

## Исследование спектров флуоресценции растений при возбуждении излучением первой и второй гармоник титан-сапфирового лазера

Ю.В. Федотов, М.Л. Белов, А.Л. Титов, А.В. Степанов\*

Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана  
105005, г. Москва, ул. 2-я Бауманская, 5

Поступила в редакцию 16.07.2013 г.

Представлены результаты экспериментальных исследований спектров флуоресценции растений, полученных при возбуждении излучением первой и второй гармоник перестраиваемого титан-сапфирового лазера. Исследуется зависимость эффективности возбуждения флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения.

*Ключевые слова:* лазер титан-сапфировый, растительность, хлорофилл, спектры флуоресценции; Ti:Sapphire laser, vegetation, chlorophyll, fluorescence spectra.

Исследование флуоресценции растений является одним из наиболее перспективных методов определения наличия или отсутствия растительного покрова, а также оценки его состояния [1–4]. В связи с этим метод лазерно-индуцированной флуоресценции может быть эффективно использован при решении задач в области экофизиологии растений [5], сельского и лесного хозяйства [6, 7], экологического мониторинга [3, 8].

В настоящее время актуальной является задача исследования зависимости спектров флуоресценции растительности от длины волны возбуждения. На сегодняшний день накоплены экспериментальные данные по спектрам флуоресценции растительности, полученные при разных длинах волн возбуждающего излучения. Однако эти данные относятся, как правило, к разным растениям, получены для разных источников возбуждения флуоресценции и зависимость спектров флуоресценции растительности от длины волны возбуждения остается мало изученной.

Другой актуальной задачей является измерение спектров флуоресценции в абсолютных единицах. Как правило, измеренные спектры флуоресценции получены на разных экспериментальных установках при разных условиях. Они приводятся в относительных единицах и не позволяют проводить сравнение их интенсивности.

Абсолютные значения величины интенсивности флуоресценции необходимы для определения энер-

гетического потенциала флуоресцентных лидаров и оптимальной длины волны возбуждающего излучения. Для определения оптимальной длины волны возбуждения необходимо иметь возможность сравнивать интенсивности спектров флуоресценции, полученных при использовании разных длин волн возбуждающего излучения.

Измерение абсолютных значений спектральных распределений интенсивности флуоресценции является достаточно сложной метрологической задачей, требующей разработки и применения соответствующей методики калибровки экспериментального оборудования. При этом такая методика должна включать в себя калибровки: по длине волны, спектральной чувствительности, интенсивности [9–13].

Наиболее сложной процедурой является калибровка по интенсивности, цель которой – определение чувствительности спектрофлуориметра в абсолютных единицах. Данный этап калибровки предполагает, как правило, использование специально разработанных стандартов [10, 12]. Для получения хорошей воспроизводимости результатов используемый стандарт должен иметь тот же динамический диапазон измеряемого сигнала и тот же спектральный диапазон. При этом необходимо использовать ту же геометрию проведения эксперимента, как и при регистрации экспериментально измеряемых спектров флуоресценции, а это далеко не всегда реализуемо.

Задача исследования влияния длины волны возбуждения на спектральные характеристики излучения флуоресценции может быть упрощена, если вместо измерения спектров флуоресценции в абсолютных единицах использовать их измерение по отношению к интенсивности спектра флуоресценции, полученного при использовании хорошо изученной длины волны

\* Юрий Викторович Федотов (fed@bmstu.ru); Михаил Леонидович Белов (belov@bmstu.ru); Александр Леонидович Титов (tital1952@mail.ru); Алексей Валериевич Степанов (stepanov\_3@mail.ru).

возбуждения. В этом случае отпадает необходимость калибровки оборудования по интенсивности для других длин волн возбуждающего излучения. Одними из наиболее изученных являются спектры флуоресценции растительности, полученные при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 532 нм.

Исследование спектров лазерно-индуцированной флуоресценции в зависимости от длины волны возбуждающего излучения проводилось на экспериментальной установке (рис. 1).

В качестве источника возбуждения использовался титан-сапфировый лазер, выпускаемый фирмой «СОЛАР Лазерные Системы» (Беларусь). Лазер состоит из двух модулей: модуля накачки LQ829, на основе Nd:YAG-лазера с генератором второй гармоники, и собственно титан-сапфирового лазера LX329 с модулями генерации гармоник. Лазер позволяет получить перестраиваемое излучение в диапазонах 690–980 и 350–490 нм, а также излучение на длине волны 532 нм. Регистрация излучения флуоресценции осуществлялась с использованием полихроматора M266, выпускаемого фирмой «СОЛАР Лазерные Системы», и высокочувствительного многоканального приемника на основе усилителя яркости «Матрица 430-нс», производимого российской фирмой «ДельтаТех».

Перед проведением измерений осуществлялась калибровка экспериментальной установки по длине волны и спектральной зависимости чувствительности с использованием соответственно линейчатого и непрерывного калибровочных источников света.

В качестве образцов растительности использовались листья березы бородавчатой (*Betula pendula*) и дуба черешчатого (*Quercus robur*), срезанные непосредственно перед измерениями, проводимыми в период с 17 по 28 сентября 2012 г. В экспериментах

использовались зеленые листья без видимых следов осенней окраски.

Частота повторения импульсов лазера составляла 10 Гц, длительность импульса ~ 10 нс. Энергия импульса лазера в плоскости образца контролировалась измерителем мощности Coherent FieldMaxII-TOP с измерительной головкой J-25MB-LE. Плотность энергии на поверхности образца не превышала 4 мДж/см<sup>2</sup>. Ширина аппаратной функции системы регистрации составляла ~ 6 нм.

В канале регистрации использовались интерференционные заграждающие фильтры, подавляющие излучение на длине волны возбуждения. При возбуждении флуоресценции излучением с длиной волны 532 нм использовался узкополосный заграждающий фильтр (notch filter) с центральной длиной волны 532 нм, полосой 17 нм и оптической плотностью более 6. При возбуждении флуоресценции излучением второй гармоники титан-сапфирового лазера применялся длинноволновый пропускающий фильтр с длиной волны среза 440 нм и оптической плотностью вне полосы пропускания более 6. Из-за близости длины волны регистрации флуоресценции к диапазону первой гармоники титан-сапфирового лазера использовался полосовой пропускающий фильтр с центральной длиной волны 740 нм, полосой 13 нм и оптической плотностью более 7 вне полосы пропускания. В этом случае регистрировался не спектр флуоресценции, а интегральное значение интенсивности.

Спектры флуоресценции усреднялись по 100 измерениям. Полученные спектры флуоресценции нормировались на среднюю энергию импульса возбуждающего излучения. Затем осуществлялась нормировка на интенсивность излучения флуоресценции в полосе (740 ± 3) нм, полученную при возбуждении излучением с длиной волны 532 нм.

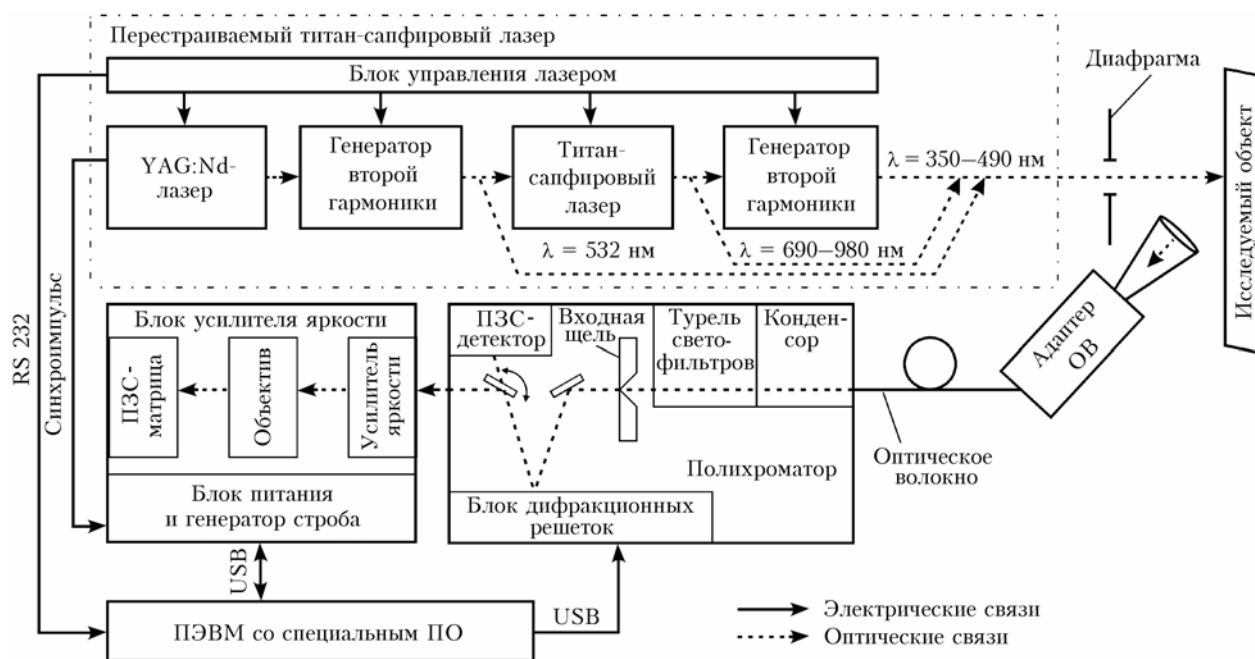


Рис. 1. Структурная схема экспериментальной установки

На рис. 2 приведены спектры флуоресценции листа березы, полученные при возбуждении излучением второй гармоники титан-сапфирового лазера. Для сравнения показан спектр, полученный при возбуждении излучением с длиной волны 532 нм. Пики интенсивности в спектрах флуоресценции, приведенных на рис. 2, б, объясняются прохождением непрерывного излучения первой гармоники титан-сапфирового лазера.

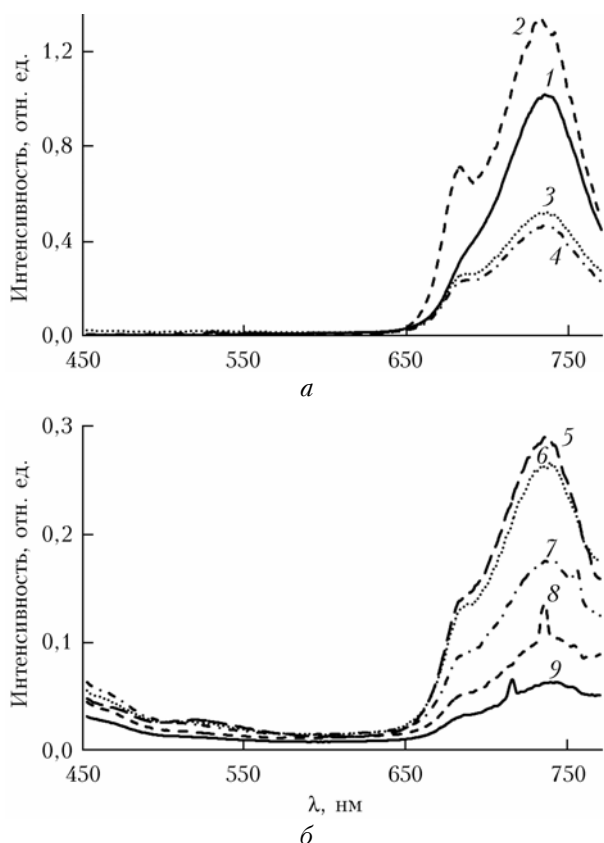


Рис. 2. Спектры флуоресценции листа березы в зависимости от разных длин волн возбуждения (1 – длина волны возбуждения 532 нм; 2 – 438; 3 – 428; 4 – 418; 5 – 408; 6 – 398; 7 – 378; 8 – 368; 9 – 358 нм)

На рис. 3 приведена зависимость интенсивности флуоресценции листьев дуба и березы в полосе  $(740 \pm 3)$  нм от длины волны возбуждающего излучения. На рис. 3, а представлена интенсивность флуоресценции при возбуждении излучением второй гармоники титан-сапфирового лазера, а на рис. 3, б – излучением первой гармоники.

Анализ полученных экспериментальных результатов показывает, что эффективность возбуждения флуоресценции существенно зависит от длины волны возбуждения. Наибольшая интенсивность флуоресценции (в полосе  $(740 \pm 3)$  нм) наблюдается при использовании для возбуждения излучения с длиной волны 690–720 нм (первая гармоника титан-сапфирового лазера), а также излучения с длиной волны 430–440 нм (вторая гармоника титан-сапфирового лазера). При переходе длины волны возбуждения

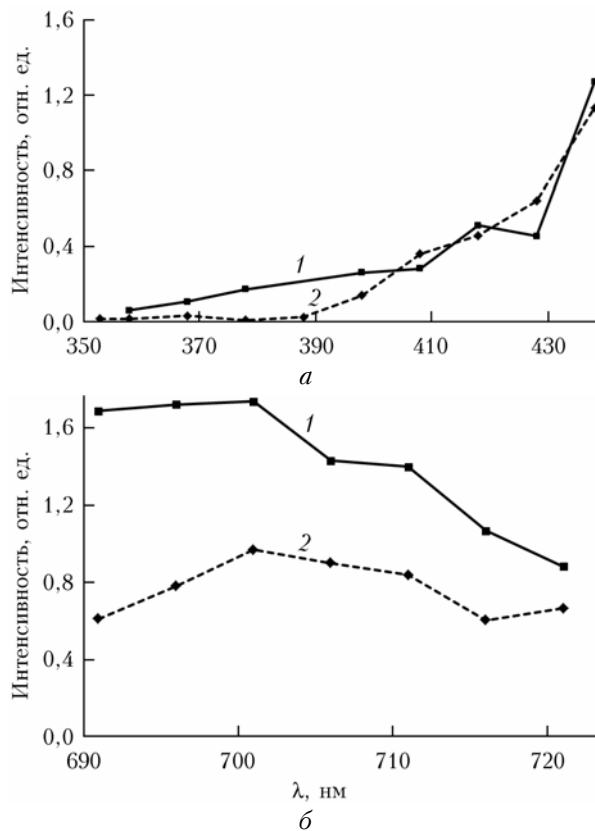


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции в полосе  $(740 \pm 3)$  нм от длины волны возбуждения: 1 – лист березы; 2 – дуба

в ультрафиолетовую область эффективность возбуждения флуоресценции растительности существенно снижается.

1. Гришин А.И., Матвиенко Г.Г., Харченко О.В., Тимофеев В.И. Исследование флуоресценции растений при возбуждении излучением второй гармоники YAG:Nd-лазера // Оптика атмосф. и океана. 1997. Т. 10, № 7. С. 806–812.
2. Гришин А.И., Матвиенко Г.Г., Харченко О.В., Тимофеев В.И., Клишкин В.М., Соколов В.Г., Астафурова Т.П., Зотикова А.П. Дистанционная оценка состояния фотосинтетического аппарата в растениях методом индуцированной лазером флуоресценции // Оптика атмосф. и океана. 1999. Т. 12, № 4. С. 334–337.
3. Daughtry C.S.T., McMurtrey III J.M., Chappelle E.W., Hunter W.J., Steiner J.L. Measuring crop residue cover using remote sensing techniques // Theor. and Appl. Climatol. 1996. V. 54, N 1–2. P. 17–26.
4. Cerovic Z., Samson G., Iribas F.M. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects // Agronomie. 1999. V. 19, N 7. P. 543–578.
5. Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology // Radiat. and Environ. Biophys. 1986. V. 25, N 4. P. 297–308.
6. Edner H., Johansson J., Svanberg S., Wallinder E. Fluorescence lidar multicolor imaging of vegetation // Appl. Opt. 1994. V. 33, N 13. P. 2471–2479.
7. Ruth B. The initial phase of the chlorophyll fluorescence induction kinetics as an indicator for the degree of forest decline // Proc. SPIE. 1992. V. 1714. P. 61–72.

8. *Schneckenburger H., Frenz M.* Time-resolved fluorescence of conifers exposed to environmental pollutants // *Radiat. and Environ. Biophys.* 1986. V. 25, N 4. P. 289–295.
9. *Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H.* Toward instrument-independent quantitative measurement of fluorescence intensity in fiber-optic spectrometer systems // *Appl. Opt.* 2007. V. 46, N 29. P. 7132–7140.
10. *Young I.T., Garini Y., Vermolen B., Liqui Lung G., Brouwer G., Hendrichs S., El Morabit M., Spoelstra J., Wilhelm E., Zaal M.* Absolute Fluorescence Calibration // *Proc. SPIE* / Eds. D.L. Farkas, D.V. Nicolau, R.C. Leif. 2006. V. 6088. P. 60880U-1–60880U-9.
11. *Eastman J.* Standardization of fluorescence spectra and the calibration of spectrofluorimeters // *Appl. Opt.* 1966. V. 5, N 7. P. 1125–1132.
12. *Melhuish W.* A standard fluorescence spectrum for calibrating spectro-fluorophotometers // *J. Phys. Chem.* 1960. V. 3, N 1. P. 7–9.
13. *Melhuish W.* Calibration of spectrofluorimeters for measuring corrected emission spectra // *J. Opt. Soc. Amer.* 1962. V. 52, N 11. P. 1256–1258.

*Yu.V. Fedotov, M.L. Belov, A.L. Titov, A.V. Stepanov.* **Investigation of the chlorophyll fluorescence spectra using Ti:Sapphire laser as an excitation source.**

Measurement results of the chlorophyll fluorescence spectra excited by tunable radiation of first and second harmonic of Ti:Sapphire laser are presented. The efficiency of fluorescence excitation is investigated depending on laser radiation wavelength.