

Сравнительный анализ спектроскопических методов дистанционной диагностики биоаэрозоля

М.М. Макогон*

*Институт оптики атмосферы им. В.Е. Зуева СО РАН
634021, г. Томск, пл. Академика Зуева, 1*

Поступила в редакцию 5.02.2010 г.

Кратко изложена суть физических процессов, которые могут быть использованы для дистанционной диагностики биоаэрозоля, оценена чувствительность измерений на основе спектроскопической информации о ряде биоаэрозолей, приведены некоторые показательные результаты. Сделан вывод о перспективах и возможностях дистанционного определения качественного состава биоаэрозолей и их количественного содержания в атмосфере. Рассмотрение ограничено видимым и ближним УФ-диапазонами спектра.

Ключевые слова: биоаэрозоль, флуоресценция, комбинационное рассеяние, эмиссионная спектроскопия, лидар; bioaerosol, fluorescence, Raman, LIBS, lidar.

Введение

Оптические спектры флуоресценции, комбинационного рассеяния (КР) и эмиссионные спектры, возбуждаемые лазерным излучением, служат основой дистанционных методов контроля газовой-аэрозольных и жидких сред различного происхождения. Эффективность указанных физических явлений (что выражается, в конечном счете, в дальности действия, селективности и чувствительности соответствующих устройств) зависит от свойств определяемых веществ, особенностей формирования сигнала при атмосферных условиях и «правильности» аппаратуры, «учитывающей» эти свойства и особенности. Немаловажную роль играет и влияние атмосферы на работу дистанционных спектральных приборов, не сводящееся к тривиальному ослаблению зондирующего и регистрируемого излучений. Разнообразие веществ и условий измерений в каждом конкретном случае требует выбора и детальной проработки физического явления, механизма и средства, наиболее адекватно отвечающих формулируемым требованиям.

Ниже проведено сопоставление трех методов дистанционной диагностики биоаэрозоля с целью обоснования на основе имеющейся спектроскопической информации их возможной чувствительности и дальности действия при определении качественного состава биоаэрозолей и их количественного содержания в атмосфере. Рассмотрение ограничено видимым и ближним УФ-диапазонами спектра.

Существо рассматриваемых физических явлений

Известно, что биологические клетки содержат очень сложную смесь органических и неорганических

компонентов. Внутри клетки находятся большое количество биологических молекул типа белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов и т.д. и разнообразные электролиты. Конституция и устройство этих биомолекул в живущей клетке зависят от ее физиологического состояния и могут изменяться в присутствии внешних химических или под действием физических агентов — температуры и/или света. Важно отметить, что природа биохимических свойств и процессов может изменяться от одной разновидности клетки (или штамма) к другой.

Когда излучение падает на среду (например, на биологическую клетку, ткань или микроорганизм), оно поглощается или рассеивается, причем рассеяние может быть как упругим, так и неупругим (комбинационное рассеяние). Поглощение наиболее вероятно, если длина волны находится в инфракрасном (ИК) или в ультрафиолетовом (УФ) диапазонах спектра. ИК-поглощение приводит к возбуждению колебательных мод молекул, в то время как УФ-поглощение вызывает возбуждение электронного перехода, которое часто сопровождается эмиссией (флуоресценцией). При очень высокой плотности мощности падающего излучения происходят разрушение материала и возбуждение эмиссионных спектров.

Комбинационное рассеяние света

Классическое спонтанное КР имеет богатую историю исследования биохимических и биологических процессов, начавшуюся в 1974 г. [1]. Это мощный аналитический инструмент, позволяющий исследовать как качественный, так и количественный состав биологических образцов. Однако низкая эффективность преобразования энергии излучения существенно ограничивает применимость спонтанного КР для дистанционного спектроскопического контроля объектов. Для увеличения сигнала КР наиболее часто применяются две разновидности метода — резонансное

* Михаил Мордухович Макогон (mmm@asd.iao.ru).

КР и КР, усиленное поверхностью [2]. В обоих случаях имеет место увеличение сигналов на несколько порядков величины и может также подавляться мешающая флуоресценция. В дистанционных измерениях может быть использована только первая методика.

Спектроскопия КР обычно выполняется при возбуждении излучением зеленого и красного лазеров или лазера ближнего инфракрасного диапазона. Длины волн возбуждения в этих случаях лежат ниже первых электронных переходов большинства молекул, и поскольку они далеки от электронного поглощения, флуоресценция не возбуждается. Однако некоторые вещества имеют способность рассеивать лазерную радиацию со значительно увеличенной интенсивностью (до 10^6 раз большей, чем при спонтанном КР), если частота возбуждения лазера близка к частоте, требуемой для электронного возбуждения — эта разновидность процесса получила название резонансного КР.

Зависимость величины сигнала КР ряда биомолекул от длины волны возбуждения иллюстрируется табл. 1 (фрагмент из [3]).

Таблица 1
Сечения линий КР ряда аминокислот, $\text{см}^2/\text{ср} \cdot 10^{28}$

Аминокислота	Линия КР, см^{-1}	Длина волны возбуждения, нм				
		200	218	223	229	240
Фенилаланин	1000	225	188	38	11	14
	1586	224	94	10	2	—
	1606	229	274	51	11	15
Тирозин	1180	800	194	163	161	17
	1210	2297	36	53	62	7
	1262	2316	42	23	—	—
	1601	1911	195	138	94	8
	1617	2880	278	369	324	33
Триптофан	762	130	2106	2103	556	21
	880	68	329	580	190	7
	1016	129	1518	1705	544	23
	1238	171	250	354	79	—
	1342	—	181	295	283	109
	1361	93	358	403	134	7
	1555	166	1419	1231	511	22
	1622	248	384	213	172	37

Резонансное КР белков, аминокислот, нуклеиновых кислот и целых бактерий имеет место при возбуждении в УФ-диапазоне [4–12]. Для использования резонансного КР не требуется никакого специального оборудования, отличного от обычно применяемого в КР-спектроскопии. Вместе с тем в качестве источника возбуждения более удобно использовать перестраиваемый лазер, который позволяет регулировать энергию возбуждения в области электронного поглощения.

Флуоресценция

Процесс флуоресценции состоит из ряда пошаговых переходов. Первый шаг — поглощение падающего фотона, который вызывает переход из основного электронного состояния в возбужденное. Второй шаг — безызлучательный переход с верхних

вращательно-колебательных уровней на более низкие вращательно-колебательные уровни того же самого электронного состояния. Третий и заключительный шаг — излучательный переход в основное электронное состояние. Переходы происходят между реальными колебательно-вращательными уровнями энергий различных электронных состояний, поэтому частота и форма спектра флуоресценции задаются колебательно-вращательными уровнями энергий верхнего и основного электронных состояний, определенных структурой рассеивающей молекулы. Заново испускаемая длина волны сдвинута (как правило, достаточно сильно) в красную область относительно упруго рассеянного света.

При очень низких давлениях (т.е. при отсутствии столкновений) вероятность излучения из возбужденного состояния постоянна, поэтому интенсивность затухает экспоненциально с характерным временем порядка наносекунд. Однако в общем случае возбужденные молекулы или атомы испытывают соударения друг с другом и с частицами другого вида до того, как возбуждение снимается переизлучением фотона. Тушение за счет соударений уменьшает интенсивность флуоресценции атомов или молекул и сокращает время ее затухания; этот фактор всегда проявляется при атмосферных измерениях.

Методы флуоресцентной спектроскопии *in situ* много лет используются в аналитической фотохимии и фотобиологии [13]. Впервые дистанционное лазерное зондирование на основе широкополосной лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) применялось для контроля содержания хлорофилла и фитопланктона в поверхностном слое океана [14]. Однако уже первые попытки применения флуоресцентных методов для диагностики биогенного аэрозоля в тропосфере [15] выявили принципиальные трудности, связанные с большой скоростью тушения флуоресценции. Это дало основание автору известной монографии [16] сделать заключение о неперспективности использования флуоресцентных лидаров для дистанционного зондирования малых аэрозольных и газовых примесей в атмосфере.

Поскольку спектр флуоресценции микроорганизмов слабо структурирован, был сделан вывод [17] о сложности (и даже невозможности) идентифицировать биоагент. Более поздние данные, однако, показали, что совместное использование информации о спектрах флуоресценции, возбуждаемой на нескольких длинах волн в УФ- и видимом диапазонах, и о пространственной структуре рассеянного излучения [18, 19] позволяет распознать различные бактерии и дифференцировать растущие клетки от спор.

Для того чтобы отличить биоаэрозоли от небиоаэрозолей, было создано много доступных оптических систем локального действия [20–35], основанных на регистрации флуоресценции от индивидуальных частиц аэрозоля в воздухе, прокачиваемом через прибор. Эти инструменты могут работать непрерывно, *in situ* и в режиме реального времени, чтобы обеспечить своевременное предупреждение о наличии в воздухе потенциально опасных для жизни частиц аэрозоля среди обширного числа небоиологических

частиц. Имеющиеся сегодня инструменты способны анализировать несколько сотен литров воздуха в минуту при различных условиях окружающей среды.

Метод лазерной искровой спектроскопии

Этот метод, именуемый в англоязычной литературе как laser induced breakdown spectroscopy (LIBS), представляет собой разновидность атомного эмиссионного спектрального анализа. Разложение объекта (части объекта) на атомы и возбуждение эмиссионного спектра исследуемого вещества в этом случае осуществляются за счет энергии короткого острого фокусированного лазерного импульса.

Определяемый материал (в частности, аэрозольная частица) идентифицируется по относительным интенсивностям эмиссии в определенных атомных линиях. Принципы калибровки традиционны для методик эмиссионного спектрального анализа [36]. К преимуществам LIBS следует отнести простоту экспериментальной установки, возможность одновременного исследования многих элементов, оперативность, отсутствие непосредственного контакта с анализируемым веществом и предварительной подготовки проб для анализа, проведение анализа вне зависимости от фазового состояния исследуемого вещества. Это дает возможность использовать LIBS для дистанционного анализа и получения информации в режиме реального времени. Вместе с тем в отличие от предыдущих методов требуется высокая интенсивность излучения: по данным [37, 38] лазерный пробой в аэрозольной атмосфере под действием излучения с длиной волны около 1 мкм происходит при интенсивности $I_{\text{пор}} = 10^8 - 10^9 \text{ Вт/см}^2$. Краткий исторический обзор работ по LIBS, начатых в 1980-х гг., приведен в [39].

Влияние атмосферы на дистанционное зондирование методами КР, флуоресценции и лазерной искровой спектроскопии

Лидарное уравнение, описывающее зондирование с использованием явлений комбинационного рассеяния и флуоресценции, может быть записано в стандартном виде [16]:

$$E(\lambda, R) = E_l K_0(\lambda) T(R) \xi(R) \frac{A_0}{R^2} N(R) \frac{\sigma(\lambda_l, \lambda) c \tau_d}{4\pi \cdot 2}, \quad (1)$$

где $E(\lambda, R)$ – энергия принятого лидаром излучения на длине волны λ , достигшая фотодетектора; E_l – энергия зондирующего лазерного импульса на длине волны λ_l на выходе оптической системы лидара; $K_0(\lambda)$ – функция пропускания приемной системы; $T(R)$ – пропускание атмосферы на трассе лидар–объект–лидар; $\xi(R)$ – геометрический фактор лидара; A_0 – площадь приемного объектива; R – расстояние до точки зондирования; $N(R)$ – концентрация анализируемых частиц; $\sigma(\lambda_l, \lambda)$ – сечение комбинацион-

ного рассеяния или флуоресценции анализируемой частицы; τ_d – время интегрирования детектора; c – скорость света.

Условия применимости этого уравнения:

- интенсивность облучения достаточно низкая, чтобы не принимать во внимание нелинейные эффекты и чтобы не возникало заметного обеднения концентрации молекул (или атомов) в основном состоянии;
- до облучения все молекулы (или атомы) находятся в основном состоянии;
- изменение коэффициента пропускания атмосферы в спектральной полосе $\Delta\lambda_0$ оптической приемной системы лидара мало, и его можно не учитывать;
- оптическая толщина зондируемого объекта мала.

При регистрации флуоресценции накладывается еще одно ограничение на использование лидарного уравнения в записанной форме – длительности флуоресценции не должна быть больше длительности зондирующего импульса. В противном случае надо использовать поправочные коэффициенты, учитывающие длительность и форму импульса. В большинстве случаев величина поправочных коэффициентов стремится к единице, если длительность лазерного импульса больше или равна времени жизни возбужденных лазером молекул, исследуемая среда является оптически тонкой и излучение проникает в исследуемую среду на глубину больше нескольких длин лазерного импульса [16]. При атмосферных исследованиях эти условия, как правило, выполняются, даже если требуется хорошее пространственное разрешение.

Уравнение (1) позволяет оценить величину сигнала, дальность действия или пороговую чувствительность при использовании явлений КР и флуоресценции, если известны сечения σ , определенные для условий измерений (в частности, для флуоресценции учтено тушение). Для не очень большого числа биообъектов (молекул, биоаэрозоля) такая информация имеется.

За пороговое значение концентрации $N_{\text{пор}}$ определяемого объекта примем такую концентрацию, при которой на один посылаемый лазерный импульс регистрируется один фотоэлектрон:

$$N_{\text{пор}} = \frac{1}{\eta} \frac{h\nu}{E_l} \frac{1}{K_0(\lambda) T(R) \xi(R)} \frac{R^2}{A_0} \frac{4\pi}{\sigma(\lambda_l, \lambda)} \frac{2}{c\tau_d}, \quad (2)$$

где η – квантовая эффективность фотокатода; h – постоянная Планка; ν – частота излучения. Значение $N_{\text{пор}}$ становится больше при наличии шумов (в том числе фонового излучения) и может быть уменьшено путем накопления сигнала.

Оценить таким же образом дальное действие систем, основанных на методе лазерной искровой спектроскопии, не представляется возможным из-за отсутствия информации о величинах сечений процесса, что связано со сложностью процесса и его зависимостью от большого числа параметров [37]. Но эту оценку можно сделать, исходя из анализа возможности обеспечения на объекте необходимой интенсивности лазерного излучения.

Для однородной трассы эффективный радиус полностью когерентного гауссова пучка в турбулентной атмосфере a_r определяется выражением [40]:

$$a_r^2 = a^2 \left[\left(1 - \frac{R}{F} \right)^2 + \Omega^{-2} \left(1 + \frac{4a^2}{3\rho_n^2} \right) \right].$$

Здесь a – эффективный радиус гауссова пучка на выходной апертуре; F – радиус кривизны волнового фронта на выходной апертуре; $\Omega = ka^2/R$; $k = 2\pi/\lambda$ – волновое число; $\rho_n = (1,45C_n^2 k^2 R)^{-3/5}$; C_n^2 – структурная характеристика флуктуаций показателя преломления воздуха. Результаты расчета интенсивности сфокусированного излучения для $R = F$, энергии лазерного импульса 0,3 Дж при длительности 10 нс и для трех значений C_n^2 в условиях, определенных в [40] как наилучшие ($C_n^2 = 5,2 \cdot 10^{-16} \text{ м}^{-2/3}$), средние ($7,21 \cdot 10^{-15}$) и наихудшие ($1,0 \cdot 10^{-13}$), представлены на рис. 1.

Видно, что турбулентность сильнее влияет на пучок с большим начальным диаметром, а его уменьшение приводит к более быстрому спаду интенсивности излучения с ростом дальности, но меньшей зависимости от турбулентности. Ситуация $R = F$ подразумевает, что ведется зондирование поверхности макроскопического объекта, расположенного на определенном (равном F) расстоянии от лидара.

Если это условие не соблюдается, то интенсивность излучения сильно зависит от дальности зондирования и зона высокой плотности мощности составляет всего несколько метров (рис. 2).

Заметим, что продукты разложения обследуемого материала экранируют зондирующее излучение [37] и дополнительно уменьшают контролируемую зону.

Для атмосферных применений метода лазерной искровой спектроскопии необходимо, чтобы высокая интенсивность имела место на некоторой дистанции, составляющей заметную часть от дальности фокусировки. Оценим эту дистанцию из условия, что интенсивность на ее концах составляет половину от максимальной. Максимальная интенсивность достигается в точке фокусировки, в которой квадрат радиуса пучка без учета турбулентности равен $a_{r,\min}^2 = F^2 \lambda^2 / (4\pi^2 a^2)$. Расстояния до ближнего и дальнего (от лидара) концов искомой дистанции находятся из уравнения

$$a^2 \left[\left(1 - \frac{R}{F} \right)^2 + \frac{R^2 \lambda^2}{4\pi^2 a^4} \right] = 2 \frac{F^2 \lambda^2}{4\pi^2 a^2}$$

и равны

$$R_{1,2} = F \left(1 \pm \frac{F\lambda}{2\pi a^2} \sqrt{1 + \frac{F^2 \lambda^2}{2\pi^2 a^4}} \right) / \left(1 + \frac{F^2 \lambda^2}{4\pi^2 a^4} \right).$$

Соответственно длина этой дистанции («глубина сцены»)

$$\Delta R = R_1 - R_2 = \frac{F^2 \lambda}{\pi a^2} \left(\sqrt{1 + \frac{F^2 \lambda^2}{2\pi^2 a^4}} \right) / \left(1 + \frac{F^2 \lambda^2}{4\pi^2 a^4} \right).$$

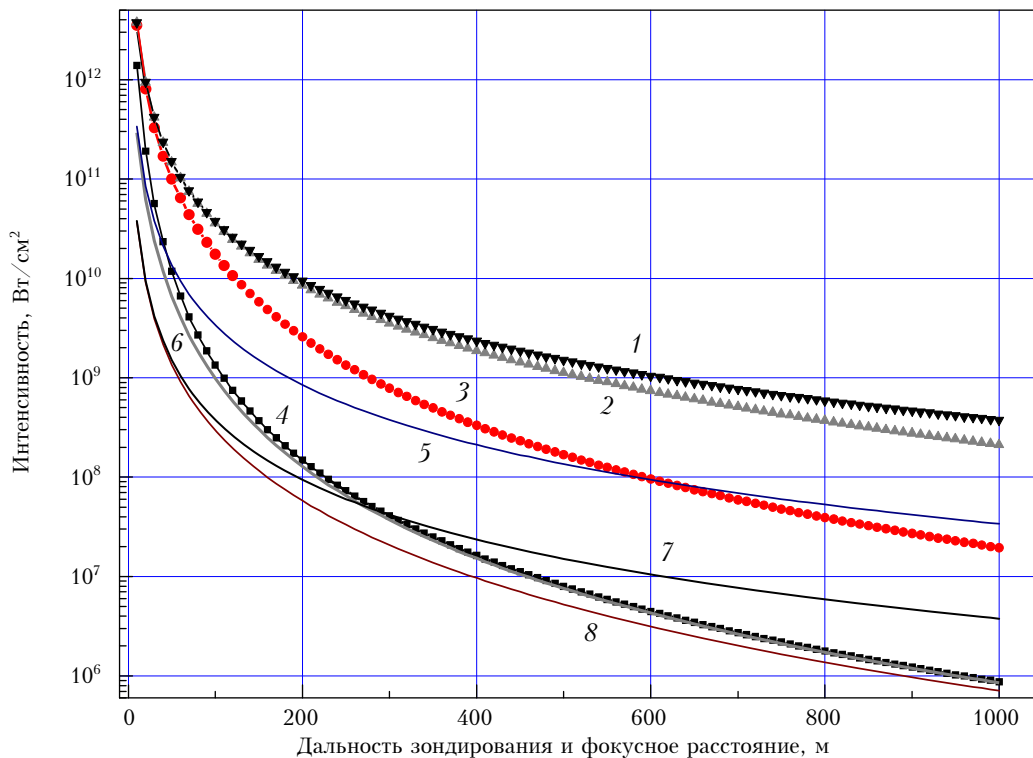


Рис. 1. Интенсивность излучения сфокусированного пучка в турбулентной атмосфере при $R = F$: кривые 1–4 – $a = 0,1$ м; 5, 6 – $a = 0,03$ м; 7, 8 – $a = 0,01$ м; 1, 5, 7 – турбулентность отсутствует; 2 – $C_n^2 = 5,2 \cdot 10^{-16} \text{ м}^{-2/3}$; 3 – $C_n^2 = 7,21 \cdot 10^{-15} \text{ м}^{-2/3}$; 4, 6, 8 – $C_n^2 = 1,0 \cdot 10^{-13} \text{ м}^{-2/3}$

Таблица 2

Необходимая минимальная мощность излучения W и ее зависимость от турбулентности

ΔR , м	W , МВт	E , Дж	F , м	a , см	Поправочный коэффициент для C_n^2	
					$7,21 \cdot 10^{-15} \text{ м}^{-2/3}$	$1,0 \cdot 10^{-13} \text{ м}^{-2/3}$
20	100	1	50	0,63	1,002	1,047
			100	1,26	1,018	1,432
50	250	2,5	100	0,8	1,007	1,174
			200	1,6	1,064	2,503
100	500	5	200	1,13	1,032	1,750
			300	1,69	1,125	3,935
200	1000	10	300	1,2	1,062	2,463
			500	2	1,319	8,499
			1000	4	3,934	69,92

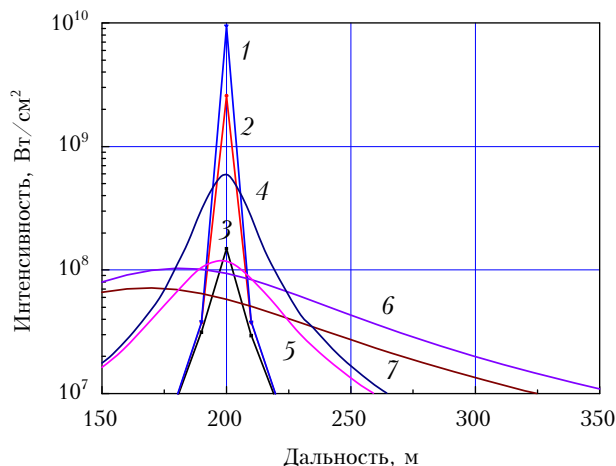


Рис. 2. Интенсивность излучения сфокусированного пучка в турбулентной атмосфере при фиксированном F : кривые 1–3 – $a = 0,1$ м; 4, 5 – $a = 0,03$ м; 6, 7 – $a = 0,01$ м; 1, 4, 6 – турбулентность отсутствует; 2 – $C_n^2 = 7,21 \cdot 10^{-15} \text{ м}^{-2/3}$; 3, 5, 7 – $C_n^2 = 1,0 \cdot 10^{-13} \text{ м}^{-2/3}$

В практически значимых случаях $\frac{F^2 \lambda^2}{2\pi^2 a^4} \ll 1$ и $\Delta R = F^2 \lambda / (\pi a^2)$. Отношение $\Delta R / a_{\text{т, min}}^2 = 4\pi / \lambda$ зависит только от длины волны, что позволяет определить минимальную мощность излучения W , обеспечивающую превышение интенсивности над пороговым значением на всем интервале ΔR :

$$W = 2I_{\text{пор}} \pi a_{\text{т, min}}^2 = \frac{1}{2} I_{\text{пор}} \Delta R \lambda.$$

Величина выходной апертуры фокусирующей системы находится по формуле $a = F \sqrt{\lambda / \pi \Delta R}$. Учет влияния турбулентности в первом приближении можно провести, умножив значение W на коэффициент, полученный из расчета данных (см. рис. 1). Результаты расчета W (табл. 2) показывают, что, во-первых, наиболее серьезным ограничивающим фактором является «глубина сцены» фокусировки и, во-вторых, дальность работы рассматриваемого метода в условиях реальной атмосферы при диагностике биоаэрозоля вряд ли превысит 50–200 м.

Зондирование фемтосекундными импульсами дает качественное улучшение эмиссионных спектров [41], но даже в случае филаментации существенно не влияет на дальность работы лидара [42].

Спектроскопическая информация, оценки чувствительности измерений

Информации о спектрах комбинационного рассеяния и флуоресценции биообъектов в литературе чрезвычайно много (сотни публикаций). Спектры КР более богаты и у разных бактерий отличаются довольно сильно, спектры флуоресценции более «похожи». Но и те и другие меняются от штамма к штамму, зависят от условий выращивания и окружения микроорганизмов и позволяют идентифицировать бактерии.

Данные о сечениях КР весьма ограничены (см. табл. 1 и 3). Сечения флуоресценции определены для более широкого набора объектов (некоторые данные приведены в табл. 3), интегральное по спектру сечение разных бактерий составляет от $3 \cdot 10^{-11}$ до $1,7 \cdot 10^{-14} \text{ см}^2 / (\text{ср} \cdot \text{частицу})$ [43–46]. Сечение флуоресценции, проинтегрированное по всей полосе, примерно в 40 раз больше указанного в табл. 3 (ширина полосы составляет 40 нм), в то время как сечение КР не изменится, так как ширина полосы линии КР меньше 1 нм.

Таблица 3

Дифференциальное сечение флуоресценции и КР для биологических материалов [47]

Объект	Детектируемая полоса	Сечение частицы, $\text{см}^2 / (\text{ср} \cdot \text{нм})$
<i>B. subtilis</i> (спора)	Флуоресценция, возбуждение на 228 нм, центр полосы 330 нм	$6,00 \cdot 10^{-14}$
Аминокислота триптофан	Флуоресценция, центр полосы 330 нм	$2,75 \cdot 10^{-21}$
Нуклеозид аденозин	Резонансное КР, возбуждение на 251 нм, полоса 1336 см^{-1}	$3,04 \cdot 10^{-22}$, вся линия
Нуклеозид гуанозин	Резонансное КР, возбуждение на 251 нм: полоса 1575 см^{-1}	$1,56 \cdot 10^{-22}$, вся линия
	полоса 1485 см^{-1}	$3,30 \cdot 10^{-22}$, вся линия
<i>B. subtilis</i> (начальная фаза роста)	Резонансное КР, возбуждение на 229 нм, полоса 1615 см^{-1}	$1,04 \cdot 10^{-16}$, вся линия

Лидары для дистанционного зондирования биоаэрозоля

Результаты расчета концентрационной чувствительности при дистанционном зондировании указанных в табл. 3 бактерии и аминокислот для параметров лидара [$E_l = 0,1$ Дж, $K_0(\lambda) = 0,2$, $T = 1$, $\xi(R) = 1$, $A_0 = 315$ см² (диаметр приемного телескопа 20 см), $\tau_d = 10$ нс, $\eta = 0,2$, регистрируется один фотон за один лазерный импульс] и дальности $R = 1$ км приведены в табл. 4. Длины волн регистрации флуоресценции 330 нм, КР 260 (аминокислоты) и 230 нм (бактерия).

Из табл. 4 следует, что чувствительность метода КР даже в случае резонансного увеличения сечения ниже чувствительности метода флуоресценции на 3–4 порядка; методом флуоресценции можно вести регистрацию бактерий на дальности в несколько километров.

Повышение селективности специальной обработкой данных

Исследования последних лет показали, что применение развитых математических методов к обработке получаемых данных позволяет существенно улучшить селективность измерений. Для дискриминации микроорганизмов по их спектрам КР, флуоресценции, LIBS и др. применяется большое число цифровых методов [48, 49], таких как:

- анализ основных компонентов (principal component analysis (PCA));
- иерархический кластерный анализ (hierarchical cluster analysis (HCA));
- анализ функций дискриминации (discriminant function analysis (DFA));
- Фурье-анализ (Fourier transfer analysis);
- метод нейронных сетей;
- фрактальный анализ (fractal analysis);
- факторный анализ (Factor Analysis (FA)) и др.

Они позволяют идентифицировать микроорганизмы и «выделять» их на фоне мешающих естественных аэрозолей, выбрать оптимальный диапазон и разрешение при регистрации спектров, оценить достоверность полученной информации. В ряде случаев дополнительный эффект дает последовательное использование 2–3 методов. Использование этих методов заметно сближает возможность идентификации бактерий, однако селективность анализа по спектрам флуоресценции все же уступает КР и LIBS.

В [50] сообщается о портативном СКР-лидаре на второй гармонике гранатового лазера, который дистанционно (на расстоянии до 66 м) записывает спектры ряда органических соединений, а на расстоянии 10 м – паров триаминотринитробензола (ТАТВ) и октогена (НМХ), входящих в состав пластиковых взрывчатых средств. И это достигается при довольно скромных параметрах излучателя (35 мДж в импульсе при частоте повторения 20 Гц) и приемного телескопа (диаметр 12,7 см).

В мобильном СКР-лидаре [51] возбуждение ведется излучением 4-й гармоники лазера на гранате (энергия в импульсе 8 мДж, частота повторения 30 Гц), диаметр приемного телескопа 40 см. При дальности около 0,5 км, спектральном разрешении 11 см⁻¹ и накоплении сигнала в течение 150 с были записаны спектры жидкого циклогексана и ацетонитрила.

Примером мобильного аэрозольно-флуоресцентного лидара, предназначенного для обнаружения биогенного аэрозоля, является лидар [52]. Испытания лидара проводили по обширной программе и, в частности, проводилось зондирование искусственного аэрозольного образования, создаваемого за счет распыления водного раствора триптофана и суспензии, содержащей бактерию *Escherichia coli*. Лидар работает под управлением компьютера (рис. 3).

В выделенной эллипсом зоне показана зависимость сигнала от дальности зондирования (ось ординат) и времени (ось абсцисс); величина сигнала выражена в условных цветах (шкала справа). Генератор аэрозоля работал в интервале времени, соответствующем номерам импульсов от 40 до 270. Испытательный туннель, в котором находилось искусственное образование, располагался на расстоянии примерно 570 м от лидара, и сигнал с этой дистанции был наиболее сильный. Под действием ветра аэрозоль выносился из туннеля и постепенно рассеивался, тем не менее прослеживался лидаром до дальности 700–750 м.

Основной технической характеристикой лидара является дальность его действия, которая для концентрации аэрозоля 100 см⁻³ составила более 30 км (аэрозольный ИК-канал) и 4 км (флуоресцентный

Таблица 4

Пороговая чувствительность дистанционных измерений

Объект	Используемое явление	Пороговая концентрация, см ⁻³ , при регистрации сигнала	
		с разрешением по спектру	с интегрированием
<i>B. subtilis</i> (спора)	Флуоресценция	$5,33 \cdot 10^2$	$1,33 \cdot 10$
Триптофан	Флуоресценция	$1,16 \cdot 10^{10}$	$2,91 \cdot 10^8$
Аденозин, гуанозин	Комбинационное рассеяние	$1,35 \cdot 10^{11}$	–
<i>B. subtilis</i> (начальная фаза роста)	Комбинационное рассеяние	$4,59 \cdot 10^5$	–

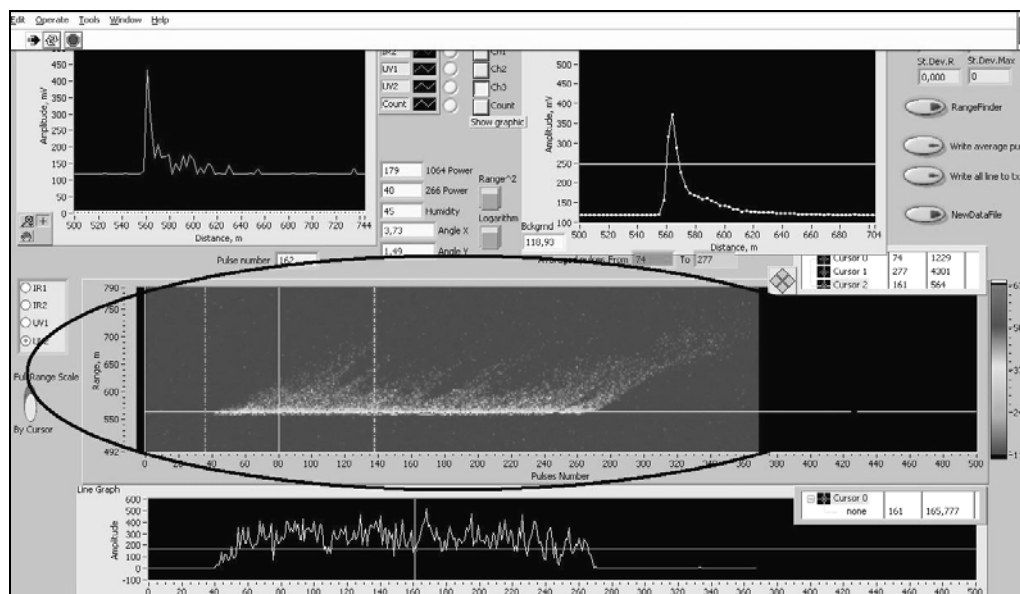


Рис. 3. Изображение монитора при проведении измерений (время интегрирования – 5 с)

УФ-канал). Аналогичные параметры имеют и другие мобильные лидары [53, 54].

Примером стационарного исследовательского лидара является канадская система Standoff Integrated Bioaerosol Active Hyperspectral Detection (SINBAND) [55]. В этой системе флуоресценция возбуждается излучением эксимерного лазера (длина волны 351 нм, частота повторения импульсов 125 Гц, средняя мощность 30 Вт), диаметр приемного телескопа равен 40 см. Максимальная дальность действия при записи спектров составила 6,5 км (время накопления 15 мин).

В [56] сообщается о портативном лидаре, работающем по методу лазерно-индуцируемой эмиссионной спектроскопии, который позволяет вести детектирование с расстояния 30 м. Были зарегистрированы LIBS-спектры пылицы ячменя, кукурузы и пшеницы. Практически все эмиссионные атомные линии совпадают, однако отношения их интенсивностей в различных объектах настолько различаются (см. табл. 5 [42]), что не представляет труда идентифицировать эти объекты.

Таблица 5

Отношение интенсивностей линий в спектрах пылицы ячменя, кукурузы и пшеницы. Длины волн линий, нм: MgI – 285,17, SiI – 288,16, AlI – 396,15, MnI – 403,31, CaI – 422,67, NaI – 588,99, CN – 388,25, C₂ – 516,41

Элемент	Ячмень	Кукуруза	Пшеница
Mg/Si	4,0 ± 1,0	13,7 ± 5,0	22 ± 11
Al/Si	1,1 ± 0,3	9,4 ± 3,5	8 ± 4
Mg/Mn	4,6 ± 1,3	2,7 ± 1,1	1,3 ± 0,5
Na/Ca	0,76 ± 0,2	1,53 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Al/Mn	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,9	0,45 ± 0,3
Si/Mn	1,2 ± 0,5	0,2 ± 0,07	0,06 ± 0,03
CN/C ₂	2,9 ± 1,5	2,5 ± 1,3	3,0 ± 1,5
Mo/CN	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,07	0,35 ± 0,12
Al/CN	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,08	0,13 ± 0,07

Заключение

Существующие методы дистанционной диагностики биообъектов по оптическим спектрам позволяют обнаруживать и в некоторых случаях устанавливать состав биоаэрозоля на расстоянии нескольких километров. Применительно к рассматриваемым объектам каждый метод имеет достоинства и определенные недостатки, их сравнение по чувствительности, селективности и требованиям к лазерному источнику позволяет сделать следующие выводы:

- методы лазерно-индуцированной флуоресценции и комбинационного рассеяния могут анализировать только аэрозоли, имеющие соответствующие спектры; применение метода эмиссионной спектроскопии не имеет ограничений такого рода;

- метод ЛИФ имеет наивысшую чувствительность и, соответственно, наибольшую дальность зондирования, характеризуется сравнительно невысокой селективностью, для контроля разных объектов в общем случае требуется лазер, перестраиваемый по длинам волн;

- метод КР позволяет использовать для возбуждения один лазерный источник, имеет самую высокую селективность, но очень низкую чувствительность; при использовании резонансного КР чувствительность возрастает (хотя остается существенно ниже, чем у ЛИФ), но требуется использовать лазер, также перестраиваемый по длинам волн;

- лазерная эмиссионная спектроскопия не требует какой-либо подготовки проб, имеет среднюю селективность и очень малую дальность действия; один лазерный источник, обеспечивающий интенсивность излучения на анализируемом объекте порядка 0,1–1 ГВт/см², возбуждает любые образцы.

1. Woodruff W.H., Spiro T.G., Gilvarg C. Raman Spectroscopy *In Vivo*: Evidence on the Structure of Dipi-

- colinate in Intact Spores of *Bacillus Megaterium* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 58. N 1. P. 197–203.
2. Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode // Chem. Phys. Lett. 1974. V. 26. N 2. P. 163–166.
 3. Chadha S., Manoharan R., Moenne-Loccoz P., Nelson W.H., Peticolas W.L., Sperry J.F. Comparison of the UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial cell walls, and ribosomes excited in the deep UV // Appl. Spectrosc. 1993. V. 47. N 1. P. 38–43.
 4. Manoharan R., Ghiamati E., Chadha S., Nelson W.H., Sperry J.F. Effect of cultural conditions of deep UV resonance Raman spectra of bacteria // Appl. Spectrosc. 1993. V. 47. N 12. P. 2145–2150.
 5. Nelson W.H., Manoharan R., Sperry J.F. UV resonance Raman studies of bacteria // Appl. Spectrosc. Rev. 1992. V. 27. N 1. P. 67–124.
 6. Ghiamati E., Manoharan R., Nelson W.H., Sperry J.F. UV resonance Raman spectra of Bacillus spores // Appl. Spectrosc. 1992. V. 46. N 2. P. 357–364.
 7. Lopez-Diez E.C., Goodacre R. Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics // Anal. Chem. 2004. V. 76. N 3. P. 585–591.
 8. Jarvis R.M., Goodacre R. Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for rapid discrimination of urinary tract infection bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 232. N 2. P. 127–132.
 9. Chadha S., Nelson W.H., Sperry J.F. Ultra-violet micro-Raman spectrograph for the detection of small numbers of bacterial cells // Rev. Sci. Instrum. 1993. V. 64. N 11. P. 3088–3093.
 10. Britton K.A., Dalterio R.A., Nelson W.H., Britt D., Sperry J.F. Ultraviolet resonance Raman spectra of Escherichia coli with 222.5–251.0 nm pulsed laser excitation // Appl. Spectrosc. 1988. V. 42. N 5. P. 782–788.
 11. Wu Q., Hamilton T., Nelson W.H., Elliott S., Sperry J.F., Wu M. UV Raman spectral intensities of *E. coli* and other bacteria excited at 228.9, 244.0 and 248.2 nm // Anal. Chem. 2001. V. 73. N 14. P. 3432–3440.
 12. Manoharan R., Ghiamati E., Chadha S., Nelson W.H., Sperry J.F. Effect of cultural conditions of deep UV resonance Raman spectra of bacteria // Appl. Spectrosc. 1993. V. 47. N 12. P. 2145–2150.
 13. Harriman A. Photophysical processes in condensed phases // Photochemistry. V. 33 / Ed. by A. Gilbert. London: The Royal Society of Chemistry, 2002. P. 13–50.
 14. Кондратьев К.Я., Поздняков Д.В. Оптические свойства природных вод и дистанционное зондирование фитопланктона. Л.: Наука, 1988. 183 с.
 15. Gelbwach J., Birnbaum M. Fluorescence of atmospheric aerosols and lidar implication // Appl. Opt. 1973. V. 12. N 10. P. 2442–2447.
 16. Межерис П. Лазерное дистанционное зондирование. М.: Мир, 1987. 550 с.
 17. Laucks M.L., Roll G., Schweiger G., Davis E.J. Physical and chemical (Raman) characterization of bioaerosols-pollen // J. Aerosol Sci. 2000. V. 31. N 3. P. 307–319.
 18. Alupoaei C.E., Garcia-Rubio L.H. Growth behavior of microorganisms using UV-Vis spectroscopy: *Escherichia coli* // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 86. N 2. P. 163–167.
 19. Alupoaei C.E., Olivares J.A., Garcia-Rubio L.H. Quantitative spectroscopy analysis of prokaryotic cells: vegetative cells and spores // Biosensor. Bioelect. 2004. V. 19. N 8. P. 893–903.
 20. Hill S.C., Pinnick R.G., Nachman P., Chen G., Chang R.K., Mayo M.W., Fernandez G.L. Aerosol-fluorescence spectrum analyzer: real-time measurement of emission spectra of airborne biological particles // Appl. Opt. 1995. V. 34. N 30. P. 7149–7155.
 21. Pan Y.L., Holler S., Chang R.K., Hill S.C., Pinnick R.G., Niles S., Bottiger J.R. Single-shot fluorescence spectra of individual micrometer-sized bio-aerosols illuminated by a 351- or a 266-nm ultraviolet laser // Opt. Lett. 1999. V. 24. N 2. P. 116–118.
 22. Hill S.C., Pinnick R.G., Niles S., Pan Y.L., Holler S., Chang R.K., Bottiger J., Chen B.T., Orr C.S., Feather G. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles // Field Anal. Chem. Tech. 1999. V. 3. N 4–5. P. 221–239.
 23. Eversole J.D., Hardgrove J.J., Cary W.K., Choulas D.P., Seaver M. Continuous, rapid biological aerosol detection with the use of UV fluorescence: Outdoor test results // Field Anal. Chem. Tech. 1999. V. 3. N 4–5. P. 249–259.
 24. Eversole J.D., Cary W.K., Scotto C.S., Pierson R., Spence M., Campillo A.J. Continuous bioaerosol monitoring using UV excitation fluorescence: Outdoor test results // Field Anal. Chem. Tech. 2001. V. 5. N 4. P. 205–212.
 25. Pan Y.L., Hartings J., Pinnick R.G., Hill S.C., Halverson J., Chang R.K. Single-particle fluorescence spectrometer for ambient aerosols // Aerosol Sci. Tech. 2003. V. 37. N 8. P. 628–639.
 26. Nachman P., Chen G., Pinnick R.G., Hill S.C., Chang R.K., Mayo M.W., Fernandez G.L. Conditional-sampling spectrograph detection system for fluorescence measurements of individual airborne biological particles // Appl. Opt. 1996. V. 35. N 7. P. 1069–1076.
 27. 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. V. 21. N 16. P. 1307–1309.
 28. 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. N 21. P. 3738–3745.
 29. Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D. Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bio-aerosols // Opt. Express. 2004. V. 12. N 19. P. 4457–4466.
 30. Cheng Y.S., Barr E.B., Fan B.J., Hargis P.J., Rader D.J., O'Hern T.J., Torczynski J.R., Tisone G.C., Preppernau B.L., Young S.A., Radloff R.J. Detection of bio-aerosols using multiwavelength UV fluorescence spectroscopy // Aerosol Sci. Tech. 1999. V. 30. N 2. P. 186–201.
 31. Hill S.C., Pinnick R.G., Nachman P. Conditional-sampling spectrograph detection system for fluorescence measurements of individual airborne biological particles. // Appl. Opt. 1996. V. 35. N 7. P. 1069–1076.
 32. Schroder K.L., Hargis P.J., Jr., Schmitt R.L., Rader D.J., Shokair I.R. Development of an unattended ground sensor for ultraviolet laser induced fluorescence detection of biological agent aerosols // Proc. SPIE. 1999. V. 3855. P. 82–91.
 33. Leblanc L., Dufour E. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence // FEMS Microbiol. Lett. 2002. V. 211. N 2. P. 147–153.
 34. Pinnick R.G., Hill S.C., Nachman P., Videen G., Chen G., Chang R.K. Aerosol fluorescence spectrum analyzer for rapid measurement of single micrometersized airborne biological particles // Aerosol Sci. Tech. 1998. V. 28. N 2. P. 95–104.
 35. Jonsson P., Kullander F., Wästerby P., Tiihonen M., Lindgren M. Detection of fluorescence spectra of individual bioaerosol particles // Proc. SPIE. 2005. V. 5990. 59900M.

36. Сухов Л.Т. Лазерный спектральный анализ. Новосибирск: Наука, 1990. 139 с.
37. Гейнц Ю.Э., Землянов А.А., Зуев В.Е., Кабанов А.М., Погодаев В.А. Нелинейная оптика атмосферного аэрозоля. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. 260 с.
38. Оптический разряд в аэрозолях / Ю.Д. Копытин, Ю.М. Сорокин, А.М. Скрипкин, Н.Н. Белов, В.И. Букатый. Новосибирск: Наука, 1990. 159 с.
39. Harmon R.S., De Lucia F.C., Munson C.A., Miziolek A.W., McNesby K.L. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) – An Emerging Field-Portable Sensor Technology for Real-Time Chemical Analysis for Military, Security and Environmental Applications // Proc. SPIE. 2005. V. 5994. 59940K.
40. Зуев В.Е., Банах В.А., Покасов В.В. Оптика турбулентной атмосферы. Л.: Гидрометеоздат, 1988. 270 с.
41. Wolf J.P. Detection and identification of bacteria in air using femtosecond spectroscopy // Analysis and Control of Ultrafast Photoinduced Reactions. Berlin; Heidelberg: Springer, 2007. P. 807–828.
42. Xu H.L., Mejean G., Liu W., Kamali Y., Daigle J.-F., Azarm A., Simard P.T., Mathieu P., Roy G., Simard J.-R., Chin S.L. Remote detection of similar biological materials using femtosecond filament-induced breakdown spectroscopy // Appl. Phys. B. 2007. V. 87. N 1. P. 151–156.
43. 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. N 4. P. 958–967.
44. Kunnil J., Sarasanandarajah S., Chacko E., Reinisch L. Fluorescence quantum efficiency of dry *Bacillus globigii* spores // Opt. Express. 2005. V. 13. N 22. P. 8969–8979.
45. Atkins J., Thomas M.E., Joseph R.I. Spectrally resolved fluorescence cross sections of BG and BT with a 266-nm pump wavelength // Proc. SPIE. 2007. V. 6554. 65540T.
46. Cabredo S., Parra A., Anzano J. Bacteria Spectra Obtained by Laser Induced Fluorescence // J. Fluoresc. 2007. V. 17. N 2. 171–180.
47. Hug W.F., Bhartia R., Taspin A., Lane A., Conrad P., Sijapati K., Reid R.D. Status of Miniature Integrated UV Resonance Fluorescence and Raman Sensors for Detection and Identification of Biochemical Warfare Agents // Proc. SPIE. 2005. V. 5994. 59940J.
48. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. В 2 т. / Под ред. Р. Кельнер, Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Виднер; Пер с англ. М.: Мир + АСТ, 2004. Т. 1. 608 с.; Т. 2. 728 с.
49. Марьянов Б.М. Избранные главы хеометрики. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 164 с.
50. Sharma S.K., Porter J.N., Misra A.K., Hubble H.W., Menon P. Portable stand-off Raman and Mie–Rayleigh lidar for cloud, aerosol, and chemical monitoring // Proc. SPIE. 2003. V. 5154. P. 1–14.
51. Wu M., Ray M., Fung K.H., Ruckman M.W., Harder D., Sedlacek A.J., III. Stand-off detection of chemicals by UV Raman spectroscopy // Appl. Spectrosc. 2000. V. 54. N 6. P. 800–806.
52. Балин Ю.С., Коханенко Г.П., Куряк А.Н., Макогон М.М., Новоселов М.М., Пономарев Ю.Н., Рышков О.А., Симонова Г.В. Мобильный аэрозольно-флуоресцентный лидар // Мат-лы XVI Междунар. симпоз. «Оптика атмосферы и океана. Физика атмосферы». Томск, 12–15 октября 2009. Томск: ИОА СО РАН, 2009. С. 496–499.
53. Christesen S.D., Merrow C.N., DeSha M.S., Wong A., Wilson M.W., Butler J. UV fluorescence lidar detection of bioaerosols // Proc. SPIE. 1994. V. 2222. P. 228–237.
54. URL: http://www.fibertek.com/Projects_05_Bio.html
55. Buteau S., Stadnyk L., Rowsell S., Simard J.-R., Ho J., Déry B., McFee J. Spectrally resolved Laser-Induced Fluorescence for Bioaerosols Standoff Detection // Proc. SPIE. 2007. V. 6756. 675608.
56. Kumar A., Sharma P.C. Uses of LIBS Technology in Biological Media // Proc. SPIE. 2006. V. 6377. 637701.

M.M. Makogon. Comparative analysis of spectroscopic methods for bioaerosol remote diagnostics.

The essence of physical processes which can be used for bioaerosol remote diagnostics is briefly stated in this article. The sensitivity of measurements on a basis of spectroscopic information on a number of bioaerosols is appreciated, some indicative results are given. The conclusion about prospects and opportunities of remote adjectives of bioaerosols qualitative structure and their quantitative contents in the atmosphere is made. The discussion is limited by optical and near IR spectral ranges.