

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДИКАТРИСЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЧАСТИЦ БИОАЭРОЗОЛЯ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2012 г. **Е. А. Кочелаев***; **А. О. Волчек***, канд. физ.-мат. наук; **Б. А. Елизаров***, канд. техн. наук;
В. М. Сидоренко**, доктор техн. наук

* НПО “ПРИБОР”, Санкт-Петербург

** СПбГЭТУ “ЛЭТИ” им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

E-mail: Kochelaev@bk.ru

Результаты численного моделирования углового распределения флуоресценции отдельных частиц биоаэрозоля сравниваются с данными эксперимента, полученными проточно-оптическим методом при исследовании частиц белка *Ovalbumin*, а также спор *Bacillus subtilis*. Показано, что экспериментальные данные в целом согласуются с результатами модельных вычислений.

Ключевые слова: биоаэрозоль, индикатриса флуоресценции, сферическая частица, проточно-оптический метод.

Коды OCIS: 300.2530, 280.1415, 010.1110.

Поступила в редакцию 11.11.2011.

Введение

Анализ аэрозолей в приземном слое воздуха относится к числу актуальных проблем экологического мониторинга, поскольку носителями аэрозоля могут выступать патогенные микроорганизмы, способные вызывать аллергические реакции и заболевания человека.

В настоящее время задача высокоскоростного экспресс-анализа респираторной (вдыхаемой) фракции аэрозоля размером 1–10 мкм успешно решается проточно-оптическим методом (ПОМ) [1–4]. При анализе ПОМ отдельные частицы аэрозоля подвергаются воздействию внешнего возбуждающего излучения, диапазон длин волн которого соответствует возбуждению типичных для биологических веществ флуорофоров. Измерение сигналов флуоресценции и упругого рассеяния позволяет выделять потенциально опасные биологические частицы в условиях переменного собственного фона атмосферы как неорганического, так и биологического происхождения, маскирующего наличие патогенных микроорганизмов. При этом скорость анализа достигает 10^4 отдельных аэрозольных частиц в секунду.

В работах [5–7] показано, что для оптически прозрачных частиц аэрозоля в диапазоне размеров 1–10 мкм пространственное распределение интенсивности флуоресценции определяется преломлением излучения на поверхности частицы. С другой стороны, в [8] продемонстрировано влияние поглощения на индикатрису флуоресценции оптически плотных частиц суспензий с малым относительным показателем преломления на границе частица – окружающая среда.

Для реальных биоаэрозолей, исследуемых ПОМ, оптическая плотность D_λ изменяется в широком диапазоне значений [9–11], а относительный показатель преломления частицы во внешней среде (воздух) находится в диапазоне 1,3–1,5. Таким образом, следует ожидать, что индикатриса флуоресценции аэрозольной частицы должна одновременно зависеть как от поглощения излучения веществом частицы, так и от преломления излучения на ее поверхности.

В общем случае расчет индикатрисы флуоресценции позволяет решить две важные задачи:

– исследовать возможность использовать измерение индикатрисы флуоресценции в ка-

честве нового маркера аэрозольных частиц, позволяющего расширить границы ПОМ как метода анализа;

– учесть для реальных оптических систем, используемых в ПОМ и отличающихся углами регистрации излучения частицы, влияние углового распределения флуоресценции на измеряемые сигналы.

В настоящей статье представлены результаты численного моделирования углового распределения флуоресценции модельных сферических частиц, оптические характеристики которых соответствуют экспериментальным данным для бактерий *Erwinia herbicola* и спор *Bacillus subtilis* [9, 10]. Частицы с оптическими характеристиками бактерий *Erwinia herbicola* [9] и белка *Ovalbumin* [11] служат моделью частиц оптически плотных для возбуждающего излучения и слабо поглощающих для флуоресценции. Частицы с оптическими характеристиками спор *Bacillus subtilis* [10] являются моделью оптически плотных частиц как для возбуждающего излучения, так и для флуоресценции. Полученные результаты численного моделирования сравниваются с данными эксперимента по регистрации сигналов флуоресценции сухих частиц белка *Ovalbumin*, частиц суспензий белка *Ovalbumin*, а также спор бактерий *Bacillus subtilis*. Измерения выполнялись на лабораторной установке, оптическая система которой была ранее описана в [12].

Описание расчетной модели

Так как исследуемые ПОМ частицы имеют размер 1–10 мкм, а измеряемые длины волн лежат в диапазоне 0,26–0,6 мкм, то для расчета углового распределения флуоресценции можно использовать приближение геометрической оптики

$$\alpha = 4\pi d/\lambda \gg 1, \quad (1)$$

где d – диаметр частицы, λ – длина волны излучения, и тогда для наименьшей измеряемой ПОМ частицы 1 мкм в диапазоне длин волн 0,26–0,6 мкм получим $\alpha = 21–42 \gg 1$.

Для расчета угловой зависимости флуоресценции в [13] было предложено представить излучающий флуоресценцию объем частицы набором слоев цилиндрической формы одинаковой высоты h по оси Z , соосных возбуждающему излучению (рис. 1). В таком случае энергия флуоресценции E_n , излучаемая в выбранном направлении регистрации, определяется

суммой вкладов отдельных флуоресцирующих слоев $E_{n,сл_i}$:

$$E_n = \sum_{i=1}^s E_{n,сл_i} = \Delta V \frac{km}{c} \sum_{i=1}^s \tau_i \eta_i \sum_{j=1}^{p_i} I_j^{(i)}. \quad (2)$$

Здесь ΔV – малый флуоресцирующий кубический объем, размеры которого много меньше линейных размеров частицы; m – число элементарных объемов, которые укладываются по оси каждого i -го цилиндрического слоя высотой h ; k – коэффициент, учитывающий эффективность возбуждения флуоресценции ($k = K\Delta Z\chi$, K – коэффициент поглощения на длине волны возбуждения, χ – квантовый выход флуоресценции); c – скорость света, s – число цилиндрических слоев, τ_i – относительное пропускание возбуждающего излучения вдоль оси Z суммы $(i - 1)$ слоев, предшествующих i -му слою частицы; η_i – доля флуоресцентного излучения, пришедшего от i -го слоя в выбранном направлении регистрации (определяется формой частицы, комплексным показателем преломления n' и учитывает, в том числе, поглощение флуоресценции веществом частицы); p_i – число элементарных объемов в каждом сечении i -го цилиндрического слоя, $I_j^{(i)}$ – плотность потока возбуждающего излучения на j -м элементарном объеме внутри i -го цилиндрического слоя.

Как следует из (2), энергия флуоресценции каждого излучающего слоя определяется суммой энергий малых флуоресцирующих кубических объемов ΔV . Объем ΔV является достаточно малым, чтобы считать плотность потока

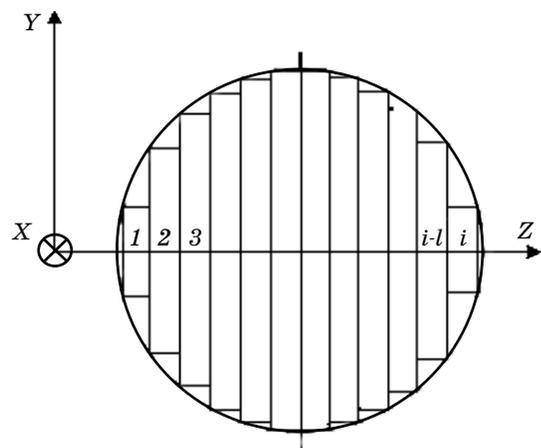


Рис. 1. Приближение флуоресцирующей сферической частицы набором флуоресцирующих слоев цилиндрической формы.

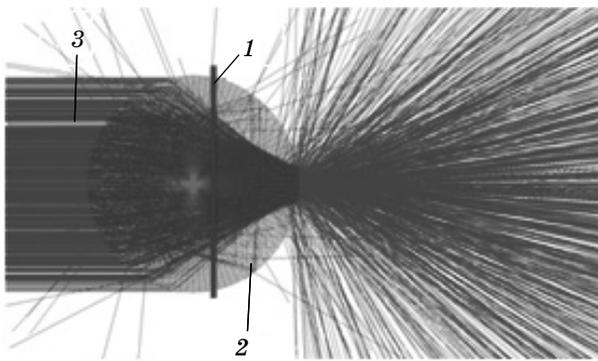


Рис. 2. Моделирование распределения интенсивности возбуждающего излучения внутри сферической частицы в программе Zemax-ЕЕ. 1 – детектор, 2 – сферическая частица, 3 – возбуждающее излучение внешнего источника.

световой энергии I , падающего на грань $\Delta X\Delta Y$, постоянной, но достаточно большим, чтобы среда внутри ΔV являлась оптически однородной, изотропной и содержала большое количество флуоресцирующих молекул. Энергия флуоресценции каждого объема ΔV определяется плотностью потока световой энергии I , падающего на ортогональную оси Z грань ΔV . Угловое распределение излучения флуоресценции для каждого ΔV принимается изотропным (аналогично принятому в [5]).

Численное моделирование энергии флуоресценции E_n , определяемой соотношением (2), было реализовано в 2 этапа в программе Zemax-ЕЕ. На первом этапе расчета для каждого i -го флуоресцирующего слоя было вычислено распределение плотностей потока $I_j^{(i)}$ внутри частицы с учетом преломления возбуждающего излучения на поверхности частицы (рис. 2). Предполагается освещение частицы параллельным пучком, что соответствует лазерным источникам излучения, которые применяются в большинстве современных систем ПОМ [1–4].

На втором этапе в программе Zemax-ЕЕ определялась доля флуоресцентного излучения, дошедшего до приемников, расположенных вне частицы, от каждого i -го излучающего слоя. Моделью излучающего слоя являлся набор изотропно излучающих точечных источников, расположенных в одной плоскости, с мощностью каждого источника, пропорциональной $I_j^{(i)}$. Отметим, что на данном этапе учитывалось поглощение флуоресцентного из-

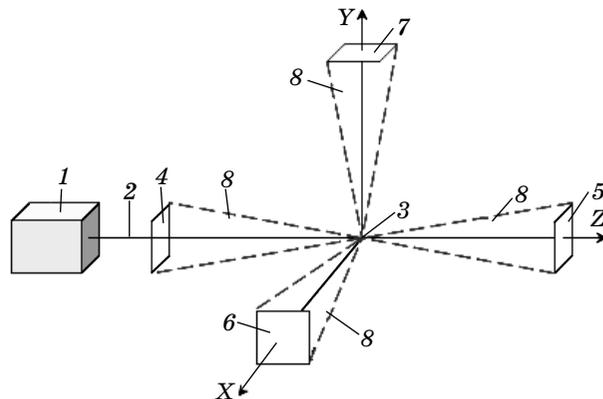


Рис. 3. Расчет в Zemax флуоресцентного излучения в направлениях прямое (ось Z), обратное (ось $-Z$), боковое (ось X) и верхнее (ось Y). 1 – источник излучения, 2 – луч источника (совпадает с осью Z), 3 – частица, 4–7 – приемники излучения флуоресценции, 8 – излучение флуоресценции, дошедшее до приемника.

лучения на оптических путях лучей внутри частицы.

Положение приемников относительно излучающей частицы показано на рис. 3. При моделировании определялась доля энергии флуоресценции, излученной слоем частицы в направлениях “обратное” (180° относительно оси возбуждения – направление, противоположное оси Z , приемник 4), “прямое” (0° относительно оси возбуждения – ось Z , приемник 5), “боковое” (90° относительно оси возбуждения – ось X , приемник 6) и “верхнее” (90° относительно оси возбуждения – ось потока Y , приемник 7). Числовая апертура NA приемников составляла 0,18, при этом по отношению к приемникам частица являлась точечным источником (размеры частицы минимум на 2 порядка меньше характерных размеров приемников и расстояний от частицы до приемников).

Указанный метод вычисления был предварительно протестирован с целью оценки погрешности получаемых данных. Расчетная погрешность зависела от количества моделируемых лучей возбуждения и флуоресцентного излучения и не превышала 5%. Число лучей возбуждающего излучения, приходящего на частицу, было равно 5×10^4 ; сетка $I_j^{(i)}$ в сечении частицы, проходящем через центр, – 50×50 элементов; число излучающих слоев – 10, а число лучей флуоресценции $5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$, что соответствовало 2000 лучей от каждого элементарного объема частицы.

Результаты численного моделирования и обсуждение

Расчет углового распределения флуоресценции был выполнен для сферических частиц, оптическая плотность которых изменялась в широком диапазоне значений:

- оптически прозрачные частицы ($D_\lambda = 0$),
- частицы с незначительным поглощением ($D_{в, \phi} \leq 0,2$, где подстрочный индекс “в” соответствует длине волны возбуждения, а “ф” – флуоресценции),
- частицы оптически плотные для возбуждающего излучения ($D_{в} > 0,2, D_{\phi} \leq 0,2$),
- оптически плотные частицы с $D_{в, \phi} > 0,2$.

Согласно [9] к частицам с незначительным поглощением ($D_{в, \phi} \leq 0,2$) можно отнести бактерии *Erwinia herbicola* размером 1–10 мкм при возбуждении $\lambda = 360$ нм и регистрации флуоресценции с пиком на 430 нм: $n'_{\lambda=360} = 1,545 - i0,00035$ ($D_{\lambda=360} = 0,013-0,13$) и $n'_{\lambda=430} = 1,533 - i0,000279$ ($D_{\lambda=430} = 0,008-0,08$). Те же бактерии должны рассматриваться оптически плотными для возбуждающего излучения $\lambda = 265$ нм ($n'_{\lambda=265} = 1,59 - i0,0035$, $D_{\lambda=265} = 0,2-1,8$) и прозрачными для пика флуоресценции $\lambda = 360$ нм ($D_{\lambda=360} = 0,013-0,13$). Оптические свойства белка *Ovalbumin* [11] близки к бактериям *Erwinia herbicola*. Споры [10] 1–10 мкм являются оптически плотными частицами как при возбуждении на 265 нм, так и для флуоресценции на длинах волн 365 нм и 430 нм: $n'_{\lambda=265} = 1,55 - i0,014$ ($D_{\lambda=265} = 0,65-6,5$), $n'_{\lambda=365} = 1,53 - i0,016$ ($D_{\lambda=365} = 0,57-5,7$), $n'_{\lambda=430} = 1,52 - i0,017$ ($D_{\lambda=430} = 0,52-5,2$). Отметим, что указанные оптические свойства частиц слабо изменяются в широких диапазонах длин волн флуоресценции.

Для анализа влияния эффектов преломления и поглощения на угловое распределение флуоресценции удобно рассмотреть следующие отношения сигналов (энергии E_n) на приемниках 4–6 (рис. 3):

$$\alpha = \frac{E_n \text{ обратное}}{E_n \text{ прямое}}, \quad \beta = \frac{E_n \text{ обратное}}{E_n \text{ боковое}}. \quad (3)$$

Так как для сферических частиц сигналы в боковом и верхнем направлениях равны и разница в расчетах не превышает отмеченной погрешности 5%, то результаты расчетов флуоресценции в верхнем направлении сферических частиц далее не приводятся.

При $D_\lambda = 0$ моделирование показало появление максимума индикатрисы флуоресценции в обратном направлении, с значениями

$$\alpha = 3,3, \quad \beta = 3,8. \quad (4)$$

Данные результаты наглядно интерпретируются слоевой моделью, описанной выше. Из-за преломления поверхностью частицы лучей флуоресценции индикатриса флуоресценции отдельных излучающих слоев перестает быть изотропной. Максимальное и минимальное значения энергии флуоресценции находятся на оси возбуждения Z , при этом максимум излучения находится в направлении более удаленной от слоя поверхности сферы, а минимум – в направлении ближней к слою поверхности. Степень асимметрии индикатрисы отдельного слоя (степень отклонения от изотропности) растет при удалении слоя от центра частицы и называется максимальной для краевых ($i = 1, 2, 9, 10$) слоев, тогда как для центральных слоев ($i = 5, 6$) индикатриса почти изотропна.

Индикатриса флуоресценции всей частицы (общая индикатриса) определяется суммой вкладов отдельных слоев и при однородном возбуждении вещества сферической частицы является изотропной в силу симметрии задачи. Так как фокусировка возбуждающего излучения внутри сферы приводит к более эффективному возбуждению удаленных ($i > 5$) от лазера слоев, то происходит доминирование вкладов в общую индикатрису слоев с $i > 5$, имеющих максимум пространственного распределения флуоресценции в направлении источника излучения (отрицательное направление оси Z , рис. 1). В результате данного геометрического эффекта общая индикатриса флуоресценции модельной прозрачной сферической частицы имеет максимальное значение в направлении “обратное” относительно других направлений. Полученные в (4) значения не зависят от диаметра сферических частиц и согласуются с данными работ [5–7].

Для реальных частиц оптическая плотность D_λ отлична от нуля и наряду с геометрическим эффектом присутствует эффект поглощения возбуждающего излучения и излучения флуоресценции. Поглощение возбуждающего излучения приводит к уменьшению вклада в общую индикатрису более удаленных от источника слоев и, следовательно, к снижению их вклада в общую индикатрису частицы.

Поглощение флуоресценции приводит к изменению индикатрисы отдельных слоев в сравнении с прозрачной частицей. Так как излучение отдельных слоев поглощается в большей степени в направлении более удаленной по оси Z поверхности частицы, то для индикатрисы флуоресценции отдельных слоев с ростом оптической плотности наблюдается тенденция, обратная геометрическому эффекту, – увеличение относительной доли излученной энергии флуоресценции в направлении ближней к слою поверхности сферы по оси Z .

Результаты расчета зависимостей α и β для частиц различной оптической плотности представлены на рис. 4. Все точки на кривых α и β соответствуют определенному размеру частиц, оптические характеристики которых относятся к трем типам:

- 1) слабо поглощающие частицы ($D_{в, \phi} \leq 0,2$, $n'_в = 1,545 - i0,00035$, $n'_\phi = 1,533 - i0,000279$ [9]),
 - 2) частицы оптически плотные для возбуждающего излучения ($D_в > 0,2$, $n'_в = 1,59 - i0,0035$) и слабо поглощающие излучение флуоресценции ($D_\phi \leq 0,2$, $n'_\phi = 1,545 - i0,00035$ [9]),
 - 3) оптически плотные частицы ($D_{в, \phi} > 0,2$, $n'_в = 1,55 - i0,014$, $n'_\phi = 1,53 - i0,016$ [10]).
- В общем случае степень влияния отдельных эффектов на индикатрису флуоресценции зависит от оптических плотностей частицы на длинах волн возбуждения $D_в$ и флуоресценции D_ϕ . Для слабо поглощающих частиц $D_{в, \phi} \leq 0,2$ влияние эффектов поглощения слабо

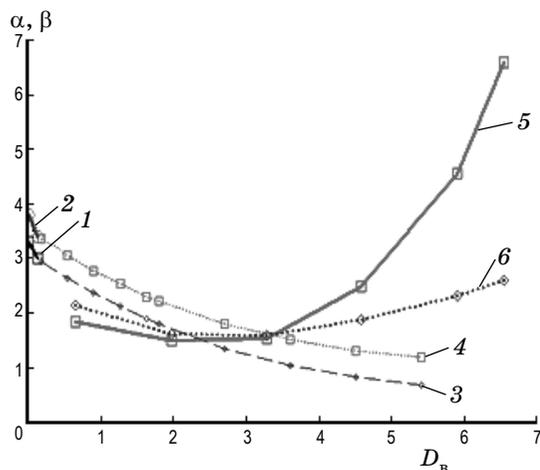


Рис. 4. Отношения $\alpha =$ обратное/прямое и $\beta =$ обратное/боковое в зависимости от оптической плотности излучающей частицы. 1 – α , 2 – β , при $D_{в, \phi} \leq 0,2$; 3 – α , 4 – β , при $D_в > 0,2$, $D_\phi < 0,2$; 5 – α , 6 – β , при $0,5 \leq D_{в, \phi} \leq 6,5$.

заметно и индикатриса определяется главным образом геометрическим эффектом (рис. 4, 1 – α , 2 – β).

Если частица является оптически плотной для возбуждающего излучения ($D_в > 0,2$) и при этом прозрачной или слабо поглощающей для излучения флуоресценции ($D_\phi \leq 0,2$), ее общая индикатриса определяется совместным действием геометрического эффекта и эффекта поглощения возбуждающего излучения. Для таких частиц ослабление влияния геометрического эффекта при $D_в > 0,2$ приводит к возрастанию вклада в общую индикатрису излучения ближних к источнику слоев, энергия флуоресценции которых максимальна в направлении “прямое”. В результате α и β уменьшаются с ростом $D_в$ и при $D_в > 3,7$ индикатриса частицы имеет максимум в направлении “прямое” (рис. 4, 3 – α , 4 – β).

Индикатрису флуоресценции оптически плотных частиц ($D_{в, \phi} > 0,5$) определяет совместное действие всех перечисленных эффектов. Как видно из рис. 4, α (кривая 5) имеет минимум в области $D_в = 2-3$. Для частиц с $D_в < 3$ преобладает эффект уменьшения α при увеличении $D_в$ за счет ослабления возбуждения последних слоев.

Для частиц с $D_в > 3$ общая индикатриса определяется главным образом вкладом первых слоев и ее максимум из-за существенного поглощения флуоресценции смещается в направлении источника. В результате энергия флуоресценции всей частицы в обратном направлении стремится к некоторому пределу (излучают только ближние к источнику слои), тогда как флуоресценция в прямом направлении для непрозрачной частицы стремится к нулю (флуоресценция ближних к источнику слоев поглощается веществом частицы, а удаленные от источника слои оказываются невозбужденными).

Поведение параметра β (кривая 6 на рис. 4) объясняется аналогично с той лишь разницей, что флуоресценция в боковом направлении не стремится к нулю при больших значениях $D_в$ и достигает некоторого предела, когда излучающими являются только первые поверхностные слои абсолютно непрозрачной частицы. Результаты расчетов показывают, что в большом диапазоне значений оптической плотности ($0,6 \leq D_в \leq 6,5$) величина β оптически плотных частиц (кривая 6 на рис. 4) не превышает значений β слабо поглощающих частиц (кривая 2 на рис. 4).

Эксперимент

Эксперименты по измерению угловой зависимости сигналов флуоресценции отдельных частиц аэрозоля были выполнены на лабораторной установке, оптическая система которой (рис. 5) была описана ранее в [12]. Система содержит следующие основные элементы: глубокое эллиптическое зеркало, линзы, спектроделительные зеркала, оптические светофильтры, полевые диафрагмы, оптическую ловушку, бленды ввода/вывода излучения лазера.

Основным элементом системы является глубокое эллиптическое зеркало 4, телесный угол светосбора которого составляет 3π 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, который ортогонален плоскости рисунка (на рис. 5 не показан), в окрестности первого фокуса зеркала. Флуоресцентное излучение частицы, проходящей через область анализа (область пересечения потока частиц аэрозоля и луча источника излучения), отражается эллиптическим зеркалом 4 в область второго фокуса 5. Двойковогнутая линза 13 уменьшает числовую апертуру лучей, отраженных эллиптическим зеркалом, и строит промежуточное изображение области анализа в плоскости полевой диафрагмы 27.

Плоскость AA' совпадает с торцевой поверхностью 12 эллиптического зеркала и является проекцией поверхности эллиптического зеркала, подсвеченной точечным источником в первом фокусе. Так как каждому угловому положению луча, вышедшего из первого фокуса, соответствует одна точка в плоскости AA' , то распределение энергии в плоскости AA' однозначно задает картину углового распределения флуоресценции аэрозольной частицы, излучающей в окрестности первого фокуса. На оптической схеме рис. 5 показан геометрический ход трех лучей, вышедших под разными углами из первого фокуса эллиптического зеркала.

С помощью линз и спектроделительных зеркал изображение плоскости AA' формируется на приемных площадках приемников оптического излучения 9–11 (ПОИ). Установка диафрагм 24–26 непосредственно перед приемными площадками позволяет выделять области пространственного распределения флуоресценции по одной на каждый канал регистрации. Спектроделительные зеркала и ши-

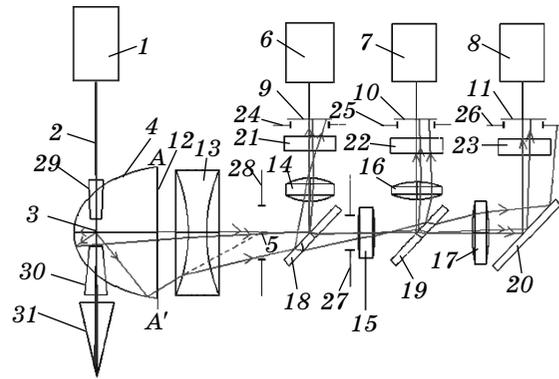


Рис. 5. Оптическая система регистрации угловой зависимости флуоресцентного излучения аэрозолей. 1 – УФ лазер, 2 – луч УФ лазера, 3 – первый фокус эллиптического зеркала, 4 – эллиптическое зеркало, 5 – второй фокус эллиптического зеркала, 6–8 – ПОИ, 9–11 – приемные площадки ПОИ, 12 – плоскость торцевой поверхности эллиптического зеркала, 13 – двойковогнутая линза, 14–17 – линзы, 18–20 – спектроделительные зеркала, 21–23 – широкополосные светофильтры, 24–27 – полевые диафрагмы, 28 – диафрагма, 29 – бленда ввода излучения лазера, 30 – бленда вывода излучения лазера, 31 – оптическая ловушка.

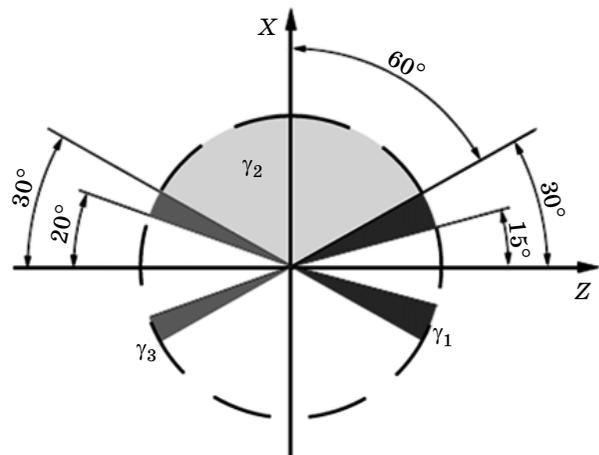


Рис. 6. Диаграмма углов регистрации флуоресценции.

рокополосные светофильтры обеспечивают выделение необходимого спектрального диапазона на каждом канале регистрации. Оптическая ловушка 31 предназначена для подавления лазерного излучения, выходящего через отверстие в зеркале 4.

Схематичное изображение углов регистрации флуоресценции показано на рис. 6, где центр системы координат совпадает с центром облучаемой частицы, ось Z – с осью луча лазера, а ось потока аэрозольных частиц ортогональна

плоскости рисунка. Измерения проводились в следующих направлениях: “прямое” – угловой сектор γ_1 (ось вращения совпадает с осью Z), “боковое” – угловой сектор γ_2 (ось вращения X ортогональна оси Z), “обратное” – угловой сектор γ_3 (ось вращения противоположна оси Z). Следует отметить, что выбор более широких углов регистрации по сравнению с расчетными углами (порядка 10°), был обусловлен малыми сигналами флуоресценции, регистрируемыми в меньших углах. В направлениях “прямое” и “обратное” измерения в углах, близких к оптической оси лазера, не проводились в силу конструктивных ограничений оптической системы (виньетирование флуоресценции на элементах и отверстиях оптической системы). Данные отличия экспериментальных условий и модельных расчетов позволяют только качественно сопоставить эксперимент и результаты вычислений.

Внешним источником излучения был опытный образец твердотельного импульсно-периодического УФ лазера ($\lambda = 266$ нм) с пассивной модуляцией добротности, обеспечивающий облучение отдельной частицы аэрозоля с плотностью энергии $E \approx 100\text{--}200$ мкДж/см². Частота импульсов источника составляла 22 кГц при средней мощности около 3 мВт. Из-за невысокого квантового выхода флуоресценции и малого времени регистрации полезного светового сигнала в качестве приемников оптического излучения использовались фотоэлектронные умножители (ФЭУ). Сигналы флуоресцентного излучения частицы в “прямом”, “боковом” и “обратном” направлениях регистрировались соответственно приемниками 6, 7 и 8 и были последовательно измерены в диапазонах 300–400 и 400–500 нм.

В эксперименте исследовались сухие частицы белка *Ovalbumin*, частицы водных суспензий белка *Ovalbumin*, а также споры бактерий *Bacillus subtilis*. Пробы сухих частиц белка *Ovalbumin* и споры бактерий *Bacillus subtilis* представляли собой порошки, и подавались через эжектор на вход воздухозаборной трубки лабораторной установки. Частицы водных суспензий белка *Ovalbumin* распылялись вблизи воздушного входа лабораторной установки ингалятором PARI junior boy N, обеспечивающим средний размер частиц 3,9 мкм.

Результаты измерений ПОМ сигналов отдельных частиц исследуемого аэрозоля должны рассматриваться как случайные величины [4, 14]. Полученные экспериментальные

данные представлены в виде гистограмм распределения отношений α (рис. 7) и β (рис. 8). Из рис. 7, 8 следует, что для частиц суспензий *Ovalbumin* и спор бактерий *Bacillus subtilis* индикатриса флуоресценции не изотропна и имеет максимум в обратном направлении, тогда как для сухих частиц *Ovalbumin* пик гистограмм α и β близок к 1 в каждом из диапазонов регистрируемой флуоресценции. Кроме того, для суспензий и сухих частиц *Ovalbumin* угловое распределение флуоресценции не зависит от диапазона регистрации, а для спор

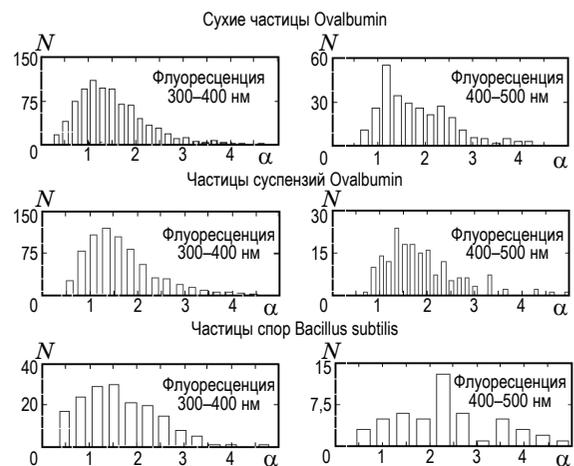


Рис. 7. Гистограммы распределения отношений α сухих частиц белка *Ovalbumin*, частиц суспензий *Ovalbumin* и спор *Bacillus subtilis*. N – число зарегистрированных сигналов флуоресценции.

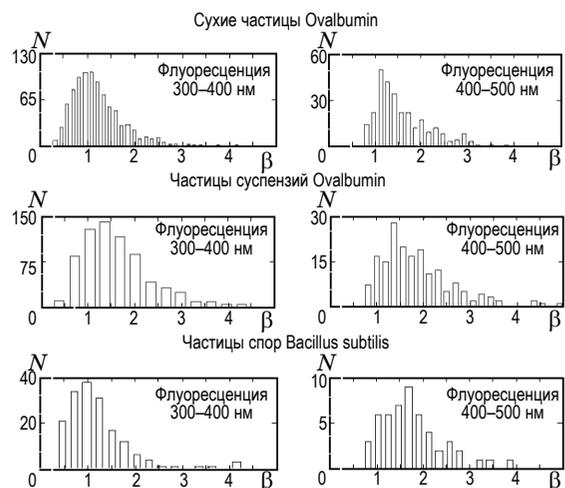


Рис. 8. Гистограммы распределения отношений β сухих частиц белка *Ovalbumin*, частиц суспензий *Ovalbumin* и спор *Bacillus subtilis*, N – число зарегистрированных сигналов флуоресценции.

Bacillus subtilis с ростом длины волны флуоресценции максимум α смещается с 1,5 до 2,3, а β – с 1 до 1,7.

Для белка *Ovalbumin* полученные результаты измерений качественно согласуются с данными [11]. Так как частицы *Ovalbumin* являются слабо поглощающими в диапазоне длин волн флуоресценции ($D_{\lambda = 360} = 0,013-0,13$, $D_{\lambda = 430} = 0,008-0,08$), то влияние поглощения флуоресцентного излучения на угловое распределение оказывается незначительным и индикатриса флуоресценции в основном определяется действием геометрического эффекта и эффектом ослабления возбуждающего излучения ($D_{\lambda = 265} = 0,16-1,6$). При этом для сухих частиц *Ovalbumin* геометрический эффект оказывается скомпенсирован эффектом поглощения на длине волны возбуждения в большей степени ($\alpha = 1$, $\beta = 1$) по сравнению с частицами суспензий, где $\alpha = 1,5$, $\beta = 1,5$.

Для спор бактерий *Bacillus subtilis* оптические плотности на длинах волн возбуждения ($D_{\lambda = 265} = 0,65-6,54$) и флуоресценции ($D_{\lambda = 365} = 0,56-5,69$, $D_{\lambda = 430} = 0,52-5,2$) относительно близки и влияние поглощения флуоресцентного излучения оказывается существенным наряду с остальными эффектами. При этом ввиду близости оптических плотностей D_{λ} в диапазонах измеряемых длин волн флуоресценции угловое распределение флуоресцентного излучения не должно существенно изменяться при переходе от диапазона 300–400 нм к диапазону 400–500 нм. Однако для спор *Bacillus subtilis* в эксперименте наблюдалось смещение максимумов α и β при переходе от диапазона 300–400 нм ($\alpha = 1,5$, $\beta = 1$) к диапазону 400–500 нм ($\alpha = 2,3$, $\beta = 1,7$). Отмеченное несоответствие свидетельствует о возможном различии оптических свойств спор бактерий *Bacillus subtilis*, исследуемых нами и в работе [10]. Такие различия могут быть связаны с разными условиями изготовления и хранения образцов спор [15, 16].

Чтобы разрешить указанное расхождение, нами было оценено изменение оптической плотности $D_{C(\lambda)}$ используемых образцов в диапазоне длин волн 250–500 нм. Для уменьшения эффекта рассеяния порошки сухого белка *Ovalbumin* и частиц спор были помещены в среду с близким показателем преломления (вода). Суспензии *Ovalbumin* были разбавлены с целью уменьшения оптической плотности и, как следствие, снижения влияния эффекта самозатенения частиц на результаты измерения величин

$D_{C(\lambda)}$. Эксперимент проводился на спектрофотометре СФ-46. По данным измерений наиболее сильное уменьшение оптической плотности при увеличении длины волны в диапазоне длин волн возбуждения и флуоресценции происходит для частиц белка *Ovalbumin*, где для сухих частиц $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 450)} = 7,2$, $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 350)} = 3$, а для частиц суспензий $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 450)} = 6,6$, $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 350)} = 2,7$. Таким образом, для частиц *Ovalbumin* наблюдается существенное различие оптических плотностей в диапазонах возбуждения и флуоресценции, что качественно совпадает с данными [11] и подтверждается нашим экспериментом по измерению углового распределения флуоресценции. Для спор бактерий *Bacillus subtilis* уменьшение оптической плотности в диапазоне 265–500 нм менее значительно и составляло $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 450)} = 2,7$, $D_{C(\lambda = 265)}/D_{C(\lambda = 350)} = 1,7$. Таким образом, с одной стороны, для частиц спор оптические плотности в диапазонах возбуждения и флуоресценции имеют более близкие значения, чем для белка *Ovalbumin*, что совпадает с данными [10]. С другой стороны, оптическая плотность спор бактерий *Bacillus subtilis* монотонно уменьшается с ростом длины волны, что отличается от результатов [10]. В то же время указанная спектральная зависимость оптической плотности качественно объясняет результаты измерений угловой зависимости флуоресценции спор *Bacillus subtilis*.

Действительно, для исследуемых образцов спор *Bacillus subtilis* в более прозрачном диапазоне 400–500 нм ослабление геометрического эффекта оказывается менее сильным (максимум гистограмм $\alpha = 2,3$, $\beta = 1,7$), чем в диапазоне 300–400 нм (максимум гистограмм $\alpha = 1,5$, $\beta = 1$). Увеличение асимметрии индикатрисы для спор *Bacillus subtilis* при переходе от диапазона регистрации флуоресцентного излучения 300–400 нм к диапазону 400–500 нм соответствует на рис. 4 переходу α от кривой 5 к кривой 3 при $D_B < 2,3$, и β от кривой 6 к кривой 4 при $D_B < 3,3$. Отметим, что на гистограммах *Bacillus subtilis* (рис. 7 и 8) пиковые значения β ($\beta = 1$ в диапазоне 300–400 нм и $\beta = 1,7$ в диапазоне 400–500 нм) находятся ниже соответствующих значений α ($\alpha = 1,5$ в диапазоне 300–400 нм и $\alpha = 2,3$ в диапазоне 400–500 нм), тогда как в соответствии с расчетом для каждой частицы $\alpha \leq \beta$ при $D_B < 3,3$ (рис. 4). Данное несоответствие можно объяснить существенным различием в углах реги-

страции флуоресценции в боковом направлении при расчете (порядка 10°) и эксперименте (порядка 60°). Как следствие, увеличение числовой апертуры приводит к росту средней интенсивности флуоресценции в боковом направлении регистрации.

Выводы

Моделирование в геометрическом приближении индикатрисы флуоресценции аэрозольных частиц позволило провести анализ совместного влияния эффектов преломления излучения на поверхности частицы и поглощения на угловое распределение интенсивности флуоресцентного излучения.

Полученные экспериментальные данные подтверждают наличие эффекта анизотропии флуоресценции, который зависит от оптической плотности частиц аэрозоля на длинах волн возбуждения и флуоресценции. При этом

для слабо поглощающих флуоресцентное излучение частиц индикатриса определяется преимущественно геометрическим эффектом и почти не зависит от длины волны регистрации флуоресценции. Для оптически плотных частиц ($D_\lambda > 0,2$) влияние поглощения флуоресценции (наряду с геометрическим эффектом и эффектом ослабления возбуждающего излучения) оказывается существенным. Зависимость параметров индикатрисы от степени поглощения флуоресценции может быть использована в методике ПОМ в качестве маркера для разделения биологических частиц (например, вегетативных клеток и спор) по величине оптической плотности на длине волны флуоресценции. Полученные экспериментальные данные в целом согласуются с результатами моделирования и подтверждают применимость использованной методики расчета индикатрисы флуоресценции отдельных частиц аэрозоля.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yong-Le Pan, Hill S.C., Pinnick R.G., Hermes Huang, Bottiger J.R., Chang R.K.* Fluorescence spectra of atmospheric aerosol particles measured using one or two excitation wavelengths: Comparison of classification schemes employing different emission and scattering result // *Optics Express*. 2010. V. 18. P. 12436–12457.
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. *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.
5. *Domann R., Hardalupas Y., Jones A.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.
6. *Steven C. Hill, Veronique Boutou, Jin Yu, Stephane Ramstein, Jean-Pier Wolf, Yong-Le Pan, Stephen Holler, Richard K. Chang.* Enhanced, Backward-Directed Multiphoton-Excited Fluorescence from Dielectric Microcavities // *The American Physical Society*. 2000. № 1. P. 54–57.
7. *Yong-Le Pan, S.C. Hill, J.-P. Wolf, S. Holler, R.K. Chang J.R. Bodiger.* Backward-Enhanced Fluorescence from clusters of microspheres and particles of tryptophan // *Appl. Opt.* 2002. V. 41. № 15. P. 2994–2999.
8. *Сидоренко В.М.* Молекулярная спектроскопия биологических сред. М.: Высшая школа, 2004. С. 105–115.
9. *Arakawa E.T., Tuminello P.S., Khare B.N., Milham M.E.* Optical properties of *Erwinia herbicola* Bacteria at 0,19–2,5 μm // *Biopolymers*. 2003. P. 391–398.
10. *Tuminello P.S., Arakawa E.T., Khare B.N., Wrobel J.M., Querry M.R., Milham M.E.* Optical properties of *Bacillus subtilis* spores from 0,2 to 2,5 μm // *Appl. Opt.* 1997. № 13. P. 2818–2824.
11. *Arakawa E.T., Tuminello P.S., Khare B.N., Milham M.E.* Optical properties of Ovalbumin in 0,130–2,50 μm Spectral Region // *Biopolymers*. 2001. V. 62. P. 122–128.
12. *Кочелаев Е.А., Волчек А.О.* Оптическая система регистрации для проточно-оптического метода анализа биоаэрозолей // *Оптический журнал*. 2011. № 78. № 6. С. 23–30.

13. *Кочелав Е.А., Волчек А.О., Сидоренко В.М.* Метод расчета индикатрисы флуоресценции частиц аэрозоля // Изв. СПбГЭТУ “ЛЭТИ”. 2011. № 9. С. 110–118.
 14. *Steen H.B.* Noise, Sensitivity, and Resolution of Flow Cytometers // *Cytometry*. 1992. V. 13. P. 822–830.
 15. *Faris G.W., Copeland R.A., Mortelmans K., Bronk B.V.* Spectrally resolved absolute fluorescence cross sections for bacillus spores // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 958–967.
 16. *Sivaprakasam V., Lin H.-B., Huston A.L., Eversole J.D.* Spectral characterization of biological aerosol particles using two-wavelength excited laser – induced fluorescence and elastic scattering measurements // *Optic Express*. 2011. V. 19. № 7. P. 6191–6208.
-