Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт автоматики и процессов управления
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Попик Александр Юрьевич

Динамика спектров лазерной индуцированной флуоресценции хлорофилла-*a* фитопланктона в условиях меняющихся параметров внешней среды

01.04.21 – Лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат технических наук,
доцент Гамаюнов Е. Л.

Владивосток 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОВОДИМЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 12
1.1. Механизм флуоресценции фитопланктона 12
1.1.1. Фотосинтез 12
1.1.2 Хлорофилл-*a* 16
1.2. Определение концентрации хлорофилла-а 20
1.2.1 Колориметрический метод 20
1.2.2 Спектрофотометрический метод 22
1.2.3 Метод ЛИФ 25
1.2.4. Расчет концентрации хлорофилла-*a* по интенсивности флуоресценции 35
1.3. Оптоволоконный датчик флуоресценции для измерения концентрации хлорофилла-а 39
1.4. Экспериментальная измерительная система для мониторинга экологического состояния водных экосистем 43
1.5. Выводы по главе 45
ГЛАВА 2. ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ СРЕДЫ НА СПЕКТРЫ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА-*a* 47
2.1. Определение параметров флуоресценции для расчета концентрации хлорофилла-а 47
2.2. Влияние параметров среды на спектры лазерно-индуцированную флуоресценцию 52
2.2.1 Исследование влияния освещенности 56
2.2.2 Исследование влияния температуры 64
2.3. Новая методика расчета концентрации хлорофилла-а 71
2.4. Выводы по главе 74
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА-*A* В ВОДЕ 76
3.1. Оптоволоконный датчик ЛИФ 76
3.2. Измерительный комплекс для экологического мониторинга водных объектов 93
3.2.1 Принципы построения и структура экспериментального измерительного комплекса 95
3.2.2 Бортовой комплекс 98
3.2.3 Погружаемая часть 105
3.2.4 Управление измерениями 108
3.3. Выводы по главе 110
ГЛАВА 4. ОПЫТНАЯ ЭКСПЛУАТАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ С ОПТОВОЛОКОННЫМ ДАТЧИКОМ ЛИФ 112
4.1. Экспедиция 2010 года 112
4.2. Экспедиция 2011 года 120

4.3. Экспедиция 2012 года 126
4.4. Экспедиция 2013 года 130
Выводы по главе 131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 134
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 136
ЛИТЕРАТУРА 137

ВВЕДЕНИЕ

В связи с быстрыми изменениями, которые происходят в биосфере, требуется разработка новых методов оперативного мониторинга окружающей среды. Парниковый эффект, разработка нефтяных скважин, выбросы промышленными предприятиями загрязняющих веществ, искусственное изменение ландшафта, – все это оказывает сильное влияние на экологическое состояние отдельных регионов и всей планеты. В настоящее время наибольшая техногенная нагрузка приходится на водные объекты. Постоянно возрастающий уровень антропогенного воздействия на водную среду повсеместно приводит к ее деградации, под которой понимается ухудшение качества среды. В общем объеме токсического загрязнения водной среды большую часть составляет загрязнение тяжелыми металлами. В связи с ухудшением качества вод мирового океана весьма актуальной становится задача экологической реабилитации и восстановления заросших и зеленеющих деградированных водоемов [1].

Важно вовремя реагировать на негативные изменения в экологическом состоянии среды, для чего необходимо осуществлять постоянный мониторинг. Существует множество способов наблюдения за экологическим состоянием Мирового океана. Использование естественных компонентов экосистемы в качестве индикаторов ее состояния называется биоиндикацией. Биоиндикация является наиболее современной стратегией экологического мониторинга [2], ее большие возможности обусловлены тем, что биологические организмы, обладают высокой чувствительностью к изменениям в окружающей среде — присутствию загрязнителей, климатическим изменениям, изменению светового режима и т. п. Особенно чувствительными являются фотосинтезирующие организмы [3]. Наиболее распространенными из которых являются микроводоросли фитопланктона. Развитие фитопланктона определяет общий уровень биологической продуктивности водоемов. Большая концентрация водорослей способствует

быстрому росту и увеличению популяций организмов, которые питаются фитопланктоном, кроме того, водоемы богатые фитопланктоном так же насыщены и кислородом, который необходим для донной растительности. Однако чрезмерное увеличение концентрации фитопланктона может вызывать цветение воды, и неблагоприятно влиять на организмы, обитающие в воде, часто в таких случаях фитопланктон становится токсичным [4, 5]. В первую очередь при цветении водоемов страдают организмы фильтраты, такие как: двустворчатые моллюски, членистоногие, однако не редко из-за цветения воды погибают и более развитые животные, такие как рыбы и водные млекопитающие. Поэтому изучение одноклеточных водорослей крайне важно для понимания процессов, протекающих в водоемах.

Способность фитопланктона обитать в разнообразных условиях уникальна, он обитает в морях и океанах, реках и озерах, дождевой воде с минимальным количеством солей, в гиперсоленых озерах, на высокогорных льдах и на поверхности раскаленных скал [6]. Несмотря на высокую способность выживать в широком диапазоне условий, фитопланктон легко реагирует на загрязнение среды. Благодаря своему широкому распространению водоросли имеют большое значение в жизни многих организмов, играют важную роль в биотическом круговороте и являются одним из первых звеньев пищевой цепи [7].

Вещества, входящие в состав промышленных и бытовых стоков, способны оказывать токсическое действие на фитопланктон. В связи с этим водорослевые биотесты входят в число основных при нормировании качества вод [8, 9, 10]. Так как загрязняющие вещества могут встречаться в форме наноматериалов, например, на основе тяжелых металлов, а тяжелые металлы оказывают вредное воздействие на фотобиологические процессы, то исследование воздействия нано размерных веществ на фотосинтез, также является важной задачей. Исследования показывают, что по спектрам лазерно-индуцированной флуоресценции водорослей можно обнаружить разные токсичные загрязнители, в том числе и соли тяжелых металлов, даже

при низких концентрациях. Флуоресцентные измерения параметров фотосинтеза можно использовать для исследования воздействия нано размерных загрязняющих веществ на фитопланктон [7, 11, 12].

Методы исследования фитопланктона постоянно совершенствуются. Их развитие начиналась с отлова проб фитопланктона специальными сетями и исследования их под обычным микроскопом, до in situ измерений состояния фитопланктона при помощи лазеров или спутниковых систем. Существуют электрохимические, оптические, лазерные, радиационные, статистические и т.д. методы исследования состояния фитопланктона. В диагностике водных сред и состояния биологических объектов все большее внимание уделяется оптическим методам. На смену световым микроскопам пришли люминесцентные, а на смену газоанализаторам – флуорометры и спектрометры. Одним из наиболее эффективных является метод лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ). Эффективность данного метода характеризуется высокой чувствительностью, оперативностью, возможностью вызвать нелинейные эффекты флуоресцентного сигнала, кроме того, флуоресцентные измерения не причиняют вреда исследуемым организмам и способны осуществлять неразрушающий контроль. К настоящему времени методы ЛИФ широко используются в исследованиях океана и атмосферы, внедрение лазерных методов позволяет ставить и решать задачи мониторинга на новом качественном уровне [13, 2].

В настоящее время активно проводятся работы по биотехнологии промышленного культивирования микроводорослей для получения их биомассы. Ее используют в качестве корма для различных организмов на рыборазводных заводах, для получения биологически-активных веществ, биотоплива, а также для очистки сточных вод. Многочисленные результаты указывают на тесную взаимосвязь первичных реакций фотосинтеза со скоростью роста и накоплением метаболитов у промышленно используемых водорослей [7]. Поэтому измерение ЛИФ является весьма информативным методом для изучения фотосинтетического аппарата водорослей в

культиваторах. Для контроля скорости роста водорослей используют различного типа флуориметры. При этом процесс измерения при помощи ЛИФ измерителей значительно быстрее, в отличие от продолжительных измерений скорости фотосинтеза по выделению кислорода или фиксации двуокиси углерода.

Основная масса первичного органического вещества, определяющего биологическую продуктивность водоема, синтезируется фитопланктоном, поэтому изучение экологического состояния фотосинтеза фитопланктона отдельных замкнутых экологических объектов, например озер и водохранилищ, представляет большой научный и практический интерес. Действие различных экологических факторов и антропогенных загрязнений может приводить к изменению концентрации и фотосинтетической активности водорослей. Вследствие этого регистрация продукционных характеристик фитопланктона позволяет оценивать состояние водной среды в целом. Таким образом, фитопланктон может служить индикатором чистоты воды объектов, которое имеют особо важное значения для индустрии туризма и рекреации [14].

Исследование фотосинтеза так же имеет огромное значение при подробном изучении растений и водорослей. Измеряя ЛИФ фитопланктона можно исследовать пути его миграции, определять предпочтительные места обитания определенных видов, а так же следить за сезонными изменениями в состоянии зеленых клеток. Известно, что при переходе растений из активного состояния в состояние зимнего покоя уменьшается скорость фотосинтетического транспорта электронов, одного из важных параметров фотосинтеза, который можно определить при помощи ЛИФ [15, 14], такие же процессы должны происходить в водорослях и в клетках фитопланктона. Возможность изучения состояния зеленых клеток под воздействием природных факторов при помощи ЛИФ, так же подтверждает актуальность их развития.

Мониторинг фитопланктона является актуальной задачей, так как при помощи него можно планировать мероприятия по предотвращению цветения водоемов, в том числе и изолированных, таких как озера или мелководные реки. Исходя из концентрации хлорофилла-*a*, можно определять биопродуктивность искусственно выращиваемого фитопланктона, который используется для создания биотоплива или для изготовления кормов; выявлять токсичность водопроводной воды; а так же исследовать взаимодействие микроводорослей и наночастиц.

В настоящее время существует множество разнообразных методик определения концентрации хлорофилла-*a*. Большинство из них не позволяет проводить исследования живых клеток фитопланктона, так как предусматривает механическое воздействие на клетки, а так же применение химических реагентов, в том числе разрушающих клетку. Для тестирования воды на больших глубинах применяют батометрические заборы и последующие лабораторные исследования. Процедура таких измерений занимает много времени, а точность сильно зависит от концентрации фитопланктона и качества работы персонала. Лабораторные исследования требуют использования химических реактивов, и поэтому довольно дорогостоящи, кроме того, подобные исследования вносят изменения в состояние клеток фитопланктона и обычно приводят к гибели образцов. Большие площади океанов и морей исследуются методом цветового анализа со спутников, однако такие спутники не могут действовать при измерениях в прибрежных акваториях, наиболее важных с точки зрения их использования в хозяйственной деятельности, в реках и озерах, не говоря уже о водоемах более мелких или скрытых элементами ландшафта. Спутниковые системы не позволяют проводить измерения в толще воды, исследуемый ими слой едва достигает десятка метров в глубину [16].

Трудность при изучении микроводорослей лазерными методами состоит в том, что их концентрация в воде может быть очень мала, что требует от измерительной аппаратуры высокой чувствительности, а при

лазерных измерениях в прибрежных водах необходимо обеспечивать учет влияния на интенсивность ЛИФ фитопланктона примесей и растворенных в воде органических веществ. Для увеличения чувствительности, при измерении флуоресценции стараются расположить оптическую аппаратуру (лазеры и спектрометры), как можно ближе к среде, в которой проводятся исследования, что, при работе в агрессивной морской среде, приводит к существенному увеличению массы и габаритов измерительных приборов и ухудшению их эксплуатационных характеристик.

Связь интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a* со многими процессами метаболизма водорослей открывает перед исследователями большие перспективы использования ЛИФ для измерения концентрации хлорофилла-*a* в клетках и определения физиологического состояния фитопланктона. Измерения ЛИФ могут проводиться непосредственно в среде обитания фитопланктона. Это является большим преимуществом, так как на исследуемый образец не оказывается большого пагубного воздействия. Однако измерения в непосредственной среде обитания требуют учета таких факторов как температура, давление, соленость, освещённость и т.п. Изменение этих факторов может оказывать воздействие на внутреннее состояние клеток фитопланктона и, следовательно, на их флуоресценцию. При выполнении мониторинга экологического состояния методом ЛИФ фитопланктона необходимо учитывать тип вод Мирового океана [17, 18]. Таким образом, для правильной интерпретации измерений ЛИФ, необходимо знать влияние параметров среды обитания на интенсивность ЛИФ хлорофилла-*a* в составе клеток фитопланктона.

Поскольку влияние среды обитания на внутреннее состояние клеток фитопланктона не изучено до конца, определение концентрации хлорофилла-*a* методом ЛИФ, в настоящее время, выполняется с большой погрешностью. С целью уменьшения последней, необходимо выполнить дополнительные измерения зависимости интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a*, находящегося в составе клеток микроводорослей, от воздействия параметров внешней среды

и разработать способ учета такого воздействия при расчёте концентрации хлорофилла-*a* по интенсивности ЛИФ.

Измерение интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a* и спектров ЛИФ фитопланктона в естественных условиях его обитания требует применения высокочувствительных спектрометрических приборов, способных работать в сложных морских условиях эксплуатации. Большая часть таких приборов, имеющихся на рынке, предназначена для выполнения измерений в лабораторных условиях и не может быть использована в полевых или морских условиях [19]. В настоящее время развиваются погружаемые и прокачиваемые измерители флуоресценции. Такие приборы позволяют максимально приблизить измерения флуоресценции фитопланктона к неразрушающему контролю. Измерения при помощи таких систем имеют эпизодический характер, так как они требуют зарядки аккумуляторов. Часто данные об измерениях записываются в самих погружаемых зондах, что требует их поднятия и переписывания данных. Прокачиваемые флуориметры позволяют выполнять измерения во время хода судна, что увеличивает исследуемую площадь и избавляет от необходимости погружений, однако такие приборы применяются для измерения в поверхностных водах, на глубинах не больше 1 - 2 метров.

Многие недостатки современных погружных флуориметров могут быть преодолены путем применения оптоволоконных датчиков для измерения ЛИФ в технике мониторинга, что позволяет отделить сложную и дорогую измерительную аппаратуру (лазеры и спектрометры) от среды, в которой проводятся измерения. Использование оптоволоконного датчика для измерения ЛИФ в воде позволяет создавать высокочувствительные системы, в которых дорогостоящие и сложные элементы, такие как измерители мощности, спектрометры, лазеры, находятся на борту судна носителя, а в воду опускается только оптическое волокно. Использование оптических волокон в качестве «источников» и «приемников» света позволяет создать оптимальные режимы возбуждения флуоресценции, так как обеспечивает

получение высокой плотности излучения в среде измерения. Применение волоконных датчиков позволяет эффективно реализовать метод лазерно-индуцированной флуоресценции для определения концентрации хлорофилла-а фитопланктона в естественной среде его обитания, что ранее было возможно только при лабораторных исследованиях.

Таким образом, **целью** диссертационной работы является разработка новой методики лазерно-индуцированной флуориметрии для определения концентрации хлорофилла-а фитопланктона, учитывающей изменение параметров внешней среды.

В связи с этим в данной работе были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать воздействие освещенности и температуры среды на спектральную плотность лазерно-индуцированной флуоресценции хлорофилла-а, находящегося в составе клеток фитопланктона.
2. Разработать методику вычисления концентрации хлорофилла-а с учетом воздействия факторов внешней среды.
3. Разработать концепцию системы измерения концентрации хлорофилла-а методом лазерно-индуцированной флуоресценции, позволяющей учитывать воздействия факторов внешней среды.
4. Исследовать оптоволоконный датчик лазерно-индуцированной флуоресценции, разработать его математическую модель и определить его оптимальную конфигурацию.
5. Создать экспериментальный макет установки для измерения концентрации хлорофилла-а методом лазерно-индуцированной флуориметрии с учетом освещенности и температуры среды.
6. Выполнить апробацию новой методики при проведении экспедиционных исследований распределения фитопланктона в морских акваториях залива Петра Великого.

7.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОВОДИМЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе рассматриваются аспекты определения концентрации хлорофилла-а фитопланктона по интенсивности лазерно-индуцированной флуоресценции. Так как фитопланктон является сложной биологической системой, он может реагировать на изменения среды обитания, тем самым выявляя наращения экологии. Для точного измерения концентрации хлорофилла-а необходимо понять, какие процессы могут играть важную роль в внутреннем состоянии фитопланктона, и определить основные вещества, участвующие в этих процессах. Кроме того важной задачей является изучение и построение средств для научных экспериментов по изучению лазерно-индуцированной флуоресценции хлорофилла-а фитопланктона в естественной среде его обитания.

1.1 Механизм флуоресценции фитопланктона

1.1.1. Фотосинтез

Фотосинтез является ключевым звеном сложной системы внутреннего взаимодействия, обеспечивающей рост и развитие растений и одноклеточных водорослей. Поэтому он является главным индикатором внутреннего состояния клеток фитопланктона. В фотосинтезе происходит преобразование энергии кванта света в химическую, которая преобразуется в результате последующих процессов. Глобальным результатом фотосинтеза является образование свободного молекулярного кислорода, создание атмосферы Земли, необходимой для дыхания, как автотрофов, так и гетеротрофов. Хорошо известно, что в водных экосистемах начальным и ключевым звеном трофической цепи являются фитопланктонные одноклеточные микроорганизмы, благополучие и обилие которых определяется в основном

эффективностью процессов фотосинтеза.

При разных температурах, освещенности и действии внешних факторов, в том числе и стрессового характера, изменяется состояние фотосинтетического аппарата, продуктивность фотосинтеза и число клеток фитопланктона, и тем самым продуктивность всей водной экосистемы. Рассмотрим фотосинтетический аппарат более подробно:

Химическое уравнение фотосинтеза выглядит следующим образом:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{свет}} O_2 + (CH_2O) + \Delta G$$

где (CH_2O) – фрагмент молекулы углевода

Так как фотосинтез является химической реакцией, существует зависимость скорости фотосинтеза, как от интенсивности света, так и от температуры [20]. Кроме того, участие воды в реакциях фотосинтеза дает основание полагать, что качество воды будет отражаться на химических реакциях фотосинтеза. Изменение свободной энергии в реакции фотосинтеза составляет 120 ккал/моль. На образование одной молекулы кислорода расходуется 8 квантов света с суммарной энергией около 350 ккал/моль [21]. Можно рассчитать коэффициент использования солнечной энергии, который будет равен 0,34. В общем виде фотосинтез представляет окислительно-восстановительную реакцию между углекислым газом и водой разность потенциалов в которой составляет 1,2 В [21]. На рисунке 1.1 схематично изображен процесс фотосинтеза, и указаны электрические потенциалы реакций. Это довольно подробная схема, иллюстрирующая множество компонентов процесса фотосинтеза, однако для исследований часто используют лишь начальные стадии, которые характеризуются высокой скоростью и информативностью.

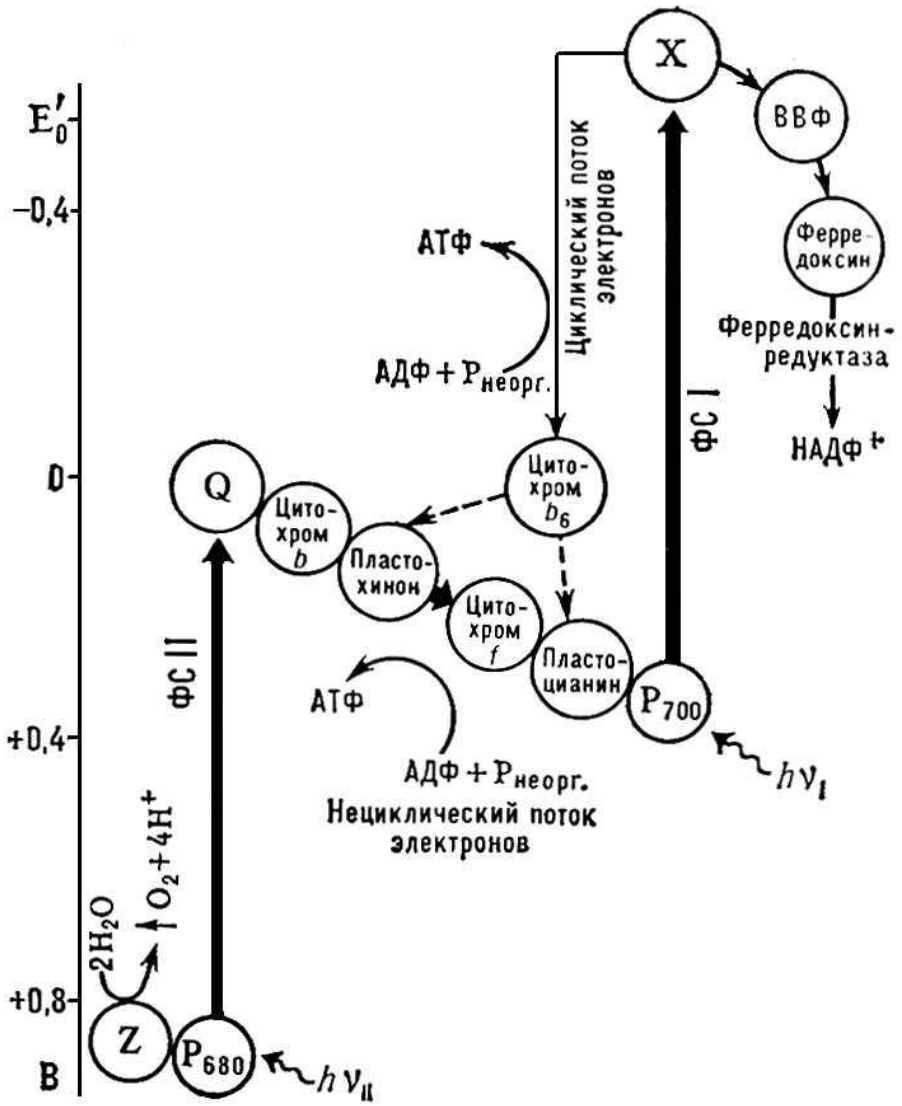


Рисунок 1.1. Схема окислительно-восстановительной реакции фотосинтеза

Энергетическую основу фотосинтеза составляет система первичных процессов фотосинтеза (ППФ), где происходит непосредственное запасание энергии квантов света в виде химических связей конечного восстановленного продукта световой стадии. Вся совокупность ППФ, протекающих в фотосинтетических мембранах, осуществляется с участием пяти белковых и пигмент-белковых комплексов, встроенных в мембрану тилакоида. Наиболее важными среди таких комплексов являются фотосистемы ФС1 и ФС2, которые отвечают за поглощение энергии квантов света и передачу ее по цепи транспорта электронов. Состояние этих комплексов влияет на спектр и

интенсивность ЛИФ, так как именно в них происходит перераспределение поглощенной энергии квантов между конкурирующими процессами. Как видно из рисунка 1.1, при поглощении света, с образованием кислорода, главную роль играет ФС2. Данная стадия носит название световой фазы фотосинтеза. Так как фотосистемы являются комплексами «запускающими» фотосинтез, и снабжающими его энергией на определенных стадиях, то по их состоянию можно судить и о состоянии фотосинтеза.

Главная особенность ППФ состоит в том, что начальные этапы переноса электрона и восстановление первичного акцептора происходят в специальных пигментных комплексах, реакционных центрах фотосинтеза (РЦ) очень быстро, за несколько пикосекунд. Восстановление первичного акцептора является важным процессом в перераспределении поглощенной энергии квантов. При недостаточно быстром восстановлении, вновь поглощенное возбуждающее излучение не может быть перераспределено на фотосинтез, из-за разности знаков переносчиков электрона в цепочке транспорта электронов, и интенсивность флуоресценции и теплового рассеяния увеличиваются. Высокая скорость восстановления зарядов переносчиков электронов обуславливает почти 100% эффективность начального разделения зарядов в фотосинтезе, поскольку оно происходит намного быстрее, чем испускание света флуоресценции отдельными возбужденными молекулами хлорофилла-*a* в растворе. Ясно, что целостная система ППФ, обладающая структурно функциональной автономией и сложной организацией, должна характеризоваться своеобразными механизмами переноса электрона и динамическими способами регуляции своего состояния. Под регуляцией можно понимать направленную перестройку сложной системы с сохранением ее интегральной целостности с целью обеспечения оптимального функционирования при изменении внешних и внутренних условий.

Важную роль в регуляции состояния переносчиков ЭТЦ играет специальный комплекс - пул хинонов. Именно на этом этапе замедляется

скорость потока электронов при образовании трансмембранной разности электрохимических потенциалов, т.е. осуществляется контроль скорости линейного транспорта электронов [22]. От восстановленности хинонов, в свою очередь, зависит окислительное состояние переносчиков цепи между ФС. В настоящее время наиболее хорошо изучен механизм быстрой регуляции переноса электрона за счет перераспределения энергии возбуждения между двумя ФС, основанный на обратимом фосфорилировании белков светособирающего комплекса (ССК) [20].

Отдельные звенья трансформации энергии в системе ППФ испытывают влияние различных факторов природы, например загрязнение среды. Это приводит к регуляторным перестройкам ЭТЦ и к изменению характера фотосинтеза. Накопленные данные фундаментальных исследований, в принципе позволяют расшифровать последовательность событий от момента воздействия внешнего фактора до изменения фотосинтеза на уровне его конечных продуктов. Вместе с тем очень важно найти такой показатель состояния ЭТЦ, который бы позволял в режиме реального времени непосредственно оценивать не только эффективность запасания энергии света в ППФ, но и динамику ее изменений в различных условиях существования клеток (свет, температура, состав минеральных и биогенных элементов) во внешней среде. Это может дать в руки исследователей мощный инструмент для экологического мониторинга водных биоценозов, снижения ошибки при оценке физического состояния фитопланктона, для управления ростом культивируемых популяций клеток. Именно таким показателем является спектральная плотность флуоресценции хлорофилла-*a*, локализованного в фотосинтетических мембранах клеток.

1.1.2 Хлорофилл-*a*

Фотосинтез начинается с поглощения света окрашенными веществами – пигментами растений, среди которых важную роль играет хлорофилл. Спектр действия солнечного света, то есть те длины волн, которые сильнее

всего поглощаются фитопланктоном, при фотосинтезе находится в соответствии со спектром поглощения хлорофилла-а, показанном на рисунке 1.2 [23, 24]. Цвет клеток фитопланктона главным образом определяется спектром отражения хлорофилла. Различают хлорофиллы -*a*, -*b* и -*c*. Наряду с хлорофиллами в фотосинтетических системах растений присутствуют другие флуоресцирующие пигменты. Основным пигментом после хлорофиллов -*a* и -b являются каротины. В красных и в сине-зеленых водорослях присутствуют фикобилины. Так как именно хлорофилл-а является основным светособирающим пигментом при фотосинтезе, а фотосинтез является мощным индикатором внутреннего состояния зеленых клеток, то по состоянию и количеству хлорофилла-а можно оценивать экологическое состояние водных объектов и природных водоемов.

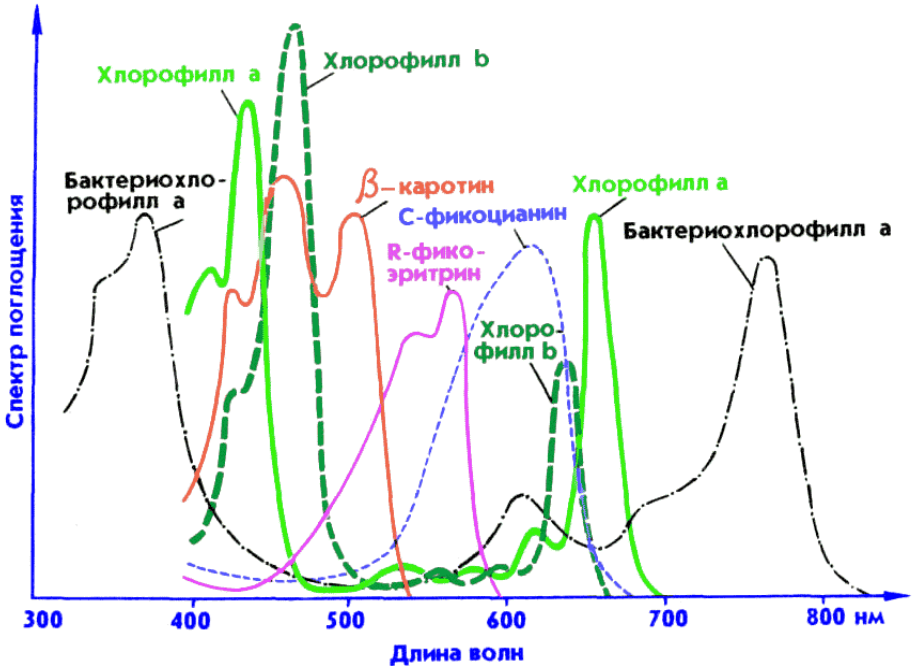


Рисунок 1.2. Спектры поглощения различных пигментов

Фотосинтез протекает только в органоидах клеток фитопланктона именуемых хлоропластами, размер и количество которых зависит от вида фитопланктона. Как видно на рисунке 1.3, зеленые хлоропласты хорошо видны в клетках фитопланктона под микроскопом. Лабораторные исследования показывают, что у разных видов фитопланктона различается не

только количество хлоропластов в составе клетки, но и их размер, расположение, геометрия, а так же соотношение различных пигментов в них. Однако у большинства видов основу фотосинтетического аппарата составляет именно хлорофилл-*a*, поэтому определение его концентрации в водоеме является важной задачей, которую необходимо решать при организации экологического мониторинга водных объектов.

Рисунок 1.3. Клетки фитопланктона под микроскопом

Пигменты внутри зеленых клеток объединяются в фотосинтетические единицы, которые располагаются в хлоропластах. Типичное строение хлоропласта показано на рисунке 1.4. Хлоропласт заполнен особой соединительной тканью (стромой), в которую погружены ламеллы. Ламеллы представляют собой поперечные сечения уплощенных замкнутых мешочков – тилакоидов. Тиллакоиды часто собраны в стопки, которые называются гранами. Число тилакоидов в хлоропласте достигает 1000 штук. Именно в них содержатся активные пигменты, такие как хлорофилл-*a*, а в мембранах тиллакоидов осуществляется фотосинтез.

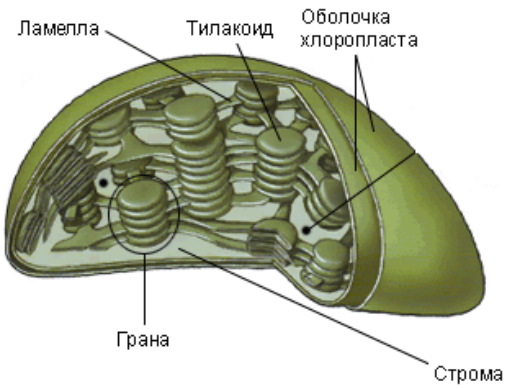


Рисунок 1.4. Строение хлоропласта

Одним из важных свойств молекулы хлорофилла-*a*, наряду с поглощением и отражением света, является способность флуоресцировать. Растворы хлорофилла-*a*, преобладающей формы данного пигмента, характеризуются достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции порядка 20-35% [25, 26, 27]. На рисунке 1.5 представлены спектры лазерно-индуцированной флуоресценции хлорофилла и других пигментов мирководорослей.

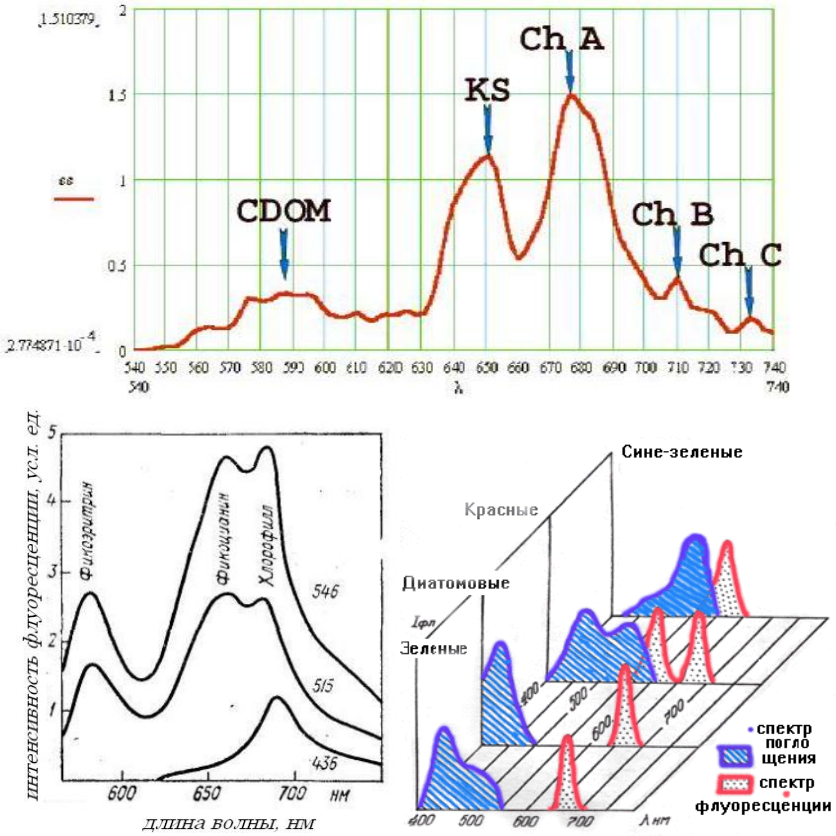


Рисунок 1.5. Спектры ЛИФ хлорофилла и некоторых пигментов

При различной концентрации хлорофилла-*a* в растворах меняется не только их окраска, но и спектральная плотность поглощения и флуоресценции. В зависимости от состояния фотосинтетического аппарата спектральная плотность ЛИФ хлорофилла-*a* *in vivo* может меняться в значительных пределах. Множество факторов могут оказывать воздействие на клетки фитопланктона, тем самым изменяя строение хлоропластов или самой клетки. Эти изменения сказываются как на количестве хлорофилла-*a*, так и на скорости физических процессов, в которых он участвует. Поэтому спектры ЛИФ хлорофилла-*a* позволяют оценить концентрацию хлорофилла-*a*, и, следовательно, экологическое состояние водоемов, в которых он обитает.

1.2. Определение концентрации хлорофилла-*a*

Основополагающим методом изучения строения клеток, в том числе и определения их пигментного состава, является микроскопирование. Подготовленные пробы с клетками фитопланктона рассматривают под микроскопами. Подсчитывается количество хлоропластов и при помощи пропорций, выраженных на основе химических тестов, вычисляется концентрация хлорофилла. Такой метод является трудозатратным, и к тому же, не может быть использован для оперативного экологического мониторинга по ряду причин: занимает много времени, требует особых условий проведения, требует высокой точности и внимания исследователей и невозможен для множественных долгосрочных измерений. На смену микроскопированию пришли эффективные и быстрые методы, основанные на оптических свойствах хлорофилла-*a*.

1.2.1 Колориметрический метод

Из оптических методов анализа концентраций в практике аналитических лабораторий наиболее простыми являются

колориметрические методы. Колориметрические методы используют анализ спектра поглощения хлорофилла-*а* и основаны на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через раствор пигмента. Известно что растворы одного и того же пигмента при одинаковой концентрации этого вещества и толщине слоя раствора поглощают равное количество световой энергии, т. е. светопоглощение таких растворов одинаковое. Эта зависимость выражена законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot l} \tag{1.1}$$

где I – интенсивность света, прошедшего через раствор;

I_0 – интенсивность падающего на раствор света;

ε – коэффициент поглощения света — постоянная величина, характерная для каждого пигмента и зависящая от его природы;

C – концентрация пигмента в растворе;

l – толщина светопоглощающего слоя раствора, см.

Следовательно, оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации пигмента и толщине слоя раствора. То есть при одинаковой толщине слоя раствора хлорофилла-а оптическая плотность этого раствора будет тем больше, чем больше хлорофилла в нем содержится. Или, наоборот, при одной и той же концентрации данного окрашенного вещества оптическая плотность раствора зависит только от толщины его слоя. Таким образом, чтобы определить концентрацию раствора хлорофилла-а, необходимо измерить его оптическую плотность.

Лучи видимого света, проходят через цилиндры с эталоном и исследуемым образцом, после чего попадают в призму, откуда, собираясь линзой, подаются на фотодетектор. Манипулируя высотой уровня пробы в исследуемом цилиндре, уравнивают поглощение света, прошедшего через оба цилиндра. После уравнивания поглощения, зная, что отношение толщин

обратно пропорционально отношению концентраций, вычисляют концентрацию хлорофилла-*a* в исследуемом растворе.

Колориметрические методы можно применять при средних концентрациях исследуемого вещества, что очень удобно при измерении концентрации хлорофилла-*a* в водных образцах фитопланктона. Кроме того эти методы занимают мало времени, нежели изучение и подсчет концентрации вещества под микроскопом.

К недостаткам колориметрического метода можно отнести следующее:

– отсутствие строгой пропорциональности между содержанием определяемого вещества и интенсивностью окраски;

– субъективность оценки интенсивности окраски при отсутствии точной оптической аппаратуры.

Так как хлорофилл-*a* является пигментом живых клеток, его физические параметры могут зависеть от внешних факторов, поэтому температура, концентрация кислорода, интенсивность света и содержание в растворе посторонних веществ вызывает изменения в поглощении света раствором. Именно поэтому колориметрические методы используются для определения концентрации хлорофилла-*a* в лабораторных условиях, когда есть возможность поддержания внешних условий, например температуры и освещенности, постоянными. Необходимость особых условий при проведении измерений не позволяет использовать колориметрические методы в рамках оперативного экологического мониторинга.

1.2.2 Спектрофотометрический метод

Избавиться от ряда недостатков колориметрического метода позволяет более сложный, но в то же время более точный метод спектрофотометрирования. В основу спектрофотометрирования положен принцип измерения отношения спектральной интенсивности двух световых потоков: потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, прошедшего через эталонный образец. Световой пучок из широкополосного

источника света попадает в монохроматор и раскладывается дифракционной решеткой в спектр. В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели монохроматора в кюветное отделение, поочередно вводятся эталонный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через образец, принимают фотодиодом, обрабатывают и записывают в виде токов I_T $I_к$ $I_и$, которые пропорциональны соответственно темновому потоку; потоку, прошедшему через контрольный образец; потоку, прошедшему через исследуемый образец. Коэффициент пропускания исследуемого образца рассчитывается по формуле:

$$D = lg\left(\frac{I_и - I_T}{I_к - I_T}\right). \quad (1.2)$$

При определении концентрации хлорофилла-*а* при помощи данного метода используют спектрофотометрирование экстракта пигментов до и после его подкисления раствором соляной кислоты. Расчеты концентрации хлорофилла-*а* основаны на известных удельных спектральных показателях поглощения света хлорофиллам-*а* в экстракте [28].

Концентрацию хлорофилла-*а* рассчитывают по формуле [(28)].

$$C = 2.44 \cdot \frac{D_{664} - D_{664}^{k}}{D_{664}} \cdot (11.85D_{664} - 1.54D_{647} - 0.08D_{630}) \cdot \frac{V_э}{V_{пр} - l}, \quad (1.3)$$

где C – концентрация хлорофилла-*а*;

D_{664} и D_{664}^{k} – оптические плотности экстракта до и после подкисления;

c' – концентрация хлорофилла-*а* без поправки на феофетин.

где D_{630} и D_{647} – оптические плотности на длинах волн 630 и 647 нм;

$V_э$ – объем экстракта в см^3;

$V_{пр}$ – объем пробы в литрах;

l – длина кюветы в см.

Установив концентрацию пигментов в экстракте, определяют их содержание в исследуемом материале с учетом объема экстракта и отфильтрованного материала пробы:

$$A = V \cdot C/(P \cdot 1000), \quad (1.4)$$

где C – концентрация пигментов в мг/л;

V – объем экстракта в мл (25 мл);

P – масса отфильтрованного материала в г;

A – содержание пигмента в растительном материале в мг/г сырой массы.

В данном методе хлорофилл-*a* фиксируется, в составе экстракта, что исключает влияние факторов среды на его состояние. Однако при фиксации клетки фитопланктона подвергаются механическому и химическому воздействию, которое приводит к их разрушению. У мертвых или разрушенных клеток фитопланктона меняются оптические характеристики. Это может быть результатом не только количественного изменения состава пигментов, но и их качественного изменения в виде преобразования в иные, более стойкие к пагубным воздействиям формы. Это исключает применение данного метода для исследования живых клеток фитопланктона и экологического мониторинга посредством биоиндикации.

Из анализа описанных выше методов следует, что для измерения концентрации хлорофилла-*a* в составе клеток фитопланктона, обитающего в водных объектах, в различных условиях необходимо использовать метод, который исключает механическое повреждение клеток, и воздействие на исследуемые образцы химических реагентов, а так же позволяющий учитывать влияние параметров среды обитания на хлорофилл-*a*. Такими качествами обладает метод определения концентрации хлорофилла-*a* по

данным измерения интенсивности его лазерно-индуцированной флуоресценции.

1.2.3 Метод ЛИФ

В ФС2 поглощенная энергия индуцирующего излучения перераспределяется между тремя конкурирующими процессами: фотосинтезом, тепловым рассеянием и флуоресценцией. Состояние хлорофилла-а в составе хлоропластов непосредственно влияет на процесс фотосинтеза. Идея наличия связи между фотосинтезом и флуоресценцией была предложена Каутским в 1931 году. Он обнаружил, что в подсвеченных образцах адаптированных в темноте листьев растений возникали изменения интенсивности флуоресценции. Эти изменения происходили согласованно с изменениями в фотосинтезе [29]. В наше время флуоресценция хлорофилла-а является мощным и надежным инструментом, который широко используют для определения концентрации хлорофлииа-*а* и изучения реакций фотосинтеза [30, 31, 32].

Суть ЛИФ зеленых клеток состоит в следующем: под воздействием возбуждающего лазерного света, фотосинтетические пигменты поглощают энергию индуцирующего излучения, при этом часть испускается в виде флуоресценции, часть преобразуется в тепло и часть используется в фотосинтезе. Именно наличие конкуренции между процессами фотосинтеза, теплового рассеяния и флуоресценции дает возможность оценивать состояние зеленых клеток при помощи ЛИФ. На рисунке 1.6 изображена схема электронных уровней, в которой отмечены основные конкурирующие процессы в клетке фитопланктона.

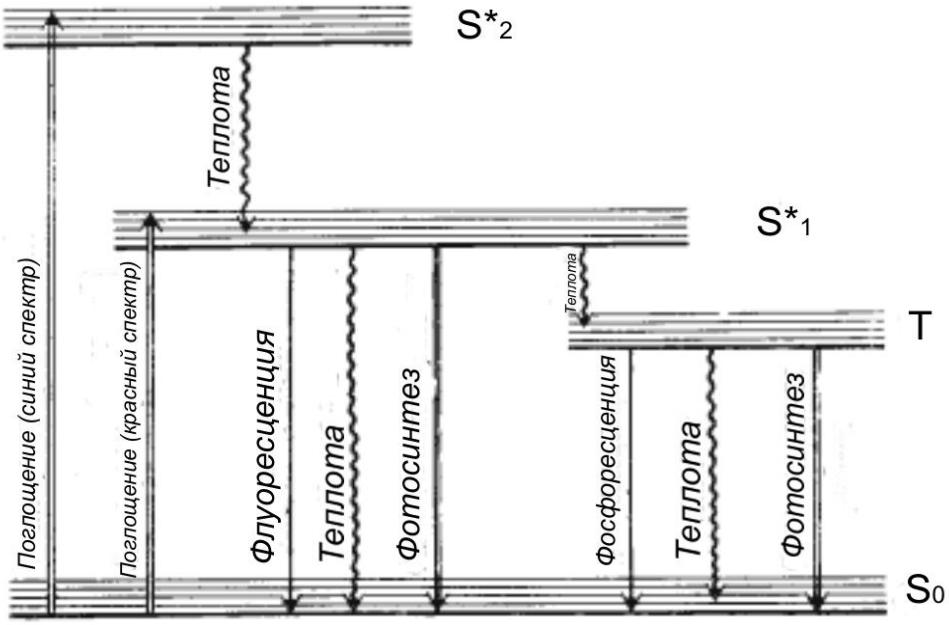


Рисунок 1.6. Схема электронных уровней в клетке фитопланктона

При изучении спектра ЛИФ клеток фитопланктона выяснилось, что хлорофилл-а является преобладающим пигментом и спектральная плотность его флуоресценция намного выше, чем у остальных пигментов клетки. Так хлорофилл-b флуоресцирует очень слабо, из-за того что передает поглощенную энергию возбуждающего света хлорофиллу-а практически со 100% эффективностью. Прочие пигменты, такие как фикобилины, могут иметь различную интенсивность ЛИФ, в зависимости от того, какую часть поглощенной энергии возбуждающего света они передают хлорофиллу-а. Кроме того, спектральные максимумы ЛИФ пигментов, сильно отличаются друг от друга, как и максимумы спектров поглощения (рисунки 1.2, 1.5), что позволяет использовать ЛИФ для исследования отдельных, интересующих нас веществ. Флуоресценция возникает в «объемных» пигментах, а не в РЦ молекулы, однако излучение флуоресценции чувствительно к изменению фотохимии, которое происходит в реакционных центрах, особенно ФС2. В сущности ФС2 отвечает не только за поглощение света и образование кислорода, но и за основную часть спектра флуоресцентного излучения клетками фитопланктона, максимум спектральной плотности флуоресценции

наблюдается в области 680 нм. На данный момент существует множество технических реализаций измерителей флуоресценции хлорофилла-а природного фитопланктона, самые популярные представлены на рисунке 1.7.

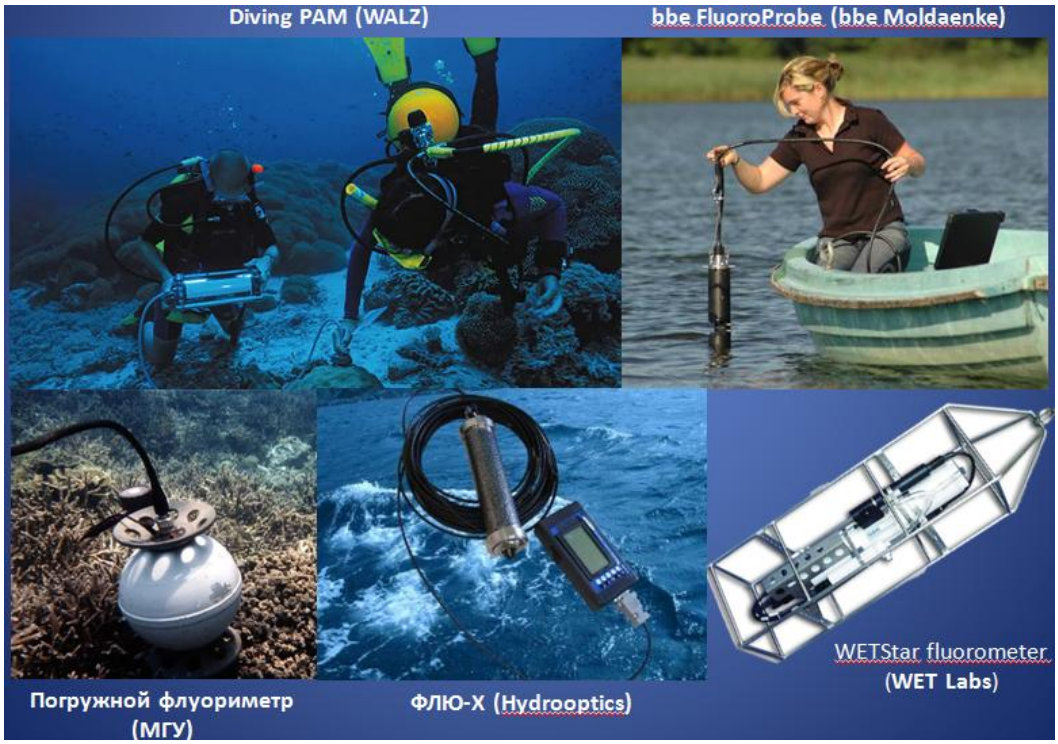


Рисунок 1.7. Погружаемые флуориметры.

Измерение в этих приборах проходит с учетом того, что интенсивность флуоресценции, в спектральном диапазоне 680-690 нм, пропорциональна поглощенной энергии, а ее величина определяется коэффициентом утилизации (1.5):

$$F = \mathrm{E}_{\text{погл}}\alpha \ , \tag{1.5}$$

где $\mathrm{E}_{\text{погл}}$ – энергия света, поглощенная клеткой фитопланктона;

α – коэффициент утилизации энергии.

Если коэффициент утилизации представить, как совокупность квантового выхода флуоресценции (φF) и коэффициента поглощения (AC), то интенсивность флуоресценции можно выразить следующим образом:

$$F = \varphi F \cdot I \cdot AC \quad (1.6)$$

Квантовый выход флуоресценции представляет собой отношение константы скорости флуоресценции (kF) и суммы констант скоростей всех процессов реализации возбужденного состояния молекул хлорофилла-*a*, в том числе и альтернативных (конкурентных) процессу флуоресценции. К таким процессам относят: тепловое рассеяние с константой скорости (kH), фотохимию фотосинтеза (kP), переход возбужденных молекул хлорофилла в триплетное состояние (kT). Тогда, квантовый выход флуоресценции может быть представлен формулой:

$$\varphi F = \frac{kF}{kF + kH + kT + kP}, \quad (1.7)$$

Величина kT сравнительно мала и практически не влияет на значение φF. В клетках фитопланктона, существуют комплексы ФС2 в различных состояниях, отличающиеся величинами kH или kP, следовательно, и квантовым выходом флуоресценции. Комплексы ФС2 могут отличаться окислительно-восстановительным состоянием первичного акцептора хинонной природы (Q_A), наличием или отсутствием фотоповреждений протеинов. Все эти аспекты определяют интенсивность флуоресценции, излучаемой комплексами ФС2.

Таким образом, спектральная плотность флуоресценции природного фитопланктона является средневзвешенной величиной, зависящей от относительного количества комплексов ФСII, интенсивности индуцирующего излучения и состояния хлорофилла-*a* в этих комплексах [24]. При изучении состава флуоресцирующих пигментов исследуют широкополосные спектры флуоресценции с высоким спектральным

разрешением. При этом, для увеличения разрешающей способности измерительного аппарата используют монохроматический свет высокой плотности. В спектре ЛИФ фитопланктона присутствуют спектральные составляющие от разных пигментов, входящих в состав обеих фотосистем, но подавляющая часть наблюдаемой флуоресценции, генерируется хлорофиллом-а в ФС2 [33]. В связи с этим необходимо измерять спектры ЛИФ фитопланктона, чтобы учесть вклад всех присутствующих пигментов в спектральную плотность флуоресценции на длине волны 680 нм. Способ учета вклада различных пигментов был описан группой ученых под руководством О.А. Букина в статье [34]. Пример методики представлен на рисунке 1.8.

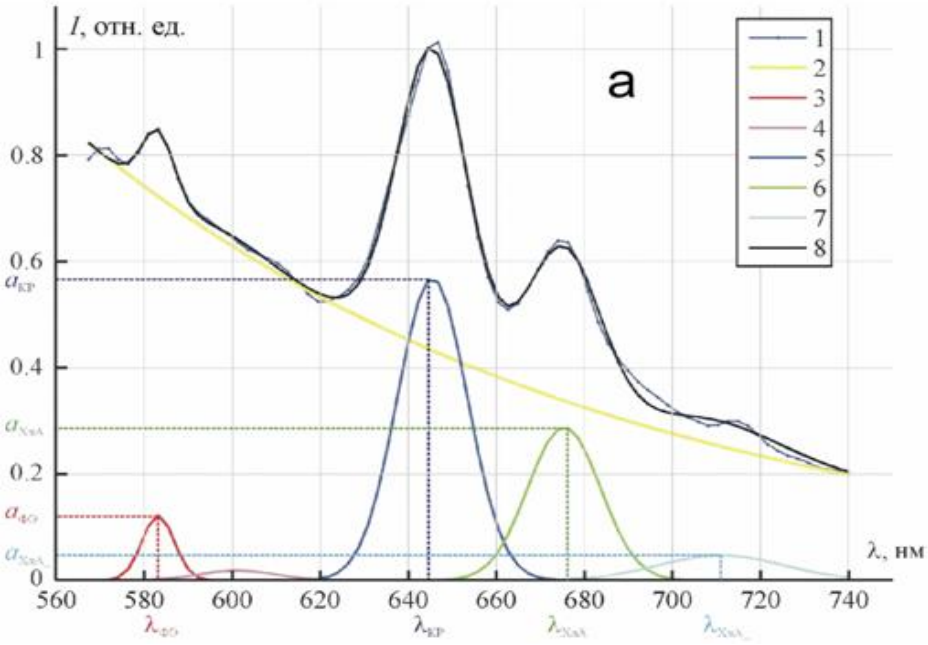


Рисунок 1.8. Учет вклада флуоресценции различных пигментов в спектре ЛИФ фитопланктона.

Молекула хлорофилла-*а* флуоресцирующая в ФС2 кратко обозначается P680, так как ее флуоресценция имеет пик на длине волны 680 нм. Вследствие высокой эффективности дезактивации возбужденного состояния молекул хлорофилла-*а* (P680) и разделения зарядов в РЦ, флуоресценция ФС 2 характеризуется низкими значениями квантового выхода и времени

затухания (100—200 пс), поэтому при помощи флуоресценции можно исследовать фотосинтез с большим временным разрешением. Основная идея исследования внутреннего состояния фитопланктона посредствам флуоресценции состоит в том, что уменьшение передачи или запасания световой энергии в фотосинтезе приводит к увеличению интенсивности флуоресценции [21, 14].

В связи с тем, что ЛИФ хлорофилла-*a* прежде всего отражает физические процессы, происходящие в комплексах ФС2, необходимо описать их структуру. Используя энергию фотонов, ФС2 осуществляет разложение воды, в результате которого во внутритилакоидное пространство поступают кислород и ионы водорода, как схематично изображено на рисунке 1.9 [35].

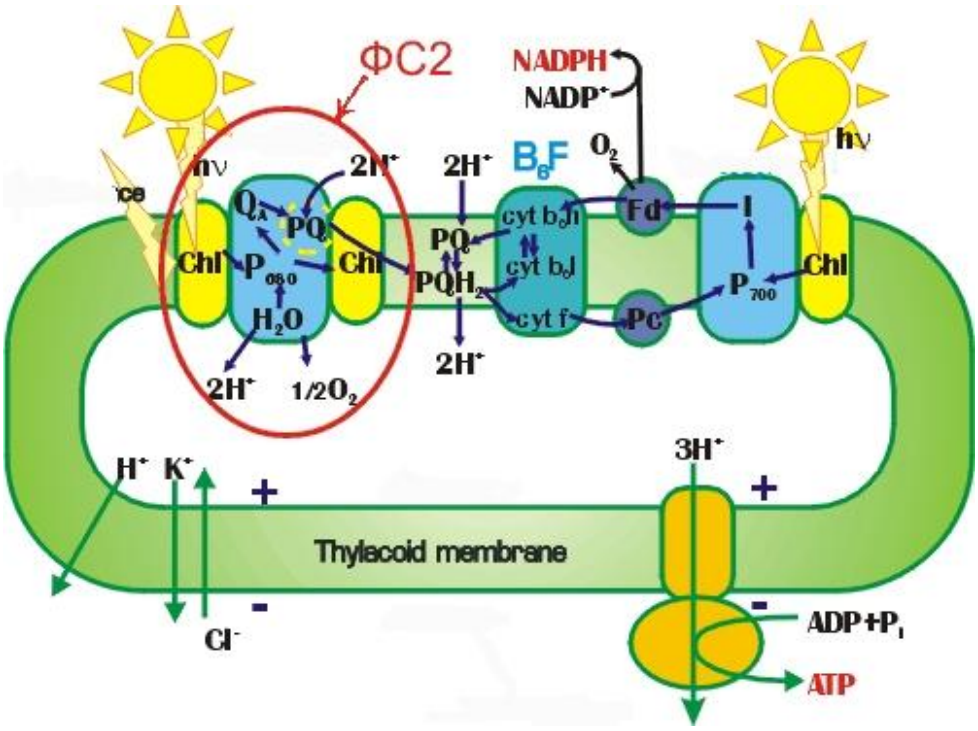


Рисунок 1.9. Разделение энергии внутри мембраны тилакоида

При этом восстанавливается Tyr_Z (остаток аминокислоты тирозин белка D1), служащий в качестве донора электронов для реакционного центра ФС2. Поглощение квантов света молекулами хлорофилла-*a* светособирающей антенны ФС2 сопровождается миграцией энергии

возбуждения к P680, состоящему из двух молекул хлорофилла. Первичная фотохимическая реакция представляет собой транспорт электрона от возбужденного P680 к феофитину (Pheo), т.е. разделение зарядов с образованием $P680^+$ и $Pheo^-$. В последствии $P680^+$ принимает электрон при образовании кислорода через Tyr_Z, а $Pheo^-$ окисляется акцептором хинонной природы – Q_A. От Q_A электроны поступают к другой молекуле пластохинона – Q_B, для восстановления которой необходимо два электрона. Q_B связывается с белком D1 ФСII в определённом месте, расположенном ближе к внешней стороне тилакоидной мембраны. Присоединение двух протонов из стромы к отрицательно заряженному Q_B, приводит к высвобождению последнего и миграции в виде PQH2 по тилакоидной мембране к цитохром b_6f комплексу, окисляющему PQH2 и передающему электроны на пул плацианинов. Механизм действия ряда гербицидов (триазины, фенилмочевины и др.) состоит в том, что они конкурируют с Q_B за место связывания на белке D1, таким образом, ингибируя электронный транспорт на участке между Q_A и Q_B [36]. При прекращении транспорта электронов между Q_A и Q_B возрастает квантовый выход флуоресценции, что может быть использовано как при изучении внутреннего состояния клеток, так и при определении концентрации хлорофилла-*a*.

Зависимость интенсивности флуоресценции от освещенности во времени называют кинетической кривой флуоресценции или кинетикой флуоресценции. Параметры кинетики флуоресценции хлорофилла-*a* обладают большой информативностью для характеристики состояния ППФ. Это связано с тем, что изменения состояния фотосинтетического аппарата сопровождаются изменением вероятности тушения энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла-*a*, что и проявляется в изменении интенсивности ЛИФ при освещении. Минимальный уровень флуоресценции (F_0) определяется флуоресценцией хлорофилла в условиях, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить ЛИФ ФС2,

поскольку все молекулы первичного хинонного акцептора Q_A готовы принять электрон от P680. Если все молекулы Q_A восстановлены (на свету), РЦ «закрыт», т.к. перенос электронов от P680 на феофитин невозможен в силу электростатического отталкивания. Поэтому энергия электронного возбуждения большей частью возвращается в антенну и интенсивность ЛИФ соответствует (F_m).

В адаптированных к темноте листьях все центры фотохимически активны и интенсивность ЛИФ соответствует уровню F_o. При освещении их насыщающей вспышкой уровень ЛИФ становится максимальным (F_m) и быстро релаксирует в темноте до исходного уровня. Величина отношения $(F_m-F_0)/F_m$ коррелирует с квантовым выходом фотосинтеза, что позволяет использовать этот параметр для характеристики процессов фотосинтеза даже на целых фотосинтезирующих объектах [37].

На постоянном свету происходит частичное восстановление Q_A. Освещение образца на этом фоне постоянного освещения насыщающей фотосинтез вспышкой увеличивает уровень флуоресценции, но только до интенсивности F_m', меньшей чем F_m, т.к. имеет место нефотохимическое тушение флуоресценции, связанное с диссипацией части энергии возбуждения в РЦ и фотосинтетической антенне. Оно обусловлено по крайней мере тремя процессами: ΔpH-зависимым тушением, уменьшением эффективного сечения поглощения ФС2 вследствие перехода части ССК к ФС1 и фотоингибированием ФС2. Таким образом, разница между максимальной интенсивностью ЛИФ F_m и F_m' обусловлена той частью ЛИФ, которая тушится за счет нефотохимических процессов. Все эти процессы отражаются на кинетической кривой, которая имеет немонотонный характер. При длительной экспозиции зеленых клеток на сильном свету ЛИФ сначала возрастает до F_m, затем снижается до F_m' за счет нефотохимического тушения [28].

Восстановленный Q_A^- легко отдает электрон на Q_B, который затем передает его в пул свободных пластохинонов. После однократного

возбуждения РЦ короткой интенсивной вспышкой окисление Q_A сопровождается быстрым уменьшением интенсивности ЛИФ за счет переноса электронов с Q_A на Q_B. Более сложная ситуация наблюдается, когда ФС2 возбуждается постоянным солнечным светом. Восстановленные молекулы Q_B передают электроны в пул пластохинона. Поэтому степень восстановленности Q_B, зависит от окислительного состояния пула. Его окисленность зависит, в свою очередь, транспорта электронов через ФС1 и далее к конечным акцепторам, таким как CO_2. После длительного периода темноты или при повреждении фотосинтетического аппарата фиксация CO_2 не происходит. По этой причине пул пластохинонов может быть восстановлен даже в первый момент освещения. В таком случае последующие электроны с Q_A^- смогут переноситься только обратно в донорную часть ФС2, что скажется на кинетической кривой. Таким образом, очевидно, что кинетика темновой релаксации переменной ЛИФ связана с состоянием Q_B, и пластохинонового пула.

Изучение фотосинтеза по кинетической кривой ЛИФ позволяет детектировать наличие повреждений при действии антропогенных загрязнений, повышенных интенсивностей солнечной и УФ-радиации, дефицита элементов минерального питания, температуры задолго до того, как они найдут свое внешнее проявление, в частности уменьшение численности клеток [38, 39].

В состоянии, когда РЦ клеток фитопланктона “закрыты” (Q_A находится в восстановленном состоянии) квантовый выход флуоресценции хлорофилла-а в ФС2 заметно больше, чем таковой для ФС2 с Q_A в окисленном состоянии. Схематически такое явление отражено на рисунке 1.10 [40, 41]. Здесь в верхней части рисунка изображена схема миграции энергии в нормальном состоянии ФС2, в нижней части рисунка изображена схема при закрытых РЦ, с восстановленным акцептором хинонной природы – (Q_A^-).

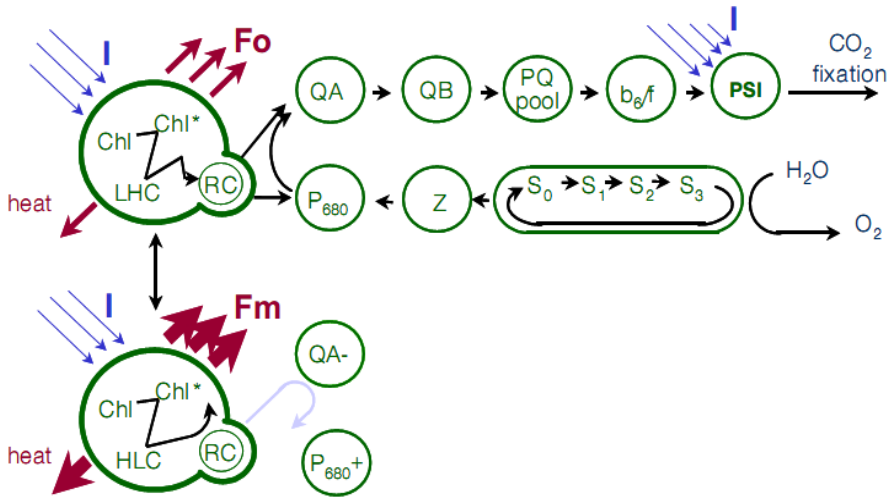


Рисунок 1.10. Упрощенная схема миграции энергии при фотосинтезе

Закрытие центров вызывается обычно мощной насыщающей вспышкой света, при которой восстанавливаются хинонные акцепторы, а центры переходят в закрытое состояние, при котором интенсивность ЛИФ соответствует максимальному уровню (F_m). Разность величин $F_v = F_m - F_0$ называется переменной флуоресценцией, а отношение переменной и максимальной флуоресценции равно эффективности использования энергии света в реакционных центрах или эффективности фотохимического тушения флуоресценции. В реальных условиях освещения развиваются процессы (в течение 1–2 минут), ведущие к уменьшению отношения (F_v/F_m), найденного для клеток, адаптированных к темноте. Как говорилось выше, наиболее важными здесь являются нефотохимические процессы тушения. Такого рода нефотохимическое тушение уменьшает величину ЛИФ F_m при действии насыщающей вспышки света до уровня $F_m{}'$ ($F_m{}'$<F_m). Снижение величины F_m может также вызываться и прямым фотоокислением РЦ с распадом его белка (D1) при высокоинтенсивных световых потоках солнечной и УФ-радиации. В условиях постоянного освещения при нефотохимическом тушении с уменьшением F_m до $F_m{}'$ и частичном восстановлении переносчиков в ЭТЦ с увеличением F_0 до F_t реальная способность фотосинтетического аппарата к

фотохимическому тушению ЛИФ хлорофилла уменьшается. Она определяется коэффициентом фотохимического тушения (qP) [24]:

$$qP = \frac{F_m{}' - F_t}{F_m{}' - F_0}, \tag{1.8}$$

а степень нефотохимического тушения – коэффициентом нефотохимического тушения (qN) [(24)]:

$$qN = \frac{F_m - F_m{}'}{F_m - F_0}. \tag{1.9}$$

Кроме исследования внутреннего состояния клеток, при экологическом мониторинге важно знать их количество. Так как количество фитопланктона определяют по концентрации хлорофилла-*a*, то ЛИФ методы являются весьма удобными для экологического мониторинга. Они оказывают неразрушающее воздействие на клетки фитопланктона и позволяют проводить измерения непосредственно в среде его обитания. Однако, из-за того, что измерения ЛИФ хлорофилла-*a* флуоресцентными методами могут проводиться непосредственно в среде обитания, то есть в различных водных объектах, различающихся по физическим свойствам и химическому составу, необходимо определить, как изменение этих свойств скажется на спектральной плотности ЛИФ хлорофилла-*a* [33, 42, 43].

1.2.4. Расчет концентрации хлорофилла-*a* по интенсивности флуоресценции

Многие исследователи в своих статьях отмечают зависимость функционального состояния фотосинтетического аппарата от различных факторов, среди которых наиболее значимыми являются внешние условия среды обитания: температура [2, 3, 44], освещенность [8, 9, 10, 13],

интенсивность ультрафиолетового излучения [2, 45, 46], наличие питательных веществ и гербицидов [47, 48]. Значения указанных параметров среды зависят от глубины, например, в работе [11] авторы отмечают, что эффективность фотосинтеза уменьшается с глубиной, и связывают это с уменьшением освещенности, интенсивности ультрафиолетового излечения, температуры и доступности питательных веществ. Существующие методики расчета концентрации хлорофилла-*a* основанные на измерении интенсивности флуоресценции, не учитывают влияние внешних условий на состояние клеток фитопланктона, что обуславливает большую погрешность таких расчетов.

Большинство методик анализа состояния фитопланктона предполагают вычисление концентрации хлорофилла-*a* по величине измеренной интенсивности флуоресценции в диапазоне длин волн 680-690 нм. Расчет концентрации хлорофилла-*a* осуществляется умножением измеренной интенсивности ЛИФ на вычисленный экспериментально коэффициент пропорциональности или поправочный коэффициент. Поправочный коэффициент для расчета концентрации фитопланктона, изменяется в зависимости от оборудования, которым проводятся измерения. Например, в погружаемом зонде SeaBird его определяют при измерении интенсивности флуоресценции 16,8 мкг/л *Thalassiosira weissflogii*. Формула для расчета поправочного коэффициента выглядит следующим образом:

$$SF = \frac{C}{F - N}, \tag{1.10}$$

где SF – «scale factor», поправочный коэффициент;

C – концентрация Thalassiosira weissflogii, 16,8 мкг/л;

F – флуоресценция фитопланктона в отсчетах;

N – темновой сигнал в отсчетах, который измеряется в той же воде, но без фитопланктона.

Полученный поправочный коэффициент используется для расчета концентрации хлорофилла-*a* при натурных исследованиях. Он носит постоянный характер и приводится в калибровочном листе прибора, однако значение концентрации хлорофилла-*a* рассчитанные при помощи него нельзя считать точным. Это связано с тем фактом, что для расчета поправочного коэффициента используется определенный вид фитопланктона и у других видов характеристики флуоресценции будут иными, кроме того его определения проходят в лабораторных условиях со строго определенными физическими параметрами среды. Поэтому необходимо всякий раз определять поправочный коэффициент для области, в которой планируется проводить эксперимент, а это неудобно и практически невозможно. В итоге, значение концентрации фитопланктона определяется по формуле:

$$C = SF \cdot (F - N), \tag{1.11}$$

Так как значение темнового сигнала значительно меньше сигнала флуоресценции, то изменениями в нем можно пренебречь. Таким образом, формула для расчета концентрации приобретает следующий вид:

$$C = SF \cdot (F), \tag{1.12}$$

Анализ данных флуоресценции, а не концентрации, в данном случае, представляется нам более уместным с точки зрения физики, так как прибор измеряет именно флуоресценцию, а формула 2.3 не представляется нам надежной для определения концентрации. Кроме того, поправочный коэффициент остается постоянным и может не учитывать особенности объектов, в которых проводятся измерения.

Традиционно, при определении концентрации хлорофилла-*a* методом ЛИФ, предполагают линейную зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации хлорофилла, и расчет выполняют по формуле (1.12).

В ряде работ [21, 49, 50] указывается, что коэффициент пропорциональности между ЛИФ и концентрацией (K) имеет разные значения в зависимости от вида микроводорослей присутствующих в исследуемой пробе воды. Среди множества параметров способных влиять на состояние фитопланктона наиболее важными являются температура и освещённость, так как эти параметры подвергаются наибольшему изменению в течение суток, года, при изменении глубины и широты как видно из рис. 1.11.

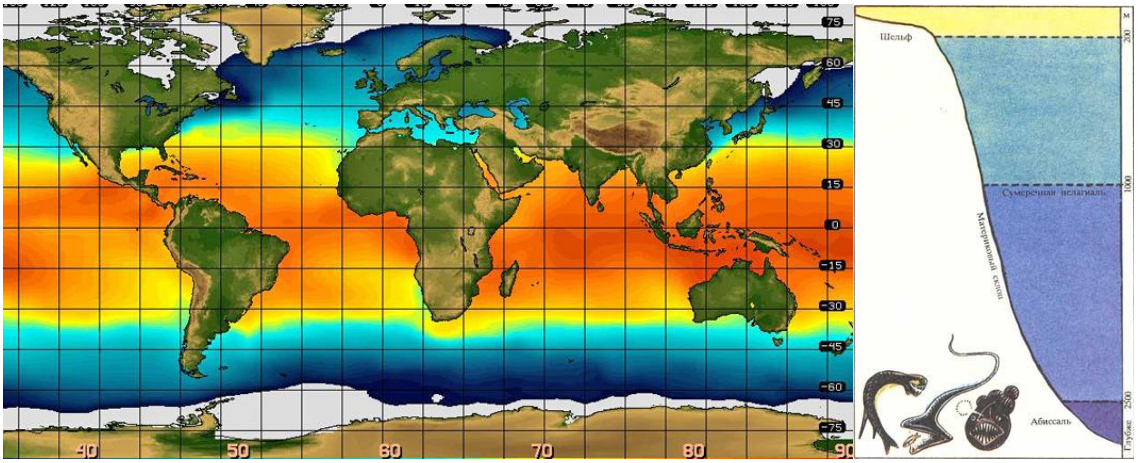


Рисунок 1.11. Изменение температуры от широты (слева) и освещенности на разных глубинах (справа).

Наблюдаемая зависимость спектров и интенсивности ЛИФ от параметров среды позволяет предположить наличие функциональной зависимости коэффициента K также от освещенности и температуры. Предполагая их влияние независимым, коэффициент K может быть представлен функцией вида (1.13):

$$K = s_0 \cdot s_1(Q) \cdot s_2(T), \tag{1.13}$$

где s_0 – коэффициент пропорциональности, зависящий от конструкции измерителя и вида фитопланктона;

$s_1(Q)$ – функция, зависящая от освещенности;

$s_2(T)$ – функция, зависящая от температуры.

Коэффициент K можно интерпретировать как функцию, характеризующую эффективность ЛИФ клетки микроводоросли. Чем больше численное значение K, тем меньше спектральная плотность ЛИФ клетки. Выражение коэффициента K в виде (1.13) позволит не только избежать ошибки при расчете концентрации хлорофилла-*a*, но и сделать измерения концентрации хлорофилла методом ЛИФ более универсальным. В связи с этим важной задачей является выявление характера влияния, которое оказывают параметры внешней среды, такие как освещенность и температура на спектры ЛИФ хлорофилла-*a*, который находится в составе клеток микроводорослей, и выражение коэффициента пропорциональности K в виде функции от температуры и освещенности.

1.3. Оптоволоконный датчик флуоресценции для измерения концентрации хлорофилла-*a*

Существует множество методик измерения ЛИФ растворенных в воде веществ. В том числе и хлорофилла. Однако при выполнении измерений в реальных водных объектах в широком диапазоне глубин возникают трудности связанные с погружением оптического оборудования на заданные глубины и обеспечения его работоспособности. В таких ситуациях, для отделения сложного измерительного оборудования от агрессивной водной среды применяют оптоволоконный датчик (ОВД) флуоресценции. К достоинствам ОВД ЛИФ можно отнести:

- малый вес,
- небольшой размер,
- высокая чувствительность,
- пассивность по отношению к среде работы,
- устойчивость к изменению температуры,
- устойчивость к химическому воздействию,

- устойчивость к изменению давления,

- работа на значительном удалении от основной аппаратуры,

- стабильность измерений.

Принцип ОВД ЛИФ заключается в том, что волокно датчика излучает свет в среду, в которой он неким образом модулируется или модифицируется. Затем свет улавливается тем же или другим волокном, и возвращается к регистрирующему устройству. Примерами таких датчиков являются датчики, определяющие светорассеивающие свойства среды, и датчики флуоресцентного излучения, измеряющие концентрацию какого-либо вещества в среде. Излучение, регистрируемое с помощью ОВД, условно разделяется на три типа:

- упругое (Релеевское) рассеяние;

- комбинационное (неупругое) рассеяние;

- флуоресценция.

Упругое рассеяние - это когерентное рассеяние света на оптических неоднородностях, размеры которых значительно меньше длины волны возбуждающего света. Датчики отражённого излучения или упругого рассеяния, выполняют измерения на той же длине волны, на которой происходит возбуждение среды.

Комбинационное (неупругое) рассеяние можно рассматривать как неупругое столкновение фотона с молекулой, находящейся на начальном энергетическом уровне. Применение ОВД комбинационного рассеяния имеет особое место в медицинских и химических исследованиях.

Флуоресцентный анализ при помощи ОВД применяется во многих научных исследованиях [51, 52], чаще всего их применяют в физике и химии. Выполнение флуоресцентных измерений предполагает знание определённых частот облучения и флуоресценции для конкретного исследуемого соединения.

В общем виде ОВД может состоять из одного или нескольких волокон, как показано на рисунках 1.12 и 1.13. Количество излучающих и

принимающих оптических волокон индивидуально в каждом конкретном случае. Через торец волокна лазерное излучение выходит в исследуемую среду и возбуждает в ней свечение. Возбуждаемое в среде излучение называется индуцированным. Лазерное излучение из торца распространяется в среде в виде сферической волны, ограниченной конусной поверхностью. Конусная поверхность имеет угловую апертуру, определяемую показателями преломления сердцевины и оболочки волокна и показателем преломления исследуемой среды. Торец волокна не только выводит лазерное излучение в среду, но через него также осуществляется прием индуцированного излучения из среды в оптоволокно. Т.е. возбуждение и регистрация индуцированного лазером излучения может происходить одним волокном, как показано на рисунке 1.12.

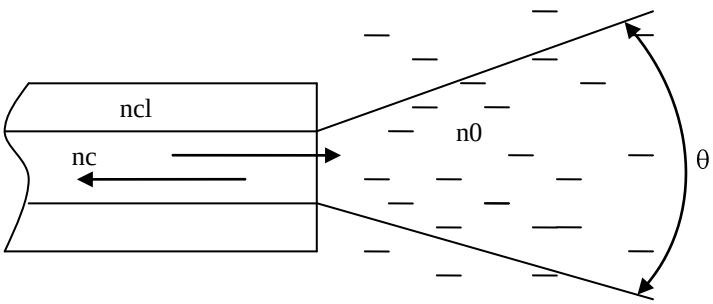


Рисунок 1.12. Принцип построения одноволоконного датчика

Угловая апертура оптоволокна может быть найдена как:

$$NA = \sin(\theta) = \frac{1}{n_0}\sqrt{n_C^2 - n_{CL}^2}, \quad (1.14)$$

где n_0 – показатель преломления среды;

n_C – показатель преломления сердцевины оптоволокна;

n_{CL} – показатель преломления оболочки оптоволокна.

У одноволоконного датчика ЛИФ есть ряд недостатков, которые существенно сказываются при исследовании водных объектов:

- возбуждающее и регистрируемое излучение необходимо разделять для направления принимаемого излучения на фотоприёмное устройство, часть принимаемого излучения теряется на оптических элементах;

- переотражение лазерного индуцирующего излучения в среде во много раз превышает измеряемый сигнал ЛИФ, вызывая зашумление;

- необходима спектральная фильтрация при регистрации излучения на длине волны отличной от длины волны лазерного источника, что приводит к потерям мощности на оптических элементах;

- собственные шумы оптической линии и интенсивность рассеивания в среде значительны по сравнению с уровнями регистрируемых излучений, что приводит к низкому соотношению сигнал-шум в слабоизлучающих средах.

Недостатки одноволоконных датчиков, связанные с высокими собственными шумами и потерями удается преодолеть или существенно уменьшить путем раздельной передачи индуцирующего лазерного и индуцированного флуоресцентного излучений. Принцип построения многоволоконных датчиков заключается в том, что лазерное излучение и ЛИФ передаются по отдельным волокнам. Наиболее распространенными в исследовательских и коммерческих целях являются двухволоконные датчики. Схема такого датчика приведена на рисунке 1.13.

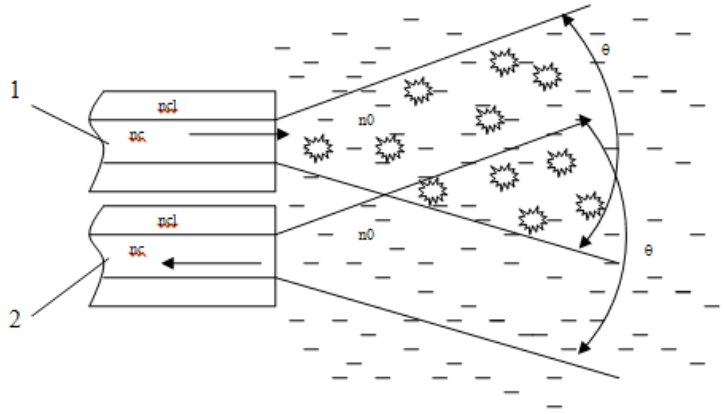


Рисунок 1.13. Принцип построения двухволоконного датчика

1- излучающее ОВ, 2 – принимающее ОВ

Разделение каналов приема и передачи в ОВД позволяет получить следующие преимущества:

- малый уровень фонового излучения от лазера в приёмном волокне;

- ввод и вывод излучения может быть выполнен без дополнительных оптических элементов;

- низкие фоновые излучения позволяют делать многоволоконные датчики с более длинными волоконными линиями, чем в одноволоконных датчиках;

- размещение волокон под углом друг к другу позволяет увеличить эффективность сбора ЛИФ датчиком;

К недостаткам многоволоконных ОВД можно отнести следующее:

- многоволоконные датчики больше одноволоконных;

- часть флуоресценции, принимаемая многоволоконными датчиками всегда меньше чем в одноволоконных

- размещение волокон под углом друг к другу ради увеличения эффективности сбора ЛИФ приводит к увеличению диаметра датчика.

Эффективность ОВД ЛИФ зависит не только от геометрических параметры ОВ и геометрии датчика, но и от мощности индуцирующего лазерного излучения. Поэтому, при создании эффективных ОВД требуется их предварительное моделирование, которое часто выполняется экспериментально. С целью повышения эффективности проектирования ОВД требуется разработать его математическую модель, которая позволит определить конфигурацию ОВД для флуоресцентных исследований в каждом конкретном случае его использования.

1.4. Экспериментальная измерительная система для мониторинга экологического состояния водных экосистем

Для решения поставленных задач и достижения цели исследований экологического состояния водных объектов требуется создание специализированного измерительно комплекса, обеспечивающего:

- долгосрочные измерения в различных водных акваториях на различных глубинах;

- точечные измерения и измерения по ходу движения судна;

- работу в различных климатических и погодных условиях, в том числе и при штормовой ситуации;

- высокую чувствительность при измерении в чистых океанических водах с малой концентрацией хлорофилла-*a* и в прибрежных водах, богатых растворенными органическими веществами.

В рамках мониторинга необходимо обеспечит возможность долгосрочных измерений в различных акваториях на различных глубинах [53]. Кроме того мониторинговые измерения, необходимо осуществлять измерения в течение всего годового цикла. Для удовлетворения множества аспектов мониторинговых исследований, необходимо создать экспериментальную систему, в основе которой должны быть положены оптоволоконные датчики. Такая система должна измерять спектры ЛИФ фитопланктона в воде на различных глубинах и обеспечивать измерение параметров воды, таких как температура, давление, освещенность. Позволять проводить измерения как в автономном режиме, на привязных буях, так и во время стоянок и движения исследовательского судна.

Для проведения измерений в различных погодных условиях измерительную систему необходимо разделить на 2 части. Первая часть – блок управления, в который входят измерительные приборы для возбуждения ЛИФ и измерения спектров ЛИФ, он должен помещаться в каюте исследовательского судна. Второй блок размещается на палубе судна. Во второй блок должны входить погружаемый модуль, с необходимыми датчиками, оптоволоконный кабель и специализированная лебедка. Необходимость использования специальной лебедки обусловлена наличием

вращающихся оптических сочленений, через которые оптическая энергия передается на вращающийся барабан лебедки с закрепленным на нем ОВ кабелем. Чтобы учесть влияние факторов среды на хлорофилл-*a* в погружаемом модуле кроме датчика флуоресценции должны быть датчики температуры и освещенности. Для определения глубины, на которой проводят измерения, система должна быть снабжена измерителем давления.

Данная система позволит отработать рассмотренные в работе аспекты, связанные с изучением спектров ЛИФ хлорофилла-*a* в составе клеток фитопланктона. Дальнейшие исследования, проведенные в реальных полевых условиях, позволят скорректировать общую стратегию экологического мониторинга.

1.5. Выводы по главе

В главе показана возможность использования фитопланктона как биоиндикатора различных изменений, протекающих в среде его обитания. К таким изменениям могут относиться как природные, например изменение освещенности, так и антропогенные, например загрязнение воды гербицидами.

Теоретически описаны механизмы воздействия различных факторов на физические свойства процесса фотосинтеза. Объяснена связь между процессами фотосинтеза и флуоресценции, которая позволяет, исследуя ЛИФ, давать оценку некоторым этапам фотосинтеза, тем самым, оценивая физиологическое состояние клеток фитопланктона.

Показана необходимость модернизации методики расчета концентрации хлорофилла природного фитопланктона по интенсивности ЛИФ. Показана необходимость учитывать не только спектральную плотность флуоресценции, но и параметры среды, такие как температура и освещенность.

Обосновано использование оптоволоконного датчика для измерения спектров ЛИФ фитопланктона. Показана необходимость построения модели такого датчика, для изучения его характеристик при измерении спектров ЛИФ фитопланктона в воде.

В завершении главы указаны принципы, которым должна соответствовать экспериментальная система для мониторинга экологического состояния водных объектов.

ГЛАВА 2. ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ СРЕДЫ НА СПЕКТРЫ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА-*a*

Глава посвящена решению задачи изучения зависимости спектров ЛИФ хлорофилла-а живых клеток фитопланктона, обитающих в естественных условиях и развитию методики расчёта концентрации хлорофилла-а в воде с учетом ее физических параметров.

2.1. Определение параметров флуоресценции для расчета концентрации хлорофилла-*a*

Для расчета концентрации хлорофилла-*a* необходимо определить уровни интенсивности (параметры) флуоресценции. В данной работе под параметрами флуоресценции подразумеваются характерные интенсивности флуоресценции на кинетической кривой ЛИФ хлорофилла-*a*. Основными можно назвать F_0 – минимальную флуоресценцию, и F_m – максимальную флуоресценцию. Параметр F_0 измеряют при слабой интенсивности лазерного излучения, которая не вызывает изменений в фотосинтетическом аппарате. Параметр F_m измеряют при насыщающем лазерном излучении, при прекращении расходования поглощенной лазерной энергии на фотосинтез. Принцип насыщения фотосинтетического аппарата показан на рисунке 1.10.

В большинстве статей для расчета концентрации хлорофилла-*a* по данным флуоресцентных измерений используют F_0 [54, 55, 23]. Однако, в ряде работ указывается, что присутствие в пробе гербицидов способно за короткий промежуток времени закрыть все реакционные центры [20] увеличив интенсивность ЛИФ с минимальной до максимальной, при постоянной интенсивности лазерного индуцирующего излучения. Поэтому, необходимо определить параметр, который целесообразно использовать для

расчёта концентрации хлорофилла-*a*, с учетом возможных изменений в фотосинтетическом аппарате, оказывающих воздействие на интенсивность ЛИФ хлорофилла-а.

Технически сложно обеспечить облучение клеток фитопланктона светом, позволяющим измерить F_0, причем не только в полевых условиях, но и в лаборатории. Это связано, прежде всего, с тем, что раствор, содержащий определенное количество живых клеток, является неустойчивой системой, которая подвергается постоянному изменению. Следовательно, изменение концентрации фитопланктона может привести к тому, что даже слабое освещение будет вызывать насыщенную флуоресценцию части клеток, а для того, чтобы эксперимент считался успешным, необходимо обеспечить одинаковое воздействие на все клетки в растворе. Приоритет при распределении поглощенной световой энергии в клетке у процессов фотосинтеза намного выше, чем у флуоресценции, если клетка не повреждена. Следовательно, при конкурентной связи фотосинтеза и флуоресценции по интенсивности последней можно определять состояние фотосинтетического аппарата. При закрытии реакционных центров и прекращении транспорта поглощенной энергии на фотосинтез, ЛИФ достигает F_m. Следовательно, эффективность фотосинтеза можно определить по разности F_m и F_0,. При этом F_m – стабильный параметр, зависящий только от вида культуры и концентрации хлорофилла-*a*. При разработке методов измерения и измерительной аппаратуры для определения концентрации хлорофилла методом ЛИФ, очевидно, необходимо использовать именно параметр F_m [24].

Для доказательства проведем мысленный эксперимент. Потеря поглощенной энергии лазерного излучения в виде теплового излучения не учитывается, так как ее воздействие на оба параметра F_m и F_0, будем считать одинаковыми. Флуоресценция и фотосинтез - конкурирующие процессы, следовательно, ЛИФ может быть представлена как часть поглощенной энергии лазерного излучения, величина которой определяется

коэффициентом утилизации энергии. Интенсивность ЛИФ может быть выражена через поглощенную энергию, и коэффициент утилизации. Как это сделано в формуле (1.5).

Коэффициент утилизации показывает, какая часть энергии расходуется на конкурирующие с фотосинтезом процессы. В нашей модели таким процессом является флуоресценция. Следовательно, если коэффициент утилизации минимален, практически вся энергия расходуется на фотосинтез, и клетка находится в оптимальном состоянии; а если коэффициент утилизации максимален, то практически вся энергия утилизируется за счет ЛИФ, фотосинтез не осуществляется должным образом, следовательно, клетка находится в угнетенном состоянии.

Пусть $E_{\text{погл}}$ представляет ту часть энергии лазерного излучения, которая поглощена рассматриваемой клеткой, в свою очередь, она пропорциональна плотности потока лазерного излучения. Кроме того, величина поглощённой энергии зависит от эффективного сечения поглощения, которое определяется состоянием и геометрическими параметрами клетки. Поглощенную энергию можно представить, как произведение плотности потока лазерного излучения на площадь эффективного сечения поглощения (2.1).

$$E_{\text{погл}} = P_{\text{лаз}} \cdot \sigma \tag{2.1}$$

где $P_{\text{лаз}}$ ·– плотность потока лазерного излучения;

σ – эффективное сечение поглощения, которое зависит от интенсивности возбуждения.

Если на клетку оказать воздействие, изменяющее коэффициент утилизации, например вызывающее полное закрытие РЦ, и изменяющее эффективность фотосинтеза и физиологическое состояние самой клетки, то интенсивность ЛИФ такой клетки можно записать как:

$$F_m = E_{\text{погл}} \cdot \alpha_{max}, \quad (2.2)$$

Поскольку, воздействие гербицидов изменяет только эффективность фотосинтеза и не влияет на поглощение энергии, следовательно, энергия лазерного излучения, поглощённая до воздействия и после – одинакова. Если поглощенную энергию лазерного излучения выразить через F_0 и подставить полученное выражение в выражение (2.2), получим:

$$F_m = \frac{F_0}{\alpha_{min}} \cdot \alpha_{max}, \quad (2.3)$$

где F_0 –интенсивность ЛИФ минимального уровня флуоресценции.

Выразим отсюда F_0:

$$F_0 = \frac{F_m}{\alpha_{max}} \cdot \alpha_{min} = S \cdot \alpha_{min}, \quad (2.4)$$

где S – постоянный коэффициент, зависящий от вида фитопланктона и конструкции датчика флуоресценции.

Таким образом, из уравнения (2.4) видно, что интенсивность флуоресценции F_0 может быть измерена только при минимальном коэффициенте утилизации. При увеличении a интенсивность флуоресценции так же увеличивается вплоть до значения F_m, независимо от концентрации. Это позволяет сделать вывод о том, что величина F_0 не может быть использована для определения концентрации, так как представляется невозможным обеспечение постоянного минимального уровня возбуждения для растворов с разной концентрацией. Для параметра F_m можно записать следующее выражение:

$$F_m = \sum_{i=1}^{n} F_{m0} \cdot \alpha_i, \quad (2.6)$$

где F_{m0} – максимальная флуоресценция одной клетки;

α_i – коэффициент утилизации, учитывающий свойства клетки.

Если пренебречь различиями между интенсивностями максимальной флуоресценции для различных видов фитопланктона и считать, что ЛИФ для каждой клетки в заданной пробе одинакова, то формулу для F_m можно записать следующим образом:

$$F_m = N \cdot F_{m0}, \tag{2.7}$$

где N – это количество флуоресцирующих клеток

Таким образом, учитывая сказанное выше, приходим к классическому виду выражения для расчета концентрации хлорофилла-*a*:

$$C = K \cdot F, \tag{2.8}$$

где F – интенсивность ЛИФ хлорофилла-а. Для расчета концентрации в качестве F необходимо использовать F_m.

K – коэффициент пропорциональности, который показывает сколько мкг хлорофилла-*a* необходимо для получения ЛИФ мощностью 1 Вт в 1 литре раствора. Данный коэффициент не зависит от состояния фотосинтетического аппарата, а определяется, как и коэффициент S в (2.4), видом фитопланктона и конструкцией датчика.

Имеется большое количество публикаций [56, 18, 57, 58, 59, 54], посвященных исследованию зависимости концентрации фитопланктона от таких параметров окружающей среды как температура, глубина, соленость, освещенность и др. В тех случаях, когда измерения выполняются методами ЛИФ, считается, что концентрация хлорофилла-*a* пропорциональна измеренной интенсивности ЛИФ и может быть вычислена по формуле (2.8).

Таким образом, по умолчанию предполагается, что интенсивность ЛИФ хлорофилла-*a* в составе клеток фитопланктона не зависит от

параметров среды. В тоже время в ряде работ указывается [60, 54], что ЛИФ хлорофилла-а, присутствующего в клетках фитопланктона, сильно зависит от таких физических параметров среды как температура и освещенность.

2.2 Влияние параметров среды на спектры лазерно-индуцированную флуоресценцию

Для определения зависимость спектров ЛИФ хлорофилла-*а* от параметров среды, проводилось сравнение данных, полученных различными методами. Анализ выполненных в ряде экспедиций измерений концентрации хлорофилла-*а* методом ЛИФ [61, 16], и методом экстрактного определения фотосинтетических пигментов [28], показал, что наблюдаются различия. При выполнении суточных станций в морских акваториях залива Петра Великого в Приморском крае, было замечено, что интенсивность флуоресценции, регистрируемая погружаемыми датчиками, изменяется с течением времени, даже в тех случаях, когда концентрация фитопланктона, а значит и концентрация хлорофилла-*а* существенно не меняются.

Измерения флуоресценции и параметров среды обитания осуществлялись зондом SeaBird оснащенным датчиком флуоресценции «ECO BB2F». Датчик представляет собой миниатюрное устройство сочетающие в себе измеритель рассеянного света и флуоресценции, позволяющее измерять обратное рассеяние света на длинах волн 470 нм и 700 нм, а так же измерять интенсивность флуоресценции хлорофилла-*а* в том же диапазоне длин волн. Угол между источником и приемником оптического излучения выбран так, чтобы снизить влияние размера и типа взвешенных в воде частиц на сигнал. Для возбуждения флуоресценции хлорофилла-*а* в данном устройстве используется синий светодиод с максимумом излучения на длине волны 455 нм. Для отсечки излучения в диапазоне длинных волн используют голубой интерференционный фильтр. Оптическая схема

устройства представляет собой двухлучевой флуориметр [24]. В качестве детектора флуоресцентного сигнала используется кремниевый фотодиод.

Спектры ЛИФ измерялись при помощи оптоволоконного спектрофлуориметра [62]. Обработка спектров осуществлялась согласно методике, коллективом сотрудников ДВО РАН под руководством д. ф.-м. н. профессора О. А. Букина [34]. Результаты измерения спектров приведены на рисунке 2.1, значения концентрации хлорофилла-а рассчитанные по измеренным спектрам при помощи данной методики [34] приведены на рисунке 2.2. На обоих рисунках представлены результаты измерений, выполненных в естественной среде обитания фитопланктона в водах Дальневосточного морского заповедника недалеко от научной станции «Мыс Шульца» на глубине 4 м. Измерения выполнены во время одной из суточных станций в сентябре 2013 г. Концентрация рассчитана экстрактным спектрофотометрированием. Данные предоставлены С. П. Захарковым в. н. с. лаборатории палеоокеанологии Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН.

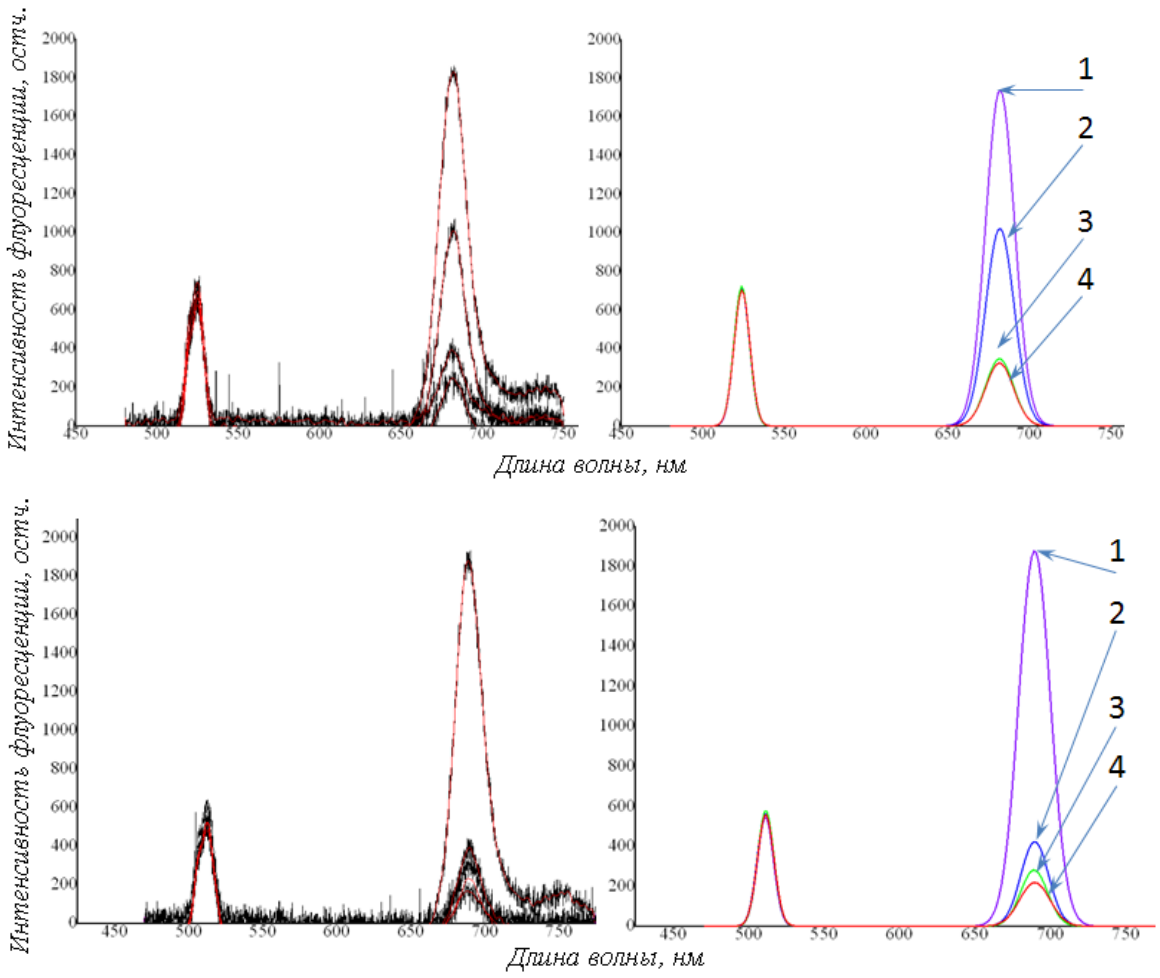


Рисунок 2.1. Спектры ЛИФ природной воды. Необработанные – слева; обработанные – справа.

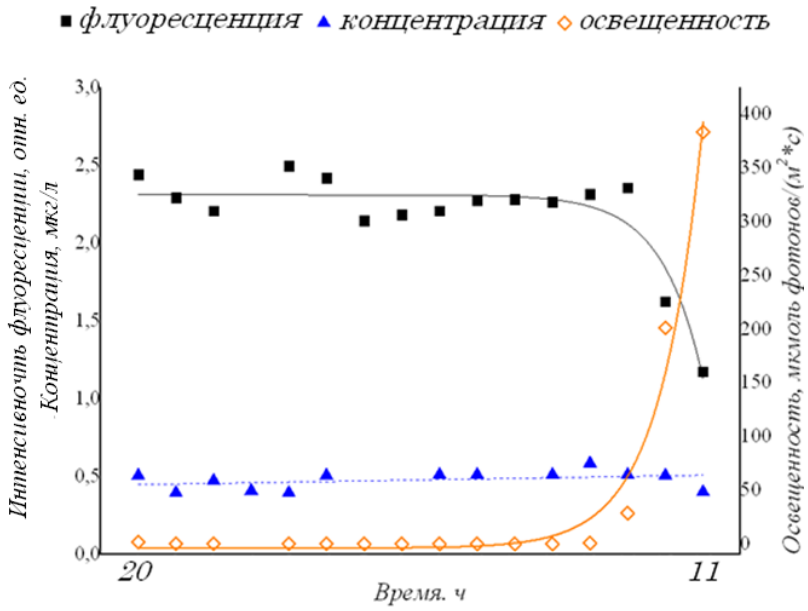


Рисунок 2.2. Несоответствие характера изменения концентрации и ЛИФ хлорофилла-а при изменении освещенности

Измерения спектров ЛИФ и заборы проб для спектрофотометрирования проводились на глубине 4 метра с 20:00 до 11:00 включительно с интервалом в 1 час. Результаты измерений, полученные при помощи зонда SBE и измерительной системы собственной разработки, приведенные на рис. 2.2, имеют вид экспоненциальной характер. Вычисленный коэффициент корреляции для данных зонда SBE равен 0,85, а для данных измерительной системы собственной разработки равен 0,8. Измеренные значения концентрации хлорофилла-*a*, полученные в результате не флуоресцентных измерений аппроксимировались линейной функцией. При этом данные, полученные в результате флуоресцентных измерений, обоими приборами хорошо коррелируют между собой с коэффициентом корреляции 0,92. На графике зависимости спектральной плотности ЛИФ наблюдается ее резкое уменьшение после 9 часов утра, когда солнце достаточно высоко поднимается над горизонтом, что не наблюдается на графике изменения концентрации хлорофилла-*a*, полученном экстрактным методом. Считая, что концентрация фитопланктона на указанной глубине в течение суток не изменялась, можно предположить, что изменение спектральной плотности ЛИФ связано с изменением внешних условий оказывающих влияние на состояние клеток фитопланктона. Корреляционный анализ изменения параметров среды, измеряемых датчиками зонда SBE, позволил предположить сильную связь спектров ЛИФ с освещенностью, график изменения, которой также приведен на рисунке 2.2.

На глубинах более 15 м наблюдалось резкое снижение температуры и одновременно, значительный рост спектральной плотности ЛИФ. Можно предположить, что увеличение спектральной плотности ЛИФ хлорофилла-*a*, в термоклине связано не только с увеличением его концентрации, но и с уменьшением эффекта теплового тушения. Графики изменения интенсивности ЛИФ и температуры с глубиной приведены на рисунке 2.3. Вычисленный коэффициент корреляции между температурой и

интенсивностью ЛИФ в диапазоне глубин 15 – 20 м, который выделен пунктирной линией, составляет – 0.98, что позволяет предположить наличие линейной зависимости между этими параметрами.

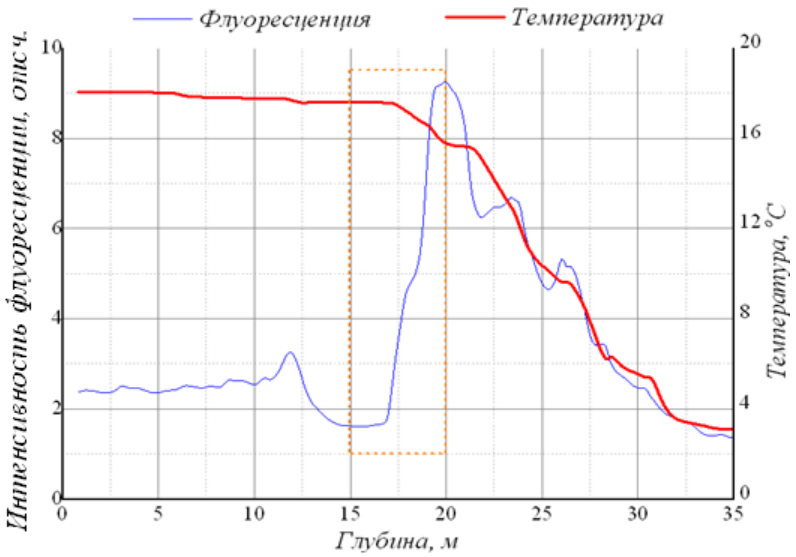


Рисунок 2.3. Изменение интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a* и температуры воды от глубины (сентябрь 2013).

Данные полученные в ходе экспедиционных исследований подтверждают отсутствие линейной зависимости между концентрацией хлорофилла-*a* в составе живых клеток фитопланктона и интенсивностью его флуоресценции при изменении внешних параметров среды. Различие между полученными значениями так же подтверждает необходимость поиска зависимости спектров ЛИФ хлорофилла-*a* от параметров среды для выражения коэффициента пропорциональности *K* в виде выражения (1.13).

2.2.1 Исследование влияния освещенности

В природных водоемах параметром, подвергающимся наибольшему изменению в течение суток или с глубиной, является освещенность. В течение суток освещенность меняется в зависимости от высоты солнца над горизонтом и состояния атмосферы. С увеличением глубины интенсивность освещенности уменьшается практически до нуля на большой глубине [34], что связано с поглощением света в воде.

В ряде статей [63, 64, 24, 65, 66] отмечается, что увеличение интенсивности освещенности приводит к снижению интенсивности флуоресценции клеток фитопланктона, во-первых, в связи с увеличением энергии, расходуемой в клетках на фотосинтез, что, в результате, вызывает фотохимическое тушение [64, 24], во-вторых, происходит изменение структуры хлоропластов содержащих хлорофилл [65, 66, 67]. В работах [63, 68] также показано, что при достижении критических значений освещенности, флуоресценция достигает максимального или минимального уровня, и дальнейшее увеличение или уменьшение интенсивности освещения не приводит соответственно к дальнейшему увеличению или уменьшению интенсивности флуоресценции.

Схема и фотография лабораторной установки для исследования зависимости спектров ЛИФ хлорофилла-а от освещенности изображена на рисунке 2.4.

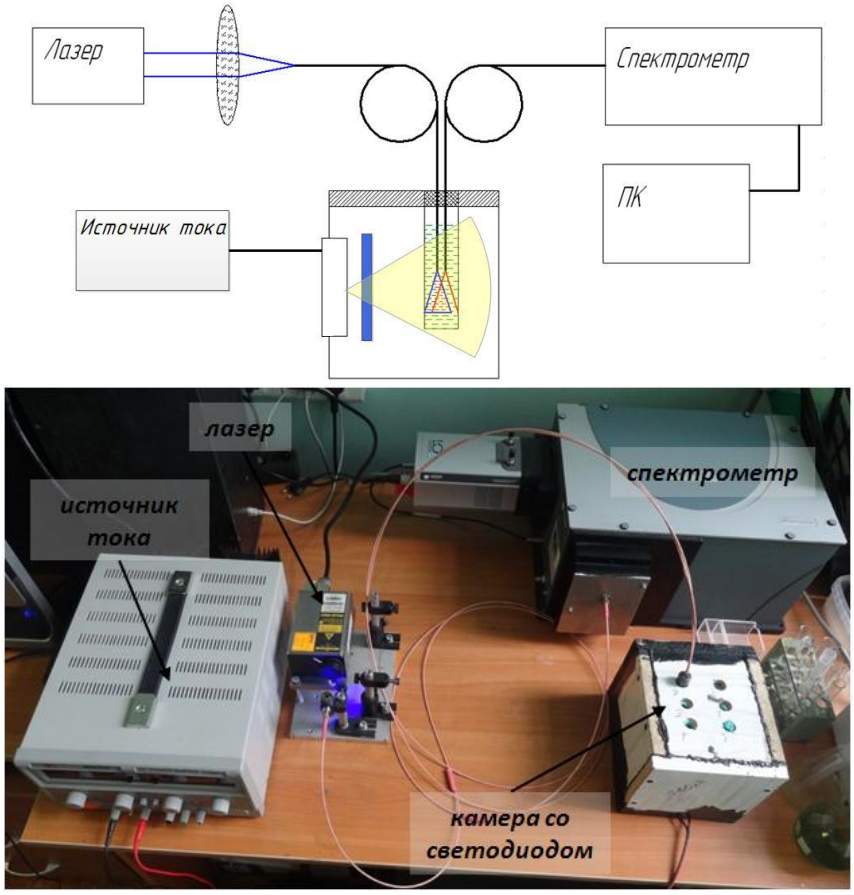


Рисунок 2.4. Схема и фотография лабораторной установки с изменяющейся освещенностью

В ходе эксперимента колба с культурой микроводоросли *Isochrysis galbana* была помещена в темную камеру, где происходила адаптация к темноте в течение 30 минут. Затем в камере включался источник света, в качестве которого использовался белый светодиод. Важным преимуществом такого источника света явилась малая рассеиваемая мощность, что позволило не применять специальные меры для охлаждения камеры. Интенсивность освещенности изменялась регулировкой протекающего через светодиод тока, при токе 700 мА измеренная мощность оптического излучения составила 1,8 Вт. Изменение освещенности производили с равными интервалами в 20 минут. Флуоресценция в растворе возбуждалась постоянным лазерным излучением с длиной волны 445 нм и оптической мощностью 40 мВт.

Измеренные спектры ЛИФ образцов фитопланктона, представлены на рисунке 2.5.

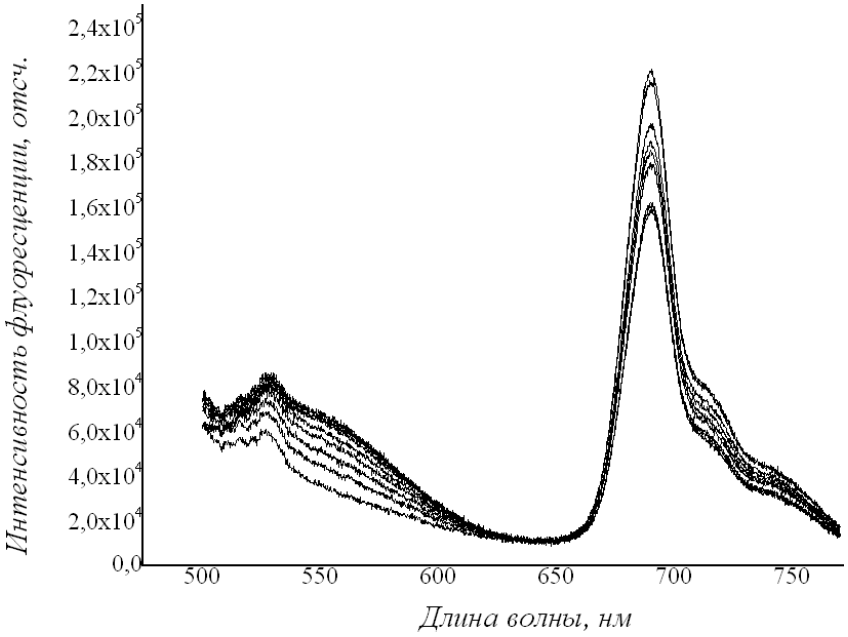


Рисунок 2.5. Динамика спектров ЛИФ фитопланктона при изменении освещенности

Обработку спектров осуществляли по методике, описанной в [63, 69]. Результаты обработки представлены на рисунке 2.6.

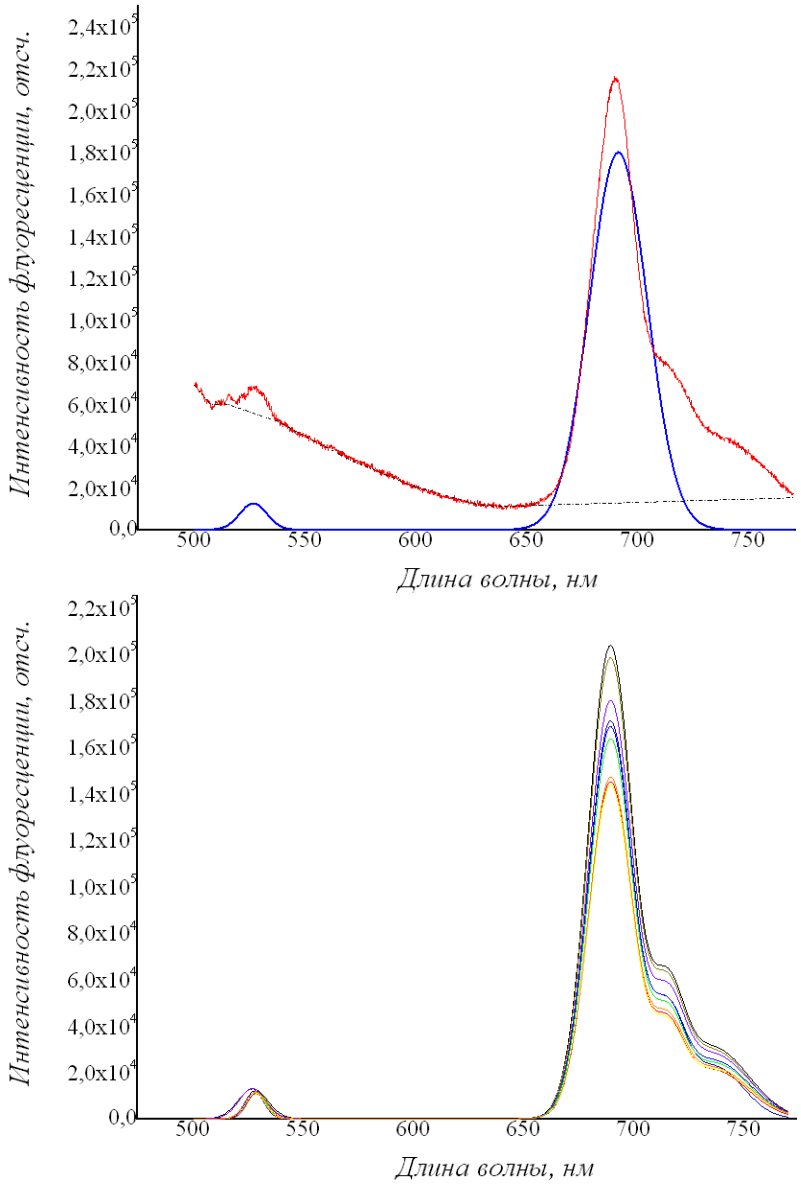


Рисунок 2.6. Обработка спектров ЛИФ образцов фитопланктона

Спектральную плотность ЛИФ хлорофилла-*a* определяли в диапазоне 685-695 нм. Полученные экспериментальные значения интенсивности флуоресценции для культуры микроводоросли *Isochrysis galbana* показаны на рисунке 2.7. Эти данные хорошо аппроксимируются прямой линией, уравнение которой приведено в поле графика. Вычисленный коэффициент корреляции для экспериментальных данных и линии аппроксимации подтверждает высокую степень их близости.

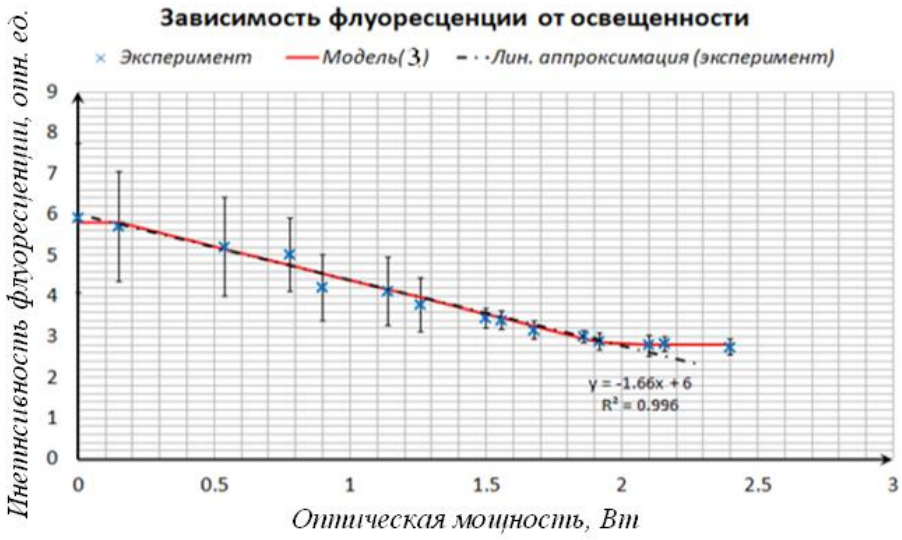


Рисунок 2.7. Зависимость интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a* (685 нм) нормированной на интенсивность КР воды от освещенности для культуры микроводоросли *Isochrysis galbana*.

На рисунке можно наблюдать наличие участков насыщения ЛИФ: при низком и при высоком уровне освещенности, что подтверждает выводы, сделанные в работах [63, 68]. С учетом этих нелинейных эффектов насыщения ЛИФ, зависимость интенсивности флуоресценции f от освещенности Q можно представить в виде следующей системы уравнений (2.8):

$$f(Q) = \begin{cases} f_{max} & \text{при } Q < Q_1 \\ \left(f_{max} + k(Q - Q_1)\right), & \text{при } Q_1 < Q < Q_2 \\ f_{min} & \text{при } Q_2 < Q \end{cases} \qquad (2.8)$$

где Q_1– значение уровня освещенности, ниже которого интенсивность флуоресценции стабилизируется на максимальном уровне f_{max};

Q_2 – значение уровня освещенности, выше которого интенсивность флуоресценции стабилизируется на минимальном уровне f_{min};

k – коэффициент пропорциональности, который для линейного участка графика может быть рассчитан по формуле:

$$k = \frac{f_{max} - f_{min}}{Q_1 - Q_2} \quad (2.9)$$

Представление коэффициента k в виде (2.9), позволяет его интерпретировать как скорость изменения интенсивности ЛИФ от уровня освещенности. Определение коэффициента k может быть легко выполнено путем последовательного измерения интенсивности ЛИФ в пробе выделенной культуры микроводорослей при различных уровнях внешнего освещения, для каждого вида фитопланктона. Этот коэффициент может быть также использован в дальнейшем для выявления видового состава микроводорослей в пробах воды. В зависимости от вида фитопланктона значения критической освещенности Q_1 и Q_2, как и интенсивность флуоресценции f_{max}; и f_{min} при этих измерениях будут разными для различных видов микроводорослей.

В поле графика на рисунке 2.7 приведено уравнение аппроксимирующей линии, из которого определяется коэффициент $k = -1.66$. Так же на графике наблюдаются участки насыщения, которые позволяют определить значения параметров: $f_{max} = 5{,}8$ усл.ед., $f_{min} = 2{,}7$ усл.ед., $Q_1 = 0{,}15$ Вт, $Q_2 = 1{,}9$ Вт. На этом же рисунке утолщенная линия построена по уравнению (2.8) с учетом найденных параметров. Вычисленный коэффициент корреляции для экспериментальных данных и модельной линии равен 0,996. Это подтверждает высокую степень их соответствия.

Освещенность в течение суток может быть представлена в виде функции Гаусса, которая выражается следующим образом[(70)]:

$$Q(t) = Q_0 + \frac{A}{\omega\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot exp\left[-2\left(\frac{t - t_c}{\omega}\right)^2\right], \quad (2.10)$$

где Q_0– освещенность в темное время;

A – интегральная характеристика, находится эмпирически;

t_c – время максимальной освещенности;

ω – дисперсия.

На рисунке 2.8 представлен график функции (2.10), который показывает изменение интенсивности освещенности в течение суток. На графике время восхода солнца 8 часов утра, и время захода – 8 часов вечера. При этом в зените солнце находится в 2 часа дня, подобный световой цикл типичен для сентября и марта, когда отношении светового дня к суткам равно ½. Так как экспедиционные измерения проводились в конце сентября, то можно сказать, что освещенность в течение суток изменялась согласно графику на рисунке 2.9. На рисунке 2.9 представлены измеренные значения освещенности в течение суток на глубине около 2 метров.

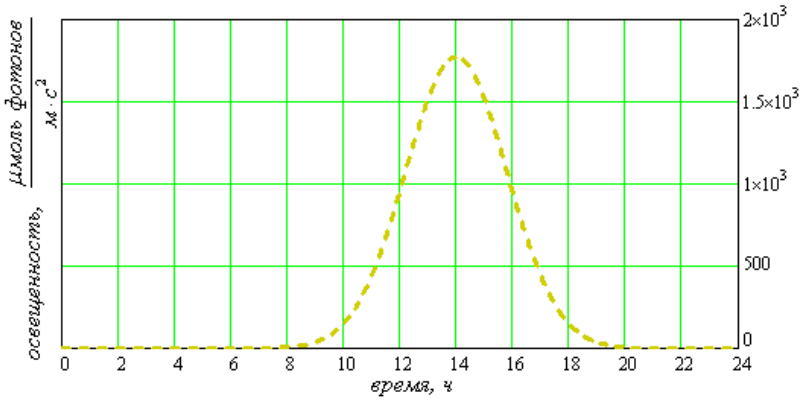


Рисунок 2.8. Изменение освещенности в течение суток

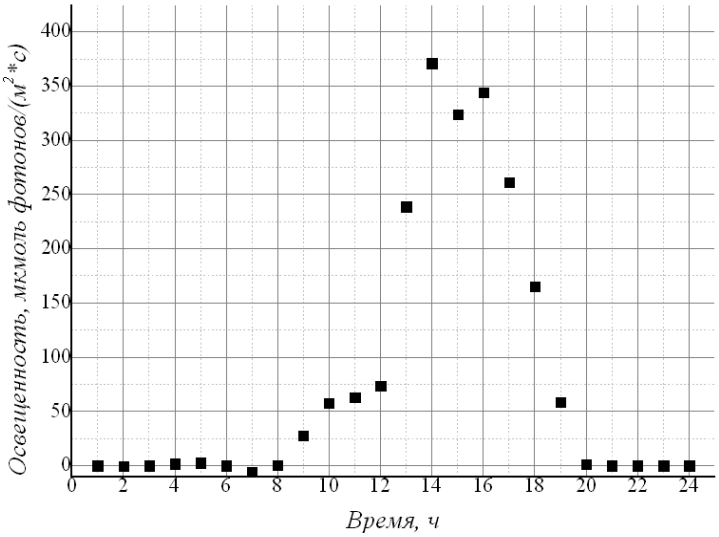


Рисунок 2.9. Суточные изменения освещенности, измеренные SBE

Как видно данные измерений хорошо соотносятся с теорией, следовательно, для определения характера изменения интенсивности флуоресценции в течение суток достаточно использовать данные полученные при помощи модели. Учет освещенности может осуществляться при наличии известных параметров $f_{max}, f_{min}, Q_1, Q_2$. Таким образом, подставив $Q(t)$ из уравнения (2.10) в (2.8) получим модель суточного изменения флуоресценции, которая показана на рисунке 2.10.

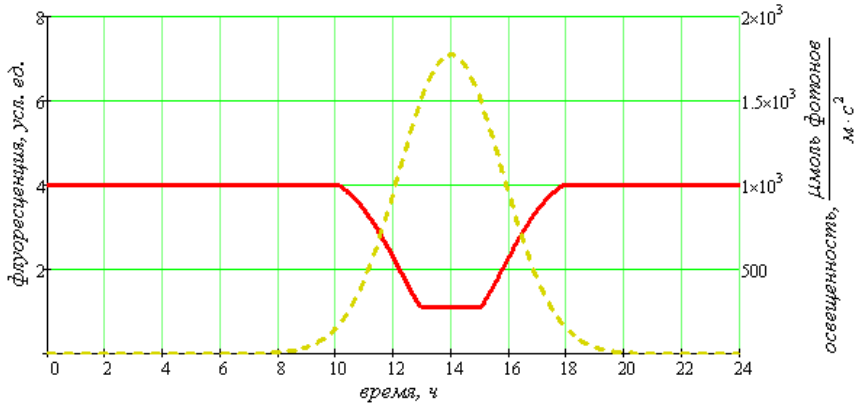


Рисунок 2.10. Суточные изменения интенсивностей освещенности и флуоресценции, результаты моделирования. Освещенность обозначена пунктирной линией, флуоресценция – сплошной.

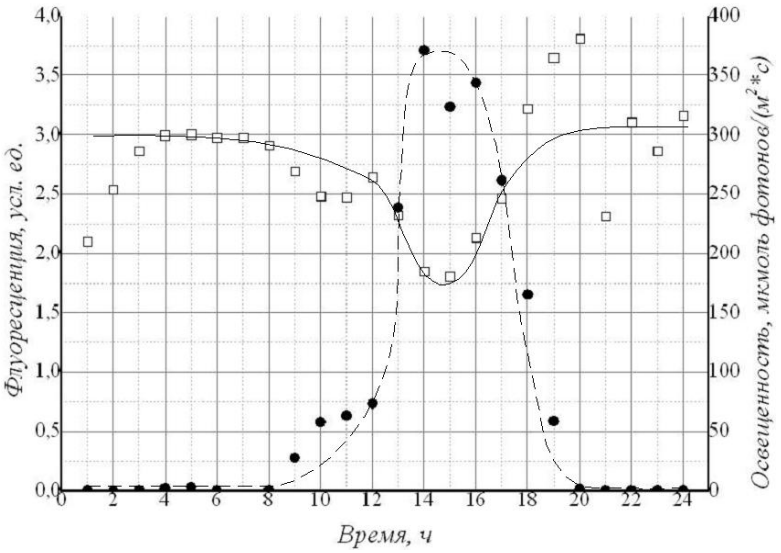


Рисунок 2.11. Суточные изменения интенсивностей освещенности и ЛИФ, данные SBE. Освещенность обозначена пунктирной линией, флуоресценция – сплошной.

Определим функцию $s_1(Q)$ в выражении (1.13) как отношение между максимально возможным (в темноте) значением интенсивности флуоресценции и наблюдаемым, т. е.:

$$s_1(Q) = \frac{f_{max}}{f(Q)} \tag{2.11}$$

Подставив (2.8) в (2.11), получим выражение для $s_1(Q)$ в виде кусочно-линейной функции (2.12):

$$s_1(Q) = \begin{cases} 1 & \text{при } Q < Q_1 \\ f_{max} / \left(f_{max} + k(Q - Q_1)\right), & \text{при } Q_1 < Q < Q_2 \\ f_{max} / f_{min} & \text{при } Q_2 < Q \end{cases} \tag{2.12}$$

2.2.2 Исследование влияния температуры

В работах [71, 72] указывается, что повышение температуры приводит к нефотохимическому тушению ЛИФ хлорофилла-*a*. Возникновение

температурного тушения обусловлено повышением частоты процессов столкновения молекул, что сопровождается дезактивацией возбужденных уровней путем безизлучательной колебательной релаксации молекул и понижением квантового выхода ЛИФ. Увеличение температуры должно приводить к изменению спектра и к уменьшению спектральной плотности ЛИФ хлорофилла-*a* и, следовательно, должно учитываться при вычислении концентрации хлорофилла-*a* в тех случаях, когда температура воды изменяется в течение суток или при измерениях вертикального профиля распределения фитопланктона.

В немногочисленных исследованиях показано, что интенсивность ЛИФ экспоненциально спадает при постепенном увеличении температуры. Подтверждающие экспериментальные результаты, полученные при исследовании флуоресценции хлорофилла, приводятся в статье [73], и в [74] для других веществ. Полученные данные хорошо аппроксимируются экспоненциальной функцией, что позволяет записать зависимость интенсивности ЛИФ хлорофилла-*a* от температуры – $\varphi(T)$ в следующем виде (2.13):

$$\varphi(T) = f_0 \cdot e^{-(a \cdot T)} \tag{2.13}$$

где f_0 – максимальная интенсивность ЛИФ в отсутствии температурного тушения;

a – температурный коэффициент флуоресценции;

T – температура среды.

Если функцию $s_2(T)$ в выражении (1.13) определить как отношение максимально возможного (в отсутствии температурного тушения) значения ЛИФ к наблюдаемому, т. е.:

$$s_2(T) = \frac{f_0}{\varphi(T)}, \tag{2.14}$$

то, подставив (2.13) в (2.14), получим следующее выражение для $s_2(T)$:

$$s_2(T) = e^{(a \cdot T)} \tag{2.15}$$

Для изучения влияния температуры на спектры ЛИФ хлорофилла-*a* был выполнен следующий лабораторный эксперимент. Колба с водой, содержащей культуру микроводоросли *Isochrysis galbana*, была охлаждена до температуры 2ºС, после чего ее поместили в темную камеру, в которой она постепенно нагревалась до 20°С. Для равномерного нагрева колба с культурой помещалась в емкость с водой, которая перемешивалась при нагреве. В процессе нагрева на каждые 5°С, измерялся спектр ЛИФ фитопланктона. Спектры регистрировались спектрометром Andor и обрабатывались по методике, описанной в [63, 69]. Лабораторная установка представлена на рисунке 2.12.

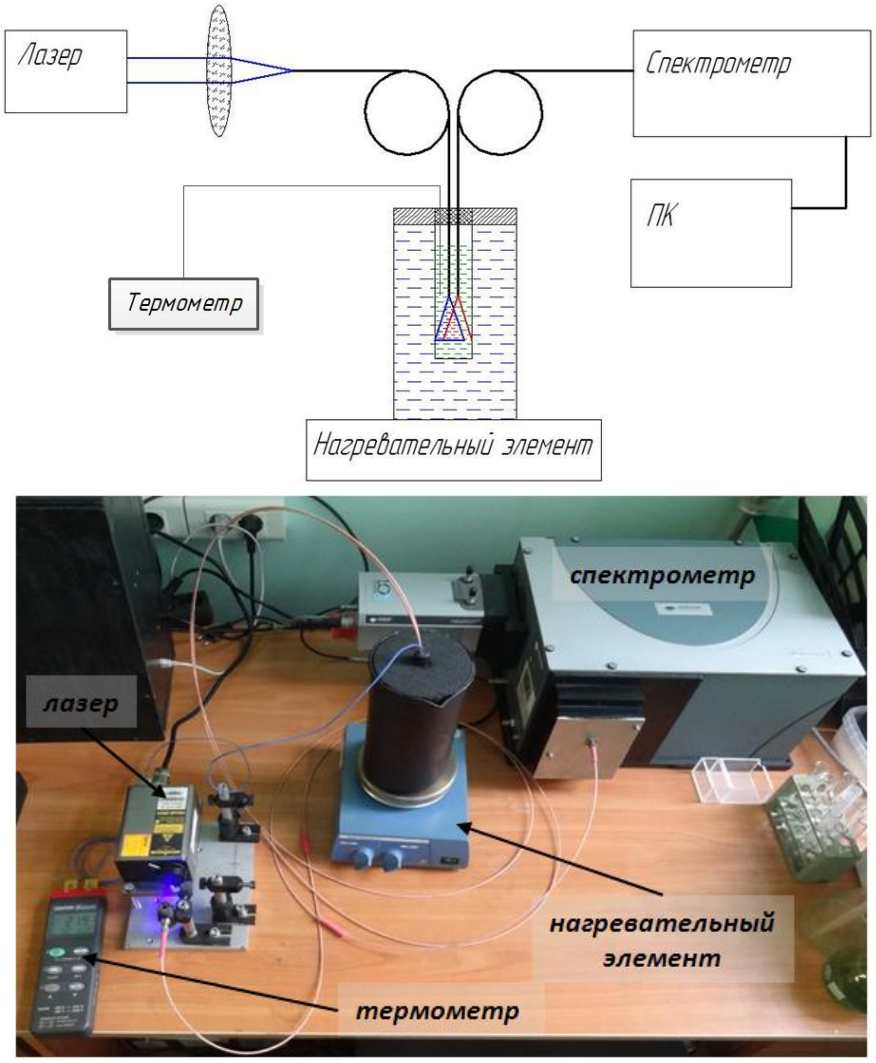


Рисунок 2.12. Схема и фотография лабораторной установки с изменяющейся температурой

На рисунках 2.13 и 2.14 показаны результаты выполненных измерений, которые убедительно подтверждают наличие зависимости спектров ЛИФ хлорофилла-*a* и спектральной плотности ЛИФ хлорофилла-а от температуры для двух проб, концентрация фитопланктона в которых отличалась в два раза.

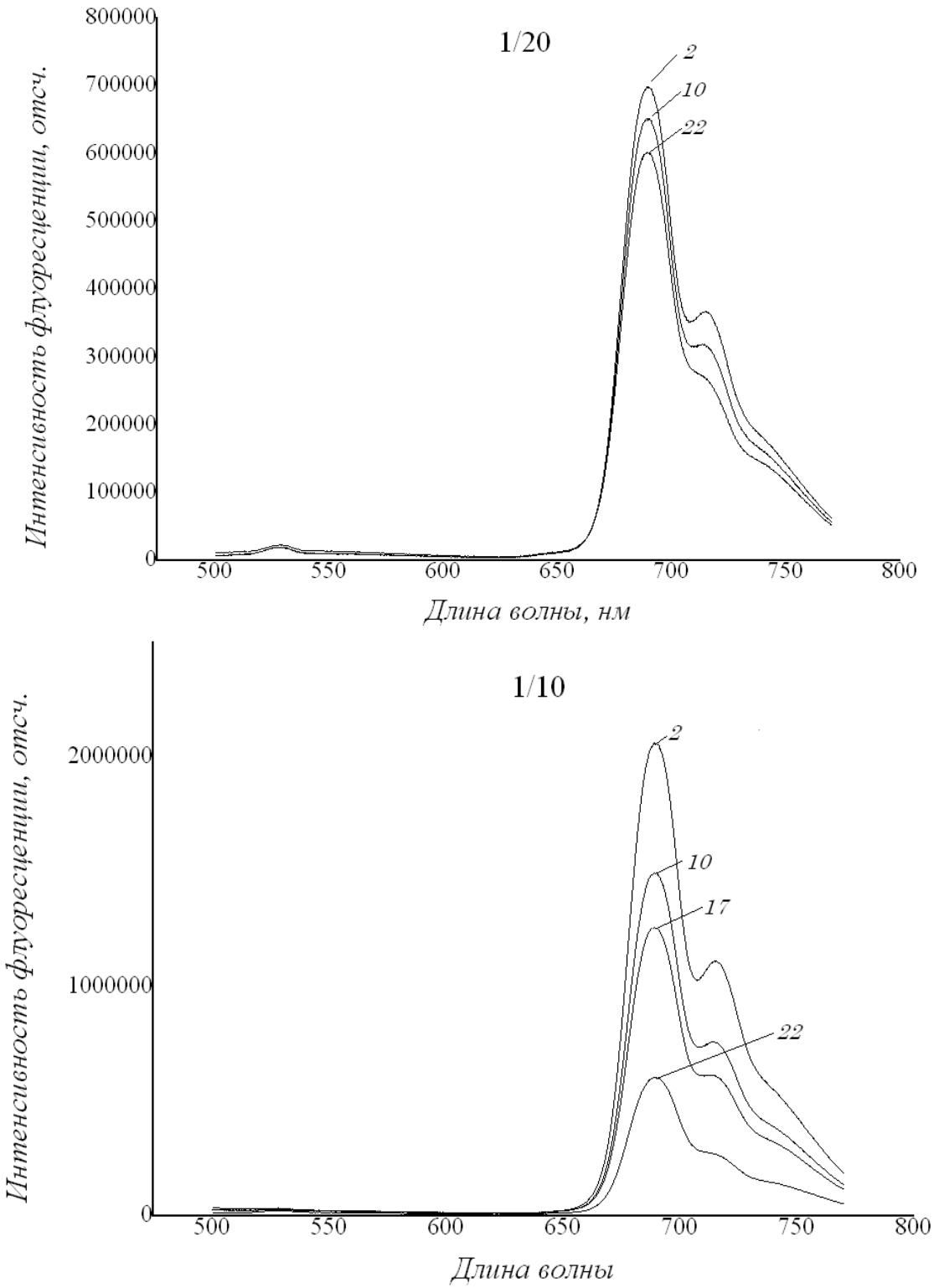


Рисунок 2.13. Динамика спектров ЛИФ проб фитопланктона с ростом температуры.

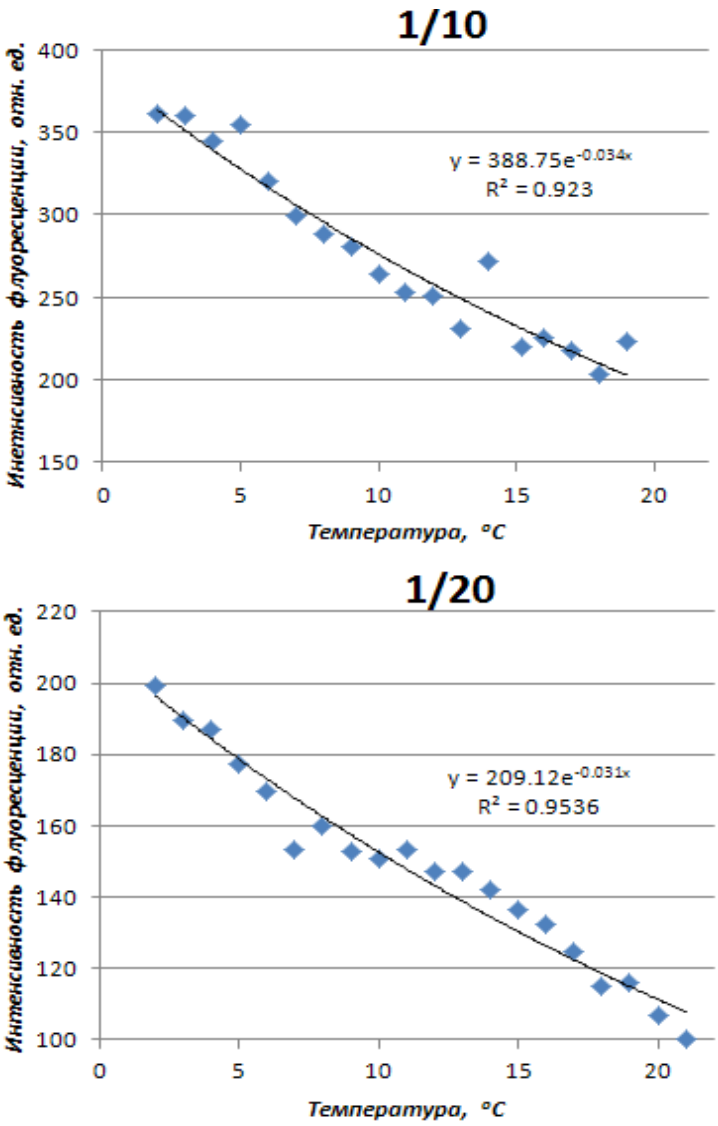


Рисунок 2.14. Зависимость интенсивности ЛИФ хлорофилла-а (685 нм), нормированной на интенсивность КР воды от температуры среды.

Как видно из графика на рисунке 2.14, зависимость интенсивности ЛИФ от температуры хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией (2.13). На рисунке указаны уравнения экспонент, а так же коэффициенты корреляции между функцией аппроксимации и экспериментальными данными для каждой концентрации. По данным проведенных экспериментов было найдено среднее значение температурного коэффициента ЛИФ для *Isochrysis galbana* ($a = 0.028 \pm 0.008$).

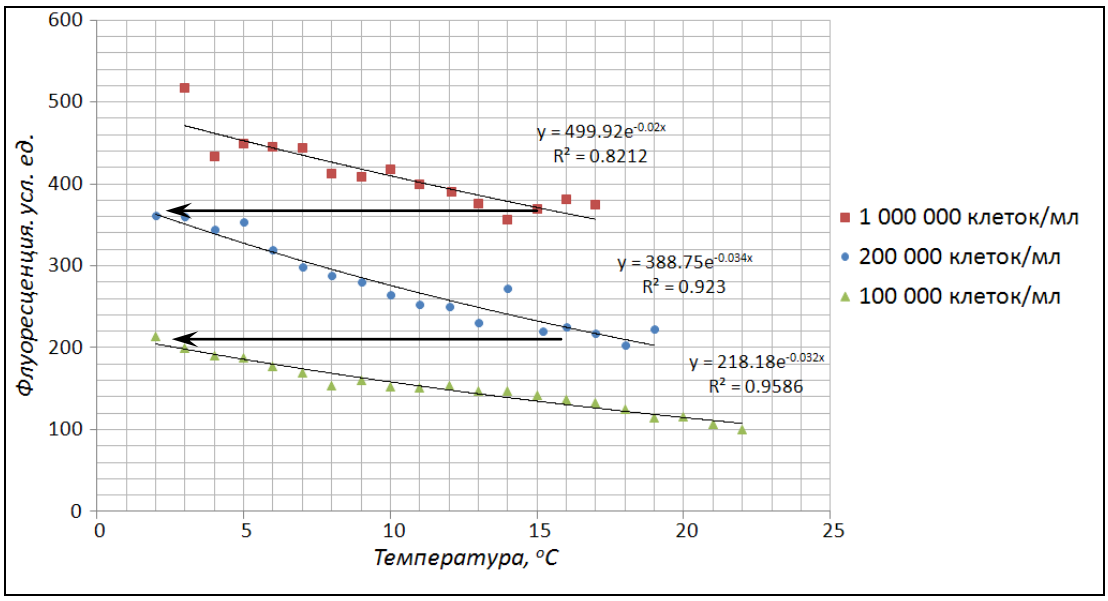


Рисунок 2.15. Возникновение ошибки при определении концентрации

Эксперимент наглядно показывает, что по результатам измерения интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а* правильное определение концентрации возможно только в тех случаях, когда температура среды не изменяется и равна температуре калибровки, в противном случае погрешность может быть очень большой. Например, на рисунке 2.15 видно, что интенсивность ЛИФ при температуре 17°С для образца культуры с концентрацией 10^6 клеток/мл (верхняя кривая на рисунке 2.15) мало отличается от интенсивности ЛИФ при температуре 3°С для образца с концентрацией $2x10^5$ клеток/мл (вторая кривая на рисунке 2.15). В свою очередь интенсивность ЛИФ при 17°С для образца с концентрацией $2x10^5$ клеток/мл мало отличается от полученной при температуре 3°С для образца с концентрацией 10^5 клеток/мл. Следовательно, относительная погрешность определения концентрации хлорофилла-а без учета температуры может достигать 2 – 5 раз.

Это доказывает необходимость учета влияния температуры при определении концентрации хлорофилла-*а* в воде методом лазерно-индуцированной флуоресценции, особенно при построении вертикальных профилей распределения, когда разность температуры между поверхностью и глубиной может достигать десятков градусов Цельсия.

2.3. Новая методика расчета концентрации хлорофилла-а

Коэффициент K в виде (1.13) позволяет учесть влияние параметров среды на спектры ЛИФ, а следовательно и на спектральную плотность ЛИФ хлорофилла-а, и получить в результате более точное значение концентрации хлорофилла-*а*. Рассмотрим применение разработанной методики учета параметров среды при обработке результатов измерений ЛИФ природного фитопланктона в полевых условиях, на суточной станции в бухте Витязь в сентябре 2013 г. На рисунке 2.16, показаны результаты измерений спектров ЛИФ при разной освещенности на глубине 4 м. Концентрация хлорофилла-*а* определялась методом экстрактного спектрофотометрирования по взятым пробам. Расчет концентрации хлорофилла выполнялся по формуле (2.8), при этом коэффициент K находился в виде (1.13), а значения функций $s_1(Q)$ и $s_2(T)$ вычислялись по формулам (2.12) и (2.15).

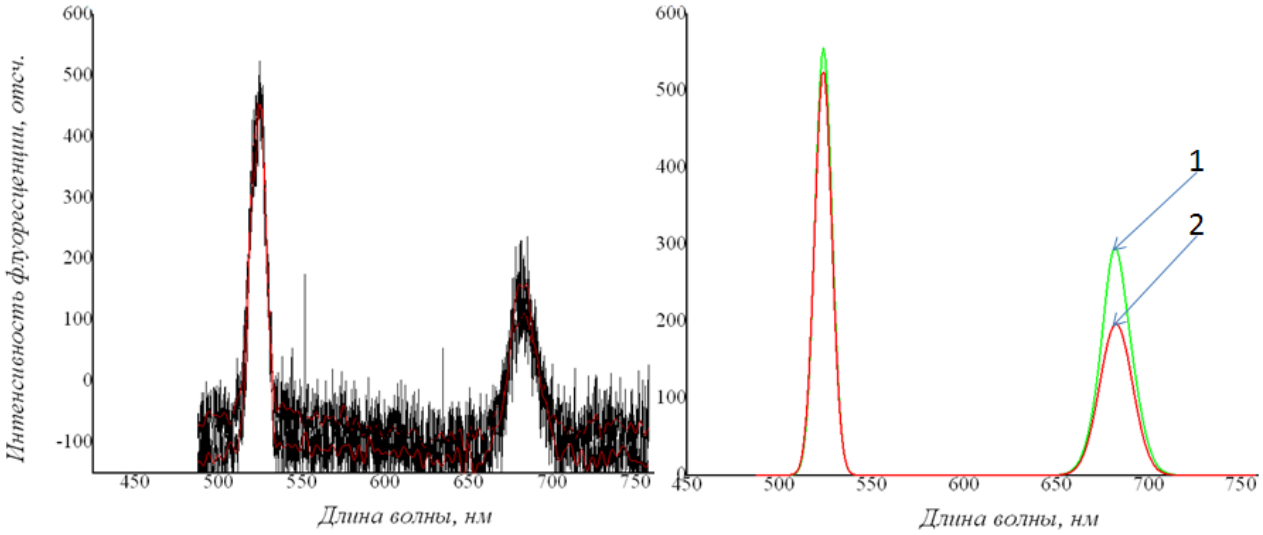


Рисунок 2.16. Динамика спектров ЛИФ воды в естественной среде при изменении интенсивности освещенности (1 – 9 часов утра; 2 – 11 часов утра).

В ходе обработки спектров ЛИФ воды были рассчитаны значения концентрации хлорофилла-а по формуле (2.8). Коэффициент пропорциональности при этом был найден с учетом данных о концентрации,

полученных экстрактным спектрофотометрированием и был равен $0{,}12\left[{}^{\text{мкг}}/_{\text{л}\cdot\text{Вт}}\right]$. Результат расчета концентрации хлорофилла-а по интенсивности ЛИФ (685 нм) представлен на рисунке 2.17.

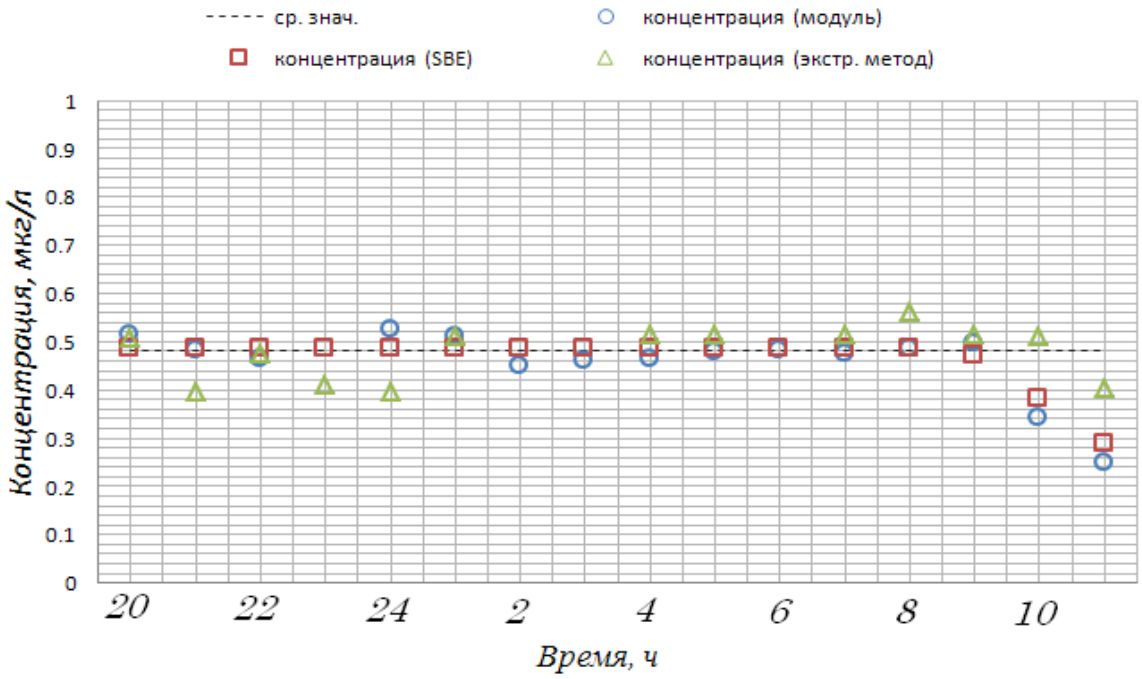


Рисунок 2.17. Различие, при измерении суточного изменения концентрации хлорофилла-а.

Как видно из графиков на рисунке 2.17, значение концентрации в течение суток практически не меняется, среднее значение 0,48 мкг/л, максимальное отклонение от среднего 16%. При этом ближе к полудню, при увеличении интенсивности освещенности отклонение в значениях концентрации, рассчитанной по классической методике, увеличивается. В 11:00 отклонение в значениях концентрации для зонда SBE составляет 40%, а для оптоволоконного модуля 49%. Расчет концентрации с использованием нового коэффициента (1.13) позволит снизить ошибку, благодаря учету влияния на интенсивность флуоресценции изменяющихся параметров среды.

Температура воды в этот период в течение суток практически не изменялась и была ровна в среднем 20°С. По результатам измерений интенсивностей ЛИФ и освещенности, в период с 9:00 до 11:00 часов, по формуле (4) был вычислен коэффициент $k = 0.005$ и определены значения

$f_{max} = 2.3$ усл. ед. и $Q_1 = 120$ мкмоль фотонов/м$^2 \cdot$ с. Подставляя найденные численные значения в (2.12) и принимая во внимание, что освещенность не превышает значения Q_2, получим выражение для вычисления $s_1(Q)$ в следующем виде:

$$s_1(Q) = \begin{cases} 1 & \text{при } Q < 120 \\ 2.3/\big(2.3 + 0.005(Q - 120)\big), & \text{при } 120 < Q < Q_2 \end{cases}$$

Принимая коэффициент температурной чувствительности $a = 0.028$ для расчета $s_2(T)$, как это было найдено в лабораторном эксперименте с культурой *Isochrysis galbana*, из (2.15) получим выражение для вычисления $s_2(T)$ в следующем виде:

$$s_2(T) = e^{(0.028 \cdot T)}$$

Подставляя в уравнение $T = 20$°C, вычислим значение $s_2(20) = 1.75$.Подставляя коэффициент *K* из (1.13) в выражение (2.8), получим уравнение для расчета концентрации хлорофилла-*a* (2.16):

$$C = K \cdot F = [s_0 \cdot s_1(Q) \cdot s_2(T)] \cdot F \qquad (2.16)$$

Данное выражение позволяет учитывать не только конструкционные особенности измерителя ЛИФ и вид фитопланктона, но и учитывать изменяющиеся факторы среды, такие как температура и интенсивность освещенности.

На рисунке 2.18 представлены данные о концентрации, вычисленные с учетом нового коэффициента пропорциональности, выраженного в виде функции зависящей от температуры и освещенности.

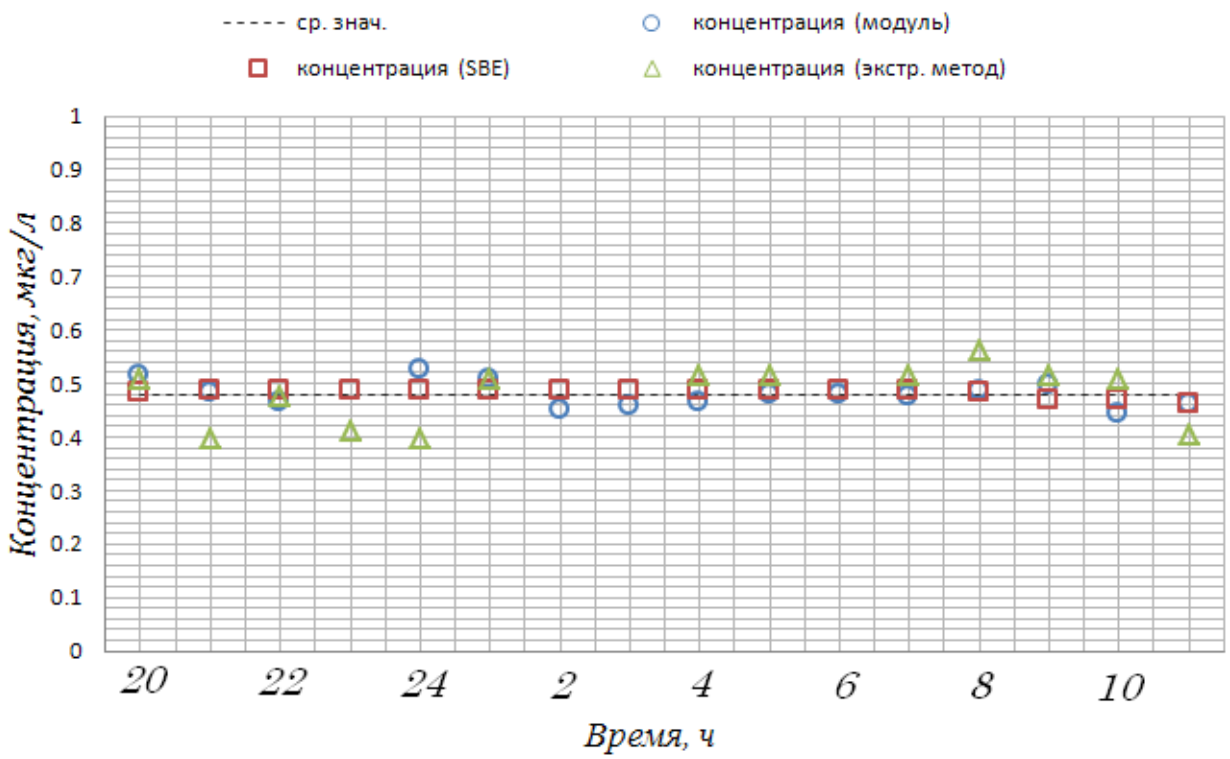


Рисунок 2.18. Суточное распределение концентрации хлорофилла-а, данные получены с учетом изменяющихся факторов среды.

Анализ данных, полученных при расчете концентрации хлорофилла-а с новым коэффициентом пропорциональности, показал, что отклонения концентрации от среднего значения при увеличении интенсивности освещенности в 11:00 составляют: для зонда SBE – 4%, для оптоволоконного модуля – 9%. Учет изменения факторов среды по новой методике позволяет снизить ошибки, возникающие при определении концентрации хлорофилла-а методом лазерно-индуцированной флуориметрии в 5-10 раз.

2.4. Выводы по главе

В главе подробно описана и исследована динамика спектров ЛИФ, как реакция на различные изменяющиеся факторы. Доказано, что при измерении концентрации хлорофилла-*а* методами ЛИФ необходимо измерять максимальную флуоресценцию, которая возникает только при возбуждении ЛИФ насыщающим излучением.

В главе экспериментально установлен характер влияния на спектральную плотность ЛИФ хлорофилла-а таких физических параметров среды обитания фитопланктона как температура и освещенность. Выражена зависимость интенсивности ЛИФ (685 нм) от температуры и от освещенности. Составлена новая форма выражения коэффициента пропорциональности для учета влияния параметров среды на значение рассчитываемой концентрации хлорофилла-*a*.

Предложено выразить коэффициент пропорциональности концентрации и интенсивности ЛИФ как функцию, учитывающую изменяющиеся физические параметры среды. Ошибка определения концентрации хлорофилла-а методом ЛИФ с использованием новой методике может быть снижена в 5-10 раз.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА-*A* В ВОДЕ

Так как измерения в рамках экологического мониторинга должны проводиться в суровых природных и погодных условиях, необходимо исследовать и разработать принципы, для измерительных систем на основе, описанной в предыдущих главах методики. Построение и исследование математической модели оптоволоконного датчика позволит лучше изучить процесс измерения спектров флуоресценции в жидких средах, а так же выявить меры по возможной дальнейшей модернизации измерительной системы. Кроме того, необходимо рассмотреть концепцию измерительной системы для экспедиционных исследований в морских условиях.

3.1 Оптоволоконный датчик ЛИФ

Схема датчика ЛИФ состоящего из двух ОВ приведена на рисунке 3.1. Волокна датчика расположены под углом δ друг к другу на некотором расстоянии, определяемом размерами g и h так, что их апертуры перекрываются. Оптическое излучение мощностью P_1, направляемое по излучающему ОВ, распространяется в границах апертурного угла в исследуемой среде вызывая ЛИФ. Часть сигнала ЛИФ с мощностью P_2 попадает в приемное волокно и по нему движется к приемнику излучения.

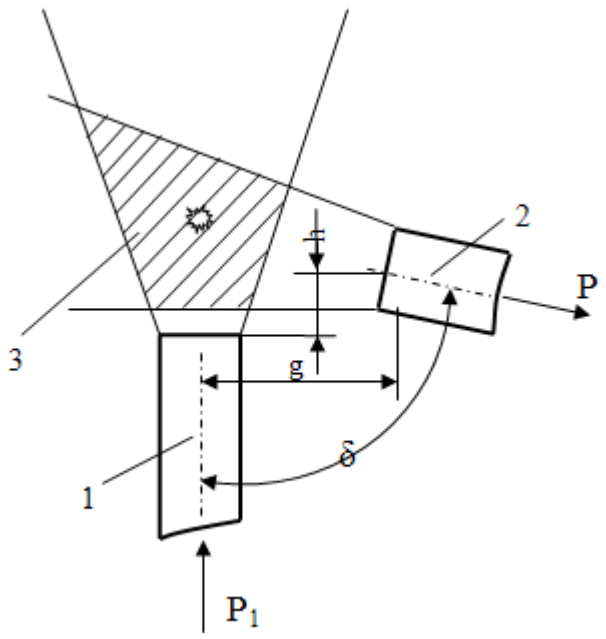


Рисунок 3.1. Схема двухволоконного датчика ЛИФ

1 – излучающее волокно; 2 – приемное волокно; 3 – область ЛИФ, воспринимаемая приемным оптоволокном

В большинстве случаев ОВ датчики используются для измерения концентрации растворенных веществ в жидких и газообразных средах, поэтому наибольший интерес представляет параметр – чувствительность датчика, который определяется как отношение мощности P_2 к концентрации растворенного флуоресцирующего вещества. Мощность ЛИФ P_2, которая попадает в приёмное ОВ и распространяется в нём, зависит от положения принимающего ОВ по отношению к области флуоресценции, формируемой излучающим ОВ и от параметров приёмного ОВ – его диаметра и апертуры. Также P_2 зависит от распределения в среде флуоресцирующих частиц и их яркости, которая, в свою очередь, зависит от облученности и свойств частиц, находящихся в среде. Повышение чувствительности является основной задачей при синтезе и оптимизации конструкций ОВ датчиков. При этом требуется определить необходимые параметры оптических волокон и такое их взаимное расположение, при котором будет достигаться максимальная мощность излучения ЛИФ, направленного в приёмном ОВ.

При исследовании однородных жидких и газообразных сред допустимо считать, что флуоресцирует каждая частица в пространстве, в которую попала энергия возбуждающего лазерного излучения. В датчике на основе двух ОВ энергия лазерного излучения излучается в среду в границах апертурного угла излучающего ОВ. Таким образом, область ЛИФ представляет собой конус, внутри которого находятся флуоресцирующие частицы. Мощность ЛИФ в каждой точке обычно зависит от облученности в этой точке и концентрации флуоресцирующих частиц, поэтому очень важно учитывать распределение интенсивности возбуждающего излучения в области измерения. При малой интенсивности облучения эта зависимость, как правило, линейная. При значительных уровнях мощности облучения – флуоресцентное излучение достигает своего максимального значения и при дальнейшем росте мощности облучения остается постоянной – наблюдается эффект насыщения. При очень большой мощности проявляются нелинейные и термодинамические эффекты, которые могут приводить как к уменьшению, так и к увеличению интенсивности ЛИФ излучения. Рассмотрим, как может быть построена область флуоресценции и функция распределения в ней интенсивности излучения для ОВ источника света.

На рисунке 3.2 показана сердцевина ОВ, излучающего свет в среду. Для ОВ с круглым сечением излучаемый свет образует конус с угловой апертурой Ω, а волновой фронт излучения имеет сферическую форму. Угловая апертура ОВ обычно задается апертурным углом – θ, который связан с числовой апертурой NA известной формулой (1.14). Угол θ, численно равен $\Omega/2$.

С сердцевиной ОВ связана ортогональная система координат XYZ. Плоскость XY совпадает с плоскостью торца оптоволокна, а ось Z совмещена с осью оптоволокна и имеет начало в центре окружности сердцевины. Интенсивность возбуждающего излучения в произвольной точке G(x,y,z) определяется мощностью лазерного излучения P, передаваемого по ОВ и излучаемого в среду.

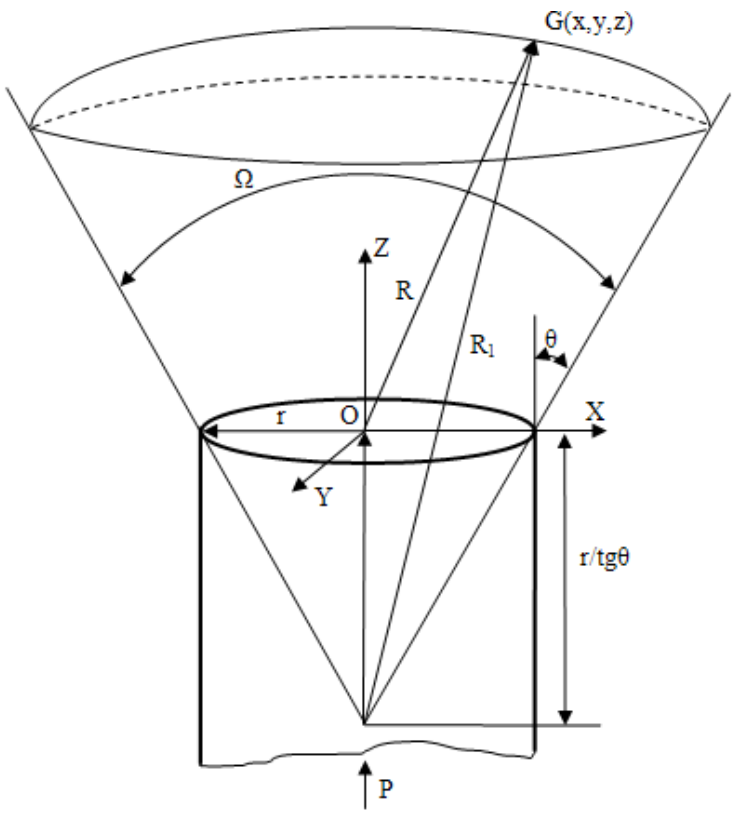


Рисунок 3.2. Модель излучающего оптоволокна

Считая излучаемый волновой фронт сферическим, облучённость поверхности фронта B(R) можно вычислить по формуле:

$$B(R) = \frac{P}{S_{seg}}, \tag{3.1}$$

где S_{seg} – площадь сегмента сферической поверхности радиусом R_1, ограниченной телесным углом Ω, как показано на рисунке 3.2.

Подставляя в (3.1) известное из геометрии выражение для площади сферического сегмента $S = 2\pi|R_1|^2(1 - \cos(\theta))$, получим:

$$B(R) = \frac{P}{2\pi|R_1|^2(1-\cos(\theta))}, \tag{3.2}$$

где, $|R_1|$ – расстояние до G(x,y,z) от точки пересечения крайних лучей угловой апертуры Ω.

Указанная точка смещена ниже плоскости окружности сердцевины ОВ по оси z, на величину $\frac{r}{tg(\theta)}$. В данном случае r – радиус сердцевины ОВ. Расстояние $|R_1|$ может быть выражено через координаты точки G(x,y,z):

$$|R_1|^2 = x^2 + y^2 + \left(z + \frac{r}{tg(\theta)}\right)^2 \tag{3.3}$$

или представлено в векторной форме:

$$|R_1| = |R + B|, \tag{3.4}$$

где $B = \left[0,0,\frac{r}{tg(\theta)}\right]$ – вектор сдвига.

Выражения (3.2-3.4) позволяют рассчитать облученность в любой точке пространства внутри телесного угла Ω. Границами такого пространства являются горизонтальная плоскость, совпадающая с плоскостью торца сердцевины излучающего ОВ, и коническая поверхность, определяемая угловой апертурой ОВ. Аналитическое представление указанных поверхностей позволяет задать облучаемое пространство системой неравенств:

$$\begin{cases} z > 0 \\ \sqrt{x^2 + y^2} < r + z \cdot tg(\theta) \end{cases}, \tag{3.5}$$

Используя формулы (3.2-3.5), можно вычислить облученность, создаваемую излучающим волокном в любой точке активной зоны датчика.

При исследовании сред с большим поглощением, необходимо учитывать ослабление световой энергии в результате ее поглощения в среде. Как известно, интенсивность лазерного излучения, распространяющегося в

поглощающей среде, ослабляется в соответствии с законом Бугера-Ламберта, поэтому формула для облученности (3.2) принимает вид:

$$B(R) = \frac{P \cdot e^{-(k_a|R|)}}{2\pi|R_1|^2(1-\cos(\theta))}, \tag{3.6}$$

где k_a – показатель поглощения среды.

Теперь рассмотрим принцип ввода ЛИФ в приемное волокно. В общей теории оптических волноводов [75] подробно рассматривается вопрос возбуждения ОВ плоским диффузным источником. Показано, что при возбуждении ОВ диффузным источником, мощность направляемых в оптоволокне лучей P_{br} вычисляется по формуле:

$$P_{br} = I\left(\frac{\pi r}{n} \cdot NA\right)^2. \tag{3.7}$$

где I – плотность мощности, излучаемая диффузной поверхностью в нормальном направлении;

r – радиус сердцевины оптоволокна;

NA – номинальная числовая апертура;

n – коэффициент преломления среды между диффузной поверхностью и ОВ.

Из (3.7) следует, что принимаемая мощность ЛИФ зависит квадратично от радиуса сердцевины приёмного ОВ и его числовой апертуры. Поэтому, для увеличения чувствительности датчика, в качестве приемного необходимо использовать волокно с как можно большим диаметром сердцевины и апертурой. Апертура оптического волокна определяется материалом: для кварцевых волокон NA обычно не превышает 0,22; для полимерных волокон NA может достигать значения 0,66.

При возбуждении ЛИФ в жидкой среде формируется объемный диффузный источник излучения, размеры и форма которого определяются

областью излучения передающего ОВ. Будем считать, что частицы облученного пространства флуоресцирует во все стороны равномерно, рассеяние отсутствует, а поглощение световой энергии определяется законом Бугера-Ламберта. Для дальнейшего анализа представляет интерес только та часть ЛИФ, которая попадает в приемное ОВ и распространяется по нему к приемнику излучения. Эта часть ЛИФ передается так называемыми направляемыми лучами, т. е. лучами, падающими на торец ОВ под углом к его оптической оси меньше апертурного угла [75].

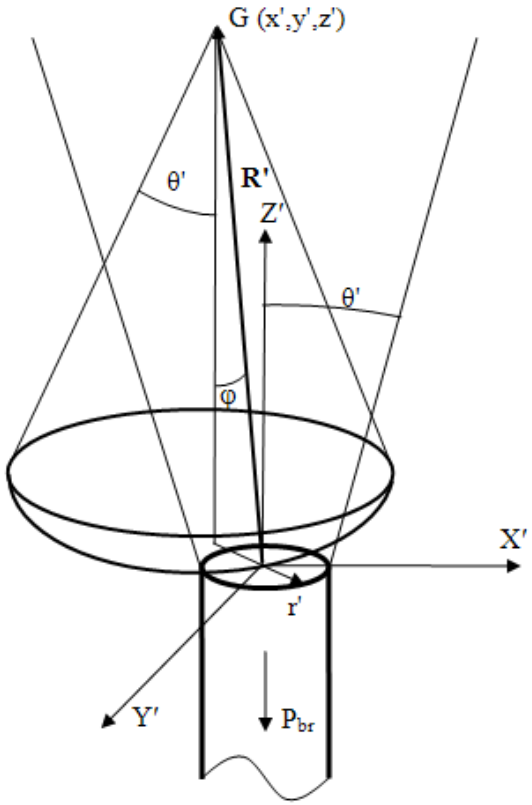


Рисунок 3.3. Прием оптическим волокном излучения ЛИФ

На рисунке 3.3 изображено приемное ОВ с апертурным углом θ'. С оптоволокном связана ортогональная система координат X′Y′Z′. Начало координатных осей совмещено с центром окружности торца сердцевины ОВ, а ось Z совпадает с его оптической осью. Мощность попадающих на торец сердцевины ОВ лучей P_{of}, излучаемых флуоресцирующей точкой среды G(x',y',z'), может быть вычислена по формуле:

$$P_{of} = P_f|R'| \cdot e^{-(k_f|R'|)} S_{of} \cdot \frac{\cos(\varphi)}{S_{sp}}, \qquad (3.8)$$

где $P_f(R')$ – полная мощность ЛИФ в точке G(x',y',z'), координаты которой определяются вектором R',

k_f – показатель поглощения ЛИФ в среде,

$|R'| = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$ – расстояние от точки излучения до цента торца сердцевины приемного ОВ,

S_{of} – площадь окружности сердцевины ОВ,

S_{sp} – площадь поверхности шара радиусом $|R'|$,

φ – угол падения лучей на плоскость торца ОВ в предположении плоского фронта волны.

Подставляя в (3.8), известные из геометрии соотношения для $S_{sp} = \pi r'^2$ и $S_{of} = 4\pi \cdot |R'|^2$, получим:

$$P_{of} = P_f|R'| \cdot e^{-(k_f|R'|)} \cdot r'^2 \cdot \frac{\cos(\varphi)}{4 \cdot |R'|^2}, \qquad (3.9)$$

Формула (3.9) справедлива, если фронт волны, падающей на торец ОВ, плоский и можно пренебречь краевыми эффектами на границах апертурного угла, имеющими место при $\varphi \approx \theta'$. Указанные условия обычно выполняются, если $|R'| \gg r'$.

Направляемыми в ОВ лучами, могут быть только те из падающих на поверхность торца ОВ, которые излучаются из точек пространства, расположенных внутри телесного угла θ', обращенного вершиной к приемному ОВ, как показано на рисунке 3.3. Учитывая указанное ограничение, мощность направляемых лучей, излучаемых из точки G(x',y',z') может быть найдена по формуле аналогичной (3.9), с учетом угла распространения θ', то есть, при $\varphi < \theta'$.:

$$P_{br} = P_{of}. \tag{3.10}$$

Выразим $\cos(\varphi)$ через координаты точки излучения G(x',y',z'):

$$\cos(\varphi) = \frac{z}{\sqrt{x^2+y^2+z^2}} = \frac{z}{|R'|} \tag{3.11}$$

Подставим выражение (3.11) в (3.9) и, при $arccos(z/|R'|) < \theta'$, получим:

$$P_{br} = P_{of} = P_f|R'| \cdot e^{-(k_f|R'|)} \cdot (r')^2 \cdot \frac{z/|R'|}{4|R'|^2}, \tag{3.12}$$

Выражение (3.12) после упрощения и приведения к векторной форме примет следующий вид, при $R'^Z/|R'| > cos(\theta')$:

$$P_{br} = P_f|R'| \cdot e^{-(k_f|R'|)} \cdot \frac{(r')^2}{4} \cdot \frac{R'^Z}{|R'|^3}, \tag{3.13}$$

где R'^Z – проекция вектора R' на ось Z,

Полная мощность направляемых лучей ЛИФ, которые будут распространяться в приемном ОВ, может быть вычислена путем интегрирования выражения (3.13) по объему пространства *V*, включающему все точки, находящиеся в границах апертурного угла приемного ОВ:

$$P_{br} = \frac{(r')^2}{4} \oiiint \left(P_f|R'| \cdot e^{-(k_f|R'|)} \cdot \frac{R'^Z}{|R'|^3}\right) dR'. \tag{3.14}$$

Численное вычисление по формуле (3.14) может быть реализовано в среде универсальных математических пакетов.

Ранее, на рисунке 3.1 была представлена модель датчика ЛИФ с произвольно расположенными в пространстве ОВ. Для формирования математической модели датчика воспользуемся более детализированной схемой, которая изображена на рисунке 3.4. Возбуждение ЛИФ происходит в области, формируемой излучающим оптоволокном – 1 с угловой апертурой Ω. Прием ЛИФ осуществляется приемным ОВ – 2, имеющим угловую апертуру Ω', сдвинутого и повернутого относительно излучающего ОВ. Параметры сдвига задаются величинами g и h, а поворот углом δ. Для вычисления мощности направляемых лучей по формуле (3.14), необходимо для каждой точки пространства в пределах апертурного угла приемного ОВ, знать мощность ЛИФ, которая, определяется свойствами флуоресцирующих частиц.

В общем случае, при малых концентрациях и уровнях облученности, мощность ЛИФ является функцией от величины облученности – B и концентрации флуоресцирующих частиц – c, в точке пространства определяемой вектором R:

$$P_f(R) = F[B(R), c(R)] \tag{3.15}$$

При достижении некоторого значения B_{min}, мощность ЛИФ достигает насыщения P_{fmax} и перестает изменяться [(76)]. В этом случае активированы все способные к флуоресценции частицы, и поэтому мощность ЛИФ не зависит от облученности и мощности индуцирующего лазерного излучения, но линейно зависит от концентрации флуоресцирующего вещества. В таком случае зависимость (3.15) принимает вид:

$$P_f(R) = \gamma \cdot c(R), \tag{3.16}$$

где γ – коэффициент, зависящий от конструкции измерительного датчика.

Будем считать, что мощность индуцирующего лазерного излучения достаточно велика, чтобы создать вблизи торца излучающего ОВ облученность, превышающую, известную для исследуемого вещества, величину B_{min}. В этом случае вблизи торца ОВ будет образовываться область насыщенной ЛИФ, интенсивность флуоресценции в которой зависит от концентрации и не зависит от мощности облучения. Если концентрация постоянна в пределах области ЛИФ, то длина области насыщенния определяется расстоянием R_{1max}, на котором облученность уменьшится до значения B_{min}, как это показано на рисунке 3.4. Расстояние R_{1max} можно выразить из (3.3):

$$R_{1max} = \sqrt{\frac{P \cdot e^{-(k_a|R|)}}{2\pi B_{min}(1-\cos(\theta))}}, \tag{3.17}$$

Выражение (3.17) является явным, если отсутствует поглощение света, т.е. при $k_a = 0$, в противном случае оно представляет собой уравнение, которое решается численными методами. Выражение (3.17) позволяет вычислить размеры активной зоны при конструировании ОВД, а также может быть использовано для вычисления границы области интегрирования при численном моделировании датчика.

Ранее мы вывели формулу (3.6) для вычисления облученности, создаваемой в пространстве ОВ источником света. В этих выражениях координаты точки G(x,y,z) задаются в системе координат привязанной к торцу излучающего ОВ. Для вычисления облученности в системе координат привязанной к приемному ОВ по формуле (3.14), необходимо преобразовать координаты (выполнить сдвиг и поворот) для каждой флуоресцирующей точки, заданной в системе XYZ, в координаты системы координат X′Y′Z′. Такое преобразование в векторной форме имеет следующий вид:

$$R' = (R + N) \cdot M, \tag{3.18}$$

где для геометрической модели, изображенной на рисунке 3.4:

R' – радиус-вектор точки в системе координат x', y', z';

R – радиус-вектор точки в системе координат x, y, z;

N – вектор сдвига (-g, 0, -h);

M – матрица поворота (направляющих косинусов), $M = \begin{bmatrix} l_1 & l_2 & l_3 \\ m_1 & m_2 & m_3 \\ n_1 & n_2 & n_3 \end{bmatrix}$.

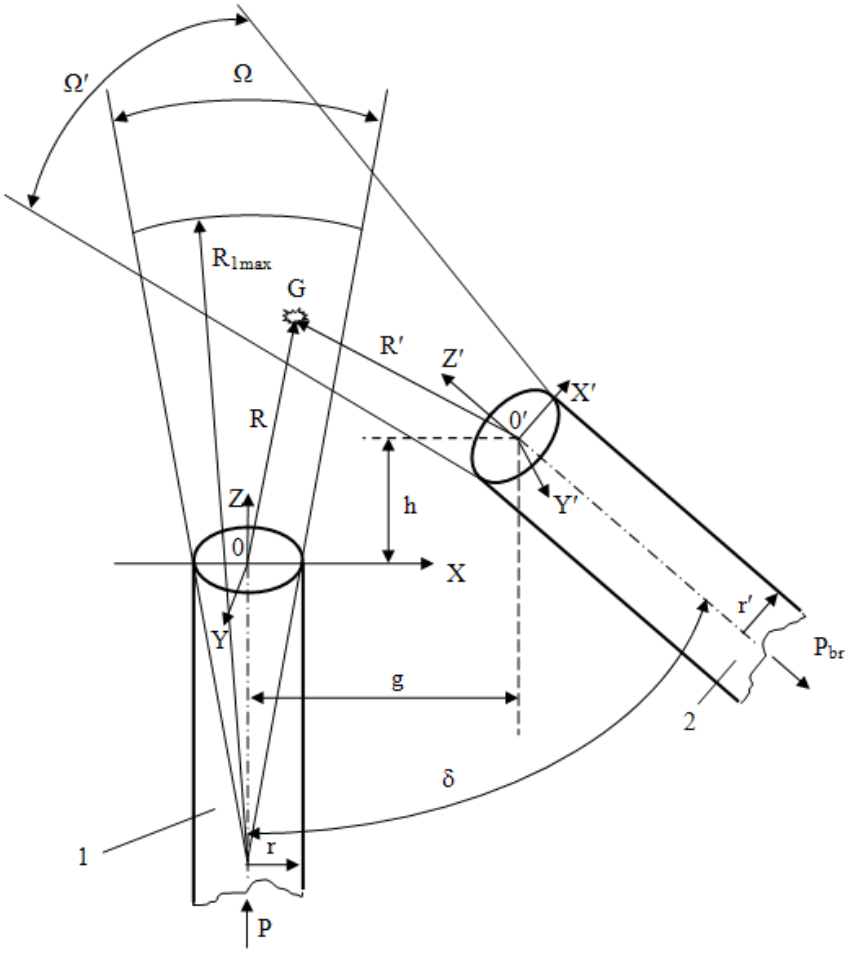


Рисунок 3.4. Геометрическая модель ОВ датчика

Параметры g и h определяют относительное взаимное положение приемного и излучающего ОВ. Матрица поворота М определяет поворот

излучающего ОВ относительно приемного ОВ. Для взаимного положения ОВ, показанного на рисунке 3.4, матрица поворота имеет вид:

$$M = \begin{bmatrix} \cos(\delta) & 0 & \sin(\delta) \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin(\delta) & 0 & \cos(\delta) \end{bmatrix}$$

В качестве примера рассмотрим моделирование ОВ датчика, использовавшегося при лабораторных и экспедиционных измерениях в рамках данной работы [16]. Указанный датчик был изготовлен из двух кварцевых ОВ с диаметром сердцевины 600 мкм и числовой апертурой 0.22. В качестве источника излучения, в ранних работах, использовался импульсный лазер с длиной волны 532 нм. длительностью импульсов 6 нс и частотой повторения 20 Гц. Оптическая энергия в импульсе на выходе излучающего ОВ составляла 250 мкДж, что соответствует мощности $P_{изл}$= $2.11 \cdot 10^3$ Вт. В лабораторных экспериментах в качестве источника использовался постоянный лазер с длиной волны 455 нм и мощностью излучения 40 мВт, который вызывал насыщение флуоресценции в течение 10 с облучения.

Минимальная освещённость B_{min} была определена с помощью графика насыщения ЛИФ фитопланктона, приведенного на рисунке 3.5, который был представлен в ряде работ [45, 77, 78, 76]. Величина Ф названа авторами данных работ флуоресцентным параметром и определялась по формуле:

$$\Phi = \frac{N_f}{N_{rs}}, \tag{3.19}$$

где N_f – количество фотонов флуоресценции фитопланктона,

N_{rs} – количество фотонов комбинационного рассеяния воды.

Поскольку интенсивность комбинационного рассеяния воды пропорциональна облученности, линейный участок на графиках,

приведенных на рисунке 3.5, соответствует насыщенному режиму ЛИФ. На приведенном графике плотность светового потока облучения указана в количестве фотонов проходящих через площадь 1 см^2 за секунду. Насыщение ЛИФ клеток фитопланктона, как видно на графике, наблюдается при плотности потока фотонов $2 \cdot 10^{23}$ фотонов/см^{2}с^1, что для используемого источника света (λ = 532 нм) соответствует плотности 746 Вт/мм^2.

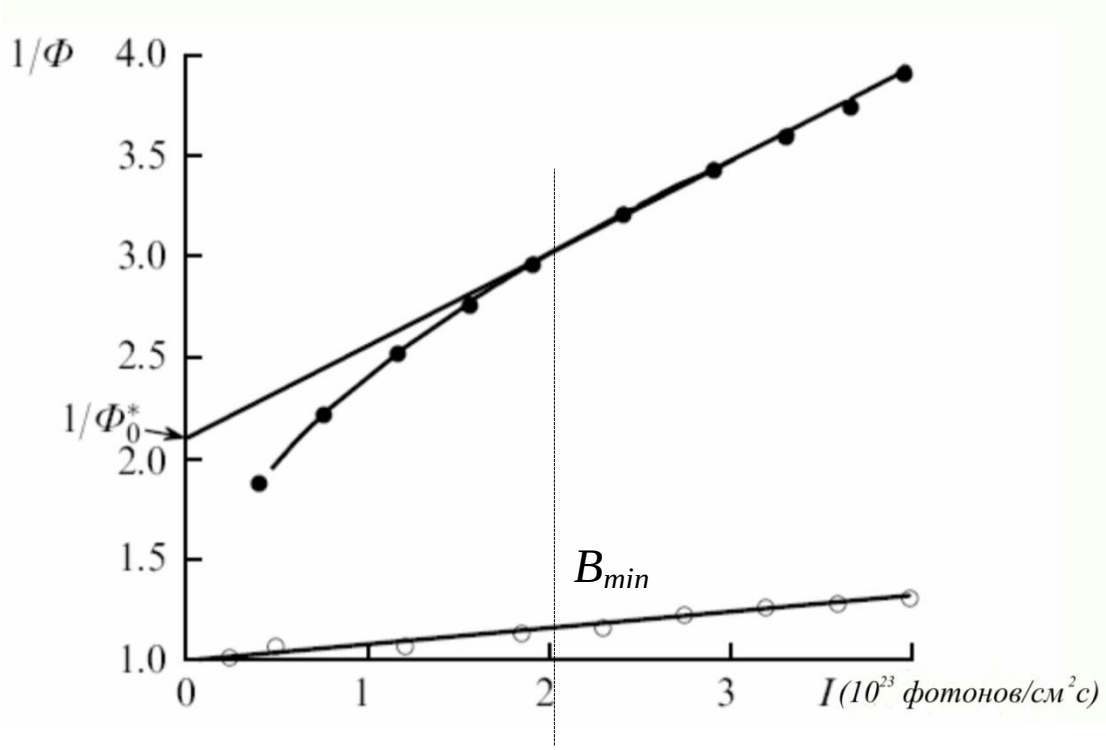


Рисунок 3.5. Кривые насыщения флуоресценции фитопланктона (•) и хлорофилла-*а* (о).

Расчёт направляемой в приемном ОВ мощности флуоресценции фитопланктона выполнялся численным интегрированием выражения (3.14). Мощность флуоресцентного излучения, направляемая в приемном ОВ датчика, вычислялась при различных положениях излучающего ОВ. На рисунке 3.6 показаны вычисленные зависимости принимаемой мощности от различных конфигураций ОВ датчика.

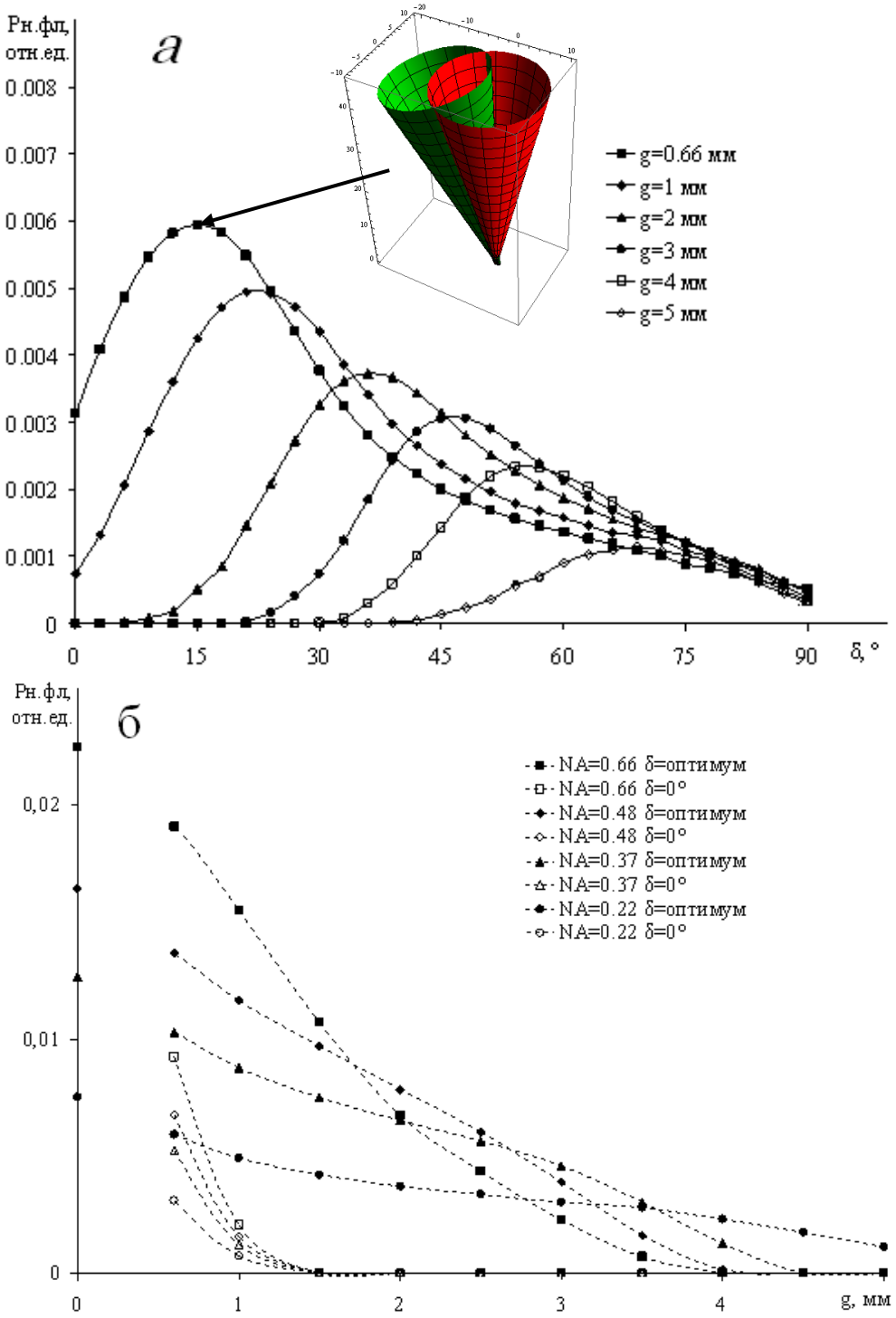


Рисунок 3.6. Моделирование ОВ датчика.

а – зависимость принимаемой мощности ЛИФ от угла и расстояния между волокнами; б – зависимость уровня принимаемого сигнала у волокон с разной числовой апертурой

На графиках сплошными линиями показаны зависимости мощности принимаемого излучения ЛИФ от угла между ОВ датчика для ряда расстояний между ними. Видно, что для каждого расстояния g между волокнами существует оптимальный угол δ, при котором направляемая мощность ЛИФ в приёмном ОВ принимает максимальное значение. При $g=0$ зависимость $P(\delta)$ соответствует случаю совмещения областей облучения и приёма ЛИФ, что соответствует одноволоконному датчику, в котором излучение и прием выполняется одним и тем же ОВ. Графики, вычисленные для g отличных от нуля, соответствуют конфигурациям двухволоконных датчиков. Особый интерес представляет случай, когда ОВ размещены вплотную друг к другу. При этом расстояние $g=0.66$ мм определяется наружным диаметром применяемых ОВ. На приведенном графике видно, что поворот ОВ относительно друг друга на 15 градусов приводит к увеличению мощности в приёмном ОВ почти в 2 раза. Приведенная методика позволяет найти оптимальный угол между волокнами при произвольном заданном расстоянии между ними.

Представляет интерес математическое моделирование датчика выполненного из ОВ с большой апертурой. На рисунке 3.6 (б) приведены результаты такого моделирования. На графиках хорошо видно, что направляемая мощность ЛИФ в приемном ОВ с ростом числовой апертуры увеличивается практически линейно, а при незначительном увеличении расстояния между параллельными ОВ очень быстро уменьшается до нуля. Параметр «δ-оптимум» – угол между ОВ, при котором наблюдается максимальный уровень сигнала ЛИФ в приемном ОВ Поворот ОВ относительно друг друга позволяет существенно разнести передающее и приемное ОВ при незначительном уменьшении мощности принимаемого сигнала ЛИФ.

Важно определить, какую мощность возбуждающего излучения необходимо использовать при использовании оптоволоконного датчика ЛИФ. Как было показано в формуле (3.17) интенсивность индуцирующего

лазерного излучения в нашей модели определяет длину конуса возбуждения. На рисунке 3.7 представлены численные результаты моделирования оптоволоконного датчика с различной длиной конуса возбуждения.

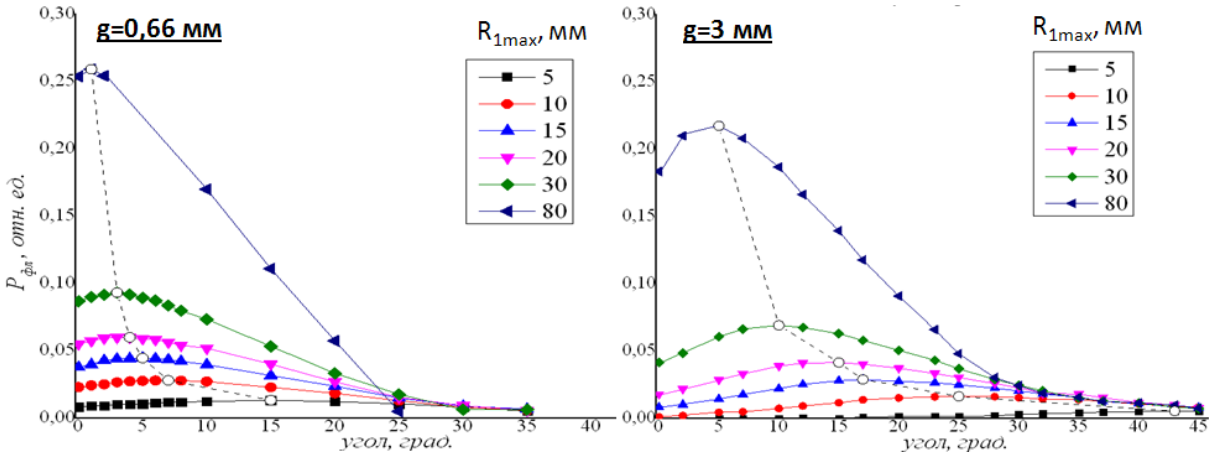


Рисунок 3.7. Эффективность приема ЛИФ в зависимости от угла между волокнами для разной длины конуса возбуждения

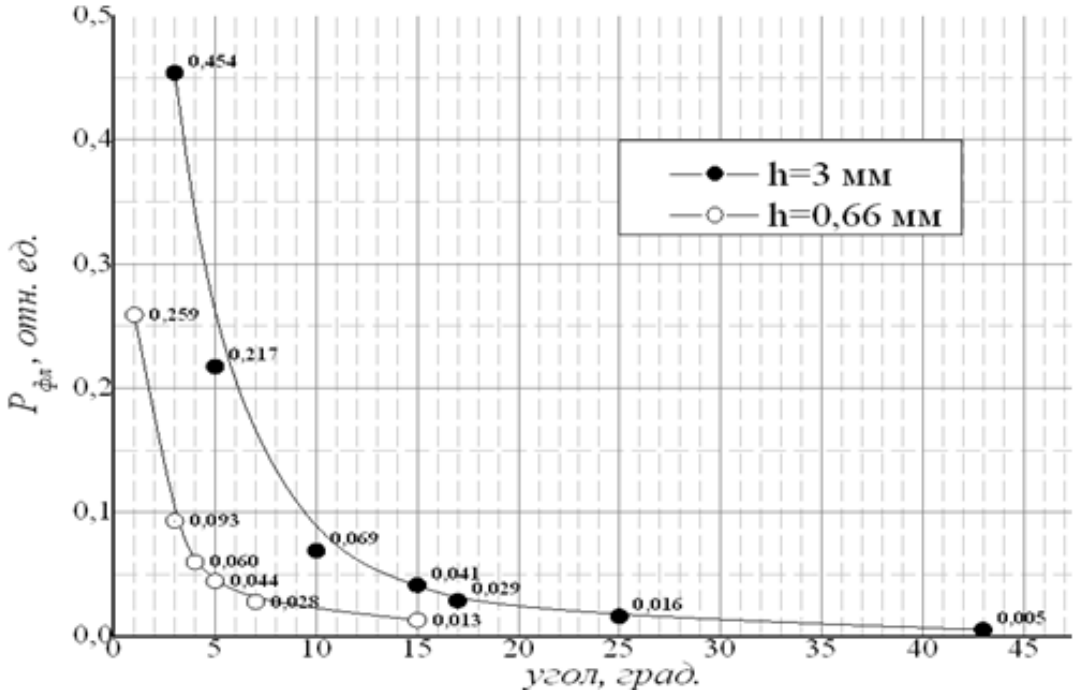


Рисунок 3.8. Соотношение длины конуса возбуждения и угла между оптическими волокнами датчика

Как видно из графиков на рисунке 3.7, при увеличении интенсивности индуцирующего лазерного излучения максимум эффективности работы

датчика наблюдается при малых углах, между оптическими волокнами. На рисунке 3.8. отчетливо видно, что при высокой интенсивности лазерного излучения и, как следствие, длинном конусе возбуждения (30-80 мм) максимальная эффективность датчика достигается при расположении волокон под углом 5 градусов друг относительно друга. При малых интенсивностях, когда конус возбуждения не больше 15 мм, необходимо точно подбирать угол между волокнами для достижения максимальной эффективности датчика. В данной ситуации значения угла между волокнами могут изменяться в большом диапазоне от 15 до 45 градусов, как на рисунке 3.8 или больше.

Разработанная математическая модель двухволоконного датчика ЛИФ позволяет кроме геометрических особенностей учитывать поглощение возбуждающего света и ЛИФ и свойства флуоресцирующих частиц. Применение модели в виде численной процедуры дает возможность исследовать конструкцию ОВ датчика в поиске оптимальных характеристик. Показано, что взаимный поворот ОВ на «оптимальный» угол позволяет повысить чувствительность двухволоконного датчика примерно в 2 раза.

Для проведения натурных исследований фотосинтеза фитопланктона и отработки принципов измерения ЛИФ хлорофилла-*a* в реальных водных объектах при помощи оптоволоконного датчика ЛИФ был предложен экспериментальный измерительный комплекс, который должен удовлетворять требованиям, предъявляемым для экологического мониторинга.

3.2 Измерительный комплекс для экологического мониторинга водных объектов

Основные задачи, для решения которых предполагается использовать экспериментальный измерительный комплекс, это оценка экологического состояния и чистоты водной среды, и измерение концентрации хлорофилла-

а. Основные требования, которым должен соответствовать измерительный комплекс:

1. Необходимо осуществлять измерения ЛИФ хлорофилла-а в клетках живого фитопланктона. Находящегося в естественной среде обитания;
2. Необходимо измерять физические параметры среды обитания фитопланктона (температура, освещенность);
3. Необходимо знать точную глубину и координаты точки, в которой проводятся измерения.

Согласно перечисленным требованиям была составлена концептуальная схема измерительной системы, как показано на рисунке 3.9.

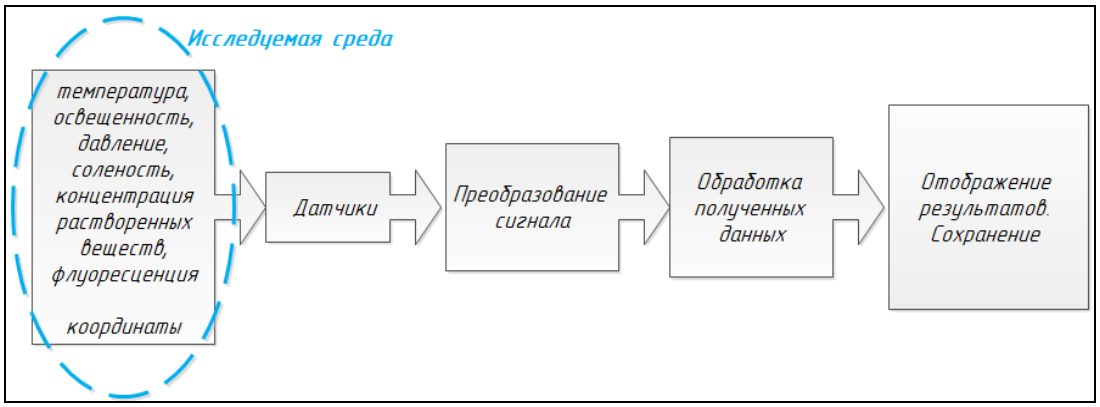


Рисунок 3.9. Концептуальная схема экспериментального измерительного комплекса

В работах [42, 43] сделаны выводы что, оценка качества воды, осуществляющаяся по концентрации хлорофилла-*а* в составе клеток фитопланктона, которая в свою очередь определяется по интенсивности ЛИФ хлорофилла-а [71, 46, 79], не может быть использована для оценки реального экологического состояния водных объектов. Одной из причин возникновения ошибок, является пересечение спектров ЛИФ хлорофилла-*а* и РОВ, а так же наличие ЛИФ хлорофилла отдельно присутствующего в воде или мертвых организмах. Кроме того на данный момент не изучено полное влияние,

оказываемое на хлорофилл-*a* и сами клетки фитопланктона со стороны окружающей среды и различных вредных факторов воздействия.

Чтобы обеспечить измерения концентрации хлорофилла-*a* в реальных водных объектах, с учетом параметров среды оптоволоконным датчиком ЛИФ, необходимо построить экспериментальный комплекс, который будет обеспечивать спуск оптоволоконного датчика на различные глубины, необходимые режимы возбуждения света, измерение спектров лазерно-индуцированной флуоресценции и параметров среды (рис. 3.10).

3.2.1 Принципы построения и структура экспериментального измерительного комплекса

Для обеспечения измерений ЛИФ в водных экосистемах необходимо реализовать следующие принципы:

- использование в качестве источника возбуждающего света монохроматического лазерного света высокой плотности;
- использование в качестве приемника широкополосного спектрометра;
- обеспечить связь лазера и спектрометра со средой, в которой проводятся измерения;
- разделение системы на погружаемую часть и бортовой комплекс, что позволяет обеспечить благоприятные условия для работы прецизионных измерительных приборов, состав которых может меняться в зависимости от решаемой задачи;
- защита датчика ЛИФ от внешнего солнечного освещения позволяет проводить измерения в любое время суток.

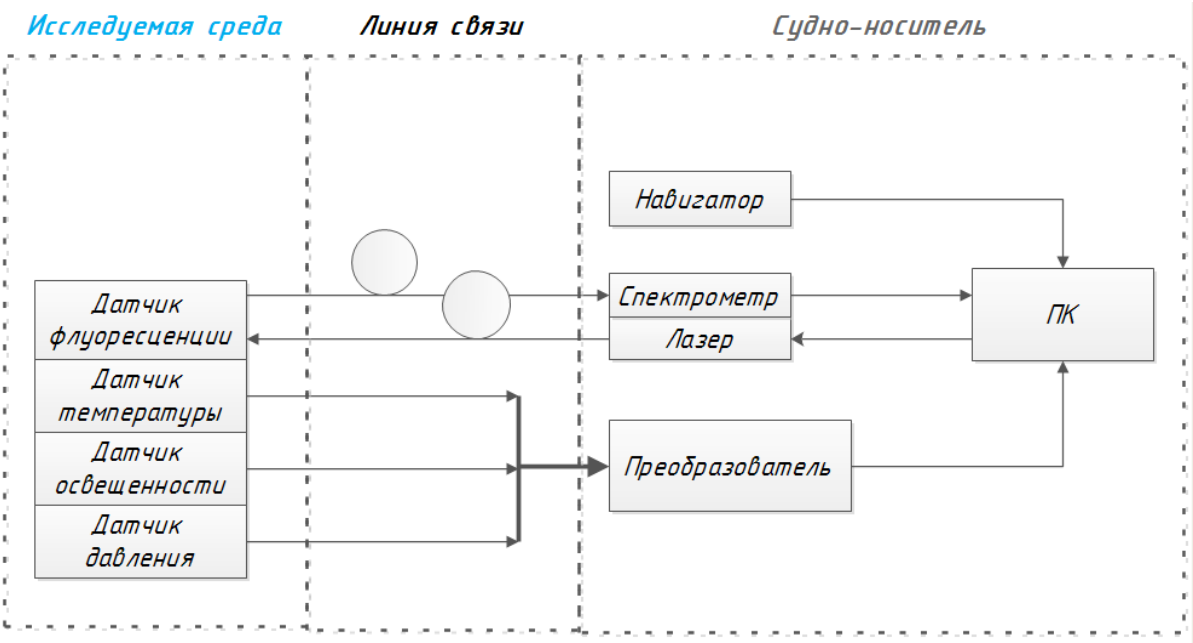


Рисунок 3.10. Функциональная схема измерительного комплекса

Измерительный комплекс должен обеспечивать измерения концентрации хлорофилла-*a*, интенсивности освещенности и температуры воды на глубинах от 0 до 100 м. Выбор глубин обусловлен залеганием термоклина в различных водоемах, как известно больше всего видов фитопланктона обитает именно в этом диапазоне глубин. Все измерения выполняются с помощью оптоволоконных датчиков, установленных в погружаемом модуле, через который осуществляется проток воды, содержащей клетки фитопланктона. Сбор, хранение и обработка сигналов с датчиков осуществляется бортовым комплексом. Связь погружаемого модуля с бортовым комплексом выполняется многожильным оптоволоконным кабель-тросом. Сматывание и наматывание кабеля происходит с помощью автоматизированной лебедки с электрическим приводом, закрепленной на борту научного судна-носителя. Общая структурная схема изображена на рисунке 3.11.

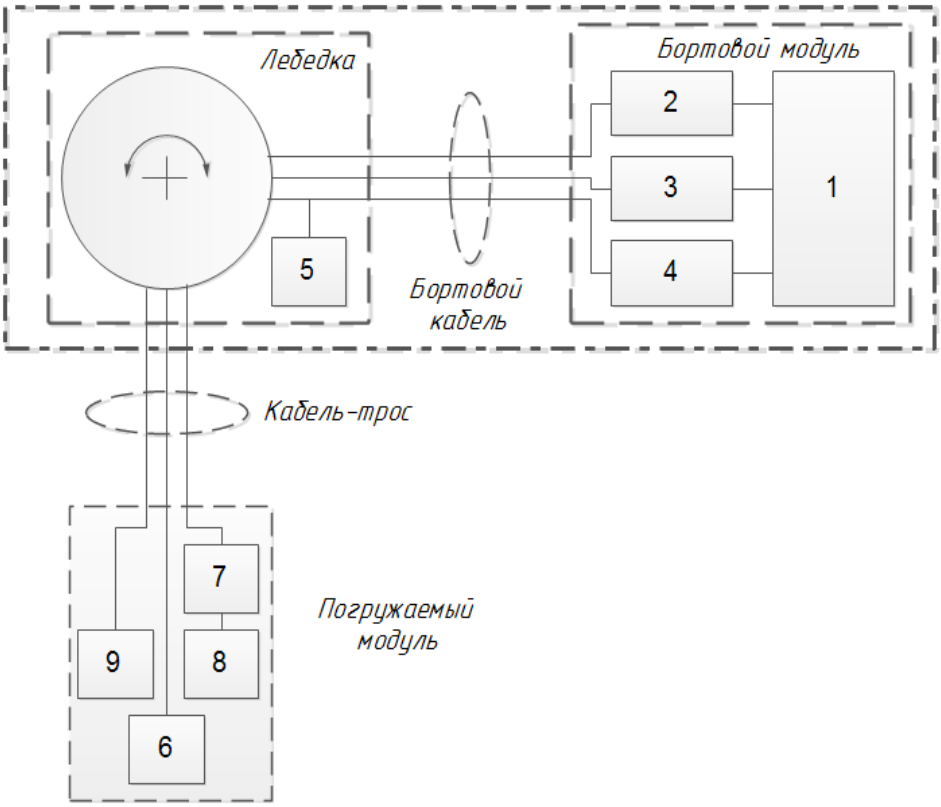


Рисунок 3.11. Схема измерительного комплекса с погружаемым модулем.

На рисунке 3.11 цифрами обозначены: 1 - персональный компьютер, 2 – спектрометр, 3 – лазерный источник, 4 – электронный блок, 5 – контроллер электродвигателя лебедки, 6 – датчик ЛИФ, 7 – датчик температуры, 8 – датчик давления.

Всю систему можно разделить на две функциональные группы. Первая это бортовой комплекс, который осуществляет управление всеми элементами системы, а так же выполняет сбор, запись и обработку информации. Вторая – погружаемая часть, которая содержит датчики и находится непосредственно в среде, в которой выполняются измерения. Фотография экспериментального измерительного комплекса для экологического мониторинга водных объектов представлена на рисунке 3.12.

Рисунок 3.12. Измерительный комплекс для мониторинга водных объектов перед экспедиционными испытаниями

3.2.2 Бортовой комплекс

Бортовой комплекс состоит из лебедки, электронного блока, лазера, широкополосного спектрометра и персонального компьютера. Этот комплекс предназначен для формирования и передачи в погружаемый модуль лазерного излучения, приема сигналов с датчиков давления, температуры, освещенности и ЛИФ, их аппаратной и программной обработки, накопления и визуализации информации на ПК. Так же бортовой комплекс осуществляет управление автоматизированным спуском и подъемом лебедкой погружаемого модуля. На рисунке 3.11 бортовой комплекс выделен штрихпунктирной линией. Лебедка осуществляет управляемый спуск, подъем и удержание на заданной глубине погружаемого модуля. Управление лебедкой, лазером и приемником излучения, осуществляется с персонального компьютера через электронный блок. Так же электронный блок обеспечивает стабильное питание приборов и защиту от перегрузок. Связь лебедки с электронным блоком осуществляется бортовым кабель-тросом. В состав

кабель-троса так же входят и оптические волокна, подключающиеся к лазеру и приемнику ЛИФ. Кабель покрыт защитной оболочкой, чтобы предохранить его содержимое от возможных механических повреждений.

Фотография оптоволоконной автоматизированной лебедки, установленной на борту исследовательского судна, приведена на рисунке 3.13. Приводом лебедки является электродвигатель с редуктором. Лебедка оснащена кабелеукладчиком, а так же предохранительным механизмом, останавливающим вращение барабана при полном выборе кабеля или при подъеме модуля над уровнем воды. Управление электродвигателем (реверсивное включение и выключение) осуществляется специальным контроллером по командам от ПК, а также с местного пульта управления. Предусмотрена возможность ручного подъема погружаемого модуля при аварийном отключении источника питания. Под действием течения и ветра кабель-трос может отклоняться от вертикали на значительный угол и перегибаться с радиусом изгиба меньшим, чем установлен для использующегося в измерительной системе оптического волокна. Для предотвращения чрезмерных изгибов и изломов кабель-троса предусмотрен подвесной слип, который устанавливается на фальшборт и крепится со стороны кабелеукладчика к лебедке и к борту судна, как показано на рисунке 3.13. Слип также предотвращает возможность ударов погружаемого модуля о борт судна при движении.

Рисунок 3.13. Лебедка с установленным слипом на борту НИС «Профессор Насонов»

Электронный блок содержит преобразователь интерфейсов RS-232 – RS-485 посредством которого происходит управление двигателем лебедки; источник бесперебойного питания и вторичные источники питания 12 В и 24 В. Оптические волокна от лазера и спектрометра пропускаются через отверстия в тыльной стороне блока и соединяются в нем через оптические коннекторы с волокнами бортового кабель-троса. В качестве источника излучения в бортовом комплексе могут использоваться различные приборы. В нашем случае используются зеленый импульсный лазер с длиной волны 532 нм и постоянный синий лазер с длиной волны 445 нм.

В конструкции разработанного модуля предполагается, что передача лазерного излучения осуществляется при помощи одного оптического многомодового волокна. При измерении концентрации фитопланктона в чистых морских водах достаточно использовать постоянный источник когерентного излучения, для насыщения ЛИФ. В экспериментальной установке с этой целью используется лазер melles griot со следующими параметрами:

Мощность	30 мВт.
Длина волны	442 нм.
Размер пучка	0,9x0,95 мм.
Нарастание	46 нс.

В качестве приемника излучения в экспериментальной измерительной системе используется спектрометр Andor, который имеет следующие характеристики:

Апертура	f/4.
Фокальная длина	303 мм.
Размер фокальной плоскости	28x14.
Обратная линейная дисперсия	2,6 нм/мм.
Точность определения длины волны	±0,2 нм.
Спектральное разрешение	0,1 нм.
Квантовая эффективность более	80%.

Для измерения спектра ЛИФ в спектрометре используется дифракционная решетка 300 линий/мм, которая имеет характеристики:

Нормальная дисперсия	10,6 нм/мм.
Ширина спектра	293 нм.
Разрешение	0,43 нм.

Так как многие вещества имеют свои спектры флуоресценции, то анализ широкополосного спектра флуоресценции исследуемого образца позволит определять их наличие. Это позволит определять вклад различных веществ в интенсивность ЛИФ хлорофилла-*a*, чтобы избежать ошибок, как это описано в статьях [80, 81].

В ходе изготовления бортового комплекса были выполнены исследования на наличие потерь ЛИФ в оптическом волокне, которые возникают в результате скрутки волокна на барабане лебедки, а так же которые возникают во вращающихся контактах лебедки.

Схема измерительного стенда и результаты исследований потерь в изогнутом волокне представлены на рисунке 3.14.

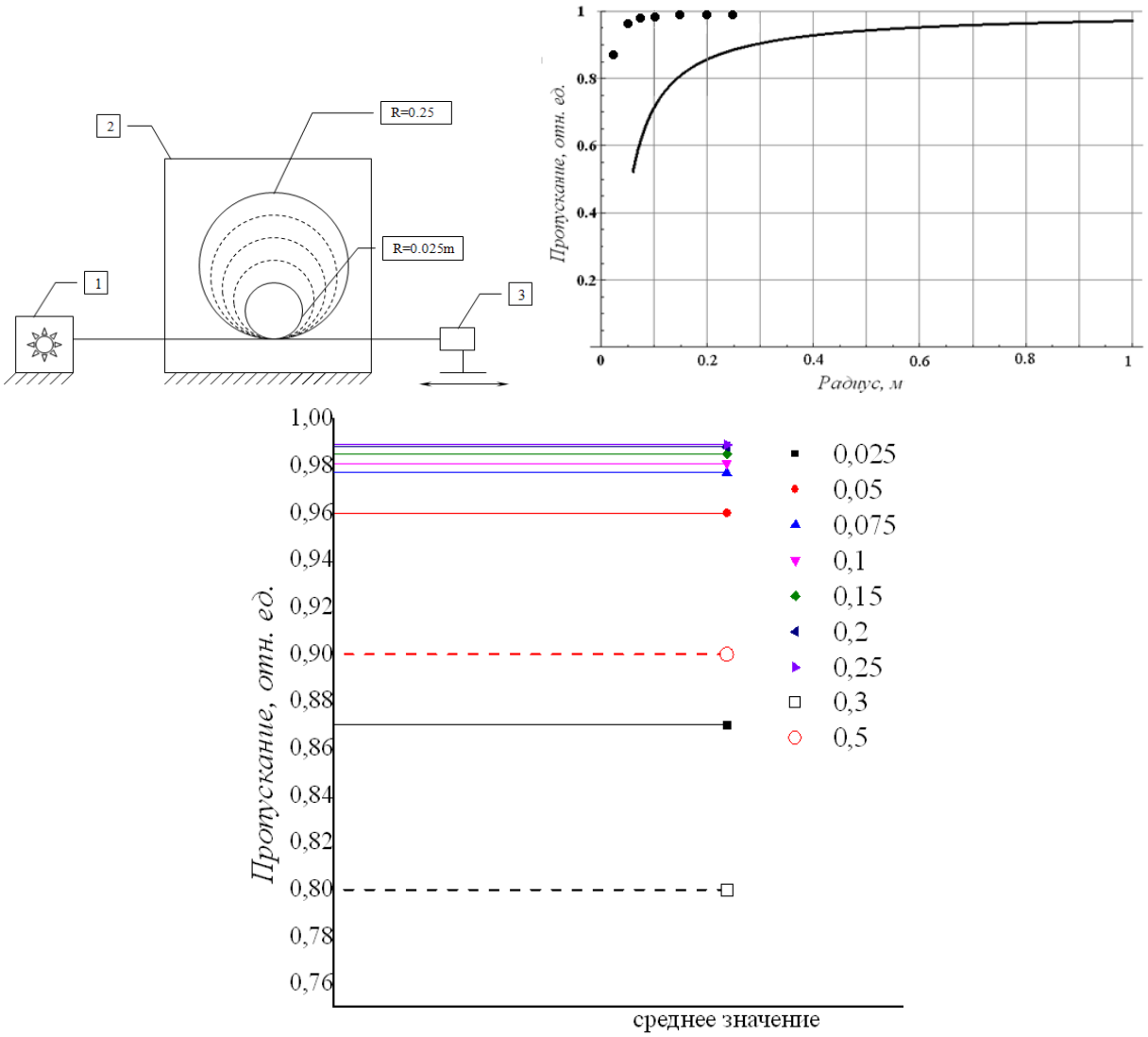


Рисунок 3.14.Исследования потерь ЛИФ в изогнутом волокне. Слева вверху – схема стенда; справа вверху зависимость пропускания от радиуса изгиба; внизу – сравнение пропускания теоретического и практического.

Упрощённая теория потерь в изогнутом волокне [75], позволяет предположить, что при изгибах оптического волокна с радиусом менее 30 см потери излучения начинают резко возрастать от 10% до полной потери сигнала. При этом в результате экспериментов было показано, что даже в ситуациях, когда оптическое волокно было изогнуто с радиусом 5 см, потери мощности диффузного излучения не превышали 10% (рис 3.14 внизу).

На рисунке 3.15 показаны результаты исследования затуханий мощности диффузного излучения в оптическом волокне в зависимости от количества витков.

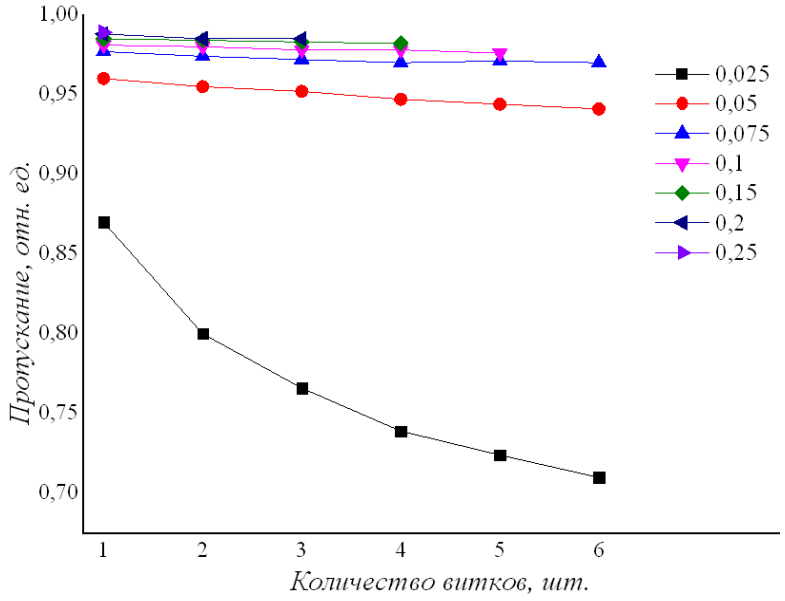


Рисунок 3.15. Зависимость затуханий мощности диффугного излучения от количества витков.

Исследования показали, что при изгибах волокна с радиусом больше 5 см какой либо зависимости пропускаемой мощности диффузного излучения от количества витков не наблюдается.

В результате исследований было решено изготовить барабан лебедки с радиусом 30 см так, потери пропускания сигнала от радиуса изгиба были минимальны, изменение количества витков волокна на барабане не влияло на интенсивность сигнала флуоресценции, и при этом оптические волокна не испытывали сильных механических нагрузок, возникающих при долговременной укладке в изогнутом виде.

Исследования потерь лазерного излучения во вращающихся контактах лебедки выполнялись на лабораторном стенде, схема и фотография которого приведены на рисунке 3.16.

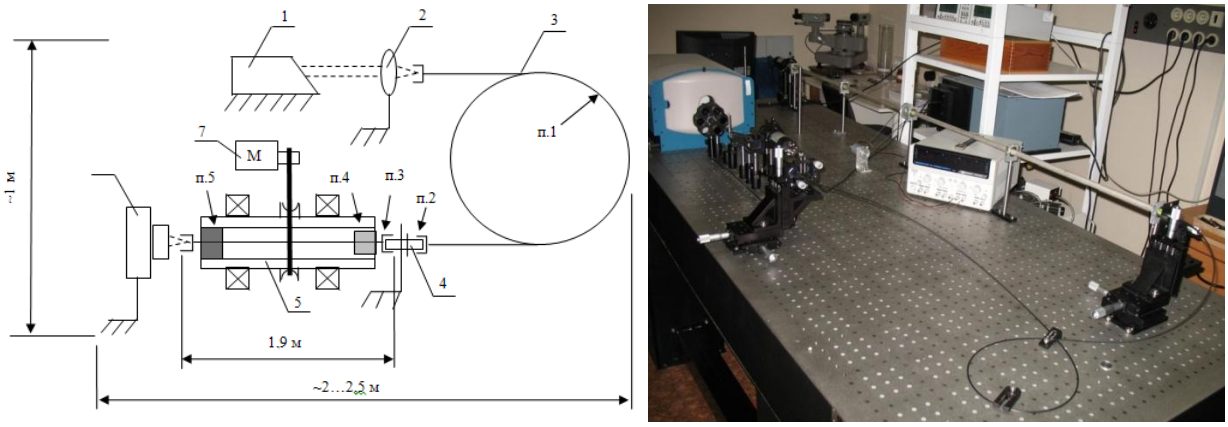


Рисунок 3.16. Стенд для испытания вращающихся оптоволоконных контактов.

На рисунке 3.16. цифрами обозначены следующие элементы стенда: 1 – лазерный источник, 2 – коллиматор, 3 – неподвижное ОВ, 4 – адаптер, имитирующий вращающееся сочленение, 5 – вращающаяся металлическая трубка с ОВ внутри, 6 – детектор измерителя оптической мощности, 7 – эклектический двигатель. Исследования показали, что максимальные потери во вращающихся контактах не превышают 1,5 дБ, если учесть потери на торцах волновода, равные 0,2 дБ, то потери, вызванные только вращающимся контактом, можно считать равными ~ 1 дБ. Данные по результатам исследования вращающегося контакта представлены на рисунке 3.17.

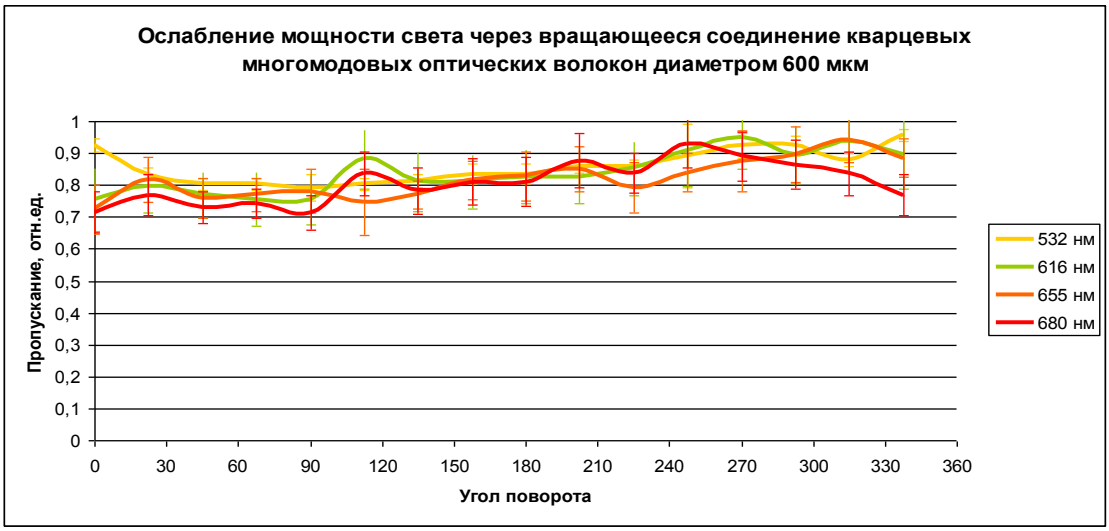


Рисунок 3.17. Потери мощности лазерного излучениявo вращающемся контакте оптоволоконной линии.

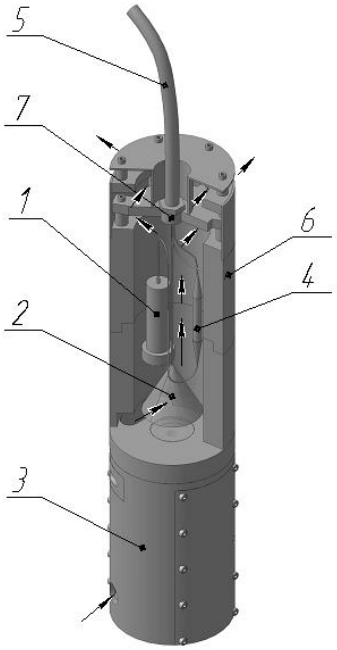
3.2.3 Погружаемая часть

В погружаемую часть системы входят оптоволоконный кабель-трос и погружаемый модуль. Погружаемый модуль выполняет несколько важных функций:

- удерживает оптоволоконные датчики измерительного комплекса при спуске и подъёме погружаемого модуля;
- механически защищает датчики при эксплуатации и транспортировке;
- защищает датчик ЛИФ от внешней засветки рассеянным в воде солнечным светом;
- обеспечивает проток воды через датчик ЛИФ и датчик температуры.

Эскиз и фотография погружаемого модуля приведены на рисунке 3.18. Модуль разделён на две части – проточную и герметичную (3). В проточной части модуля размещены датчики, в герметичной – прокачивающий насос. Насос имеет аккумуляторную батарею и управляется оптическими сигналами, поступающими на контрольный фотодиод через прозрачный иллюминатор. Наличие насоса позволяет осуществлять принудительный проток воды через измерительную камеру погружаемого модуля в тех случаях, когда измерения проводятся без перемещения модуля в течение длительного времени. Аккумуляторный блок может непрерывно работать в течение 36 часов, что достаточно для выполнения типовых суточных измерений, время полной подзарядки составляет менее 2-х часов. Поток воды проходит через входные отверстия насоса, внутреннюю часть погружаемого модуля с датчиками и выходит через отверстия в верхней части погружаемого модуля. Стрелками на рисунке 3.18 (а) показан проток воды через погружаемый модуль. Погружаемый модуль соединяется с кабель-тросом (5), несущим оптические волокна, с помощью фланца (7). Датчик освещённости воды (6) крепится внутри погружаемого модуля так, что торец волокна находится на цилиндрической поверхности корпуса. Датчики давления (1) и температуры воды (4) соединены последовательно с волокном

SMF-28 с помощью сварки. Датчики давления и температуры крепятся к штыревым опорам корпуса (на рисунке 3.18 условно не показаны). Датчик температуры терм изолирован от корпуса погружаемого модуля, чтобы исключить влияние теплоёмкости несущей конструкции. Область возбуждения ЛИФ (2) имеет диаметр и высоту примерно по 70 мм.



а Б

Рисунок 3.18. Погружаемый модуль

а – эскиз, б – фото

В качестве датчиков давления и температуры выбраны преобразователи на брэгговских решётках производства Welltech Instrument Company Ltd. Датчик температуры марки FBG-T-1550 имеет температурный диапазон -20…+85ºС. Точность измерения температуры 1±0,1ºС. Размеры датчика 8мм х 100 мм. Тип применяемого волокна – SMF-28. Датчик давления FBG-P-1540 имеет динамический диапазон измерения давления от 0 до 10 атм. Точность измерения давления 0,3±0,05% от измеряемой величины, размеры 30мм х 120 мм, способен работать в диапазоне температур -30…+150ºС.

Кабель-трос, соединяющий погружаемый модуль с лебедкой, выполняет функцию несущего силового элемента и защищает оптические волокна и электрические провода от внешнего механического воздействия. Несущий силовой элемент кабель-троса – оболочка из прочного арамидного волокна. Соединение кабель-троса с погружаемым модулем осуществляется через герметичный фланец. Фотографии кабель-троса представлены на рисунке 3.19.

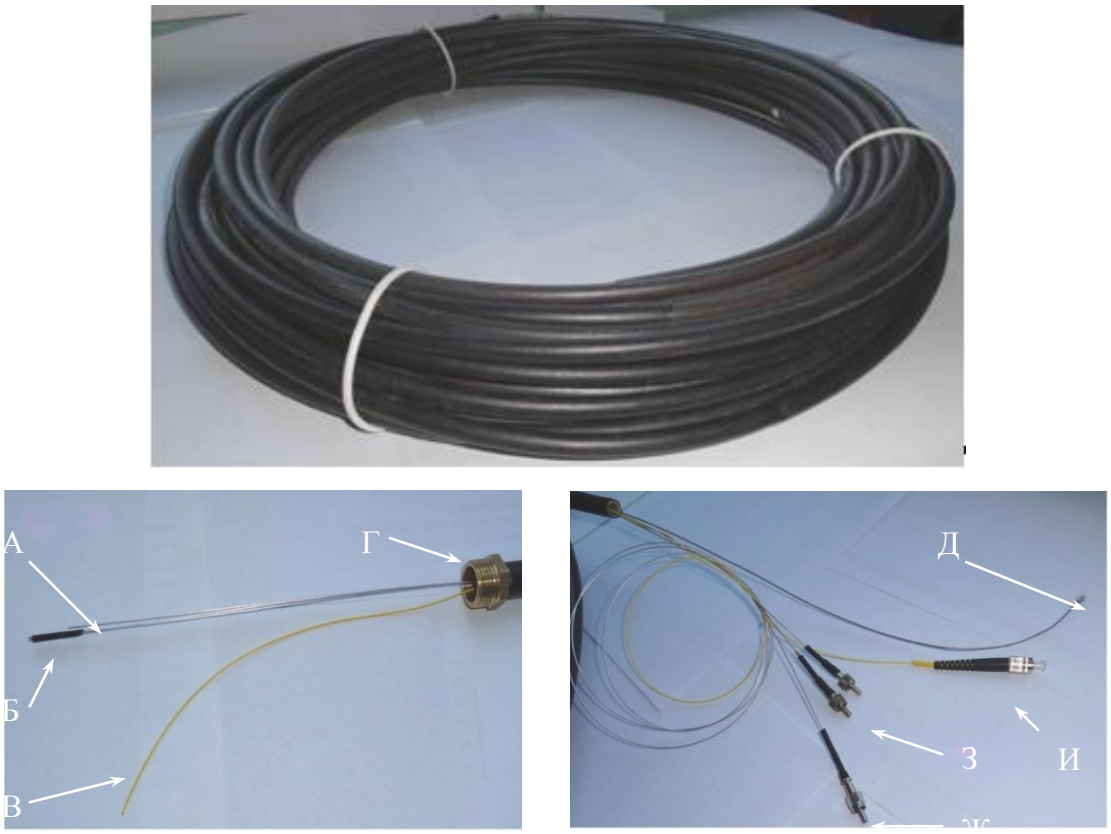


Рисунок 3.19. Кабель-трос (вверху), сторона крепления к модулю (внизу слева) и сторона крепления в лебедке (внизу справа)

На рисунке буквами обозначены: А, Ж – оптическое многомодовое волокно датчика освещенности; Б, З – оптические многомодовые волокна датчика флуоресценции; В, И – оптическое одномодовое волокно датчиков давления и температуры; Г – штуцер, для крепления кабеля к погружаемому модулю; Д – трос.

Датчики давления и температуры осуществляют обмен данными с компьютером через опрашивающее устройство FBGT-200-1008 компании

Redondo Optics Inc. Устройство FBGT-200 содержит двухканальный приёмопередатчик и имеет один оптический вход/выход. Подключаемые волоконно-оптические датчики могут быть соединены последовательно или параллельно. Устройство работает с датчиками на длине волны 1538 нм и 1548 нм. Ширина измерительных каналов по каждой длине волны составляет 2 нм, при этом разрешающая способность приёмника FBGT-200-1008 - 5 пм. Погружаемый модуль будет опускается до 100 метров. Таким образом, чувствительность устройства FBGT-200-1008 по давлению составляет 10атм·5пм/2 нм = 0,025 атм. Т.е. точность определения глубины погружаемого модуля составит 25 см. Погружаемый модуль предназначается для эксплуатации в водах любых широт, поэтому рабочий температурный диапазон воды составит 0-50ºС. Таким образом, чувствительность устройства FBGT-200-1008 по температуре составляет 50ºС·5пм/2 нм = 0,125ºС. Т.е. точность определения температуры воды составит ~ 0,2ºС. Данные с устройства FBGT-200-1008 передаются в ПК через интерфейс USB.

3.2.4 Управление измерениями

Для того чтобы наблюдать спектры ЛИФ и данные о рассчитанных значениях концентрации хлорофилла-а в реальном времени в программное обеспечение был введен модуль отображения данных (рис 3.20).

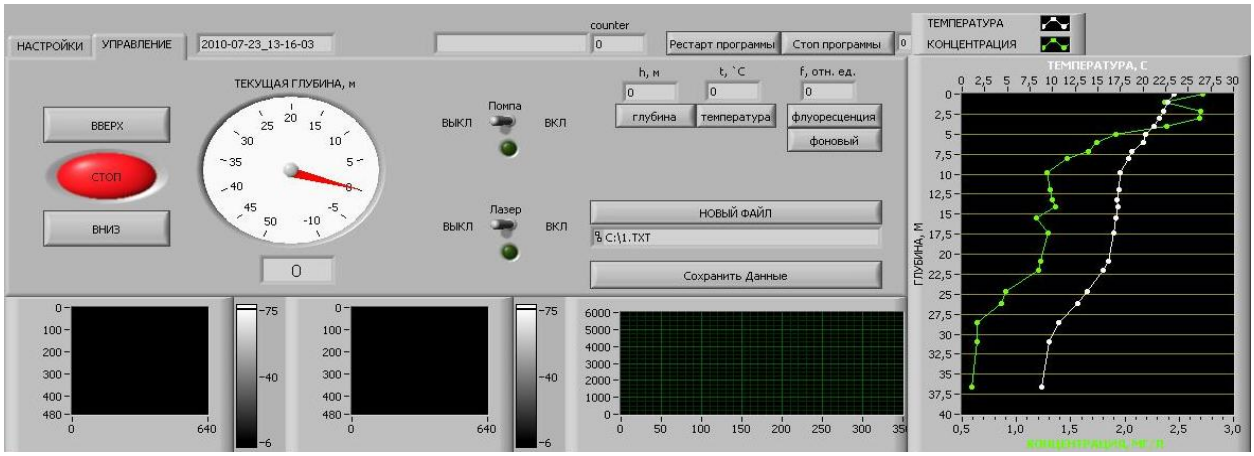


Рисунок 3.20. Измерение концентрации хлорофилла-а в реальном времени.

Второй важной задачей, которую выполняет измерительный комплекс, является исследование суточного хода концентрации хлорофилла-*а*. Данный вид мониторинга фитопланктона выполняется не менее 24 часов, с периодичностью от 30 минут. Поскольку регулярное выполнение таких измерений является трудоемкой задачей при ручном управлении комплексом, была разработана программная система автоматизации измерений. На рисунке 3.20 показан интерфейс программы управления измерениями.

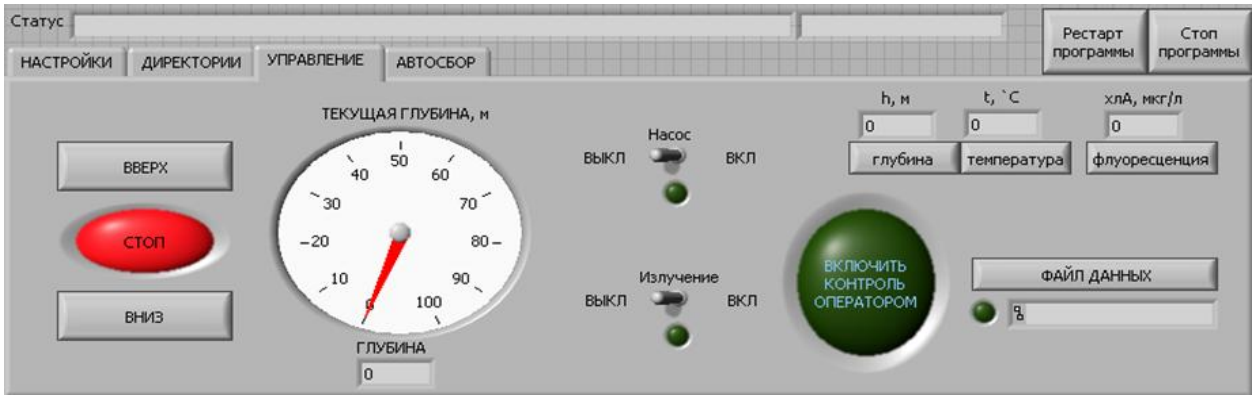


Рисунок 3.20. Диалоговое окно с вариантами автоматической работы измерительного комплекса

Автоматическая работа возможна в нескольких вариантах (рис 3.21):

1 - автоматический сбор данных;

2 - суточный ход;

3 - измерение в заданной точке.

Перед запуском автоматического режима работы измерительного комплекса оператором устанавливаются: путь для сохранения данных, предельная глубина в данном районе, шаг измерения по глубине. Для суточных измерений устанавливаются дополнительно периодичность измерений и время окончания измерений.

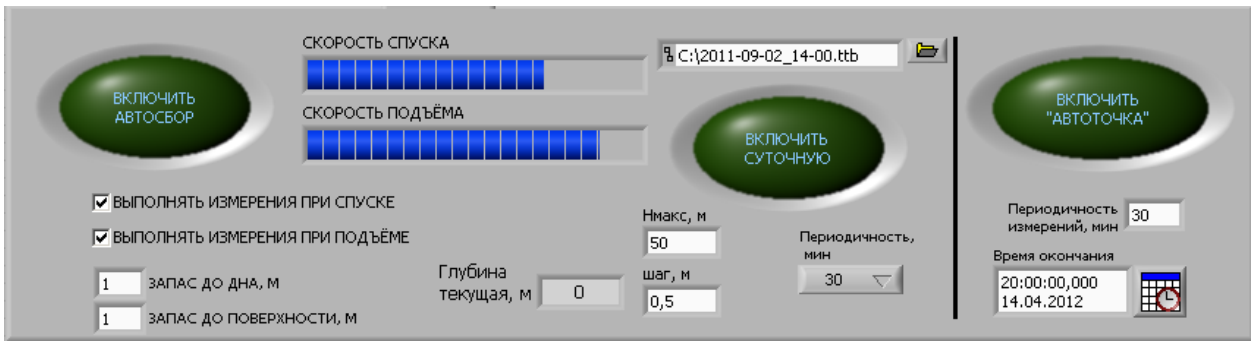


Рисунок 3.21. Панель настройки автосбора

В режиме автоматического сбора данных выполняется полный цикл измерений и построение профилей с параметрами в месте стоянки судна. В режиме суточного хода измерения выполняются, как и в первом режиме, но с заданной периодичностью в течение суток. В режиме измерения в заданной точке исследования выполняются без смещения погружаемого модуля с заранее заданной глубины. Здесь также задаётся периодичность и время окончания измерений.

Данные полученные в результате использования оптоволоконного модуля описаны в работах автора [61, 16, 82].

3.3. Выводы по главе

В главе построена математическая модель двухволоконного датчика ЛИФ. Данная модель позволяет рассчитать активную область датчика, то есть тот объем среду, в котором возбуждается и измеряется лазерно-индуцированная флуоресценция. Предложены несколько решений для увеличения чувствительности датчика: за счет увеличения возбуждающей мощности лазера и увеличения активной области, и за счет приближения активной области вплотную к торцам волокна.

Составлена концепция экспериментальной измерительной системы с оптоволоконным датчиком ЛИФ. Такая система должна быть разделена на две функциональные части: бортовую и погружаемую. Бортовая часть

осуществляет возбуждение ЛИФ, измерение и обработку спектров ЛИФ, управление автоматизированной лебедкой. Погружаемая часть включает в свой состав датчики ЛИФ, давления, температуры и освещенности и обеспечивает измерения на заданных глубинах.

ГЛАВА 4. ОПЫТНАЯ ЭКСПЛУАТАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ С ОПТОВОЛОКОННЫМ ДАТЧИКОМ ЛИФ

В диссертации использованы результаты измерений, полученные во время проведения испытаний экспериментальной измерительной системы в ряде экспедиционных исследований, которые проводились в акваториях Японского моря. Измерения проводились в закрытых водах Амурского и Уссурийского заливов, у берегов острова Русский, а так же в открытых водах Дальневосточного морского заповедника в районе мыса Шульца. Станции выполнялись в местах с различной глубиной, не превышающей 30 метров в Амурском заливе, и до 100 метров в районе Русского острова.

Для изучения влияния параметров среды на фитопланктон использованы результаты суточных измерений у пристани морской экспедиционной станции «мыс Шульца», которая находится в Хасанском районе в заливе Посьета. Все экспедиционные измерения проводились на судах принадлежащих Институту биологии моря и Тихоокеанскому океанологическому институту ДВО РАН при участии сотрудников этих институтов.

4.1 Экспедиция 2010 года

При выполнении морских испытаний экспериментальной измерительной системы были поставлены следующие цели:

1. Показать возможность прибора измерять концентрацию хлорофилла-*a* в морской воде, вблизи береговой линии и в открытом море, на различных глубинах.
2. Выполнение измерения концентрации хлорофилла в различных точках акватории и их сравнение.

3. Выполнение суточных измерений в рамках экологического мониторинга.

4. Выявление возможных недостатков конструкции.

В качестве судна носителя для установки измерительной системы использовались малые научно-исследовательские суда УНИФ (рисунок 4.1).

Рисунок 4.1. НИС «Малахит» и НИС «Импульс» у причала научной станции мыс «Шульца»

Маршруты и точки измерений за период с 2010 по 2013 годы показаны на рисунках 4.2, 4.4, 4.7, 4.9, 4.11. На рисунке 4.2 изображены точки экспериментальных измерений, которые проводились в районе города Владивосток. Первый «разрез» был проведен от поселка «Портовик» до полуострова «Де-фриз». На карте точки разреза обозначены латинскими буквами A-D. Затем измерения проводились вдоль побережья Владивостока по направлению выхода из Амурского залива (точки E-H). Самой южной точкой измерений стала точка I, которая находилась у берегов острова

«Рейнеке». Две последние точки (J, K) были сделаны в водах уссурийского залива.

На рисунке 4.3 показаны вертикальные распределения температуры воды, флуоресценции и концентрации хлорофилла-*a*. Концентрация рассчитывалась по интенсивности ЛИФ излучения по формуле (2.16).

Рисунок 4.2. Экспедиция на НИС «Насонов» (07.10.2010)

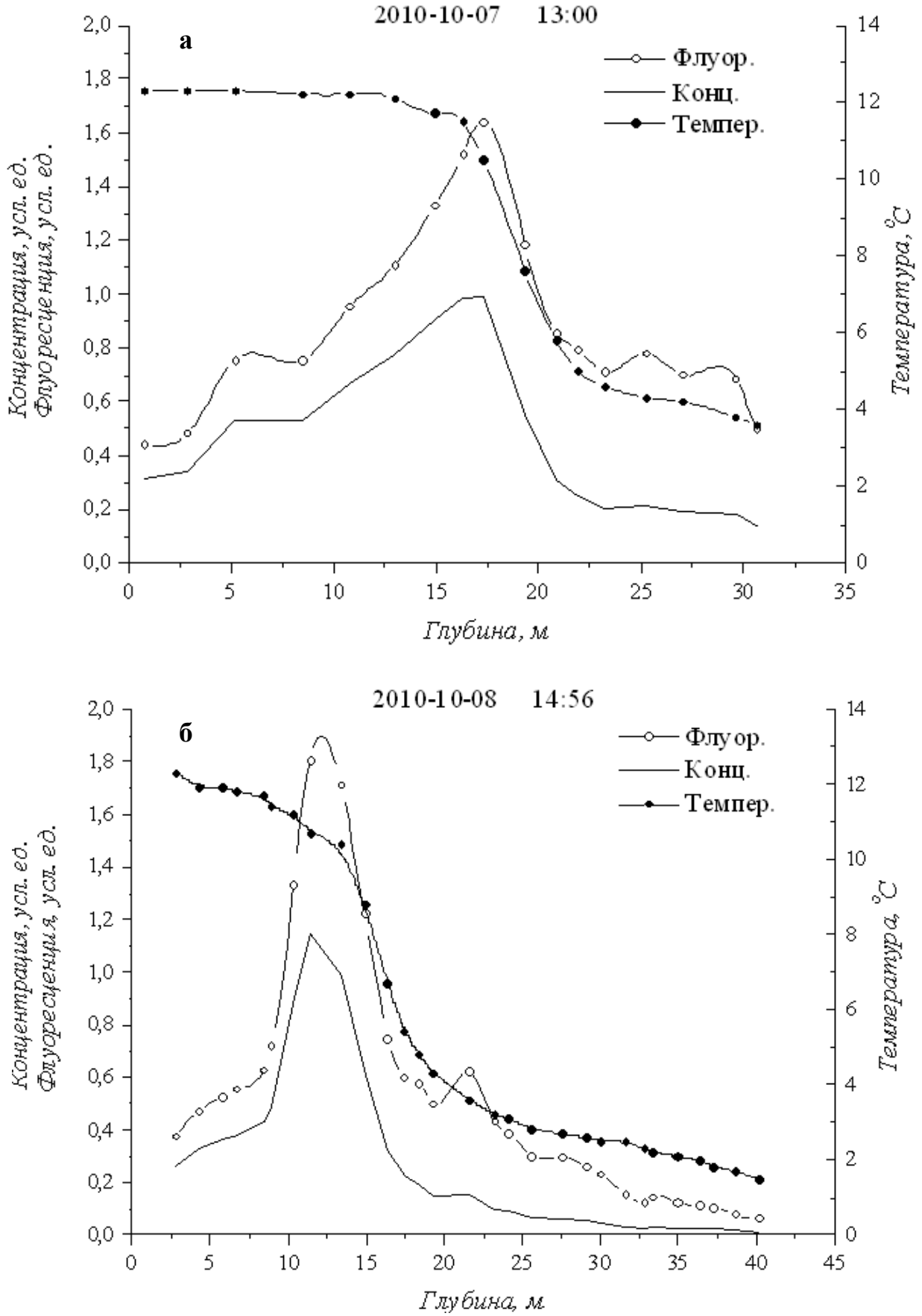


Рисунок 4.3 Измерение интенсивности ЛИФ фитопланктона в заливе Посьета в начале октября 2010 года.

На рисунке 4.3 представлены данные полученные в результате измерений в точках D (рисунок 4.3 а) и I (рисунок 4.3 б). Прямой линией на рисунке отображены значения концентрации хлорофилла-*а* в условных единицах. При расчете концентрации хлорофилла-*а* учитывалось влияние температуры воды на интенсивность ЛИФ, коэффициент пропорциональности рассчитывался согласно предложенной в работе методике. Корреляция между флуоресценцией и концентрацией составляет: рисунок 4.3 (а) – 0,88; рисунок 4.1 (б) – 0,84.

На рисунках отчетливо виден максимум концентрации хлорофилла-*а*. Для точки D такой максимум находится на глубине 17 метров. А для точки I на глубине 12 метров. Разница в глубинах залегания максимума концентрации хлорофилла-а может быть объяснена разницей в глубинах термоклина. На графиках хорошо видно, что при падении температуры возникает падение интенсивности ЛИФ. Такое явление может быть связано с тем, что понижение температуры пагубно влияет на клетки фитопланктона, в результате чего они либо погибают, либо пытаются изменить глубину обитания. Это приводит к уменьшению концентрации самих клеток фитопланктона с увеличением глубины, что непосредственно сказывается на концентрации хлорофилла-*а* и интенсивности ЛИФ.

Кроме измерений в районе города Владивосток, были проведены измерения вдоль юго-западного побережья приморского края. На рисунке 4.4 показаны точки замеров, выполненные в водах Амурского залива и залива Посьета. Первые измерения (A,B) были сделаны на выходе из Владивостока между полуостровом Шкота и островом Русский. Измерения в точках C и D были выполнены вблизи островов Попова и Рикорда. Серия измерений (E, K-L) была выполнена в районе мыса Гамова. В заливе Посьета проводились измерения в точках (F-J) Самые южные точка измерений были сделаны в Хасанском районе близ реки «Лебединая» (H, I). Измерения в точках (M-O)

были проведены вблизи островов Рикорда и Рейнеке, при возвращении научной экспедиции из Хасанского района.

Рисунок 4.4. Экспедиция на НИС «Малахит» (20-22.10.2010)

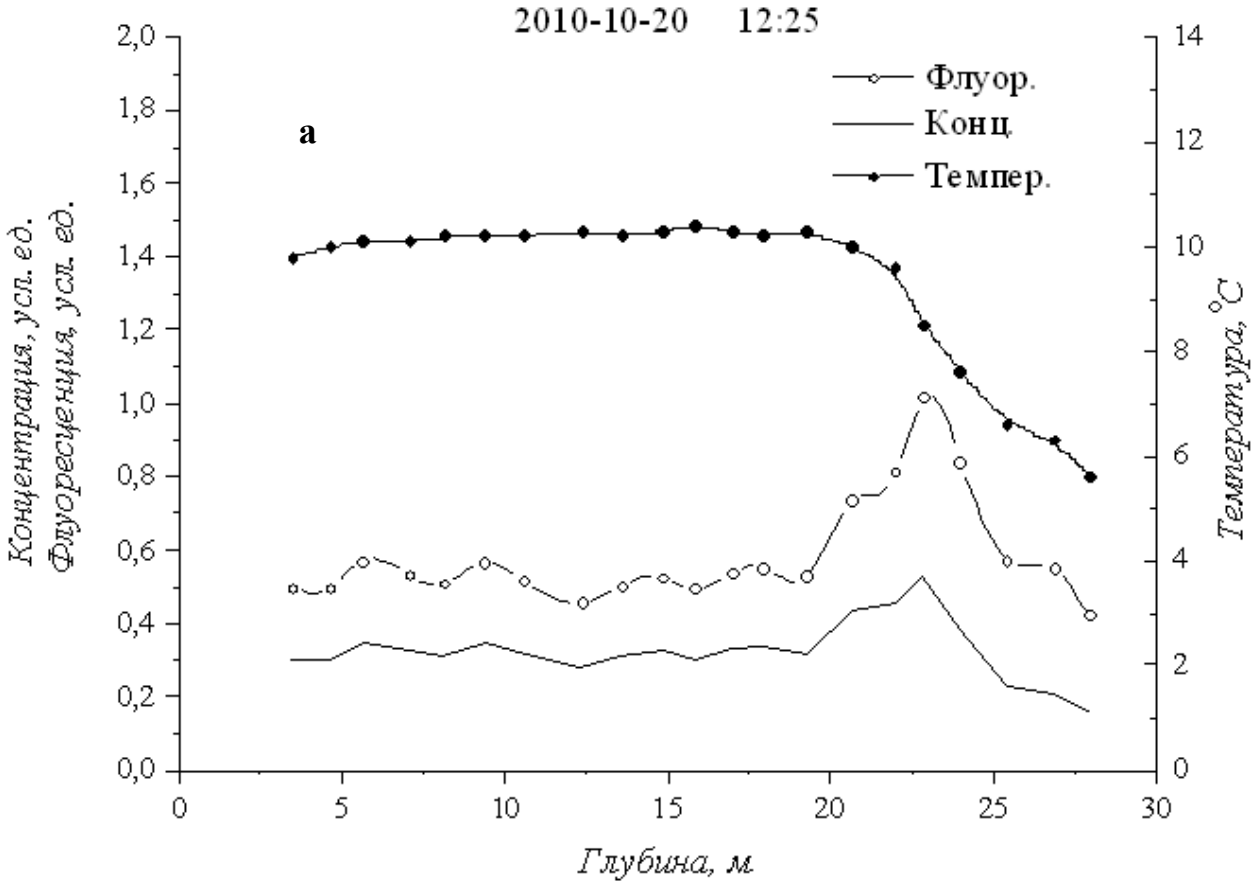
На рисунках 4.5а – 4.5в показаны результаты измерений в точках B, F, M соответственно. На рисунке 4.5 (а) отчетливо виден максимум концентрации хлорофилла-*а* залегающий на глубине 22 метра. Можно сделать вывод, что такое расположение связано в первую очередь с распределением температуры и нахождением оптимальной температуры для доминирующих видов фитопланктона именно на глубине 22 метра. На графике видно, что уменьшение температуры с глубиной начинается на 20 метровой глубине и вызывает сначала рост интенсивности ЛИФ, а затем ее падение. В данном случае можно предположить, что рост интенсивности ЛИФ связан с зависимостью ее интенсивности от температуры, а падение с

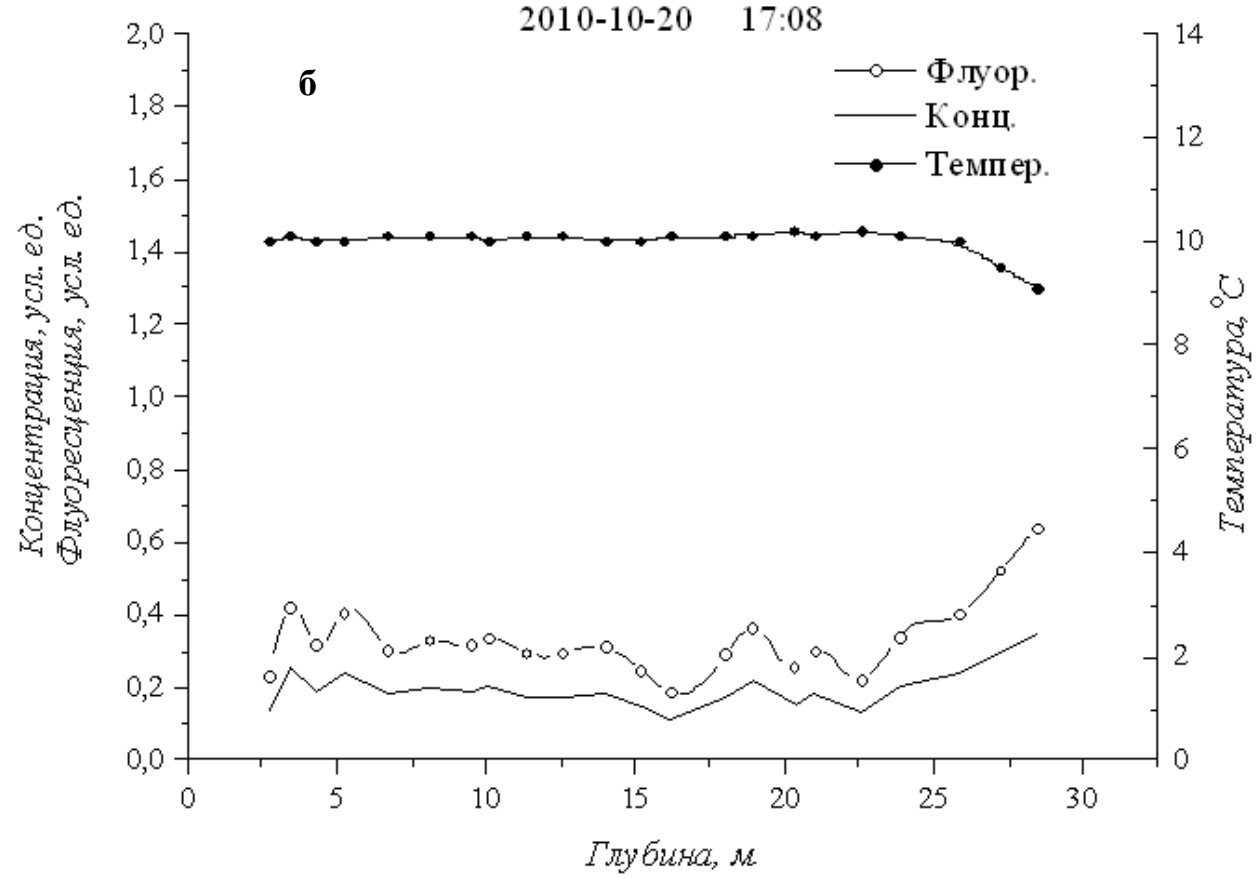
изменением концентрации клеток фитопланктона. Корреляция между ЛИФ и концентрацией для данных рисунка 4.5 (а) составляет 0,83.

На рисунке 4.5 (б) видно, что изменение температуры, как и интенсивности ЛИФ, наблюдается лишь на глубине 25 метров в районе дна. По данным этого измерения отследить влияние температуры на ЛИФ хлорофилла-*а* представляется затруднительным.

На рисунке 4.5 (в) представлены данные измерений в районе острова Рикорда. Максимальная глубина измерений составила 45 метров. На графике отчетливо виден максимум интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а* залегающий на глубинах 25-30 метров. Увеличение интенсивности ЛИФ происходит одновременно со снижением температуры. Дальнейшее снижение температуры вызывает уменьшение интенсивности ЛИФ, что может быть вызвано уменьшением количества клеток фитопланктона.

Анализ данных полученных в ходе экспедиции 2010 года позволил сделать вывод, что изменение интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а* в составе клеток фитопланктона в естественной среде зависит от температуры среды. При постоянной температуре значительных изменений интенсивности ЛИФ не наблюдается. Наличие пика флуоресценции хлорофилла-*а* при прохождении термоклина позволяет предположить наличие оптимальной температуры, которая способствует росту фитопланктона.


2010-10-20 12:25
а
Флуор.
Конц.
Темпер.
Концентрация, усл. ед.
Флуоресценция, усл. ед.
Температура, °С
Глубина, м
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
14
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
25
30


2010-10-20 17:08
б
Флуор.
Конц.
Темпер.
Концентрация, усл. ед.
Флуоресценция, усл. ед.
Температура, °С
Глубина, м
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
14
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
25
30

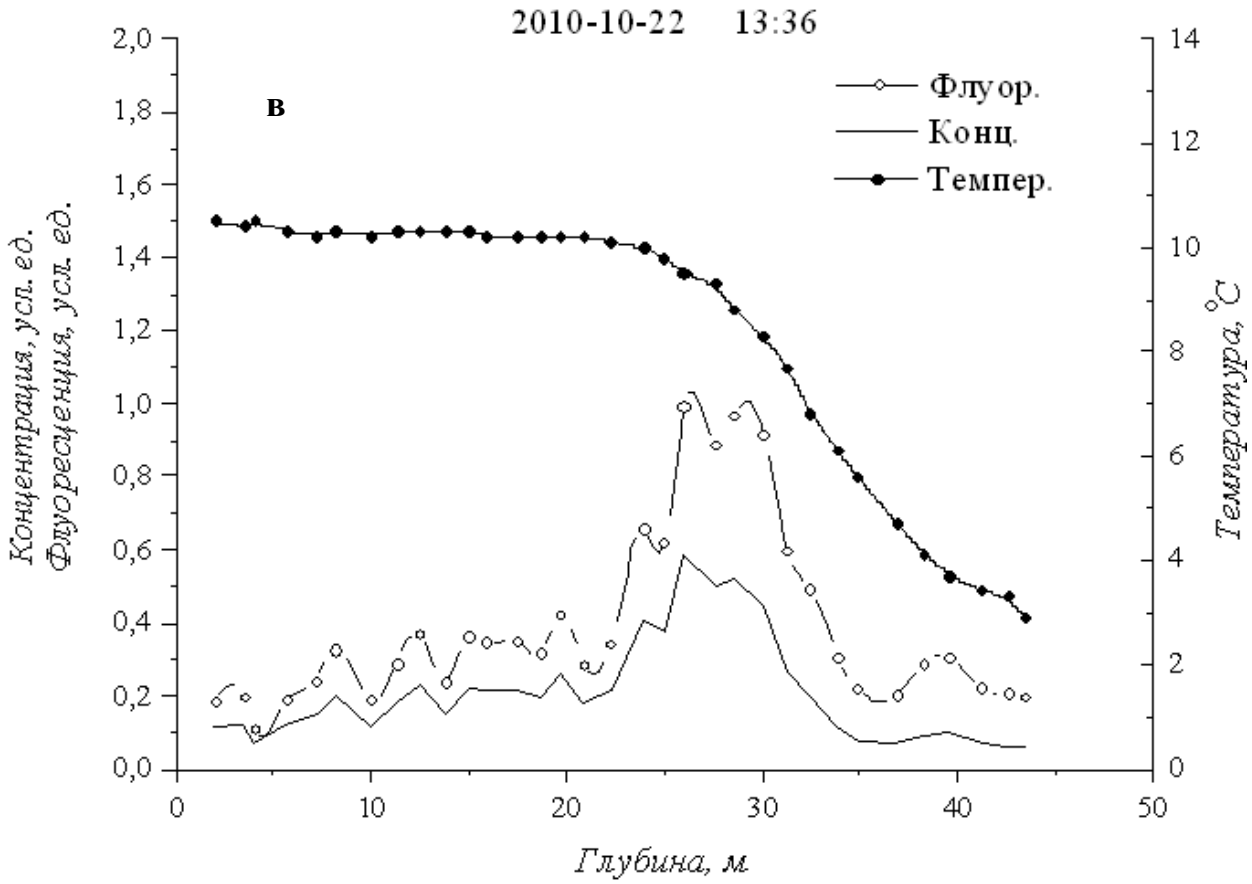


Рисунок 4.5 Измерение интенсивности ЛИФ хлорофилла-а (685 нм) в заливе Посьета в конце октября 2010 года.

4.2. Экспедиция 2011 года

В 2011 году была проведена экспедиция в Хасанский район, на научную станцию «мыс Шульца». Целью данной экспедиции стало выявление различия между ЛИФ фитопланктона обитающего в открытом море и фитопланктона в прибрежной области.

Измерения ЛИФ хлорофилла-*а* в составе клеток фитопланктона, а так же измерение температуры воды и уровня освещенности выполнялись при помощи экспериментальной измерительной системы, установленной на борту НИС «Импульс» (рисунок 4.6).

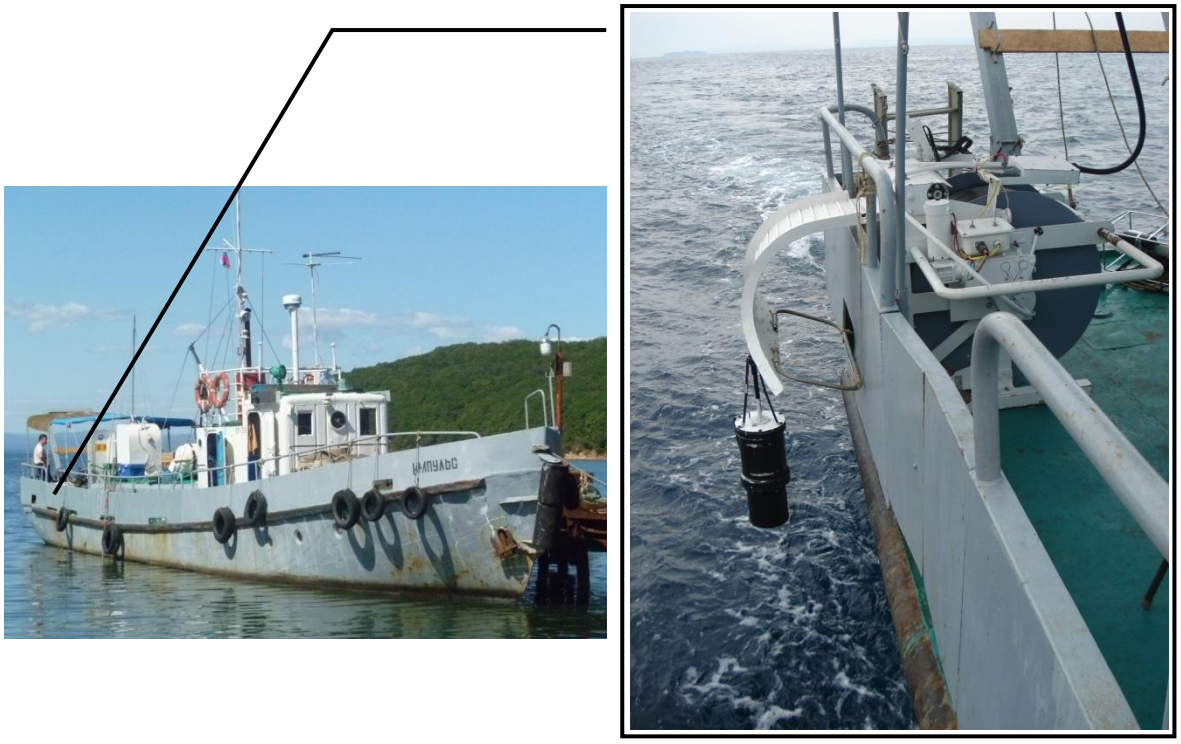


Рисунок 4.6. Экспериментальная измерительная система на борту НИС «Импульс»

На рисунке 4.7. показана карта области, в которой были проведены экспедиционные измерения. Как видно на карте измерения проводились в открытой воде (точка 3), прибрежной воде (точка 2) и на границе смешения вод (точка 1). Измерения на первой станции проводились в начале сентября 2011 года в ходе первого этапа научной экспедиции, а измерения на второй и третей станции в конце сентября, во время второго этапа научной экспедиции. Расположение точек измерения позволяет сравнить не только концентрацию фитопланктона в разных типах вод, но и выявить зависимость влияния параметров среды на интенсивность ЛИФ в зависимости от типа воды.

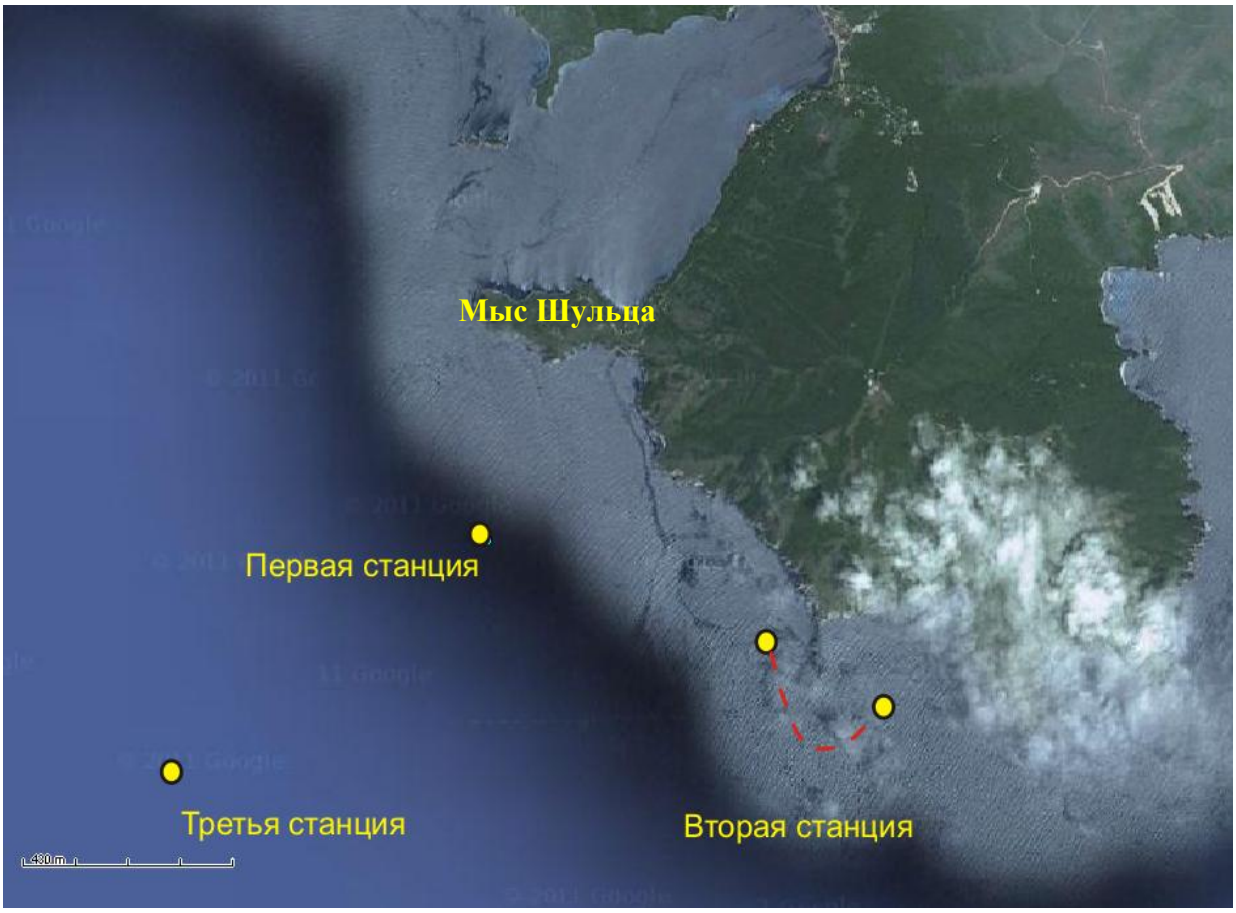
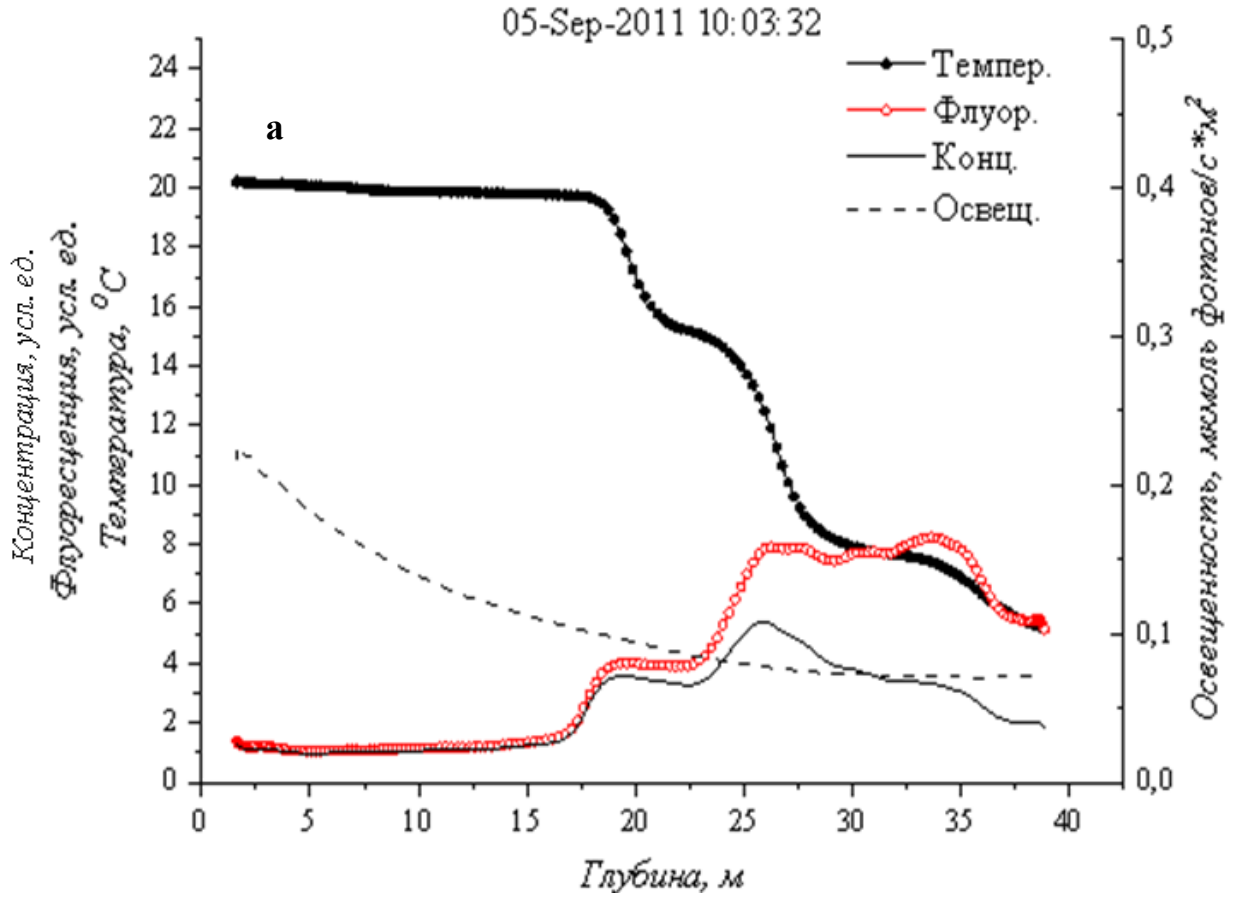
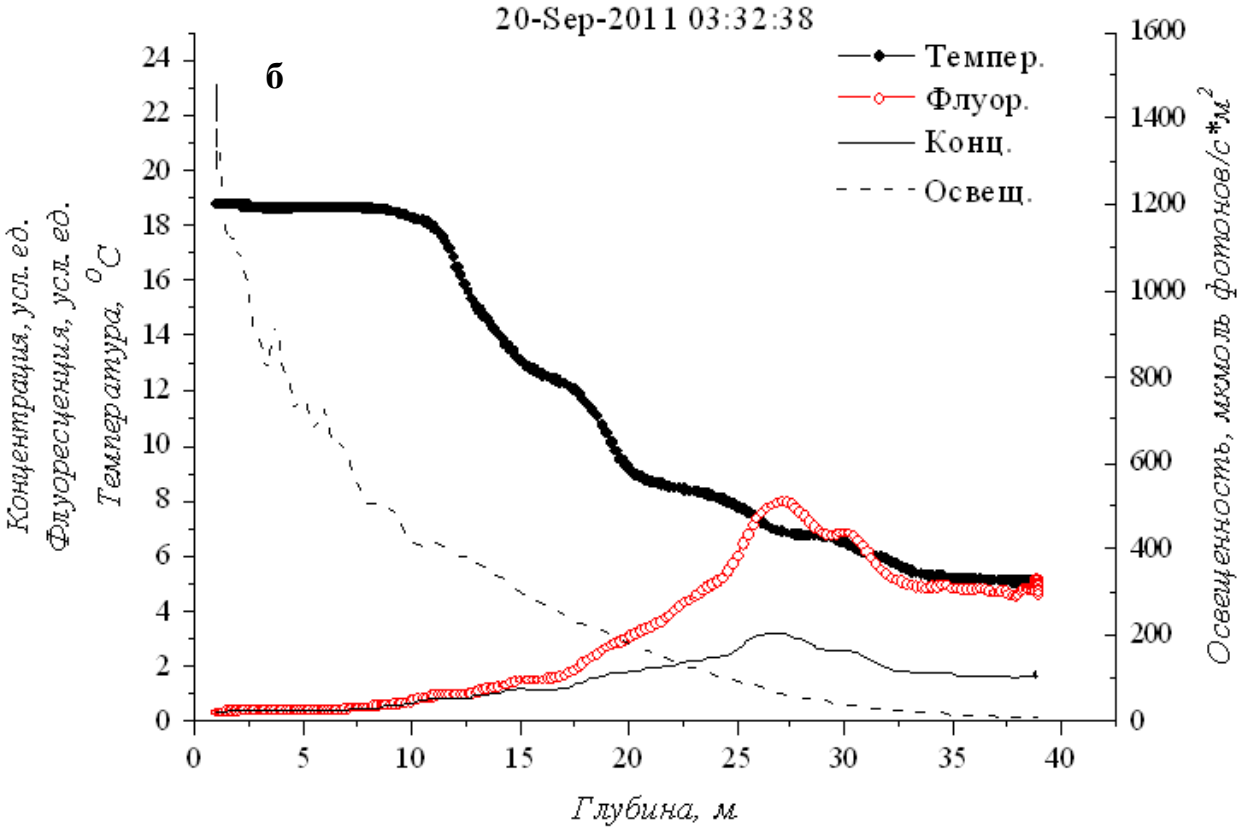


Рисунок. 4.7. Расположение суточных станций в районе мыса Шульца.

В ходе экспедиции планировалось выполнение суточных измерений в точке 2, однако в связи с погодными условиями такие измерения были проведены не полностью. Из-за сильного западного ветра, исследовательское судно было вынуждено поменять расположение и войти в бухту Алексеева, закрытую от ветра. При усилении ветра – вернуться на научную станцию. На рисунке 4.7 пунктиром обозначен маршрут НИС «Импульс» во время суточного измерения.

На рисунках 4.8 (а) – 4.8 (г) представлены результаты проведенных во время экспедиции измерений. Концентрация хлорофилла-*а* рассчитывалась по интенсивности ЛИФ по формуле (2.16). На рисунках видно, что глубина исследуемого слоя воды во всех точках примерно одинакова. При этом термоклин начинается на разных глубинах, в зависимости от места измерений, даты и времени суток.


05-Sep-2011 10:03:32
а
Темпер.
Флуор.
Конц.
Освещ.
Концентрация, усл. ед.
Флуоресценция, усл. ед.
Температура, °C
Освещенность, мкмоль фотонов/с*м²
Глубина, м


20-Sep-2011 03:32:38
б
Темпер.
Флуор.
Конц.
Освещ.
Концентрация, усл. ед.
Флуоресценция, усл. ед.
Температура, °C
Освещенность, мкмоль фотонов/с*м²
Глубина, м

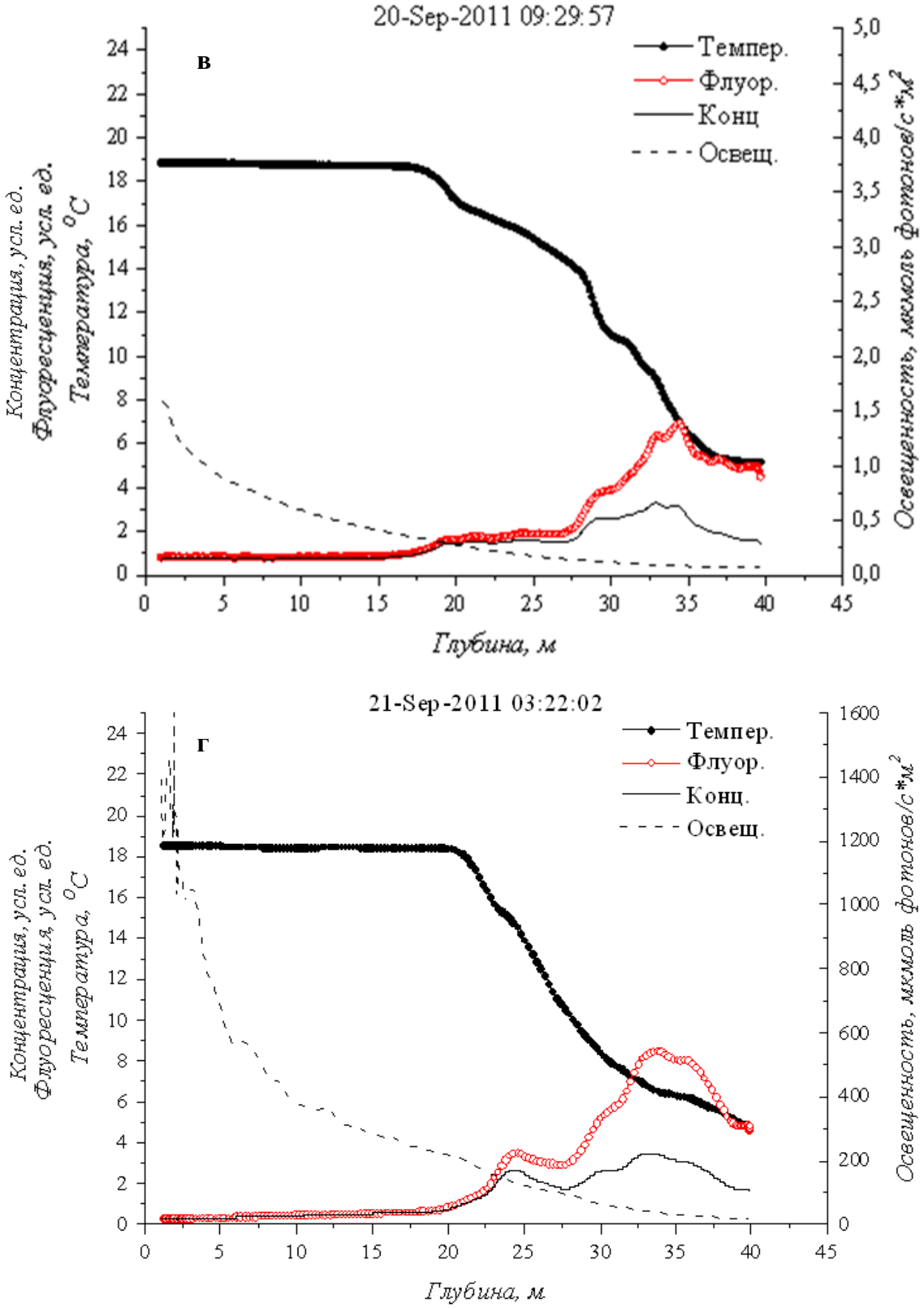


Рисунок 4.8. Измерение интенсивности ЛИФ хлорофилла-а (685 нм) на траверзе мыса Шульца в сентябре 2011 года.

На рисунке 4.8 (а) представлены данные первого этапа экспедиции. Отчетливо видно влияние температуры на интенсивность ЛИФ хлорофилла-*а*. Ступенчатое изменение температуры по глубине, возникающее, по-видимому, из-за разделения воды по слоям с разной температурой, хорошо совпадает со ступенчатым изменением интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а*. Как видно из графика, уменьшение температуры вызывает рост интенсивности ЛИФ. Падение интенсивности ЛИФ с дальнейшим уменьшением температуры вызвано уменьшением концентрации фитопланктона. На рисунке 4.8 (а) можно заметить, что при уменьшении концентрации на глубинах больше 25 метров, интенсивность ЛИФ остается неизменной. Такое явление может быть вызвано тем, что температура увеличивает интенсивность ЛИФ хлорофилла-*а* в составе клеток фитопланктона.

На рисунках 4.8 (б) и 4.8 (в) показаны данные измерений вблизи берега. Как видно из графиков, концентрация фитопланктона здесь несколько ниже, чем в первой точке. Это обстоятельство может быть вызвано климатическими изменениями. Так как вблизи берега, термоклин залегает глубже, а поверхность воды более прогрета. Пик залегания концентрации смещается в сторону больших глубин, что может быть вызвано изменением в видовом составе фитопланктона.

На рисунке 4.8 (г) представлены результаты измерений в третьей точке, которая находилась на расстоянии 3,5 км от берега. Концентрация хлорофилла-*а* незначительно отличается от данных точки 2. Максимум концентрации так же находится на глубинах 25-30 метров.

В результате исследований 2011 года выявлена четкая зависимость интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а* в составе клеток фитопланктона от температуры среды.

4.3. Экспедиция 2012 года

Экспедиционные измерения в 2012 году проводились с целью накопления информации о концентрации фитопланктона и ЛИФ хлорофилла-*а* в составе его клеток в акваториях Японского моря. Экспедиция осуществлялась в 2 этапа. Маршрут первого этапа экспедиции 2012 года изображен на рисунке 4.9. Измерения проводились в 8 точках по направлению научная станция «мыс Шульца» – Владивосток.

Рисунок 4.9. Маршрут первой экспедиции

Характерные графики, полученные в ходе измерений, представлены на рисунке 4.10. году. Согласно проведенным исследованиям основу видового состава фитопланктона в 2012 году составляли виды, слабо реагирующие на изменение внешних параметров среды. Как видно на рисунке 4.10. даже при сильном изменении освещенности и температуры, интенсивность ЛИФ хлорофилла-*а* практически не изменяется.

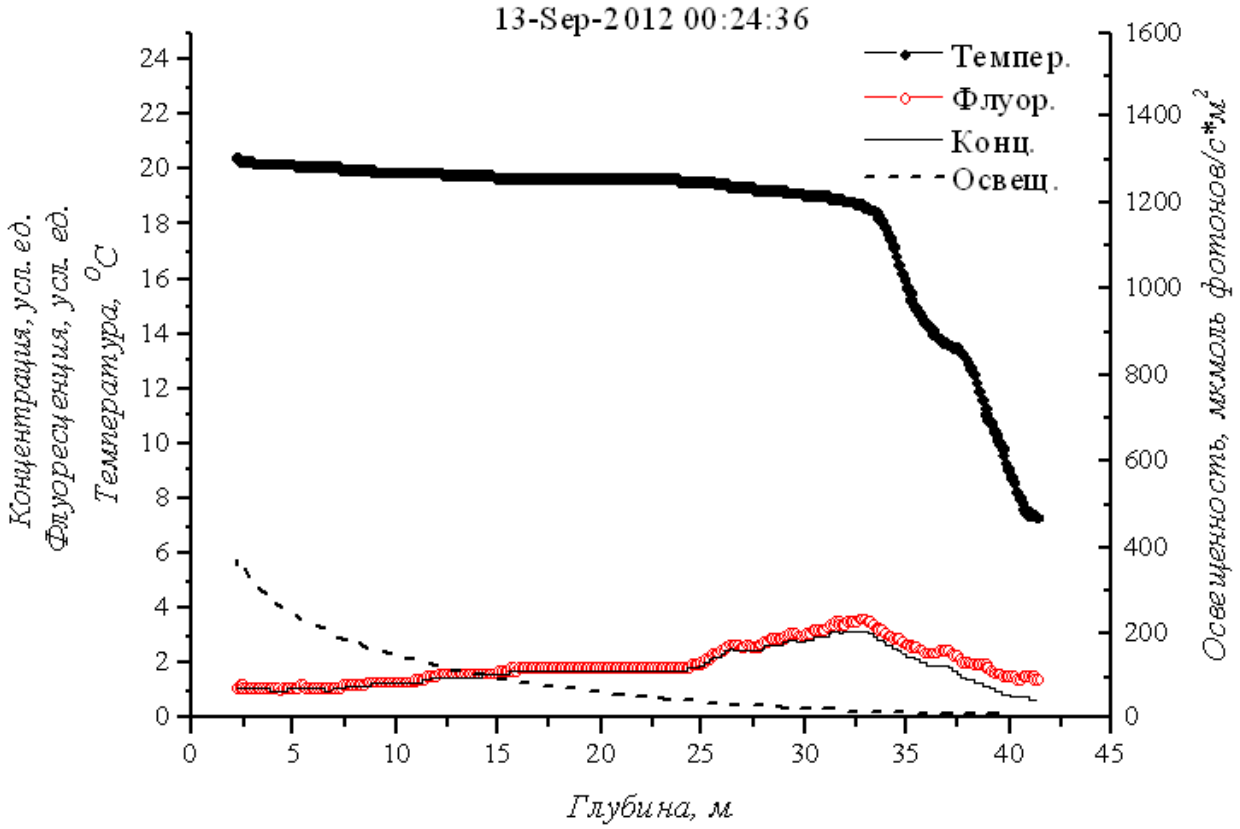


Рисунок 4.10. Экспедиционные измерения интенсивности ЛИФ хлорофилла-а (685 нм) в районе мыса Шульца середина сентября 2012.

Второй этап экспедиции осуществлялся в конце сентября 2012 года. Целью данного этапа было выявить различие между фитопланктоном прибрежной области и открытого моря. На рисунке 4.11. изображена карта экспедиционных измерений. Точка 1 находится непосредственно в закрытой бухте Витязь, защищенной от ветра и не имеющей сильных течений. Точка 2 располагается в открытом море.

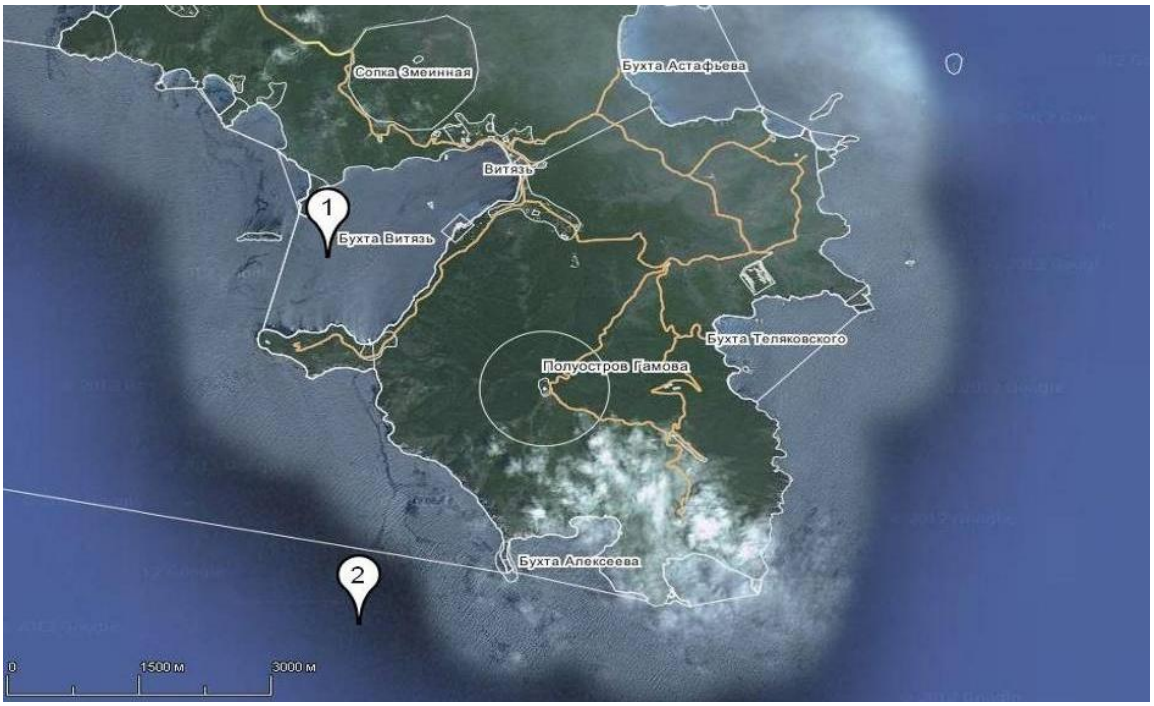


Рисунок 4.11. Маршрут второй экспедиции

Данные, полученные в ходе экспедиционных измерений в бухте Витязь, изображены на рисунке 4.12, а данные, полученные в открытом море, на рисунке 4.13.

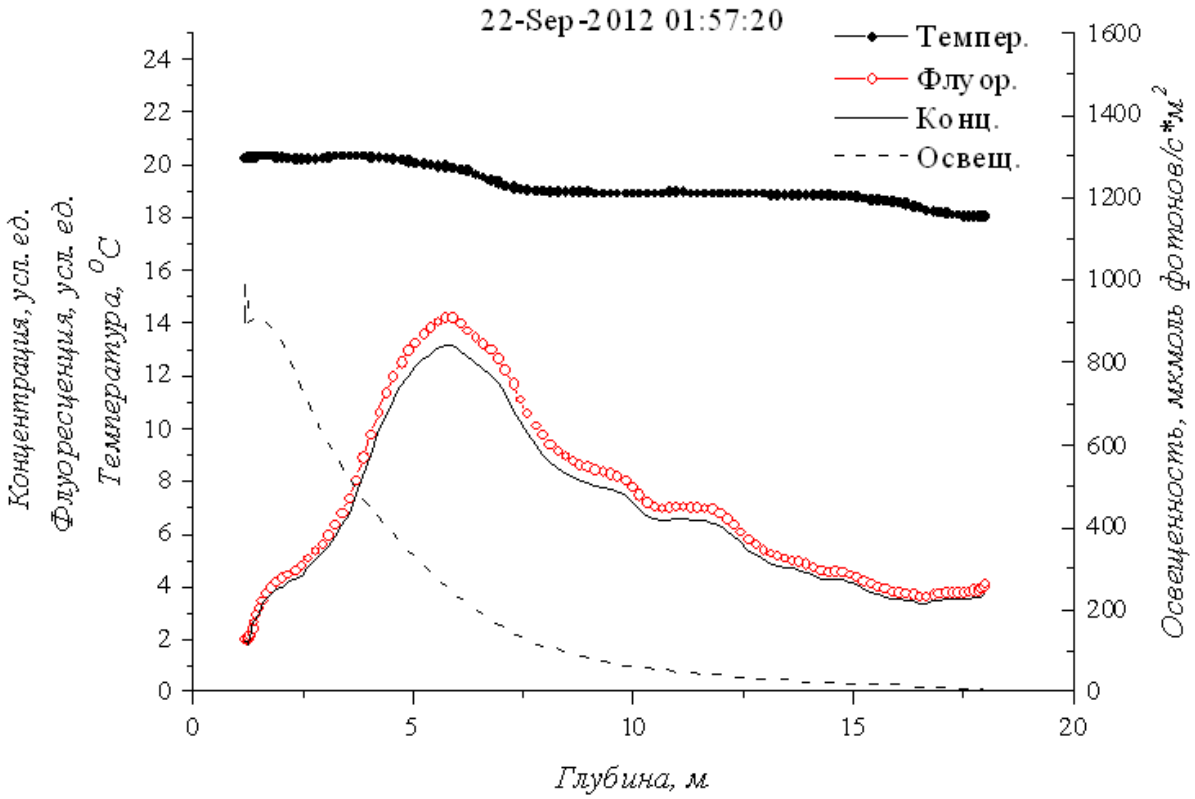


Рисунок 4.12. Измерения в закрытой бухте Витязь

Из данных полученных в 1 точке видно, что температура не оказывает влияния на интенсивность ЛИФ и концентрацию хлорофилла-*а*. Влияние освещенности не поддается однозначной оценке. Наличие пика концентрации на глубинах 5-6 метров может быть вызвано факторами, не учтёнными при измерениях. Среди этих факторов может быть сброс отходов, или смыв слоя почвы. Такое воздействие грубо нарушает экологическое состояние среды и вызывает резкий всплеск роста фитопланктонных водорослей.

При измерениях во второй точке (рисунок 4.13) виден слабый максимум концентрации хлорофилла-*а* на глубине около 30 метров, при этом воздействие температуры и освещенности на этой глубине практически не происходит.

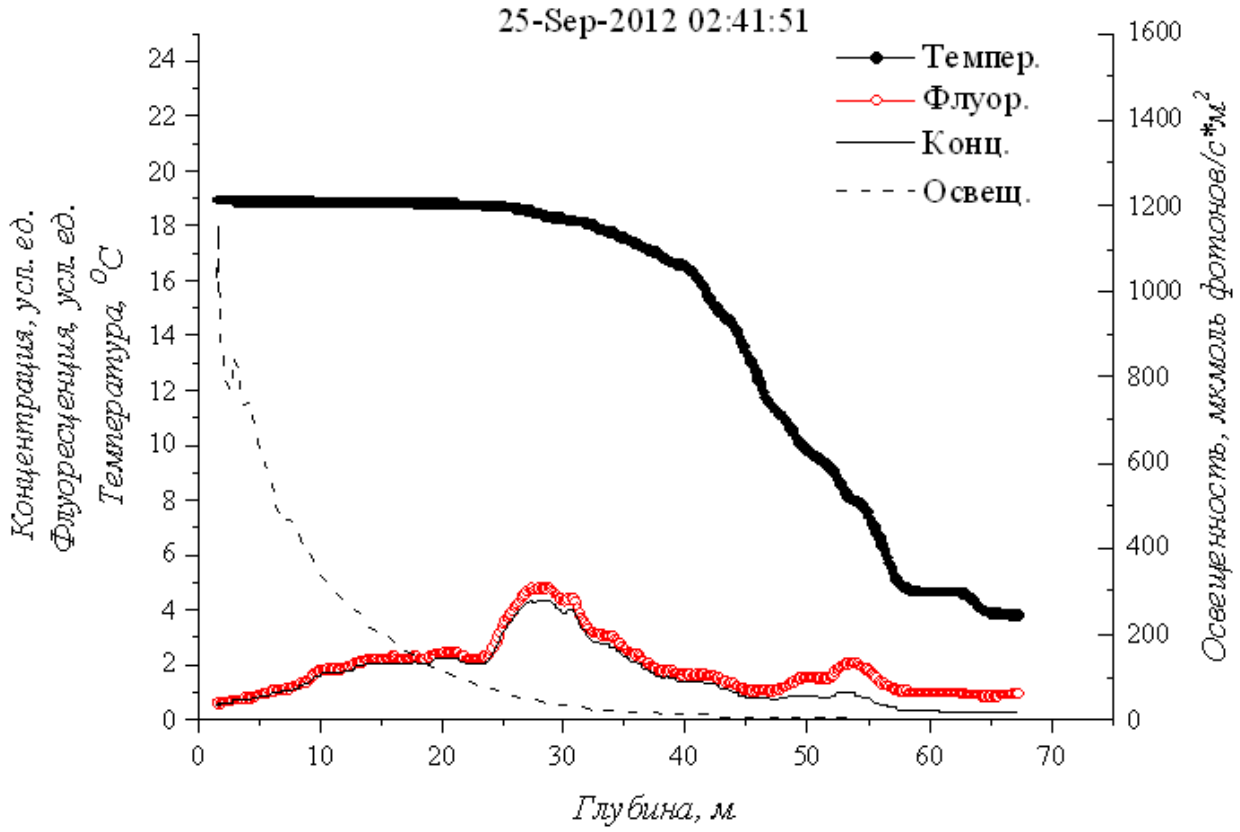


Рисунок 4.13. Измерения в открытом море

Исходя из полученных данных второго этапа экспедиции, можно сделать вывод о локальном изменении экологического состояния вблизи научной станции «мыс Шульца». Такое изменение может быть результатом деятельности человека или природных факторов (разлив рек, сход селевого потока, штормовые течения). То, что увеличение концентрации особенно сильно проявляется в закрытой бухте Витязь, может так же быть результатом преобладания одного из видов фитопланктона, развивающегося непосредственно в этой бухте в береговой полосе. Так как воздействие температуры и освещенности не оказывает воздействия на интенсивность ЛИФ фитопланктона в данных исследованиях, можно сделать вывод, что в 2012 году в акваториях Японского моря преобладал вид, стойкий к изменению данных факторов среды.

4.4. Экспедиция 2013 года

Целью экспедиции 2013 года было исследовать ЛИФ фитопланктона в районе научной станции «мыс Шульца». В ходе экспедиции 2012 года было установлено наличие пиков концентрации фитопланктона при относительно постоянных значениях таких факторов среды, как температура и освещенность. Такое явление позволило предположить наличие особого вида фитопланктона обладающего высокой стойкостью к изменению параметров. Данные типичного распределения, представлены на рисунке 4.14.

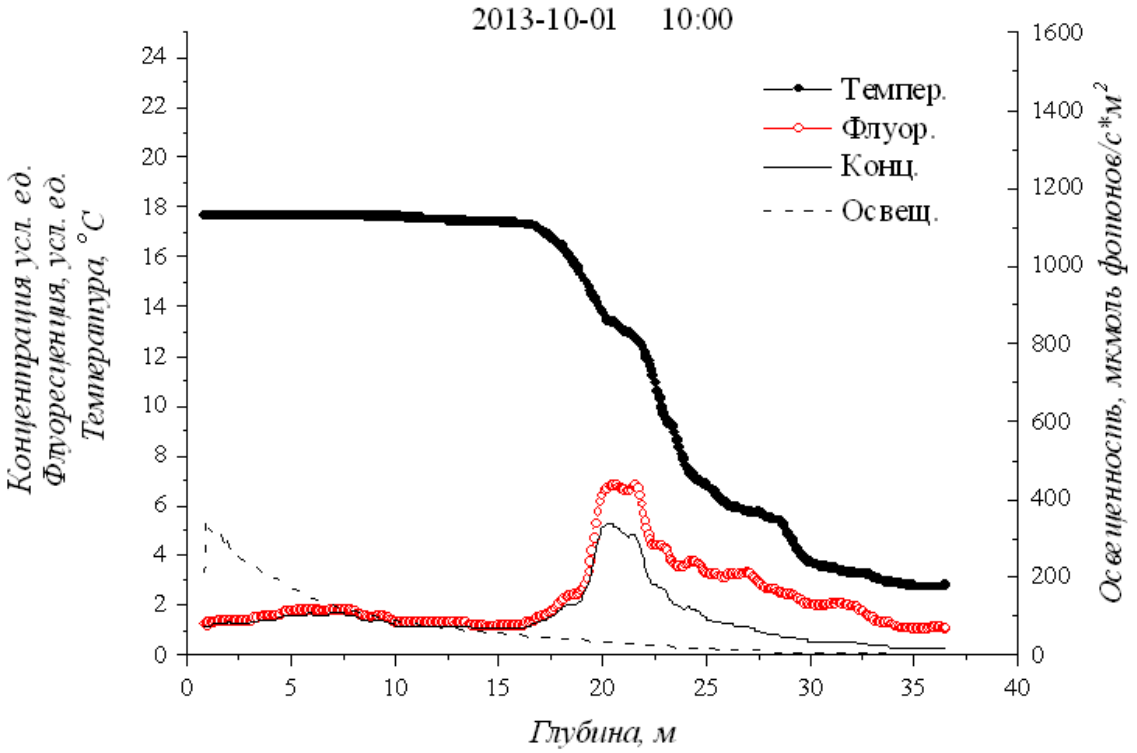


Рисунок 4.14. Суточные измерения интенсивности ЛИФ хлорофилла-а (685 нм) на траверзе мыса Шульца середина сентября 2012.

Судя по графикам изменения температуры и интенсивности ЛИФ можно сделать вывод, что в воде преобладают виды с такой же реакцией на изменение параметров среды, как и у видов, исследованных в 2010 и 2011 годах. При уменьшении температуры воды в термоклине отчетливо наблюдается увеличение интенсивности ЛИФ хлорофилла-*а*. Спад интенсивности ЛИФ предположительно вызван уменьшением количества микроводорослей фитопланктона в воде, вызванным падением температуры ниже комфортной для данного вида.

Выводы по главе

Показано практическое применение методики расчета концентрации хлорофилла-*а* по данным интенсивности ЛИФ. При расчете используется выведенная в данной работе зависимость коэффициента пропорциональности

между интенсивностью ЛИФ и концентрацией хлорофилла-а от параметров среды. Многочисленные экспедиционные исследования позволяют сформировать представление об особенностях флуоресценции природного фитопланктона.

В результате анализа проведенных экспедиционных исследований было экспериментально подтверждено, наличие зависимости интенсивность ЛИФ хлорофилла-*a* в составе клеток природного фитопланктона от температуры и освещенности среды обитания. Было установлено, что видовой состав фитопланктона меняется с течением времени, и такое изменение может носить периодический характер. Замечено, что в 2012 году преобладали вида микроводорослей более стойкие к изменениям параметров среды, по сравнению с другими годами. Экспедиционные измерения позволили показать возможность оценки экологического состояния акваторий при помощи ЛИФ измерений, необходимость учета зависимости состояния клеток фитопланктона при выполнении измерений ЛИФ в естественной среде.

Благодарность

Автор выражает благодарность научному руководителю и всем коллегам и работникам ИАПУ ДВО РАН, принимавшим активное участие и оказавшим помощь в работах, послуживших основой для создания диссертации.

Отдельную благодарность автор выражает:

Коротенко Алексею Анатольевичу м. н. с. лаборатории физических методов мониторинга природных и техногенных объектов ИАПУ за совместную работу при разработке экспериментальной измерительной системы и исследовании оптоволоконного датчика флуоресценции хлорофилла-*a*. А так же за руководство и техническую поддержку в экспедиционных исследованиях флуоресценции хлорофилла-*a*.

Захаркову Сергею Петровичу к. б. н. и в. н. с. лаборатории палеоокеанологии ТОИ за содействие и помощь при организации и проведении экспедиционных измерений на НИС «Малахит» и «Импульс», и за предоставленные данные о концентрации хлорофилла-*a*, полученные в результате экспедиций экстрактным спектрофотометрированием.

Орловой Татьяне Юрьевне к. б. н. и с. н. с. лаборатории экологии шельфовых ИБМ сообществ за предоставленный материал в виде проб гаптофитовой микроводоросли фитопланктона Isochrysis galbana.

Ивину Виктору Вадимовичу к. б. н., заведующего лабораторией продукционной биологии ИБМ за помощь в проведении первой экспедиции по испытанию экспериментальной измерительной системы и предоставленные данные о биологическом разнообразии фитопланктона в водах у берегов острова Русский полуострова Шкота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение сформулируем основные результаты, полученные в работе:

1. Разработана концепция измерения концентрации хлорофилла-а в составе клеток фитопланктона с учетом воздействия температуры и освещенности.

2. Впервые экспериментально получены зависимости спектральной плотности флуоресценции хлорофилла-а в составе гаптофитовой водоросли Isochrysis galbana от температуры и освещенности.

3. Внесены изменения в известную методику расчета концентрации хлорофилла-а, позволяющие учитывать воздействие температуры и освещенности.

4. Разработаны физические принципы построения новой измерительной системы с оптоволоконным датчиком ЛИФ для измерения концентрации хлорофилла-а в составе клеток фитопланктона с учетом воздействия температуры и освещенности.

5. Составлена математическая модель оптоволоконного датчика флуоресценции для произвольной ориентации оптических волокон и изменяющейся мощности индуцирующего излучения.

6. Определены оптимальные параметры конфигурации оптоволоконного датчика ЛИФ, для различной мощности индуцирующего излучения.

7. Выполнены исследования распределения концентрации хлорофилла-а в различных акваториях Японского моря в период с 2010 по 2013 гг.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана _____

(научная концепция; новая научная идея, обогащающая научную концепцию,

_____

новая экспериментальная методика, позволившая выявить качественно новые

_____

закономерности исследуемого явления, повысить точность измерений с расширением

_____

границ применимости полученных результатов и т.п.)

предложены _____

(оригинальная научная гипотеза, оригинальные суждения по заявленной тематике,

_____

нетрадиционный подход и т.п.)

доказана _____

(перспективность использования новых идей в науке, в практике,

_____

наличие закономерностей, неизвестных связей, зависимостей и т.п.)

введены _____

(новые понятия, измененные трактовки старых понятий, новые термины и т.п.)

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны _____

(теоремы, леммы, положения, методики, вносящие вклад в расширение представлений

_____

об изучаемом явлении, расширяющие границы применимости полученных результатов, и т.п.)

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использован _____

(комплекс существующих базовых методов исследования,

_____

в т.ч. численных методов, экспериментальных методик и т.п.)

изложены _____

(положения, идеи, аргументы, доказательства, элементы теории, аксиомы, гипотезы,

_____

факты, этапы, тенденции, стадии, факторы, условия и т.п.)

раскрыты _____

(существенные проявления теории: противоречия, несоответствия,

_____

выявление новых проблем и т.п.)

изучены _____

(связи данного явления с другими, генезис процесса, внутренние и внешние

_____

противоречия, факторы, причинно-следственные связи и т.п.)

проведена модернизация _____

(существующих математических моделей, алгоритмов и/или численных методов,

_____

обеспечивающих получение новых результатов по теме диссертации, и т.п.)

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены (указать степень внедрения) _____

(технологии, новые универсальные методики измерений,

_____

образовательные технологии и т.п.)

определены _____

(пределы и перспективы практического использования теории на практике и т.п.)

создана _____

(модель эффективного применения знаний, система практических рекомендаций и т.п.)

представлены _____

(методические рекомендации, рекомендации для более высокого уровня организации

_____

деятельности, предложения по дальнейшему совершенствованию и т.п.)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЛИФ – лазерно-индуцированная флуоресценция

ППФ – первичные процессы фотосинтеза

ФС – фотосистема

РЦ – реакционный центр

ЭТЦ – цепь транспорта электронов

ССК – светособирающий комплекс

P680 – антенна хлорофилла с флуоресценцией в области 680 нм

Q_A – первичный акцептор цепи транспорта электронов

Q_B – второй акцептор цепи транспорта электронов

ОВД – оптоволоконный датчик

ОВ – оптическое волокно

SBE – погружаемый зонд SeaBird

КР – комбинационное рассеяние

ПК – персональный компьютер

НИС – научно-исследовательское судно

УНИФ – управление научно-исследовательским флотом

ИАПУ – Институт автоматики и процессов управления

ИБМ – Институт биологии моря

ТОИ – Тихоокеанский океанологический институт

ДВО РАН – Дальневосточное отделение Российской академии наук

ЛИТЕРАТУРА

1. Continuous measurements of chlorophyll-a concentration in the Pacific Ocean by shipborne laser fluoromener and radiometer: comparision with seawifs data. Bukin O.A., Pavlov A.N., Permyakov M.S. et al. 2/3, 2001 г., International Journal of Remote Sensing, T. 22, стр. 415-427.
2. Differential lidar fluorosensor system used for phytoplankton bloom and seawater quality monitoring in Antarctica. Barbini R., Colao F., Fantoni R., Palucci A., Robes S. 2-3, 2001 г., Int. J. Remote Sensing, T. 22, стр. 369-384.
3. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. Kolber Z.S., Falkowski P.G. 8, 1993 г., Limnology and Oceanography, T. 38, стр. 1646-1665.
4. Красные приливы и токсические микроводоросли в дальневосточных морях России. Орлова Т.Ю. 2005 г., Вестник ДВО РАН, Т. 1, стр. 27-31.
5. Harmful algal blooms: A global overview. Hallegraeff G.M. 1995 г., Manual of harmful marine microalgae, стр. 1-22.
6. Котелевцев С.В., Маторин Д.Н., Садчиков А.П. Эколого-токсикологический анализ растительных сообществ в водных экосистемах. М. : Альтекс, 2012. Стр. 185.
7. Использование пассивно-активных методик оптического зондирования для измерения структурных особенностей распределения биооптических характеристик в верхнем слое океана. Букин О.А., Пермяков М.С., Павлов А.Н., Майор А.Ю., и др. 9, 2000 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 13, стр. 847-851.
8. Лазерное зондирование поверхностных вод Атлантики и морей омывающих Европу. Пелевин В.Н., Абрамов О.И., Карлсен Г.Г., Пелевин В.В., Строгов А.М., Хлебников Д.В. 8, 2001 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 14, стр. 704-709.

9. Роль аэрозолей в сохранении современного климата. Израэль Ю. А., Борзенко И. И., Северов Д. А. 2007 г., Метеорология и гидрология, Т. 1, стр. 5-14.
10. The Ocean invisible forest. Falkowski P.G. 2002 г., Scientific American, Т. 54, стр. 54-61.
11. Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. Millan-Almaraz, Jesus Roberto, et. Al. 25, 2009 г., African Journal of Biotechnology, Т. 8, стр. 7340-7349.
12. Measuring seagrass photosynthesis: methods and applications. Beer S., João Silva, Yoni Sharon, Rui Santos,. 2009 г., AQUATIC BIOLOGY, Т. 7, стр. 127–141.
13. Robotic observations of dust storm enhancement of carbon biomass in the North Pacific. Bishop J. K. B., Davis R. E., Sherman J. T. 5594, 2002 г., Science, Т. 298, стр. 817-821.
14. Oxic microzones and radial oxygen loss from roots of Zostera marina. Glud R. N., Jensen S. I., Kühl M., Jørgensen L. B., Priemé A. 2005 г., Mar Ecol Prog Ser, Т. 293, стр. 49–58.
15. Stable isotope (13 C) and O2 micro-optode alternatives for measuring photosynthesis in seaweeds. Miller H. L., Dunton K. H. 2007 г., Mar Ecol Prog Ser, Т. 329, стр. 85–97.
16. Комплексный контроль состояния морских акваторий оптическими методами. Часть 4. Оптоволоконная система измерения концентрации фитопланктона. Кульчин Ю Н., Вознесенский С.С., Гамаюнов Е.Л., Коротенко А.А., Попик А.Ю., Майор А. Ю. 1, Новосибирск : Издательство Сибирского отделения РАН, 2013 г., ОПТИКА АТМОСФЕРЫ И ОКЕАНА, Т. 26, стр. 40-45.
17. Майор А.Ю., Крикун В.А., Букин О.А., Павлов А.Н. 53016 Рос. Федерация, 2006 г.
18. Алимов А.Ф. Элементы теории функционирования водных экосистем. Спб. : Наука, 2000. Стр. 147.

19. Photosynthetic Characteristics of Marine Phytoplankton From Pump-During-Probe Fluorometry of Individual Cells at Sea. Olson R.J., Sosik H.M. and Chekalyuk A.M. 1999 г., CYTOMETRY, Т. 37, стр. 1–13.
20. Регуляция первичных процессов фотосинтеза. Рубин А. Б. И Кренделева Т.Е. 2003 г., Успехи биологической химии, Т. 43, стр. 225—266.
21. Холл Д., Рао К. Фотосинтез. М. : Мир, 1983. Стр. 134.
22. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. Лекции по биофизике фотосинтеза. Москва : МГУ, 1988 г. Стр. 320.
23. Биологические методы в экологическом мониторинге. Рубин А.Б. 4, 2000 г., Соровский образовательный журнал, Т. 6, стр. 7-13.
24. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. К. : Альтерпрес, 2002. Стр. 191.
25. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. 1998 г., Photosynthesis: a comprehensive treatise, стр. 320–336. In: Raghavendra AS (ed).
26. Govindjee, Govindjee R. Introduction to photosynthesis. Bioenergetics of Photosynthesis. Academic Press, 1975 г., стр. 1-50.
27. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical. J. Exp. Bot. 2000 г., Т. 51, 345, стр. P.659-668.
28. Кобленц-Мишке О.И. кстрактный и безэкстрактный методы определения фотосинтетических пигментов в пробе. М. : Наука, 1983. Стр. 114-125.
29. Kinetic modeling of time-resolved fluorescence in spinach chloroplasts. Berens S.J., Scheele J., Butler W.L., Magde D. 1985 г., Photochem. Photobiol., Т. 42, стр. 59-68.
30. Влияние условий среды на распределение фитопланктона в водоеме. Абакумов А.И., Израильский Ю.Г. 1, 2012 г., Математическая биология и биоинформатика, Т. 7, стр. 274 – 283.

31. Модельный способ оценки содержания хлорофилла в море на основании спутниковой информации. Абакумова А. И., Израильский Ю. Г. 3, 2013 г., Компьютерные исследования и моделирование, Т. 5, стр. 473–482.
32. Chlorophyll «A» determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development. Pinto A.M.F., von Sperling E., Moreira R.M. 16, 2001 г., Water Research, Т. 35, стр. 3977–3981.
33. Особенности формирования спектров лазерной индуцированной флуоресценции морской воды в период цветения водорослей в различных районах Мирового океана. Букин О.А., Пермяков М.С., Салюк П.А., Майор А.Ю., Буров Д.В., Хованец В.А., Голик С.С., Подопригора Е.Л. 9, 2004 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 17, стр. 1-8.
34. О калибровке метода лазерной флуорометрии при измерении концентрации хлорофилла "А". Букин О.А., Пермяков М.С., Майор А.Ю., Сагалаев С.Г., Липилина Е.А., Хованец В.А. 3, 2001 г., Оптика атмосф. И океана, Т. 14, стр. 223-226.
35. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. Stirbet A., Govindjee. 1-2, 2011 г., Journal of Photochemistry and Photobiology, Т. 104, стр. 236–257.
36. A., Trebst. The topology of the plastoquinone and herbicide binding. Z.Naturforsch. 1986 г., Т. 40, стр. P.391-399.
37. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений. Карапетян Н.В., Бухов Н.Г. 5, 1986 г., Физиология растений, Т. 33, стр. 1013-1026.
38. Рубин А.Б., Погосян С.И., Маторин Д.Н., Казимирко Ю.В., Ризниченко Г.Ю. Способ флуориметрического определения параметров фотосинтеза фотоавтотрофных организмов, устройство для его осуществления и измерительная камера. 2354958 Россия, 10 мая 2009 г.
39. Погосян С. И., Маторин Д. Н., Волкова Э. В., Антал Т. К., Казимирко Ю.В., Востоков С.В., рубина.Б. Спользование комплекса

флуорометрических методов для оценки состояния фитопланктонного сообщества моря. [ред.] М.В.Флинта. А.Г. Зацепина. Комплексные исследования северо-восточной части Черного моря. М. : Наука, 2002, стр. 436-447.

40. Assessing the error in photosynthetic properties determined by fast repetition rate fluorometry. Laney S. R. 2003 г., Limnol. Oceanogr., Т. 48, стр. 2234–2242.
41. Artifacts in measurements of chlorophyll fluorescence transients, with specific application to fast repetition rate fluorometry. Laney S. R., and Letelier R. M. 2008 г., LIMNOL. OCEANOGR., стр. 40–50.
42. Artefacts in ocean data hide rising temperatures. Schiermeier Q. 2007 г., Nature, Т. 447, стр. 8-9.
43. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. Kolber Z.S., Prasil O., Falkowski P.G. 1998 г., Biochim. Biophys. Acta., Т. 1367, стр. 88–106.
44. Связь параметров спектров флуоресценции морской воды, возбуждаемых лазерным излучением, с типом морских вод. Букин О.А., Пермяков М.С., Майор А.Ю., Павлов А.Н., Скороход Г.В., Чекункова В.В., Царева О.С., Тархова Т.И. 11, 2000 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 13, стр. 1011-1014.
45. Методы лазерного мониторинга фотосинтезирующих организмов. Фадеев В. В., Бунин Д. К., Венедиктов П. С. 1996 г., Квант. Электрон, Т. 23, стр. 963-973.
46. Исследование процессов воспроизводства органического вещества клетками фитопланктона методом лазерной индуцированной флуоресценции. Букин О.А., Салюк П.А., Майор А. Ю., Павлов А. Н. 11, 2005 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 18, стр. 976-983.
47. Биофотоника водных фотосинтезирующих организмов: флуоресцентные методы диагностики. Гостев, Т., и др. 2, Москва : Рекламно-издательский центр "Техносфера", 2011 г., Океанология, Т. 26, стр. 174–179.

48. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. Martin J. H., Coale K. H., Johnson K. S., et al. 1994 г., Nature, Т. 371, стр. 123-129.
49. Spectrofluorometric phytoplankton and sea water characterization during the XIII Italian Antarctic mission. Barbini R., Colao F., Fantoni R., Palucci A., Ribezzo S., Lazzara L. 1999 г., Pros. Of SPIE, Т. 3821, стр. 237-247.
50. Насыщение флюоресценции растворов в сложных органических соединениях при импульсном лазерном возбуждении. Серов Н. Я., Фадеев В. В., Чекалюк А. М. 4, 1991 г., Квантовая электроника, Т. 18, стр. 425-429.
51. JAMES F. BRENNAN. Portable Laser Spectrofluorimeter System for in Vivo Human Tissue Fluorescence Studies. APPLIED SPECTROSCOPY. Affymax Research Institute, 1993 г., Т. 47, 12, стр. P. 2081-2086.
52. Vincent Benoit, Cecilia M. Yappert. Characterization of a Simple Raman Capillary/Fiber Optical Sensor. Analytical Chemistry. 1996 г., Т. 68, 13, стр. P. 2255-2258.
53. Вертикальное распределение флуоресценции хлорофилла в чёрном море в тёплый период. Кривенко О. В. 9, 2010 г., Морський екологічний журнал, Т. 2, стр. 5-21.
54. Об использовании зависимостей параметров флуоресценции хлорофилла от освещенности для изучения фотосинтетической активности фитопланктона. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Горячев С.Н., Рубин А.Б. 2011 г., Вода: химия и экология, Т. 4, стр. 44-49.
55. Chlorophyll fluorimetry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.R., Ficek D., Majchrowski R. 2004 г., Oceanologia, Т. 46, стр. 519–531.
56. Раймонт Дж. Планктон и продуктивность океана. М. : Легкая и пищевая промышленность, 1983. Стр. 568. Т. 1. Фитопланктон.
57. Temperature and laser ultraviolet-radiation influence on luminescence spectra of dissolved organic-matter. Patsayeva S.V., Fadeev V.V., Filippova E.M.,

Chubarov V.V., Yuzhakov V.I. M : б.н., 1991 г., Vestnik moskovskogo universiteta seriya 3 fizika astronomiya, стр. 71-75.

58. Temperature dependence of delayed light emission in the 6 to 340 microsecond range after a single flash in chloroplasts. Jursinic P., Govindjee. 1911 г., Photochemistry and Photobiology, Т. 26, стр. 617-628.

59. Measurements and modeling of acetone laser-induced fluorescence with implications for temperature-imaging diagnostics. Thurber M.C., Grisch F., Kirby B. J., Votsmeier M., Hanson R. K. 21, 1998 г., Applied optics, Т. 37, стр. 4963-4978.

60. Effects of temperature and light induction of chl-a fluorescence in situ: an ecophysiological view. Nikolic B., Dodig D., Jovanović V., Janjić V., Sanja Durović. 4, Belgrade : б.н., 2008 г., Arch. Biol. Sci., Т. 60, стр. 567-572.

61. Система мониторинга воды с погружаемым модулем. Гамаюнов Е.Л., Вознесенский С.С., Коротенко А.А., Попик А.Ю. 2012 г., Приборы и техника эксперимента, Т. 2, стр. 135–143.

62. Кульчин Ю.Н., Вознесенский С.С., Гамаюнов Е.Л. Гурин А.С., Коротенко А.А., Майор А.Ю. Оптоволоконный погружной измеритель флуоресценции. Приборы и техника эксперимента. Наука, 2007 г., Т. 6, 50, стр. 117-122.

63. Chlorophyll Fluorescence in Marine Centric Diatoms: Responses of Chloroplasts to Light and Nutrient Stress. Kiefer D. A. 1973 г., Marine Biology, Т. 23, стр. 39-46.

64. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. Schreiber U. Dordrecht : Springer, 2004 г., Advances in Photosynthesis and Respiration, стр. 279-319. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, has been edited by George C. Papageorgiou and Govindjee.

65. Cation effects on the fluorescence of isolated chloroplasts. Homann P. H. 1969 г., Pl. Physiol., Т. 44, стр. 932-936.

66. Control of excitation transfer in photosynthesis. III. Light-induced decrease of chlorophyll a fluorescence related to the photophosphorylation system in

spinach chloroplasts. Murata N. And Sugahara K. 1969 г., Biochim. Biophys., T. 189, стр. 82-192.

67. Biogenesis of chloroplast membranes XII. The influence of chloramphenicol on chlorophyll fluorescence yield and chlorophyll organization in greening cells of a mutant of Chtamydomonas reinhardi y-1. Jennings R. C. And I. Ohad. 1973 г., P1. Sci. Lett., T. 1, стр. 3-9.
68. Fluorescence Properties of Natural Phytoplankton Populations. Kiefer D. A. 1973 г., Marine Biology, T. 22, стр. 263-269.
69. Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. Herlory O., Richard P., Blanchard G. F. 2007 г., Marine Biology, T. 153, стр. 91–101.
70. Работа солнечного коллектора в режиме естественной циркуляции теплоносителя. Матвеев А. В., Пахалуев В. М., Щеклеин С. Е. 48, 2007 г., Альтернативная энергетика и экология, T. 4, стр. 128-131.
71. Fluorescence of microalgae in relation to downward radiation and temperature in Norway sea. Antal T. K., Matorin D. N., Levenko B. A., Kazimirko Yu. V., Gorunova V. B., Sapozhnikov V. V. 3, 2000 г., Moscow Univ. Biol. Bull., T. 16, стр. 25-28.
72. Brennan R. M., Jefferies R.A. The use of chlorophyll fluorescence in assessment of low temperature hardiness in blackcurrant (Ribesnigrum L.). Ann. App. Bio. 1990 г., 117, стр. P. 667-672.
73. О связи флюоресценции хлорофилла фитопланктона с условиями его освещенности. Сидько Ф.Я., Апонасенко А.Д., Балакчина Л.А. 1, 1988 г., Океанология, T. 29, стр. 127-131.
74. Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of Laminaria (phaeophyta). Dring M. J., Makarov V., Schoschina E., Lorenz M., Liining K. 1996 г., Marine Biology, T. 126, стр. 183-191.
75. Снайдер А., Лав Дж. Теория оптических волноводов. [ред.] Е.М. Дианова и В.В. Шевченко. М. : Радио и связь, 1987. Стр. 656 .

76. Нелинейная флуориметрия сложных органических соединений. Фадеев В.В. 12, 2000 г., Соросовский образовательный журнал, Т. 6, стр. 104-110.
77. Лазерная флуоресцентная диагностика фитопланктона в режиме насыщения. Иванов И. Г., Фадеев В. В. 1, 1988 г., Квантовая электроника, Т. 15, стр. 191-197.
78. Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Filippova E.M., Chubarov V.V. 1999 г., Optics Communications, Т. 166, стр. 25-33.
79. Определение макросостава морской воды методом лазерной искровой спектроскопии. Букин О.А., Ю.А. Зинин, Э.А. Свириденков и др. 11, 1992 г., Оптика атмосферы и океана, Т. 5, стр. 1213-1216.
80. Майор А.Ю. Лазерные измерительные системы для мониторинга фитопланктонных сообществ и процессов, влияющих на их состояние. Владивосток : б.н., 2006. Стр. 275.
81. Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды. Шубина Д.М., Пацаева С.В. , Южаков В.И. , Горшкова О.М. , Федосеева Е.В. 2009 г., Вода: химия и экология, Т. 11, стр. 31-37.
82. Вознесенский С. С., Гамаюнов Е.Л., Попик А.Ю., Коротенко А.А. Оптоволоконный флуориметр для измерения параметров фотосинтеза фитопланктона. Приборы и техника эксперимента. Наука, 2014 г., 3, стр. 97-103.