

共聚焦拉曼光谱在贻贝介壳探测中的应用

崔楠楠^{1,3,4}, 杜增丰^{1,4}, 张鑫^{1,2,3,4*}, 栾振东^{1,4}, 席世川^{1,3,4}, 李连福^{1,3,4},
王敏晓^{1,4}, 王冰^{1,4}, 梁政委^{1,3,4}, 刘靖^{1,3,4}, 连超^{1,4}, 阎军^{1,4}

1. 中国科学院海洋研究所, 中国科学院海洋地质与环境重点实验室, 中国科学院海洋研究所深海极端环境与生命过程研究中心, 山东 青岛 266071
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋地质过程与环境功能实验室, 山东 青岛 266061
3. 中国科学院大学, 北京 100049
4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071

摘要 贻贝是广泛分布于全球水域的物种, 从近海海域到深海热液、冷泉等极端环境。贻贝分泌碳酸钙矿物形成介壳保护软体组织, 介壳是一种天然纳米复合材料, 具有优异的力学性能, 在生物材料、组织工程以及仿生学等方面具有很好的应用前景, 已经成为国内外研究热点之一。拉曼光谱是一种非破坏、非接触及多组分同时测试的检测技术, 可以提供矿物成分信息。利用共聚焦显微激光拉曼技术对不同环境下(台西南冷泉繁茂区、Desmos 热液区、实验室养殖及大连近海海域)生长的贻贝介壳进行检测, 得到四种环境中生存的贻贝介壳珍珠层的拉曼光谱和介壳横截面局部区域的线扫描图及二维拉曼成像图。基于实验结果得到以下结论, 四种环境中生存的贻贝介壳的棱柱层和珍珠层矿物为碳酸钙, 其中棱柱层矿物组成均为方解石, 拉曼测试方解石特征峰位于 711 和 281 cm^{-1} 附近, 而介壳珍珠层虽然主要为碳酸钙, 但不同环境下生长的贻贝珍珠层的矿物组成存在一定差别: 大连近海贻贝珍珠层矿物为文石, 拉曼测试文石特征峰位于 706 和 206 cm^{-1} 附近, 结晶程度差。热液区生长以及实验室养殖贻贝珍珠层矿物也为文石, 特征峰位于 706 和 206 cm^{-1} 附近, 但结晶程度相对较好。台西南冷泉繁茂区贻贝珍珠层主要为文石(706 和 206 cm^{-1}), 并含少量方解石, 拉曼测试方解石特征峰位于 711 和 281 cm^{-1} 附近。通过对比四种环境中贻贝介壳的矿物组分以及相对分布, 结合生存环境的差异, 认为介壳矿物组成差异是贻贝应对深海冷泉、热液不同理化环境的一种环境适应机制。测试结果表明贻贝生长环境压力对珍珠层矿物组成有较大影响。研究表明共聚焦显微拉曼光谱是一种快速、高效的用于研究不同环境下生存的贻贝的介壳矿物组成的技术手段。这为研究深海贻贝生命过程与适应机制提供了重要的参考资料。

关键词 贻贝; 共聚焦显微激光拉曼; 方解石; 文石

中图分类号: O657.37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)03-0750-05

引言

贻贝科种类广泛分布于全球多种水域, 从近海到深海(冷泉、热液等极端环境)。其介壳是一种典型的天然生物矿物, 是软体动物的保护性功能组织, 由占壳重 95% 的碳酸钙

晶体和占壳重约 5% 的有机基质组成^[1]。

深海热液和冷泉不同于一般的依赖光合作用获取能量的生态系统, 其环境具有低温/高温、高压、高盐、富含甲烷以及重金属等特点^[2-5]。热液与冷泉在成因和环境特征上存在很大区别。热液流体与周围海水随机混合, 理化环境特征变化非常明显, 以喷口为中心, 相隔几厘米温度可从 400 $^{\circ}\text{C}$ 变

收稿日期: 2019-01-25, **修订日期:** 2019-04-22

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)(XDA19060402), 国家优秀青年科学基金项目(41822604), 国家自然科学基金项目(41576104), 国家重点研发计划项目(2016YFC0302103), 国家自然科学基金委员会-山东省人民政府海洋科学研究中心联合资助项目(U1606401), 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-DQC004), 中国科学院重大科技基础设施开放研究项目(“科学”号科考船)(NMSTI-KEXUE2017K01), 泰山学者工程专项经费项目(tspd20161007)资助

作者简介: 崔楠楠, 女, 1994年生, 中国科学院海洋研究所硕士研究生 e-mail: cuinannan17@mails.ucas.ac.cn

* 通讯联系人 e-mail: xzhang@qdio.ac.cn

到 2 °C^[4], pH 值范围 1~10, 重金属种类多、浓度高, 富含硫化物。而冷泉则稳定缓和, 理化环境特征变化更温和。深海极端环境中生长的贻贝其鳃细胞中的化能自养细菌利用热液冷泉系统中的硫化氢或甲烷等气体组分合成有机物为宿主提供物质和能量^[4], 而近海贻贝科通过鳃滤水^[6]获取水体中浮游植物和悬浮颗粒等来获取营养物质。

目前对贻贝壳研究主要集中于研究壳体形成机制及矿物微观结构^[7-9]。Scurr 等利用拉曼光谱技术对贻贝锯齿状区域进行研究^[7], 发现壳体的形成与贝壳力学性能有关。Nehrke^[9]等利用共聚焦拉曼显微和电子探针对南极双壳贻贝进行壳体切割分析, 首次在海洋钙化生物的钙化结构中发现文石、方解石和球文石共存。关于环境适应机制研究的报道极少, 摄食方式及营养来源的改变对贻贝壳矿物组成产生的影响是未知的。同时热液冷泉为研究化能生态系统中生命矿化提供了可以相互比较的两种环境条件, 两种生态系统环境差异对介壳矿物组成造成的影响也是未知的。共聚焦显微拉曼光谱作为一种非破坏、非接触及多组分同时测试的检测技术, 可以在显微镜下同时直接观测贻贝壳的表观特征与矿物组成内在特征分布。本文希望通过对不同环境中贻贝壳进行共聚焦显微激光拉曼光谱研究, 了解其在特殊生存环境

是否具有矿物组成上的特殊性, 并为之后的极端生态系统的环境重建研究奠定基础。

1 实验部分

1.1 样品采集及处理

深海贻贝样品分别在 2015 年、2016 年“科学”号热液和冷泉调查航次中获得, 由“发现”号水下缆控机器人(ROV)采集, 采样点如图 1 所示, 其中热液采样点位于 Desmos 热液区(151°51'54.4", 3°41'29.88"), 水深 1 940 m, 压力 19.4 MPa, 盐度 35.02‰, 冷泉采样点位于台湾西南的南海冷泉区(119°17'08.147", 22°06'55.371"), 水深 1 120 m, 压力 11.2 MPa, 盐度 34.56‰, 近海样品采自大连近海海域, 实验室样品为 2016 年冷泉调查航次抓取, 常温常压环境(盐度 32‰)养殖至 2017 年 4 月, 其中 Desmos 热液区与台西南冷泉区贻贝生活环境参数如表 1 所示。贻贝样品解剖去除软组织, 超纯水冲洗两次, 自然风干, 部分样品备用。部分样品用于横截面扫描, 用工具钳处理, 得到样品新鲜横截面, 使用 2 000 目水洗砂纸对横截面进行打磨处理, 超纯水冲洗两次, 自然风干备用。

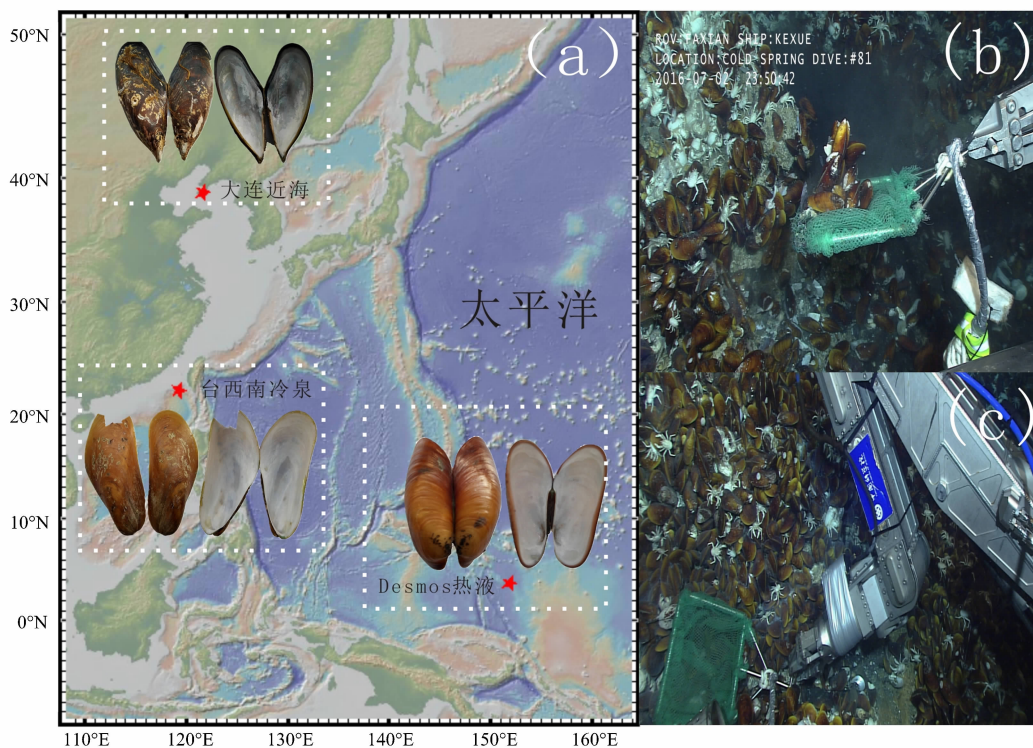


图 1 样品采集信息及示意图

(a): 样品采集地点(大连近海、台西南冷泉区、Desmos 热液区)及样品照片; (b): 冷泉区 ROV 采样照片; (c): 热液区 ROV 采样照片

Fig. 1 Information and schematic of the sample

(a): The sampling locations (Dalian-offshore, Cold seep in the Southwest of Taiwan, China, Desmos Hydrothermal Field) and photos of the sample; (b): The sampling of ROV in Cold seep; (c): The sampling of ROV in Hydrothermal Field

1.2 仪器与参数

实验所用共聚焦拉曼光谱仪(Alpha 300R+, WITec, Ulm, Germany), Nd:YAG 激光器($\lambda=532$ nm, 功率为 75

mW)作激发光源, 光栅刻痕数 1 200, 通过转动光栅塔拉曼光谱探测范围覆盖 0~4 000 cm^{-1} , 分辨率 1 cm^{-1} , CCD 制冷温度 -60 °C^[9-10]。显微镜物镜为 10×/0.25(Zeiss, EC,

Epiplan-Neofluar, Germany), 激光光斑直径 $25\ \mu\text{m}$, 共聚焦显微结构通过两根光纤(激发光纤与收集光纤内径均为 $100\ \mu\text{m}$)与激光器和光谱仪连接。拉曼系统在使用前先进行了校准, 硅单质用于激光波长校准, 用其谱线进行验证。

表 1 Desmos 热液与台西南冷泉贻贝生境对比

Table 1 Contrast of environment of mussels in Desmos hydrothermal field and Cold seep in the Southwest of Taiwan, China

	水深 /m	压力 /MPa	盐度 /%	CH ₄ /ppm	温度 /°C
Desmos 热液	1 940	19.4	35.02	—	1.02
台西南冷泉	1120	11.2	34.56	5.286	3.99

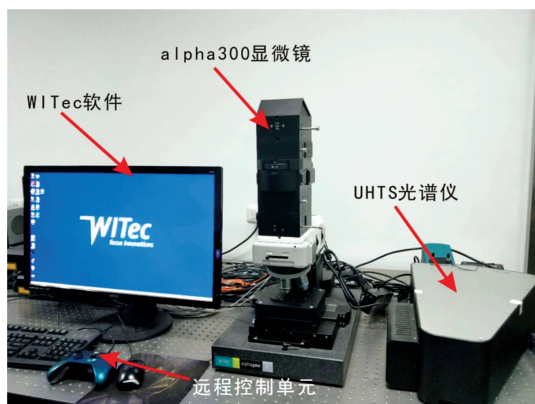


图 2 共聚焦显微拉曼系统

Fig. 2 The confocal Raman system

1.3 数据处理

使用 WITec Project plus 软件、GRAMS/AI® 9.1 软件对采集的拉曼光谱进行处理, 基于相同的校准和拟合方式对所有的拉曼光谱去除宇宙射线, 进行平滑处理及基线校准。最后通过高斯函数对处理后的拉曼峰进行拟合, 获得各个拉曼峰的频移、半峰宽等重要参数。通过代表性拉曼峰获得不同介壳层矿物组成的区别。基于 analysis 对特定的振动模式进行单变量成像, 自动寻找各层光谱进行整合得强度分布图。二维拉曼成像图直观显示了贻贝介壳不同层之间矿物组成上的区别。

2 结果与讨论

前人研究了一些碳酸钙的基本振动^[11]模式, 其中 ν_1 特征峰 $1\ 085\ \text{cm}^{-1}$ 为碳酸钙最强峰, ν_4 特征峰 $705\ \text{cm}^{-1}$ 及晶格振动特征峰 $206\ \text{cm}^{-1}$ 均为文石的拉曼特征峰, ν_4 特征峰 $711\ \text{cm}^{-1}$ 及晶格振动特征峰 $280\ \text{cm}^{-1}$ 均为方解石的拉曼特征峰。

2.1 贻贝横切面拉曼光谱分析

贻贝介壳根据形成的方式和组成可分为三层, 由外到内分别是: 角质层、棱柱层和珍珠层^[12][图 3(c)]。对四种环境中采集的介壳横截面进行线扫、面扫, 发现棱柱层拉曼光谱频移在 $1\ 085, 711$ 及 $281\ \text{cm}^{-1}$, 表明棱柱层矿物组成为方解

石, 而珍珠层拉曼光谱频移在 $1\ 085, 706$ 及 $206\ \text{cm}^{-1}$, 表明珍珠层矿物组成为文石, 四种环境之间样品横截面各层矿物组成无区别。

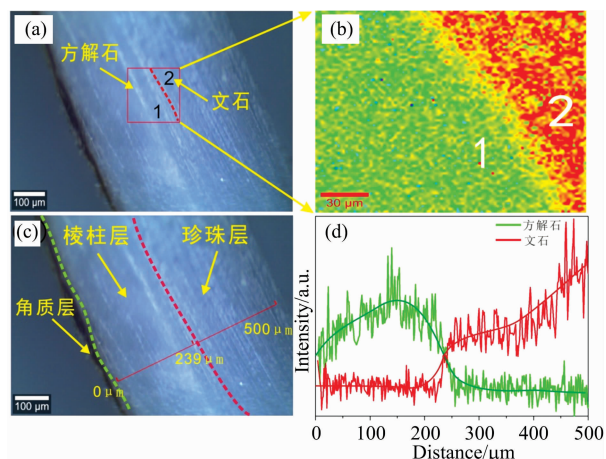


图 3 深海贻贝介壳中横截面各矿物分布特征图

(a): 面扫区域图; (b): 面扫区域对应二维拉曼成像; (c): 线扫示意图; (d): 线扫对应拉曼强度趋势图(趋势线交点对应(c)中棱柱层与珍珠层界限)

Fig. 3 The distribution map of minerals in mussel shell's cross section of deep sea

(a): Graph of area scan; (b): 2D-Raman mapping of area scan; (c): Graph of line scan; (d): Trend graph of Raman intensity of line scan

2.2 贻贝介壳珍珠层的拉曼光谱分析

实验对 4 种环境(Desmos 热液、台西南冷泉、实验室、大连近海)中收集贻贝样品介壳珍珠层进行共聚焦显微拉曼光谱分析(表 2), 发现不同环境中生存的贻贝珍珠层矿物组成存在差异。

表 2 4 种环境下贻贝珍珠层的矿物组成对比

Table 2 Contrast of minerals of mussels' nacre in four environment

环境	拉曼特征峰出现次数				
	$N_{206\ \text{cm}^{-1}}$	$N_{281\ \text{cm}^{-1}}$	$N_{706\ \text{cm}^{-1}}$	$N_{711\ \text{cm}^{-1}}$	$N_{1\ 085\ \text{cm}^{-1}}$
Desmos 热液	67	—	99	—	100
冷泉	53	17	93	—	114
实验室	50	—	100	—	112
大连近海	2	12	15	5	99

注: $N_{1\ 085\ \text{cm}^{-1}}$ 表示碳酸钙最强峰 $1\ 085\ \text{cm}^{-1}$ 出现次数; $N_{206\ \text{cm}^{-1}}$ 和 $N_{706\ \text{cm}^{-1}}$ 分别表示文石特征峰 206 和 $706\ \text{cm}^{-1}$ 出现次数; $N_{281\ \text{cm}^{-1}}$ 和 $N_{711\ \text{cm}^{-1}}$ 分别表示方解石特征峰 281 和 $711\ \text{cm}^{-1}$ 出现次数

图 4 为 4 种环境中贻贝珍珠层的拉曼图谱。从图中可以看出, Desmos 热液区、台西南冷泉区、实验室养殖与大连近海环境中贻贝珍珠层主要成分均为碳酸钙, 但是拉曼图谱存在明显区别, 根据各拉曼特征峰的归属分析, 可以确定, 四种环境下生存的贻贝珍珠层矿物主要由文石组成。

大连近海贻贝文石次级特征峰 706 和 $206\ \text{cm}^{-1}$ 出现频

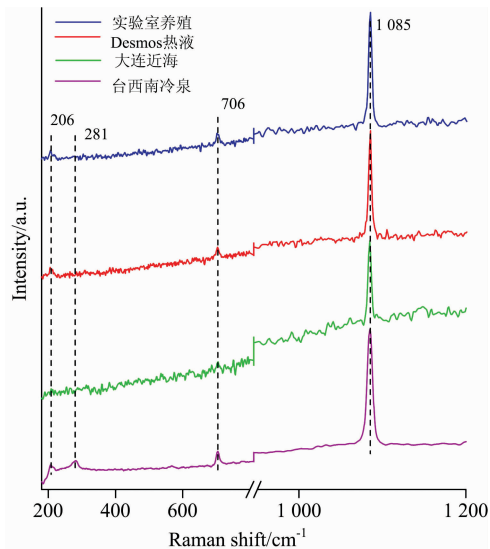


图 4 各环境下贻贝拉曼图谱

Fig. 4 The Raman spectra of mussels collected at four different environment

率低于其他环境,这可能是近海受人类活动影响,壳体杂质太多,矿物结晶程度较低,导致部分采谱点次级峰强度太弱。对比极端深海环境 Desmos 热液区、台西南冷泉区中贻贝珍珠层的拉曼图谱(表 2),热液区贻贝珍珠层的拉曼光谱中,所有采谱点均出现碳酸钙主峰 $1\ 085\ \text{cm}^{-1}$,表征文石的次级特征峰 706 和 $206\ \text{cm}^{-1}$ 出现次数依次减少,表明热液区

贻贝珍珠层矿物组成为文石。台西南冷泉区贻贝珍珠层的拉曼光谱中,所有采谱点均出现主峰 $1\ 085\ \text{cm}^{-1}$,次级特征峰 706 和 $206\ \text{cm}^{-1}$ 出现次数依次减少,与热液区无差别,但同时部分采谱点出现了表征方解石的次级特征峰 $281\ \text{cm}^{-1}$,表明冷泉区贻贝珍珠层矿物组成主要为文石,含有少量方解石。在动力学方面,方解石层硬度明显低于文石层硬度,热液区贻贝采样点水深 $1\ 940\ \text{m}$,压力 $19.4\ \text{MPa}$,冷泉区采样点水深 $1\ 120\ \text{m}$,压力 $11.2\ \text{MPa}$,热液与冷泉采样点压力相差 $8.7\ \text{MPa}$,在压力较小的冷泉区珍珠层中含有硬度较小的方解石符合动力学规律,文石的力学性能优于方解石的力学性能。贻贝壳的这种矿物组成的差异,符合生物为适应环境做出调整的机制。

3 结 论

基于共聚焦显微激光拉曼光谱技术,对不同环境生长的贻贝介壳的矿物组成进行研究。研究表明 Desmos 热液区、台西南冷泉区、大连近海及实验室后期养殖四种环境生存的贻贝的拉曼光谱存在显著差异。这些差异主要是由贻贝生活环境条件发生变化而引起,同时共聚焦显微激光拉曼光谱技术能有效区分由环境变化引起的矿物组成的样品。介壳的矿化特点与发育阶段、生存环境等密切相关,特殊的矿物组分变化是其适应极端环境的一个表征。因此,未来系统地开展对深海贻贝介壳矿化及其变化的研究及其调控机制,有助于更好的理解深海贻贝的特殊生命过程及其环境适应机制,加深人类对深海极端环境的科学认知。

References

- [1] Ricardo F G, Elena M C, Carmen G B, et al. Environmental Science & Pollution Research, 2011, 18(7): 1139.
- [2] Griffith E, Paytan A. Sedimentology, 2012, 59(6): 1817.
- [3] Antje H, Christian R, et al. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 253.
- [4] Sarrazin J, Cuvelier D, Peton L, et al. Deep Sea Research Part I Oceanographic Research Papers, 2014, 90(7): 62.
- [5] XI Shi-chuan, ZHANG Xin, DU Zeng-feng, et al(席世川, 张鑫, 杜增丰, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(11): 3390.
- [6] Smaal A C, Schellekens T, van Stralen M R, et al. Aquaculture, 2013, 404-405: 28.
- [7] Scurr D J, Eichhorn S J. Journal of Materials Research, 2006, 21(12): 3099.
- [8] Masic D, Harrington M, Waite J H, et al. AIP Conference Proceedings, 2010, 1267: 358.
- [9] Nehrke G, Poigner H, Wilhelms-Dick D. Geochem. Geophys. Geosyst., 2012, 13: Q05014.
- [10] Li Shiguo, Liu Chuang, Huang Jingliang, et al. Journal of Experimental Biology, 2015, 218(22): 3623.
- [11] Álvarezdocio C M, Reinoso J J, Campo A, et al. Dyes & Pigments, 2017, 137: 1.
- [12] Ševčík R, Mácová P. Vibrational Spectroscopy, 2018, 95: 1.

The Application of Confocal Raman Spectroscopy in Mussels Shell

CUI Nan-nan^{1,3,4}, DU Zeng-feng^{1,4}, ZHANG Xin^{1,2,3,4*}, LUAN Zhen-dong^{1,4}, XI Shi-chuan^{1,3,4}, LI Lian-fu^{1,3,4}, WANG Min-xiao^{1,4}, WANG Bing^{1,4}, LIANG Zheng-wei^{1,3,4}, LIU Jing^{1,3,4}, LIAN Chao^{1,4}, YAN Jun^{1,4}

1. CAS Key Laboratory of Marine Geology and Environment & Center of Deep Sea Research, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China
2. Laboratory for Marine Geology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266061, China
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract Mussels are widely distributed in global waters, from offshore shallow waters to hydrothermal vents and cold seeps in the deep oceans. Mussels secrete calcium carbonate and form shells to protect their soft tissues. The nanocomposite properties of mussel shell and the application prospects in biomaterial, tissue engineering and bionics have attracted much attention of scientists. The Raman spectroscopy is a kind of non-destructive, non-contact, simultaneous multi-component analysis detection technique, and can provide mineral information of samples. The mineral composition and distribution patterns of the shells and the nacre layers of the mussels collected from four different study sites (cold seeps in the Southwest of Taiwan, Desmos hydrothermal Field, Laboratory rearing, and Dalian-offshore) were obtained using the confocal Raman technique. The results showed that both of the prismatic layer and the nacre layers of the mussels are calcium carbonate. The Raman shifts of the prismatic layers locate at 711 and 281 cm^{-1} indicating the mineral composition of prismatic layer is calcite. The mineral composition of nacre exists difference in different environment although the shell nacre is mainly calcium carbonate: the mineral of nacre in Dalian-offshore is aragonite. The Raman shifts of aragonite are at 706 and 206 cm^{-1} . Aragonite crystallizes poor. The mineral of nacre layers grown in hydrothermal field and cultured in laboratory are aragonite (706 and 206 cm^{-1}) with good crystallization. The mineral of mussel nacre in cold seep is aragonite (706 and 206 cm^{-1}) and contains a little calcite. The Raman shifts of calcite are at 711 and 281 cm^{-1} . Taking the living environment conditions into consideration, the results suggested that difference in the mineral composition and distribution patterns in the mussel shells are probably caused by different physical and chemical properties within the four environments. Moreover the nacre layers is more sensitive to the pressure change of living environment. Our work also showed that the Raman spectroscopy is a quick and effective technique that can be used to analyze the mineral composition of mussels in different environments and may shine some lights on the study of the life processes and adaptive mechanisms of mussels in deep oceans.

Keywords Mussel; The confocal Raman spectroscopy; Calcite; Aragonite

(Received Jan. 25, 2019; accepted Apr. 22, 2019)

* Corresponding author