

ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ ПРОТОЧНО-ОПТИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА БИОАЭРОЗОЛЕЙ

© 2011 г. Е. А. Кочелаев; А. О. Волчек, канд. физ.-мат. наук

ОАО “НПО “ПРИБОР”, Санкт-Петербург

E-mail: Volchek@npo-pribor.ru

Разработана оптическая система для устройства регистрации биологических аэрозолей на основе малоомощного импульсно-периодического УФ лазера. Экспериментально проверена возможность дифференциации аэрозолей пыли, белка и спор бактерий с помощью данного устройства. Исследовано влияние конструктивных параметров разработанной оптической системы на решение задачи классификации аэрозолей различных веществ. Представлены данные по анизотропии излучения флуоресценции частицами аэрозоля.

Ключевые слова: биоаэрозоль, флуоресценция, рассеяние, оптическая система регистрации, проточный метод.

Коды OCIS: 230.0230.

Поступила в редакцию 09.12.2010.

Введение

В настоящее время растет интерес к задаче выявления респираторной фракции (частицы размером 1–10 мкм) патогенных биологических аэрозолей, способных вызывать аллергические реакции и болезни. Такие биоаэрозоли могут иметь как естественное, так и искусственное происхождение, включая террористические атаки с применением биологического оружия. Благодаря возможности измерять характеристики до 10^4 отдельных аэрозольных частиц в секунду в основу большинства современных систем биологического мониторинга в реальном времени положен проточно-оптический метод (ПОМ) как способ предварительного контроля аэрозольного фона в окружающем воздухе [1–7].

В самом общем случае ПОМ подразумевает:

1) воздействие на частицу в области анализа возбуждающим излучением и регистрацию ее отклика – флуоресценции и упругого рассеяния света;

2) частицы облучаются преимущественно по одной, что позволяет разделять сигналы от аэрозолей разных веществ в анализируемой пробе.

В задаче мониторинга биоаэрозолей выбор диапазонов возбуждения флуоресценции

определяется содержанием типичных для биологических веществ флуорофоров и, как правило, соответствует ультрафиолетовому (УФ) излучению. Характерные времена Δt измерения сигналов рассеяния и флуоресценции от движущихся в потоке микрочастиц не превышают десятков микросекунд. Из-за невысокого квантового выхода флуоресценции и малого Δt регистрация полезного светового сигнала предполагает использование в качестве приемника оптического излучения (ПОИ) фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Минимальная плотность энергии E возбуждающего излучения, которая обеспечивает приемлемый уровень отношения сигнал/шум для анализа данных, получаемых в процессе измерения ПОМ, определяется как

$$E = A/G, \quad (1)$$

где $A \approx 200$ мкДж стер/см² [8], G – эффективность регистрирующей оптики, выраженная в стерadianах. Величина G определяется телесным углом Ω сбора излучения и безразмерным коэффициентом τ , характеризующим потери излучения в оптическом тракте, т. е.

$$G = \Omega(1 - \tau). \quad (2)$$

Среди непрерывных источников излучения указанному требованию соответствуют непре-

рывные УФ лазеры и ртутные лампы. Однако в настоящее время применение данных лазеров затруднено из-за их высокой стоимости, больших массогабаритных характеристик и конструктивно возможно только в лабораторных условиях [1, 2]. Использование ртутных ламп связано со значительным энергопотреблением и затрудняет применение объектива регистрации с высокой эффективностью светосбора ($\Omega \geq 2\pi$) [6] для обеспечения максимальной чувствительности при заданной мощности возбуждающего излучения.

Альтернативой непрерывному режиму работы может быть применение импульсных источников излучения, которые являются менее энергоемкими и имеют меньшие массогабаритные характеристики. Импульсные источники в приборах ПОМ могут работать в двух режимах:

– импульсный источник может запускаться по сигналу от внешнего источника излучения, засвечивающего частицы выше по потоку [7–10];

– для импульсно-периодических источников излучения возможен квазинепрерывный режим [7, 11], при котором скорость движения v частицы аэрозоля в области анализа (область, образуемая пересечением луча лазера и струи аэрозоля), частота повторения импульса ν и размер L области анализа (ОА) вдоль струи аэрозоля согласованы и удовлетворяют соотношению

$$v = \nu/L. \quad (3)$$

Выполнение условия (3) обеспечивает облучение каждой частицы, поступающей в анализируемый объем.

Упомянутые выше конструктивные ограничения на источники излучения и условие (1) предъявляют следующие требования к оптической системе регистрации устройств на основе ПОМ:

1) большая ($\Omega \geq 2\pi$) числовая апертура элементов оптической системы регистрации, обеспечивающая максимально возможный сбор излучения флуоресценции частицы [3];

2) минимизация и/или коррекция приборных факторов, вносящих вклад в искажение полезного сигнала, например зависимость измеряемого сигнала от положения частицы в области анализа [7, 10, 12];

3) подавление оптических шумов, возникающих при попадании возбуждающего излучения в канал регистрации (например, при рас-

сеянии неидеального пучка возбуждающего излучения на элементах оптической системы) [6].

В настоящей работе представлена оптическая система регистрации, удовлетворяющая поставленным требованиям, и приведены результаты исследования влияния перечисленных выше факторов на экспериментальные данные, полученные при регистрации ПОМ аэрозолей различных веществ.

Описание системы

На рис. 1 приведена схема разработанной оптической системы регистрации для измерения сигналов флуоресценции и рассеяния от частиц аэрозоля в потоке, облучаемых лучом УФ лазера. Система содержит следующие основные элементы: глубокое ($\Omega = 3\pi$) эллиптическое зеркало 4, линзы 13–17, спектроразделительные зеркала 18–20, оптические светофильтры 21–23, полевые диафрагмы 24–25, оптическую ловушку 29, бленды ввода/вывода излучения лазера 26, 27. В каналах регистрации флуоресценции и рассеяния в качестве ПОИ 6–8 установлены ФЭУ-175. Для регистрации флуоресценции используются ПОИ 6, 7 (рис. 1), для регистрации рассеяния – ПОИ 8.

Основным элементом системы является глубокое эллиптическое зеркало. Телесный угол сбора зеркала 3π стер, что соответствует эффективности сбора излучения флуоресценции около 70% и существенно выше эффективности схем с использованием линзовых и зеркально-линзовых объективов в известных устройствах ПОМ [1, 4–6]. С учетом коэффициентов отражения и пропускания элементов оптической системы $\tau \approx 0,4$ из соотношения (1) получаем $E \approx 40$ мкДж/см² ($G \approx 1,7\pi$ стер). Зеркало имеет два технологических отверстия под луч лазера и два отверстия под сопла, формирующие поток частиц диаметром 0,2–0,3 мм. Луч лазера пересекает поток частиц аэрозоля (поток на рис. 1 не показан, ортогонален плоскости рисунка) в окрестности первого фокуса зеркала. Затем упруго рассеянное излучение и флуоресценция частицы, проходящей через область анализа, отражается эллиптической поверхностью зеркала и собирается около промежуточного изображения первого фокуса, построеного рассеивающей линзой в плоскости полевой диафрагмы 25. Диафрагма 25 выделяет изображение области анализа. Система линз переизображает распределение энергии в плоскости AA' (рис. 1) торца эллиптического зеркала на

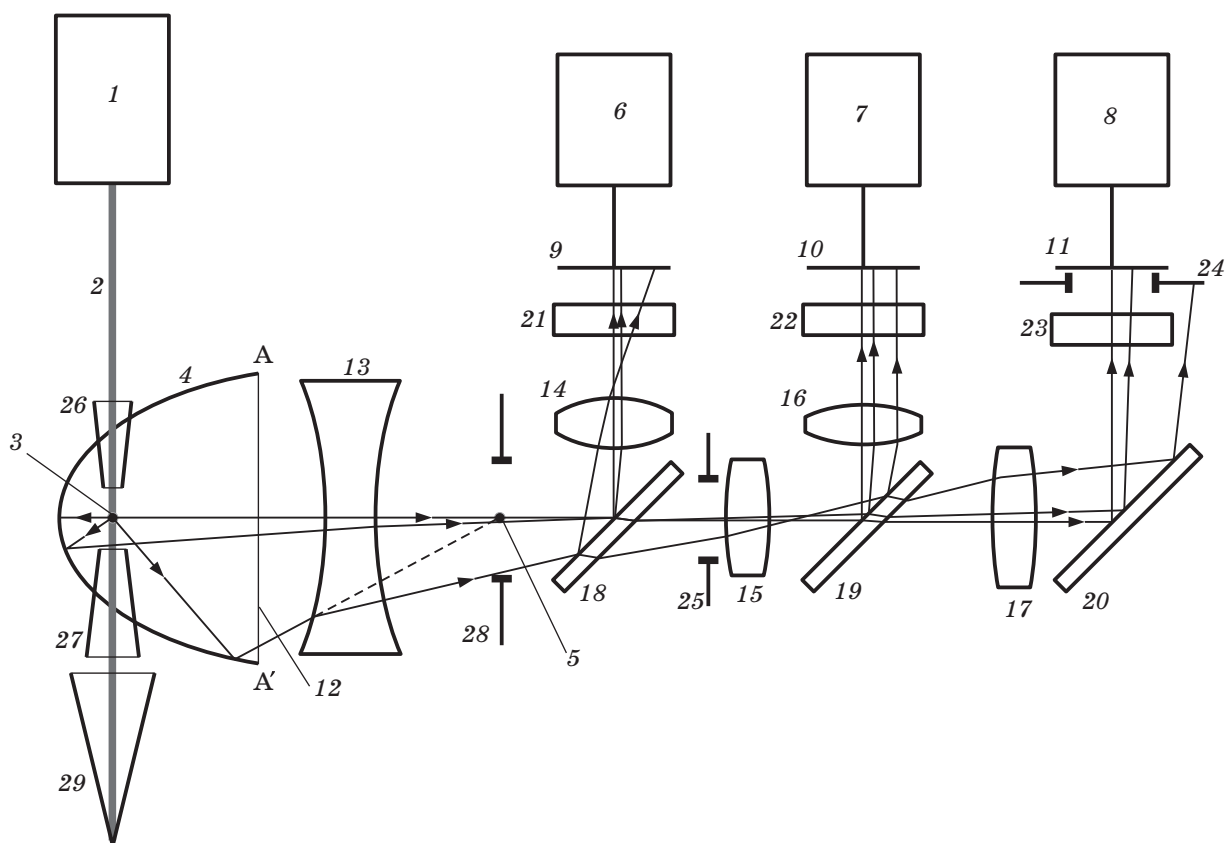


Рис. 1. Оптическая система регистрации. 1 – УФ лазер, 2 – луч УФ лазера, 3 – первый фокус эллиптического зеркала, 4 – эллиптическое зеркало, 5 – второй фокус эллиптического зеркала, 6–8 – ПОИ, 9–11 – приемные площадки ПОИ, 12 – торцевая поверхность эллиптического зеркала, 13 – рассеивающая линза, 14–17 – линзы, 18–20 – спектроделительные зеркала, 21–23 – широкополосные светофильтры, 24, 25 – полевые диафрагмы, 26 – бленда ввода излучения лазера, 27 – бленда вывода излучения лазера, 28 – диафрагма, 29 – оптическая ловушка.

приемные площадки ПОИ. Спектроделители и фильтры обеспечивают разделение излучения по заданным спектральным диапазонам регистрации излучения. Оптическая ловушка 29 предназначена для подавления лазерного излучения, выходящего через отверстие в зеркале.

В основу работы предлагаемой оптической системы положено формирование изображения плоскости AA' торца эллиптического зеркала на приемных площадках ПОИ, т. е. выбор плоскости AA' в качестве предметной плоскости для системы линз, передающей изображение на ПОИ. Программное моделирование геометрического хода лучей показывает, что в плоскости AA' местное изменение плотности энергии при смещении частицы внутри OA (рис. 2) не превышает нескольких процентов для излучения, отраженного от вершины зеркала, и убывает до нуля для излучения, отраженного от краевых областей эллиптического зеркала. Таким обра-

зом, смещение частицы в пределах OA не приводит к заметному изменению распределения энергии в плоскости изображения AA' и не вызывает изменений регистрируемого сигнала из-за неоднородной чувствительности фотокатода ФЭУ.

Изображение плоскости AA' является проекцией внутренней поверхности эллиптического зеркала, подсвеченной точечным источником в первом фокусе. Поэтому при передаче изображения плоскости AA' на ПОИ канала рассеяния в плоскости приемной площадки 11 локализуются положения источников оптических шумов, связанных с рассеянием фонового возбуждающего излучения на зеркале и соплах. Диафрагмирование в данной плоскости отдельных областей, являющихся источниками оптических шумов, позволяет повысить отношение сигнал/шум. В общем случае профиль диафрагмы 24 может быть выбран в соответствии

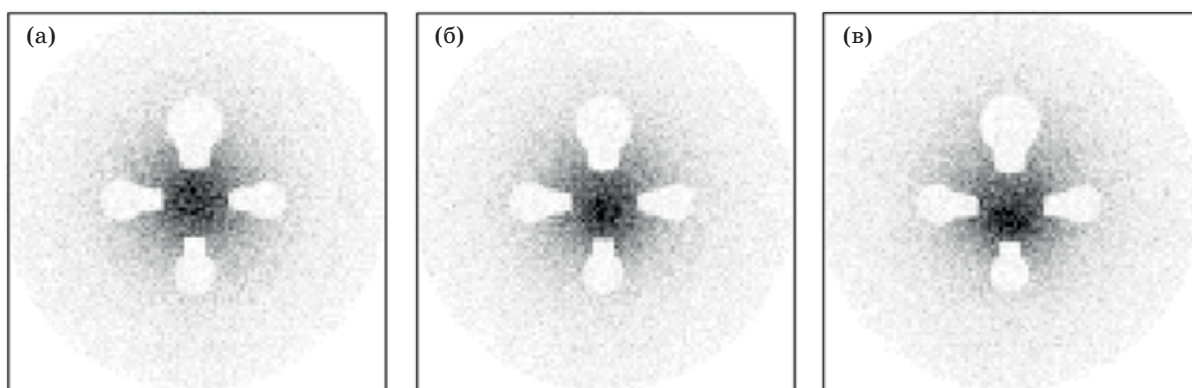


Рис. 2. Распределение энергии на торце эллиптического зеркала в зависимости от смещения частицы из фокуса зеркала на 0 (а), 0,1 (б) и 0,2 мм (в).

с пространственным распределением оптических шумов.

Аналогичное диафрагмирование ПОИ 6 и 7 каналов флуоресценции в рассматриваемой оптической системе не использовалось, так как уровень шума из-за флуоресценции элементов оптической системы регистрации не превышал уровня шумов электронной системы регистрации, которая состоит из предусилителей сигналов с ФЭУ, аналого-цифровых преобразователей и блока цифровой обработки.

Распределение энергии в плоскости AA' однозначно задается картиной двухуглового распределения световой энергии излучения частицы в диапазоне углов отражения зеркала, что позволяет получить данные о двухугловом рассеянии возбуждающего излучения частицей [13], а также данные об индикатрисе флуоресценции. При использовании нескольких каналов регистрации излучения в одном спектральном диапазоне выделение сигналов по определенным пространственным направлениям происходит за счет установки диафрагм непосредственно перед приемными площадками ПОИ. Данные диафрагмы выделяют в плоскости изображения AA' требуемые пространственные направления регистрации по одному на каждый приемник (например, прямое, обратное, боковое относительно возбуждающего излучения).

Методика эксперимента и обсуждение результатов

Для исследования оптической системы на соответствие требованиям, сформулированным во введении, были проведены экспери-

менты по регистрации сигналов флуоресценции и упругого рассеяния аэрозольных частиц. В качестве источника излучения использовался опытный образец твердотельного импульсно-периодического УФ лазера ($\lambda = 266$ нм) с пассивной модуляцией добротности, обеспечивающего облучение частиц аэрозоля внутри ОА с плотностью энергии $E \approx 100\text{--}200$ мкДж/см². Частота импульсов источника составляла 22 кГц при средней мощности около 3 мВт. При измерении регистрировались сигналы упругого рассеяния S и флуоресценции L_1, L_2 в диапазонах 300–400 и 400–500 нм соответственно. В эксперименте использовались частицы аэрозолей белка Ovalbumin, спор бактерий *Bacillus subtilis*, а также почвенной пыли.

При использовании ПОМ измеряются характеристики отдельных аэрозольных частиц. Вся совокупность измерений, регистрируемых ПОМ за время накопления данных, представляет собой набор результатов экспериментов, в которых от частицы к частице морфологические характеристики (размер, форма, содержание хромофоров и флуорофоров) варьируются случайным образом. Кроме того, измерение слабых световых сигналов носит принципиально статистический характер [14]. Таким образом, результаты измерений ПОМ упруго рассеянного и флуоресцентного излучения отдельных частиц исследуемого аэрозоля должны рассматриваться как случайные величины, а их анализ следует проводить, опираясь на статистические методы.

Классической задачей, которая ставится перед устройствами регистрации аэрозольного фона, является отнесение регистрируемого вещества аэрозоля к тому или иному классу

[10]. Уровень классификации определяется задачами, решаемыми при мониторинге воздуха. В случае наиболее грубой классификации, выполняемой так называемыми триггерами или сигнализаторами, это разделение на биологический – небιологический аэрозоль; для более сложных систем на основе ПОМ это – определение классов биологического аэрозоля, например аэрозолей бактерий или белков [7].

В соответствии с общими методами, применяемыми в задачах классификации и распознавания, данные предпочтительно представлять в пространстве информативных признаков, которые “описывают самую существенную информацию, содержащуюся в наборе данных, и при этом инвариантны к трансформациям входного сигнала” [15]. В настоящей работе для анализа данных использовалось их представление в двумерной системе координат в логарифмическом масштабе (логарифм по основанию 2), где по оси абсцисс был отложен логарифм отношения L_1/S , по оси ординат – логарифм отношения L_2/S . Нормировка флуоресценции на рассеяние использовалась для исключения дополнительного вклада в разброс регистрируемых данных, связанный с нестабильностью источника излучения и неравномерностью распределения интенсивности излучения в области анализа, а также для уменьшения зависимости данных от размера частиц [7]. Логарифмирование обеспечивало нормализацию функций распределений заре-

гистрированных сигналов [16], которые до преобразования имеют сильно асимметричные распределения с хвостами, протяженными в область больших значений. Представление данных в пространстве выбранных информативных признаков (рис. 3 и 4) демонстрирует формирование компактных областей, каждая из которых соответствует определенному веществу. Данный результат предполагает, что для частиц аэрозоля одного и того же вещества реализуются некоторые преимущественные значения микроскопических характеристик, определяющих морфологию частицы, и согласуется с работами [10, 17], рассматривающими возможность классификации биоаэрозолей с помощью ПОМ, по меньшей мере, по нескольким группам.

Ключевым требованием в задаче классификации является минимально возможное перекрытие областей данных, соответствующих различным веществам. При фиксированном положении максимумов в распределении данных в пространстве перекрытие областей определяется их характерными размерами. Поскольку области имеют различную форму, в качестве количественных характеристик размеров областей были выбраны дисперсии вдоль главных компонент эллипсов рассеяния данных в пространстве информационных признаков.

Для оценки влияния конструктивных параметров оптической системы на перекрытие областей данных были проведены измерения

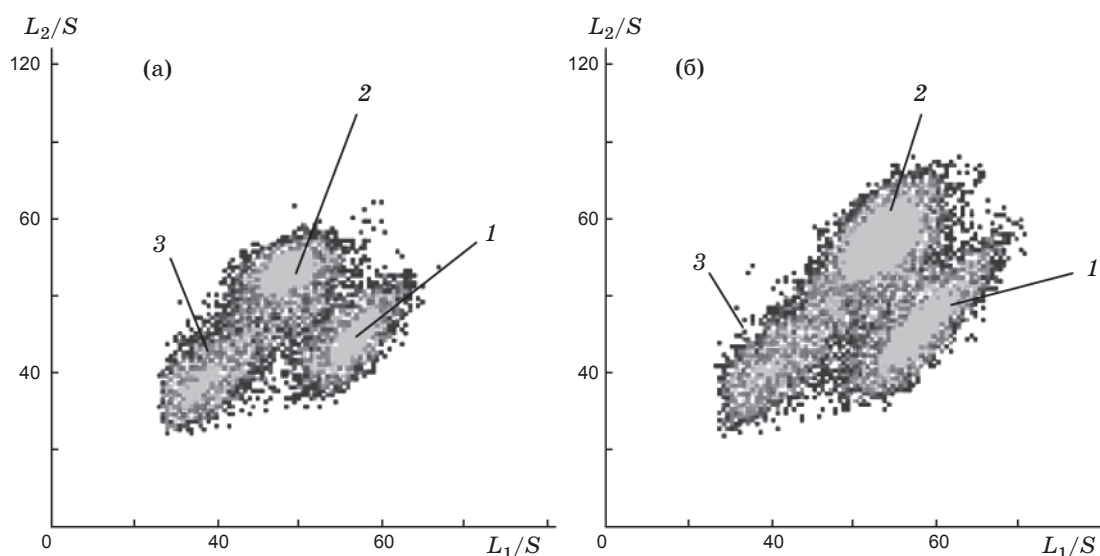


Рис. 3. Построение областей распределения сигналов при одновременном измерении белка Ovalbumin (1), споры бактерий *Bacillus subtilis* (2) и почвенной пыли (3). а – с диафрагмой, подавляющей оптический шум, б – с диафрагмой, выделяющей границы ОА.

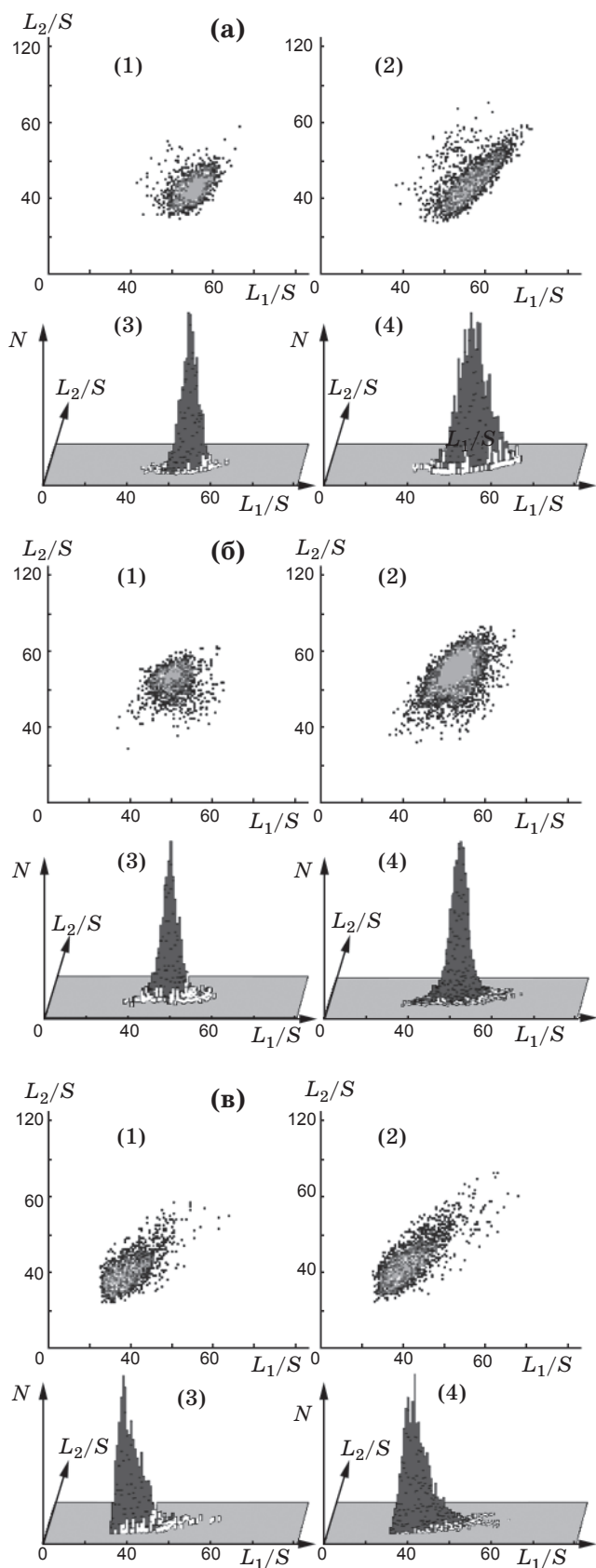


Рис. 4. Пространственные распределения (1 и 2) и их гистограммы (3 и 4) при измерениях белка Ovalbumin (а), споры бактерий *Bacillus subtilis* (б) и почвенной пыли (в). 1 и 3 – измерения с диафрагмой, подавляющей оптический шум, 2 и 4 – с диафрагмой кольцевой формы. N – число частиц.

на отдельных образцах веществ, перечисленных выше. Предварительно параметры оптической системы были оптимизированы подбором диафрагм, устанавливаемых перед фотокатодами ФЭУ для получения минимальной дисперсии областей распределения данных. Результаты экспериментов показали, что минимум дисперсии соответствует установке диафрагмы, наиболее эффективно убирающей оптические шумы (изображения 1 на рис. 4). В силу технологических условий изготовления эллиптического зеркала оптический шум при попадании фонового излучения на поверхность оказывается сосредоточенным в плоскости рассеяния, проходящей через ось лазерного луча и ось зеркала. Установка диафрагмы, экранирующей паразитное рассеяние в данной плоскости, приводит к подавлению оптических шумов до уровня электронных. При этом дисперсия областей для всех исследованных аэрозолей оказывается на 10–20% меньше, чем при измерении сигналов без диафрагмы, и на 30–50% меньше по сравнению с установкой диафрагмы кольцевой формы, выделяющей область изображения AA' , наиболее чувствительную к смещению частицы из фокуса эллиптического зеркала.

Для экспериментальной проверки возможности схемы измерять пространственное распределение световой энергии регистрировались сигналы флуоресценции в диапазоне 400–500 нм от частиц аэрозоля белка Ovalbumin. Флуоресценция регистрировалась при диафрагмировании ПОИ в трех каналах регистрации. Схематичное изображение выбранных углов регистрации показано на рис. 5, где центр системы координат совпадает с центром области анализа, ось z – с осью луча лазера, а ось потока аэрозольных частиц ортогональна плоскости рисунка. Измерения проводили в следующих направлениях: прямое – угловой сектор γ (ось вращения совпадает с осью z), боковое – угловой сектор β (ось вращения x ортогональна оси z), обратное – угловой сектор α (ось вращения обратна оси z). В прямом и обратном направлениях измерения в углах, близких к оптической оси лазера, не проводились из-за конструктивных ограничений (виньетирование флуоресценции на отверстиях эллиптического зеркала и блендах ввода/вывода пучка лазера).

Полученные данные обрабатывались в двухосевой координатной системе, где по оси абсцисс было отложено отношение сигналов

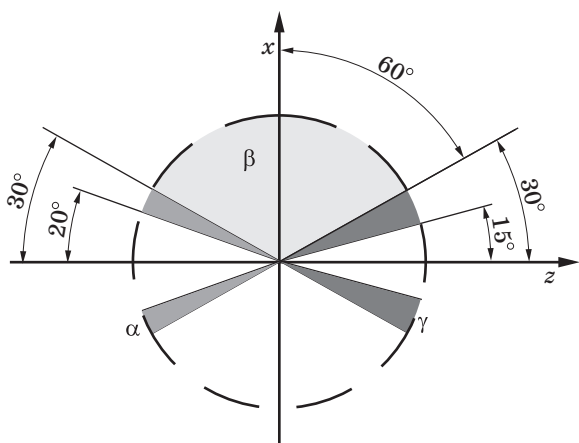


Рис. 5. Диаграмма углов регистрации флуоресценции в диапазоне 400–500 нм. Пояснения в тексте.

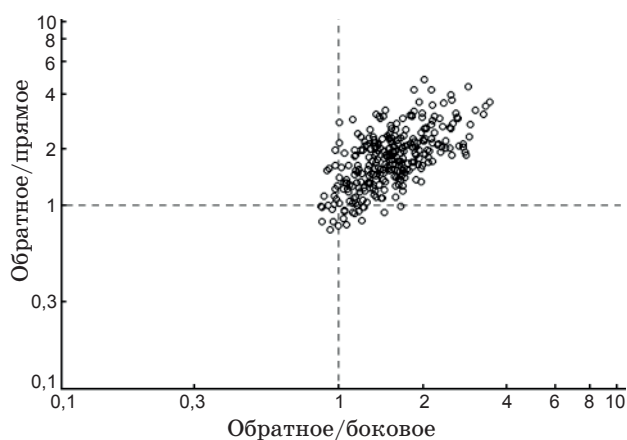


Рис. 6. Область распределения сигналов флуоресценции частиц белка Ovalbumin, построенная по измеренным отношениям сигналов. Пояснения в тексте.

флуоресценции обратное/боковое, а по оси ординат – обратное/прямое. Для учета различий в размерах угловых секторов зарегистрированные сигналы были нормированы на соответствующие значения телесных углов регистрации. Кроме того, нормировкой были учтены потери излучения на оптических элементах в каждом из каналов регистрации.

Результаты измерений пространственного распределения флуоресценции представлены на рис. 6. Координаты центра масс построенной области равны 1,9 для отношения обратное/

прямое и 1,7 для отношения обратное/боковое. Из полученных данных следует, что в среднем регистрируемые сигналы зависят от направления регистрации и имеют большие значения в обратном направлении по сравнению с боковым и прямым направлениями, что качественно согласуется с результатами работ [18–21].

Заключение

Предлагаемая схема оптической системы регистрации обеспечивает большую эффективность ($\Omega = 3\pi$) оптического элемента, собирающего излучение флуоресценции, эффективное подавление шумов от источников возбуждающего излучения, независимость измеряемой информации от положения частицы внутри области анализа. Система позволяет использовать в качестве источника возбуждающего излучения относительно недорогие малогабаритные импульсные УФ лазеры в аппаратуре проточно-оптического метода.

Среди методов снижения разброса данных, предусмотренных конструкцией системы, подавление оптических шумов диафрагмированием канала рассеяния оказывается наиболее эффективным, даже с учетом ослабления сигнала при установке диафрагмы в плоскости фотокаштода ФЭУ.

Способность измерять пространственное распределение световой энергии флуоресценции и рассеяния открывает новые возможности в исследовании частиц аэрозоля проточно-оптическим методом. Использование дополнительных каналов регистрации позволяет измерять пространственные характеристики излучения одновременно со спектральными параметрами флуоресценции. В случае применения более мощных источников излучения пространственные измерения возможны с помощью матричных приемников оптического излучения. Это позволяет соединить ранее независимые методики исследования частиц аэрозоля: измерение индикатрис рассеяния и/или флуоресценции и измерение спектров флуоресценции, что потенциально повышает информативность проточно-оптического метода в целом.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Chang R., Pan Y.-L., Pinnick R.G., Hill S.C. Method and instrumentation for measuring fluorescence spectra of individual airborne particles sampled from ambient air // Патент США № US2004125371 A1. 2004.

2. *Kaye P.H., Barton J.E., Hirst E., Clark J.M.* Simultaneous light scattering and intrinsic fluorescence measurement for the classification of airborne particles // *Appl. Opt.* 2000. V. 39. № 21. P. 3738–3745.
3. *Kaye P.H., Stanley W.R., Hirst E.* Single particle multichannel bio-aerosol fluorescence sensor // *Optics Express*. 2005. V. 13. P. 3583–3593.
4. *Ho J.y.-W.* Fluorescent biological particle detection system // Патент США № US5895922. 1999.
5. *Hairiston P.P., Quant F.R.* System for detecting fluorescing components in aerosols // Патент США № US5999250. 1999.
6. *Воробьев С.А.* Ламповый прибор для определения состава аэрозолей на основе люминесцентного анализа индивидуальных частиц // Патент РФ № 2279663. 2006.
7. *Jeys T.H., Herzog W.D., Hybl J.D., Czerwinski R.N., Sanchez A.* Advanced Trigger Development // *Lincoln Laboratory Journal*. 2007. V. 17. № 1. P. 29–60.
8. *Kaye P.H., Stanley W.R., Hirst E., Foot E.V., Baxter K.L., Barrington S.J.* Single particle multichannel bio-aerosol fluorescence sensor // *Optics Express*. 2005. V. 13. № 10. P. 3583–3593.
9. *Chen G., Nachman P., Pinnick R.G., Hill S.C., Chang R.K.* Conditional-firing aerosol-fluorescence spectrum analyzer for individual airborne particles with pulsed 266-nm laser excitation // *Opt. Lett.* 1996. № 21 (16). P. 1307–1309.
10. *Pan Y.-L., Hill S.C., Pinnick R.G., Huang H., Bottiger J.R., Chang R.K.* Fluorescence spectra of atmospheric aerosol particles using one or two excitation wavelengths: Comparison of classification schemes employing different emission and scattering results // *Optics Express*. 2010. V. 18. № 12. P. 12436–12457.
11. *Grant K.J., Piper J.A., Ramsay D.J., Williams K.L.* Pulsed lasers in particle detection and sizing // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 416–417.
12. *Zarrin F., Dovichi N.J.* Effect of Sample Stream Radius upon Light Scatter Distribution Generated with a Gaussian Beam Light Source in the Sheath Flow Cuvette // *Analytical Chemistry*. 1987. V. 59. № 6. P. 846–850.
13. *Aptowicz K.B., Pan Y.-L., Chang R.K., Pinnick R.G., Hill S.C., Tober R.L., Goyal A., Jeys T., Bronk B.* Two-dimensional angular optical scattering patterns of microdroplets in the mid infrared with strong and weak absorption // *Opt. Lett.* 2004. V. 29. № 17. P. 1965–1967.
14. *Steen H.B.* Noise, Sensitivity, and Resolution of Flow Cytometers // *Cytometry*. 1992. V. 13. P. 822–830.
15. *Хайкин С.* Нейронные сети. Полный курс // М.: Вильямс, 2006. С. 66.
16. *Campbell J.M., Tremblay D.P., Daver F., Cousins D.* Multiwavelength bioaerosol sensor performance modeling // *Proc. SPIE*. 2005. V. 5990. P. 59900k1–59900k13.
17. *Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D.* Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols // *Optics Express*. 2004. V. 12. № 19. P. 4457–4466.
18. *Сидоренко В.М.* Молекулярная спектроскопия биологических сред // М.: Высшая школа, 2004. С. 105–115.
19. *Hil S.C I, Pan Y.-L., Holler S., Chang R.K.* Enhanced, Backward-Directed Multiphoton-Excited Fluorescence from Dielectric Microcavities // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. № 1. P. 54–57.
20. *Pan Y.-L., Hill S.C., Wolf J.-P., Holler S., Chang R., Bottiger J.R.* Backward-Enhanced Fluorescence from clusters of microspheres and particles of tryptophan // *Appl. Opt.* 2002. V. 41. № 15. P. 2994–2999.
21. *Domann R.* A study of the influence of absorption on the spatial distribution of fluorescence intensity within large droplets using Mie theory, geometrical optics and imaging experiments // *Meas. Sci. Technol.* 2002. № 13. P. 280–291.