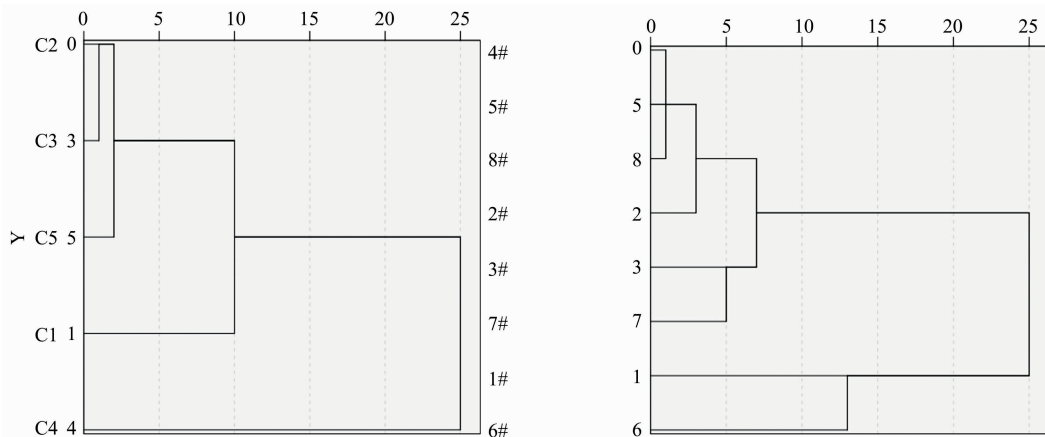


图7 C1—C5 荧光峰面积的变量聚类及采样点的样本聚类

Fig. 7 Variable clustering of C1—C5 fluorescence peak area and sample clustering of sampling points

3 结论

借助 3DEEM, AFEs 和二阶导数 AFEs, 借助 PCA, HCA 评估蘑菇湖水体中 DOM 的组成及变化情况。根据以上研究得到以下结论:

(1) AFEs 由于图谱简化、操作方便,可以用于表征 DOM 的荧光成分,确定组份类别,相较于 3DEEM 具有一定的优势。

(2) AFEs 通过主成分分析,得到了两个主成分。根据 AFEs 得分图,得到 4 类荧光峰,分别为可见光区类富里酸峰、类酪氨酸峰、类腐殖酸峰及陆源类腐殖酸峰;根据得分矩阵可知,各采样点位 DOM 主要是以相对分子量较小的

类蛋白和富里酸组分为主,腐殖化程度较弱。

(3) 通过对二阶导数 AFEs 及各类荧光峰的面积分析,得到 5 个荧光峰波段,且蘑菇湖上覆水 DOM 的荧光物质在空间上差异性不显著,DOM 以相对质量较小的有机质为主,腐殖化程度、芳香度较小。

(4) 通过对荧光峰面积以及采样点进行聚类分析,当欧式距离小于 5 时,荧光峰被分为 3 类,其中富里酸含量可能占比较大,其次为色氨酸及腐殖酸,酪氨酸含量最少;采样点被分为 3 类,其中靠近岸边的 3# 和 7# 分为一类,1# 和 6# 被分为一类,除 2# 外采样点中心位置的 4#, 5# 和 8# 被聚为一类,可能由于受岸边的距离以及岸边的土地利用方式以及靠近岸边的采样点水体较为稳定的原因。

References

- [1] Cilenti A, Provenzano M R, Senesi N. *Environmental Chemistry Letters*, 2005, 3(2): 53.
- [2] Heather E Reader, Colin A Stedman, Nikoline J Nielsen, et al. *Frontiers in Marine Science*, 2015, 2: 88.
- [3] WANG Li-ying, ZHANG Run-yu, WU Feng-chang(王立英, 张润宇, 吴丰昌). *Chinese Journal of Ecology(生态学杂志)*, 2014, 33(12): 3416.
- [4] Xu P, Zhu J, Fu Q, et al. *Journal of Soils & Sediments*, 2018, 18(5): 1865.
- [5] Vázquez E, Ejarque E, Ylla I, et al. *Freshwater Science*, 2015, 34(1): 263.
- [6] Guo X, Yu H, Yan Z, et al. *Chemosphere*, 2018, 194: 463.
- [7] Hernández-Sánchez N, Lleó L, Ammari F, et al. *Food & Bioprocess Technology*, 2017, 10(5): 949.
- [8] Osburn C L, Handsel L T, Mikan M P, et al. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 8628.

- [9] Guo X J, Yuan D H, Jiang J Y, et al. *Spectrochimical Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2013, 104(3): 280.
- [10] ZHANG Hua, QUAN Gui-jun, HUANG Jian, et al(张 华, 全桂军, 黄 健, 等). *Environmental Science and Technology(环境科学与技术)*, 2017, (10): 157.
- [11] Hao R, Ren H, Li J, et al. *Water Research*, 2012, 46(17): 5765.
- [12] CHEN Jun-yi, WANG Shu-hang, JIANG Xia, et al(陈俊伊, 王书航, 姜 霞, 等). *Environmental Science(环境科学)*, 2017, 38(1): 70.
- [13] Coble P G. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 402.
- [14] Wei H, Jin H. *Water Research*, 2015, 83: 217.
- [15] HUANG Ting-lin, FANG Kai-kai, ZHANG Chun-hua, et al(黄廷林, 方开凯, 张春华, 等). *Environmental Science(环境科学)*, 2016, 37(9): 3394.
- [16] LI Shuai-dong, JIANG Quan-liang, LI Ye, et al(李帅东, 姜泉良, 黎 烨, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2017, 37(5): 1448.
- [17] Yu H, Song Y, Tu X, et al. *Bioresource Technology*, 2013, 144(5): 595.

Accumulative Fluorescence Emission Spectra Combing Multivariate Statistics to Study the Characteristics of DOM in Moguhu Lake

ZHANG Guang-cai^{1,2}, YU Hui-bin², XU Ze-hua¹, HAN Mei¹, SONG Yong-hui^{2*}

1. School of Geography and Environment, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China

2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Abstract This study takes the DOM of the Moguhu Lake water as an example, based on accumulative emission spectra (AFEs), combined with multivariate statistics and second derivative, to characterize the various fluorescent components and content of DOM. Principal Component Analysis (PCA) was used to analyze the factor loading of AFEs and to determine the difference between the types of fluorescent peaks and their contents. The second derivative AFEs are obtained by AFEs through second derivative conversion. Analysis of the content and variation of each component in DOM by absolute area integration of the fluorescence peaks of the second derivative AFEs of all sampling points. Cluster analysis was used to analyze the difference or similarity of DOM components at different points. Studies have shown that five types of fluorescent peaks are obtained by AFEs, namely protein-like peaks, fulvic acid-like peaks, marine or terrestrial humic acid peaks, and humic acid peaks. Based on the analysis of the AFEs and sum of fluorescence intensity, it can be seen that the DOM in the water of the Moguhu Lake is mainly unstable, easily degraded, and the protein with less molecular weight and fulvic acid. The degree of humification of its DOM is reduced from the lakeside area to the deep lake area. According to the AFEs score map, five types of fluorescent peaks are obtained, and the protein-like and fulvic acid-like peaks in the fluorescent peak are the main ones. Based on the point-score matrix, it can be explained that there is a difference in the fluorescence components between the points. The second derivative AFEs are divided into five fluorescent bands. The DOM is mainly composed of organic matter with small molecular mass, and the degree of humification and aromaticity are small, and the spatial difference is not significant. By clustering the fluorescence peak area and sampling points, the fluorescence peaks are divided into three categories, of which fulvic acid content is relatively large, and there is a difference between the shore sampling point and the sampling point located in the lake center area. In summary, AFEs are relatively simple and rapid, and can be used to characterize DOM instead of 3DEEM. The DOM in the water of the Moguhu Lake is mainly composed of protein-like and fulvic acid-like substances with relatively low molecular weight, instability and easy degradation. In general, the degree of humification and relative molecular mass have a tendency to decrease from the lakeside area to the deep lake area, but the spatial difference is small.

Keywords Dissolved organic matter (DOM); Accumulative fluorescence emission spectra; Second derivative spectrum; Multivariate statistical analysis; Moguhu Lake

(Received Aug. 1, 2018; accepted Jan. 12, 2019)