

О.А. Букин¹, М.С. Пермьяков¹, А.Ю. Майор¹, С.Г. Сагалаев¹, Е.А. Липилина²,
В.А. Хованец³

О калибровке метода лазерной флуорометрии при измерении концентрации хлорофилла «А»

¹ Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН им. В.И. Ильичева,

² Дальневосточный государственный университет,

³ Дальневосточная государственная морская академия им. Г.И. Невельского, г. Владивосток

Поступила в редакцию 5.02.2001 г.

Приводятся значения калибровочных коэффициентов при измерении абсолютных значений концентрации хлорофилла «А» методом лазерной флуорометрии. Проводится сравнение коэффициентов, полученных в различных районах Тихого океана, а также на акватории Охотского и Японского морей. Показано, что в пределах ошибки измерения значения коэффициентов совпадают. Исключение составляют ситуации, когда измерения проводятся в зоне интенсивных температурных фронтов.

Вопрос об измерении концентрации хлорофилла «А» по спектрам флуоресценции морской воды, возбуждаемым лазерным излучением, имеет важное значение. Это обусловлено несколькими причинами и прежде всего тем, что величина флуоресцентного отклика пигментов на лазерное возбуждение может зависеть от многих факторов, в первую очередь от видового состава фитопланктона, его состояния и стадии развития, гидрологических параметров морской воды и т.д. [1–3]. При использовании лазерного флуоресцентного метода концентрация хлорофилла «А» определяется отношением сигналов флуоресценции и комбинационного рассеяния воды [4]. Однако к настоящему времени в литературе практически отсутствуют работы по определению калибровочных коэффициентов при переходе от относительных значений интенсивности линии флуоресценции хлорофилла «А» к абсолютным значениям концентраций для различных типов морских вод. Только в работе [1] приведены значения переходного коэффициента от относительных величин интенсивности флуоресценции к концентрации хлорофилла «А», полученные для некоторых океанических районов. Это объясняется тем, что стандартные измерения концентрации хлорофилла «А» очень трудоемки и неоперативны, а проведение подобных калибровок требует большого числа измерений.

Несмотря на то что для решения большинства задач с помощью метода лазерной флуорометрии достаточно исследовать относительные изменения сигналов флуоресценции, потребность в проведении калибровочных работ велика, так как это значительно расширяет область применения такого метода [5, 6]. В настоящее время, например, происходит интенсивное использование биоресурсов, эффективный контроль за которыми требует оперативных методов измерения абсолютных концентраций хлорофилла «А», одним из них является метод лазерной флуорометрии.

В настоящей статье приведены экспериментальные данные, полученные в нескольких научно-исследовательских рейсах, где наряду с измерениями интенсивности линии флуоресценции хлорофилла «А» проводились стандартные определения его концентрации. Данные получены

в рейсах 1992 и 1993 гг. на научно-исследовательском судне «Академик Лаврентьев» в Охотском море, на парусном учебном судне (ПУС) «Надежда» в 1997 – 1998 гг. в открытых водах Японского и Охотского морей. В общей сложности во всех рейсах было выполнено около 30 калибровок. Данные последнего рейса представляют наибольший интерес с точки зрения анализа возможной зависимости переходного калибровочного коэффициента от различных факторов. Шельфовые воды Охотского моря отличаются большим разнообразием видового состава фитопланктона, значительной изменчивостью гидрологических параметров и концентрации фитопланктона на различных пространственных масштабах.

Во всех случаях для проведения работ нами использовался проточный лазерный флуорометр, который позволял проводить измерения спектров флуоресценции морской воды по ходу судна, одновременно с измерениями температуры и солености морской воды. Более подробное описание флуорометра можно найти, например, в работе [7].

В случае линейной зависимости между концентрацией фитопланктона и интенсивностью флуоресценции хлорофилла «А» под воздействием лазерного излучения соотношение между ними выражается простой формулой [8]:

$$C_{chl} = K \Phi,$$

где C_{chl} – концентрация хлорофилла «А»; Φ – нормированная интенсивность сигнала флуоресценции хлорофилла «А» (в нашем случае нормировка осуществлялась на интенсивность линии комбинационного рассеяния воды); K – калибровочная константа, которая определяется из калибровки на стандартные методы измерения концентрации хлорофилла «А».

На рис. 1 приведен маршрут экспедиции на ПУС «Надежда» в 2000 г. Точками на линиях, обозначающих маршрут судна, показаны места отбора проб морской воды для проведения стандартных измерений концентрации хлорофилла «А».

Контактные измерения были выполнены с использованием стандартной методики, в которой исследовались спектры поглощения образцов фитопланктона, полученных при фильтрации проб воды, взятых после проточной кюветы лазерного флуорометра. Ошибка измерения концентрации хлорофилла «А» по данной методике изменяется в пределах от 10 до 50% в зависимости от величины концентрации в пробе [9].

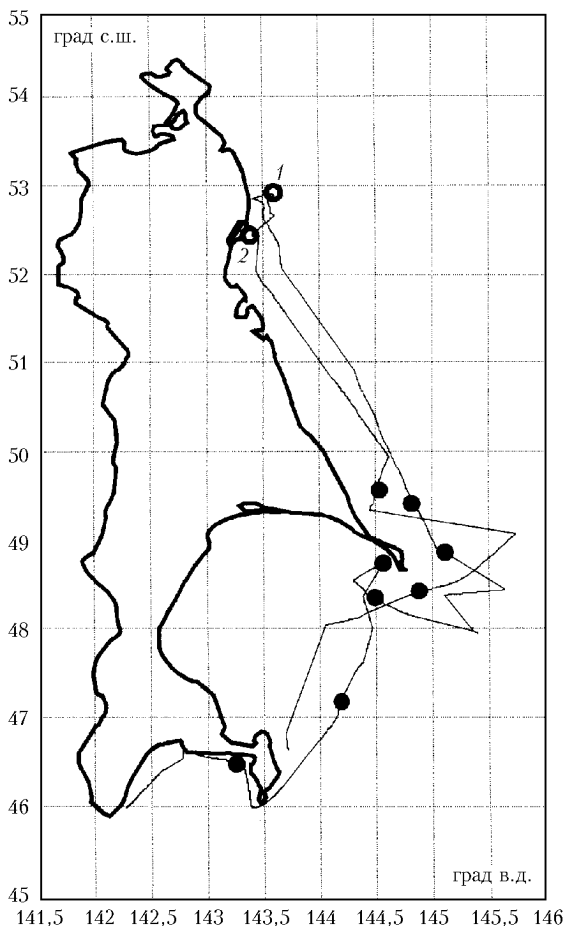


Рис. 1. Схема маршрута

На рис. 2 приведены результаты калибровок, выполненных в ходе рейса вдоль Охотского шельфа о. Сахалин в 2000 г. По вертикальной оси на рис. 2 приведены значения концентрации хлорофилла «А», полученные стандартными измерениями, по горизонтальной оси – нормированная интенсивность сигнала флуоресценции. Вертикальные и горизонтальные интервалы в каждом измерении обозначают абсолютные погрешности. Сплошной линией обозначена регрессионная прямая, полученная методом наименьших квадратов, с использованием процедуры «скользящий контроль». Эта процедура позволяет селективно исключать точки данных, наиболее уклоняющиеся от линии регрессии, и дать оценку погрешности регрессии и ее параметров на множестве подвыборок, сгенерированных из исходных данных исключением из нее одной, двух и более точек [10]. Необходимость использования процедуры «скользящий контроль» связана с малостью исходной выборки данных, она дает устойчивые оценки в условиях, когда неизвестен закон

распределения исходных данных. После исключения точек 1 и 2 (см. рис. 2), наиболее уклонившихся от линии регрессии, получено значение регрессионного коэффициента K (коэффициента перехода от относительной интенсивности флуоресценции к абсолютным значениям концентрации хлорофилла «А»), равное $(2,3 \pm 0,3)$ мкг/л. Особенности гидрологических ситуаций, в которых наблюдались отклонения, подобные отклонениям точек 1 и 2, рассмотрены ниже.

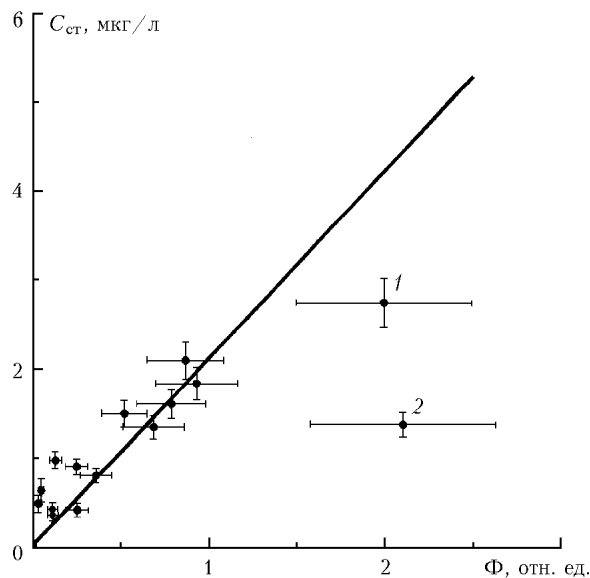


Рис. 2. Калибровка относительного сигнала флуоресценции на стандартные методы измерения

Очевидно, что объем данных не позволяет получить статистически значимые оценки вторых моментов, тем не менее приведем некоторые из них для интерпретации полученных результатов. Коэффициент корреляции между данными, приведенными на рис. 2, равен 0,8. Это довольно высокий коэффициент при косвенном определении концентрации хлорофилла «А» с использованием оптических методов.

Диапазон изменения температуры при проведении калибровочных измерений во время рейса 2000 г. составил 9–16,6 °С. Коэффициент корреляции между температурой, при которой были проведены калибровочные измерения, и значениями калибровочного коэффициента K , полученного в каждом измерении, равен 0,46, что говорит о независимости (в рамках наших погрешностей и температурного диапазона) коэффициента K от температуры или, другими словами, зависимости квантового выхода флуоресценции от температуры в указанном диапазоне. К этому же выводу приводит нас результат анализа значений K , проведенного с использованием разделения выборки данных на две подвыборки одинакового объема, для температур менее и более 12 °С. В обеих выборках значения переходных коэффициентов равны в пределах ошибки измерения.

Рассмотрим более подробно те ситуации, при которых были проведены калибровки в точках 1 и 2 на рис. 2 (соответствующие им положения станций указаны на рис. 1 полыми кружками), здесь значение коэффициента K существенно отличалось (выходило за пределы погрешностей измерения) от приведенных выше значений. Оба измерения были сделаны в зоне интенсивных тем-

пературных фронтов. На рис. 3 приведены примеры этих реализаций. Значения относительной интенсивности сигнала флуоресценции хлорофилла «А» измерялись одновременно с температурой.

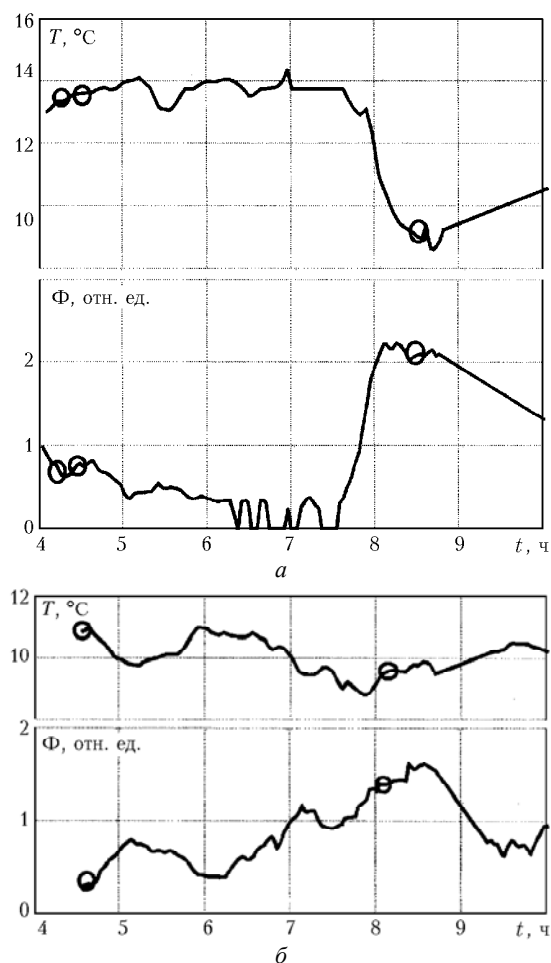


Рис. 3. Изменение сигналов флуоресценции во фронтальных зонах

Полыми кружками на рис. 3 отмечено время, в которое проводился отбор проб морской воды для стандартных измерений концентрации хлорофилла «А». Два измерения (в 4.26 и 4.55 местного времени, рис. 3,а) выполнены перед холодным фронтом и одно измерение в 8.26 за фронтом, скачок температуры на трассе длиной около 5 миль составил 4,5 °С. Это самый значительный температурный фронт, в течение которого нам удалось провести калибровку на стандартный метод измерения хлорофилла «А». Значение коэффициента K для случая, показанного на рис. 3,а, равно $(0,6 \pm 0,2)$ мкг/л, для случая рис. 3,б – $(1,4 \pm 0,4)$ мкг/л. Из рис. 3 видно, что коэффициент K может сложным образом зависеть от ряда трудно контролируемых параметров, основными среди которых являются, на наш взгляд, видовой состав и состояние планктонного сообщества. Определение видовой состава планктона в подобных экспериментах крайне затруднительно, поскольку этот процесс чрезвычайно трудоемкий и требует значительных затрат для набора соответствующей статистики. Что касается состояния планктонного сообщества, то методы его контроля только начинают разрабатываться. В

данном случае холодный фронт связан с локальным апвеллингом и выносом на поверхность холодной воды, обогащенной детритами и растворенным кислородом, что создает весьма благоприятные условия для развития фитопланктона. Это может служить причиной изменения реакции пигментов на лазерное возбуждение, по сравнению с планктоном, который исследовался в других районах.

Интересно отметить, что значение K , полученное в пределах ошибки, совпадает со значением переходного коэффициента $(2,6 \pm 0,3)$ мкг/л, приведенным в работе [1]. Значение переходного коэффициента, по данным рейса 1992 и 1993 гг. в южной части Охотского моря, равно $(1,9 \pm 0,4)$ мкг/л. В открытых водах Тихого океана, по данным рейса в 1997 – 1998 гг., $K = (2,9 \pm 0,6)$ мкг/л, что также в пределах ошибки совпадает с вышеприведенными значениями.

Коэффициент связи между концентрацией хлорофилла и относительным сигналом флуоресценции определяется такими величинами, как аппаратные константы, квантовая эффективность сигнала флуоресценции, и не носит универсального характера. Он может различаться в зависимости от типа используемых флуорометров, а также от района и сезона измерений. К сожалению, описание эксперимента в работе [1] не позволяет провести сравнение экспериментальных схем флуорометров, чтобы утверждать, что совпадение наших результатов со значением коэффициента из [1] не является случайным. Приведенные оценки скорее дают диапазон (масштаб) коэффициента для флуорометров, подобных использованному нами [7]. И более важным, на наш взгляд, является то, что калибровочный коэффициент остался практически неизменным в различных районах океана, где нам удалось провести калибровки. Это позволяет утверждать, что все вариации, связанные с отличием видовой состава и зависимостью квантового выхода флуоресценции от гидрологических параметров, лежат в пределах ошибки измерения в тех конкретных гидрофизических ситуациях, которые имели место во время экспедиций.

Однако надо иметь в виду, что статистика измерений явно недостаточна (по числу измерений и особенно по диапазону гидрологических параметров морской воды, разнообразию видовой состава планктона и т.д.) для того, чтобы обобщить вышеприведенный результат. Об этом говорит и та ситуация, которую мы наблюдали на двух интенсивных температурных фронтах, где величины коэффициента изменялись значительным образом.

Работа выполнена при поддержке гранта № С0148 ФЦП «Интеграция».

1. *Оптика океана* / Под ред. А.С. Мониной. М.: Наука, 1983. 205 с.
2. *Spinrad R.W., Carder K.L., Perry M.J.* Ocean Optics. New York: Oxford University Press, 1994. 283 p.
3. *Карбышев Г.С.* Флуоресцентные методы в исследованиях и освоении океана // *Океанология*. 1996. Т. 36. № 2. С. 165–172.
4. *Фадеев В.В., Демидов А.А., Клышко Д.Н. и др.* Применение лазерной спектроскопии для определения пигментов морского фитопланктона // *Труды Института океанологии*. 1980. Т. 90. С. 219–234.
5. *Гольдин Ю.А., Евдошенко М.А.* Исследования пространственной изменчивости гидрооптических характеристик во фронтальных зонах // *Океанология*. 1986. Т. 26. Вып. 5. С. 761–762.
6. *Бункин А.Ф., Суrowегин А.Л.* Дистанционное определение концентрации хлорофилла методом лазерной флуориметрии // *Океанология*. 1986. Т. 26. Вып. 3. С. 532–536.

7. Букин О.А., Павлов А.Н., Майор А.Ю., Константинов О.Г., Пермяков М.С., Малеев А.В. Некоторые результаты сравнения концентраций хлорофилла «А», полученных при дистанционном зондировании цвета моря с использованием различных двухполосных алгоритмов // Оптика атмосферы и океана. 1999. Т. 12. № 8. С. 715.
8. Фадеева В.В. Дистанционное лазерное зондирование фотосинтезирующих организмов // Квантовая электроника. 1978. Т. 5. № 10. С. 2221–2226.
9. ГОСТ 17.1.04.02-90. М.: Изд-во стандартов, 1990.
10. Алгоритмы и программы восстановления зависимостей / Под ред. В.Н. Вапника. М.: Наука, 1984. 816 с.

O.A. Bukin, M.S. Permyakov, A.Yu. Maior, S.G. Sagalaev, E.A. Lipilina, V.A. Khovanets. To the problem of calibration of the laser fluorometry method at measurement of the chlorophyll «A» concentration.

The values of the calibration coefficient for measurement of absolute quantities of chlorophyll «A» concentration by fluorometer are presented in this paper. It is shown that these values are equal in the limits of the experimental errors for different regions of the Pacific, Japan and Okhotsk seas, except for the regions, where the intense temperature fronts were observed. In such situation the calibration coefficients significantly differ.