

Флуориметрия насыщения сложных органических соединений с высокой локальной концентрацией флуорофоров (на примере фитопланктона)

Д.В.Маслов, Е.Е.Остроумов, В.В.Фадеев

*Рассмотрено насыщение флуоресценции сложных органических соединений с высокой локальной концентрацией флуоресцирующих молекул (флуорофоров), когда заметный вклад в насыщение вносит синглет-синглетная аннигиляция. Для случая «прямоугольного» распределения фотонов возбуждающего лазерного импульса во времени и в пространстве получено аналитическое выражение для кривой насыщения флуоресценции. Показано, что форма кривой насыщения флуоресценции зависит от параметра Φ_0 , пропорционального концентрации флуоресцирующих молекул, и параметров A , B и α , описывающих влияние синглет-синглетной аннигиляции, просветления оптически тонкого слоя и нестационарности возбуждения соответственно. Экспериментально изучены кривые насыщения флуоресценции соединений с высокой локальной концентрацией флуоресцирующих молекул, в качестве которых использовались молекулы монокультуры диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii*. Оказалось, что форма экспериментальных кривых насыщения флуоресценции хорошо аппроксимируется полученным аналитическим выражением. Из кривых насыщения флуоресценции водоросли восстановлены значения параметра Φ_0 , пропорционального концентрации хлорофилла a , и (впервые) значения параметра A .*

Ключевые слова: флуоресценция, нелинейная флуориметрия, сложные органические соединения с высокой локальной концентрацией флуорофоров, фитопланктон.

1. Введение

При возбуждении сложных органических соединений (СОС) импульсами лазерного излучения может проявляться насыщение флуоресценции – нелинейная зависимость интенсивности флуоресценции от интенсивности возбуждения [1]. Этот эффект был достаточно хорошо изучен для случая слабо концентрированных растворов органических красителей ($c \leq 10^{-9}$ М), когда насыщение флуоресценции наступает в результате обеднения основного состояния молекул [2–6].

Однако насыщение флуоресценции проявляется по-другому, когда облучаемым объектом являются комплексы с высокой локальной концентрацией флуорофоров, такие как фотосинтезирующие организмы, в частности микроводоросли – фитопланктон (ФП). В этом случае насыщение флуоресценции вызывается еще одним эффектом – синглет-синглетной аннигиляцией, элементарный акт которой состоит в переносе энергии между двумя одинаковыми возбужденными молекулами, в результате чего одна из них переходит в основное состояние и, следовательно, вместо двух возбужденных молекул остается одна [7, 8]. В [9, 10] были предприняты первые попытки разработать подходы к определению фотофизических параметров из кривых насыщения флуоресценции таких объектов, что оказалось сложной задачей, которую не удалось тогда решить до конца. В то же

время развитие новых методов определения молекулярных фотофизических параметров (к числу которых относится метод флуориметрии насыщения) представляется весьма актуальным как для изучения структуры флуоресцирующих органических соединений [11, 12], так и для разработки новых подходов к диагностике органических соединений в различных средах, в том числе при дистанционном лазерном зондировании природных вод [13–15].

В настоящей работе сообщается о получении выражения, описывающего кривую насыщения флуоресценции сложного органического соединения с высокой локальной концентрацией флуорофора в нем в широком диапазоне изменения интенсивности возбуждающего излучения. Это выражение позволяет находить удельную ненасыщенную интенсивность флуоресценции, пропорциональную концентрации флуорофора, и параметры, определяющие степень насыщения флуоресценции и равные произведению молекулярных фотофизических параметров флуорофоров.

2. Теория

Алгоритм определения фотофизических параметров методом нелинейной флуориметрии (флуориметрии насыщения) заключается в следующем. Измеряют нелинейную зависимость числа фотонов флуоресценции N_{fl} от плотности потока фотонов F возбуждающего лазерного излучения – $N_{\text{fl}}(F)$. Следует отметить, что в эксперименте N_{fl} измеряется в относительных единицах (отсчеты фотодетектора). Для перехода к величинам, которые можно измерить в абсолютных единицах, производят нормировку числа регистрируемых квантов флуоресценции N_{fl} на некоторый реперный сигнал $N_{\text{репер}}$, линейно зависящий от плотности потока фотонов возбуж-

Д.В.Маслов, Е.Е.Остроумов, В.В.Фадеев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: maslov@lid.phys.msu.ru, ostroumov@lid.phys.msu.ru, fadееv@lid.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 30 июня 2005 г., после доработки – 22 декабря 2005 г.

дающего излучения. В качестве реперного сигнала используют или излучение самого лазера, направленное отводной пластинкой во второй фотодетектор, или так называемый внутренний репер – сигнал комбинационного рассеяния света молекулами растворителя (например, воды) [16]. Отношение $\Phi = N_{\text{fl}}/N_{\text{репер}}$ называют флуоресцентным параметром, зависимость $N_{\text{fl}}(F)$ (или $\Phi(F)$) – кривой насыщения флуоресценции. Решив прямую задачу, т. е. рассчитав теоретически кривую насыщения флуоресценции $\Phi(F)$ исходя из принятой модели, можно решить обратную задачу – определить параметры модели.

Насыщение флуоресценции слабоконцентрированных растворов СОС было подробно рассмотрено в работах [2–6]. Для описания флуоресцентного отклика используется модель, описываемая следующим кинетическим уравнением для населенности n первого возбужденного синглетного состояния молекул СОС (в пренебрежении синглет-триплетной конверсией):

$$\frac{dn(t,r)}{dt} = F(t,r)\sigma[n_0 - n(t,r)] - \frac{n(t,r)}{\tau}. \quad (1)$$

Здесь σ – сечение поглощения молекул; τ – время жизни первого синглетного возбужденного состояния молекул; n_0 – концентрация молекул; $F(t,r)$ – плотность потока фотонов возбуждающего излучения.

Насыщение флуоресценции, вызванное обеднением основного состояния молекул СОС, в уравнении (1) описывается слагаемым $-F(t,r)\sigma n(t,r)$.

Считая, что распределение фотонов возбуждающего импульса является прямоугольным в пространстве и во времени и что исследуемый раствор является оптически тонким, можно получить следующее аналитическое выражение для кривой насыщения флуоресценции $\Phi(F)$:

$$\Phi^{-1}(F) = \Phi_0^{-1}(1 + BF) \left\{ 1 + \frac{\alpha BF}{1 + BF} \times \left[1 - \exp\left(-\frac{1 + BF}{\alpha}\right) \right] \right\}^{-1}, \quad (2)$$

где $B = \sigma\tau$ – параметр, определяющий степень обеднения основного состояния (произведение BF – отношение скорости возбуждения молекул σF к скорости их дезактивации $1/\tau$); $\alpha = \tau/\tau_p$ – параметр, характеризующий степень нестационарности возбуждения; $\Phi_0 = \lim_{F \rightarrow 0} \Phi(F)$ – ненасыщенный флуоресцентный параметр, не зависящий от F и линейно связанный с концентрацией флуоресцирующих молекул n_0 .

В квазистационарном приближении, когда длительность возбуждающего лазерного импульса τ_p намного превышает τ (т. е. в предельном случае $\alpha \rightarrow 0$), выражение (2) принимает следующий вид:

$$\Phi^{-1}(F) = \Phi_0^{-1}(1 + BF). \quad (3)$$

Полученные в квазистационарном случае кривые насыщения флуоресценции слабоконцентрированных растворов органических красителей хорошо аппроксимировались линейной функцией.

Если объектом исследования являются комплексы с высокой локальной концентрацией молекул СОС, для описания флуоресцентного отклика используется кинетическое уравнение

$$\frac{dn(t,r)}{dt} = F(t,r)\sigma[n_0 - n(t,r)] - \frac{n(t,r)}{\tau} - \gamma n^2(t,r), \quad (4)$$

в котором по сравнению с (1) появилось слагаемое $-\gamma n^2(t,r)$, описывающее дезактивацию возбужденных молекул за счет синглет-синглетной аннигиляции (γ – константа скорости синглет-синглетной аннигиляции).

Считая распределение фотонов возбуждающего импульса прямоугольным в пространстве и во времени и полагая, что исследуемый раствор является оптически тонким, получаем следующее выражение для кривой насыщения флуоресценции $\Phi(F)$:

$$\Phi^{-1}(F) = \Phi_0^{-1}AF \left\{ s \left[1 - \frac{1+v}{qv} \ln\left(\frac{1+v}{1+ve^{-q}}\right) \right] - \alpha \ln\left(1 - \frac{sw}{sw+1}\right) \right\}^{-1}, \quad (5)$$

где $C = \tau\gamma n_0$; $A = BC = \sigma\tau^2 n_0$;

$$q = \frac{1}{\alpha}[(1 + BF)^2 + 4AF]^{1/2}; \quad s = \frac{1}{2}[-(1 + BF) + \alpha q];$$

$$v = \frac{\alpha q - (BF + 1)}{\alpha q + (BF + 1)}; \quad w = \frac{1 - e^{-q}}{1 + ve^{-q}}.$$

В (5) по сравнению с (2) появился, хотя и в неявном виде, безразмерный параметр $C = \tau\gamma n_0$ – отношение максимальной скорости дезактивации возбужденных состояний γn_0 вследствие взаимодействия между возбужденными молекулами, приводящего к синглет-синглетной аннигиляции, к скорости внутримолекулярной релаксации $1/\tau$. Как следствие, параметр A , фигурирующий в явном виде в (5), отражает степень влияния синглет-синглетной аннигиляции на насыщение флуоресценции, ибо произведение AF является отношением реальной (а не максимальной) скорости дезактивации за счет синглет-синглетной аннигиляции $\gamma n = \gamma\sigma\tau F n_0$ ($\sigma\tau F n_0 = n$ в квазистационарном приближении при отсутствии просветления) к скорости линейной релаксации $1/\tau$.

Выражение (5) в отличие от (2) описывает кривую насыщения в общем случае, когда насыщение флуоресценции вызвано одновременно двумя процессами – просветлением и синглет-синглетной аннигиляцией. При отсутствии синглет-синглетной аннигиляции (т. е. в предельном случае $C = \tau\gamma n_0 \rightarrow 0$) выражение (5) переходит в (2).

В квазистационарном приближении выражение для кривой насыщения флуоресценции упрощается:

$$\Phi^{-1}(F) = \frac{1}{2}\Phi_0^{-1}\{1 + BF + [(1 + BF)^2 + 4AF]^{1/2}\}. \quad (6)$$

На рис. 1 приведены кривые насыщения, рассчитанные с помощью выражения (6) для различных значений параметра C . Из этого рисунка, а также из анализа (6) видно, что параметр C (или A) наиболее сильно влияет на зависимость $\Phi^{-1}(F)$ в диапазоне изменения F , в котором выполняется неравенство $(1 + BF)^2 \ll 4AF$.

Если $A \gg B$ ($\tau\gamma n_0 \gg 1$ или $C \gg 1$), то в данном диапазоне изменения F насыщение флуоресценции вызвано только синглет-синглетной аннигиляцией, а кривая насыщения описывается следующим приближенным выражением:

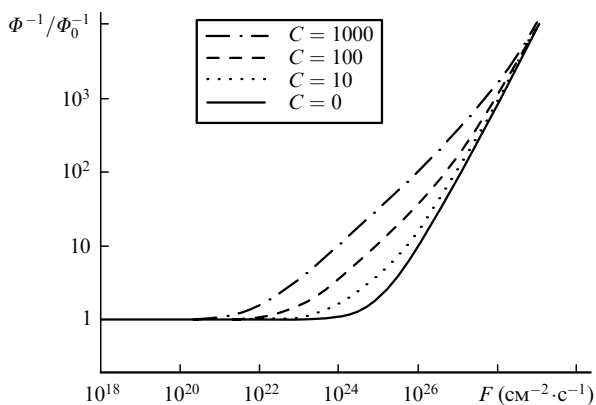


Рис.1. Кривые насыщения флуоресценции $\Phi^{-1}(F)$ при различных значениях параметра $C = \tau\gamma n_0$. При $C = 0$ для расчета зависимости $\Phi^{-1}(F)$ использовалась формула (3); $B = 10^{-25} \text{ см}^2 \cdot \text{с}$.

$$\Phi^{-1}(F) = \frac{1}{2} \Phi_0^{-1} [1 + (1 + 4AF)^{1/2}]. \quad (7)$$

С увеличением F вклад в насыщение начинает вносить просветление; при дальнейшем увеличении F , когда $(1 + BF)^2 \gg 4AF$, вклад синглет-синглетной аннигиляции становится малым, а насыщение флуоресценции обусловлено преимущественно просветлением, и для расчета зависимости $\Phi(F)$ можно пользоваться приближением (3).

Если $A \ll B$ ($\tau\gamma n_0 \ll 1$ или $C \ll 1$), то неравенство $(1 + BF)^2 \gg 4AF$ справедливо при любых F . В этом случае во всем диапазоне изменения F насыщение флуоресценции вызвано просветлением, а зависимость $\Phi(F)$ определяется выражением (3).

Типичным объектом с высокой локальной концентрацией флуоресцирующих молекул является фитопланктон. ФП – это сообщество фотосинтезирующих микроводорослей. При комнатной температуре спектр флуоресценции ФП при возбуждении излучением с $\lambda = 532 \text{ нм}$ представляет собой полосу с максимумом на длине волны 685 нм и шириной 20 нм, принадлежащую молекулам хлорофилла a (Хл a) [17].

Для описания флуоресцентного отклика ФП при 10-наносекундном лазерном возбуждении можно использовать модель, которая будет описываться кинетическим уравнением (4), если в нем изменить физический смысл параметров σ и τ [18], т.е. считать, что σ – не сечение поглощения, а сечение возбуждения молекул Хл a , учитывающее как прямое поглощения света молекулами Хл a , так и перенос возбуждения на них с молекул вспомогательных пигментов, и τ – время релаксации возбужденных состояний молекул Хл a , обусловленное внутримолекулярной дезактивацией и переносом энергии на реакционные центры.

Перечислим основные особенности ФП как объекта флуориметрии. Во-первых, т.к. время жизни флуоресценции ФП τ изменяется от $\sim 3 \times 10^{-10} \text{ с}$ (в случае открытых реакционных центров (РЦ)) до $\sim 10^{-9} \text{ с}$ (в случае закрытых РЦ) [17, 19], то при возбуждении флуоресценции 10-наносекундными лазерными импульсами справедливо квазистационарное приближение.

Во-вторых, в хлоропластах ФП локальная концентрация молекул Хл a достигает 0.1 – 1 М [20], что соответствует $n_0 \approx 6 \times 10^{19} - 6 \times 10^{20} \text{ см}^{-3}$ (при существенно меньшей средней концентрации молекул Хл a в суспензии водорослей); в данном случае справедливо неравенство $A \gg B$ или $C = \tau\gamma n_0 \gg 1$. В связи с этим в диапазоне из-

менения F , в котором выполняется неравенство $(1 + BF)^2 \ll 4AF$, зависимость $\Phi(F)$ описывается выражением (7).

Экспериментальные кривые насыщения флуоресценции ФП снимаются, как правило, в диапазоне плотностей потока фотонов $F \approx 10^{20} - 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Ограничение снизу связано с чувствительностью приемной аппаратуры, ограничение сверху – с негативным влиянием мощного лазерного излучения на клетки фитопланктона. Поскольку характерные значения параметров $\sigma \sim 10^{-16} \text{ см}^2$ [17], $\gamma \sim 10^{-8} \text{ см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$ [7], то в рабочем диапазоне изменения $F \approx 10^{20} - 10^{25} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ заведомо выполняется неравенство $(1 + BF)^2 \ll 4AF$, а зависимость $\Phi(F)$ определяется выражением (7).

На рис.2 приведена кривая насыщения флуоресценции ФП, рассчитанная по формуле (7). Из формулы (7) и рис.2 видно, что кривая насыщения флуоресценции ФП $\Phi^{-1}(F)$ в области $AF \gg 0.25$ носит корневой характер, при этом в координатах $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ имеет место линейная зависимость. Однако при уменьшении F линейность нарушается и кривая $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ постепенно выходит на стационарный уровень $\Phi^{-1}(\sqrt{F}) \approx \Phi_0^{-1}$.

Это дает основание для процедуры корректного определения ненасыщенного флуоресцентного параметра Φ_0 из кривой насыщения флуоресценции. В ранних работах, посвященных флуоресцентной диагностике ФП, где учитывался эффект насыщения флуоресценции [21], синглет-синглетная аннигиляция во внимание не принималась. Экспериментальная кривая насыщения флуоресценции снималась в небольшой области изменения F ($\sim 10^{24} \text{ см}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), и при этом зависимость $\Phi^{-1}(F)$ ошибочно аппроксимировалась прямой линией. Экстраполируя данную прямую до пересечения с осью ординат, получали значение Φ_0^* , которое, как стало ясно впоследствии [16], не равно Φ_0 . В работе [9] было замечено, что в достаточно большом диапазоне изменения плотности потока фотонов возбуждающего излучения параметр Φ_0 линейно зависит от \sqrt{F} , и предлагалось для определения Φ_0 использовать экстраполяцию прямой $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ к $F = 0$. Из выражения (7) следует, что при таком определении полученное значение Φ_0 в 2 раза меньше истинного. Для корректного же определения Φ_0 требуется снять кривую насыщения в таком диапазоне изменения F , в котором кривая насыщения выходит с линейного участка $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ на стационарный уровень $\Phi^{-1}(\sqrt{F}) \approx \Phi_0^{-1}$, и на этом участке аппроксимировать ее выражением (7).

Таким образом, в соединениях с высокой локальной концентрацией флуорофоров, такой, что скорость синг-

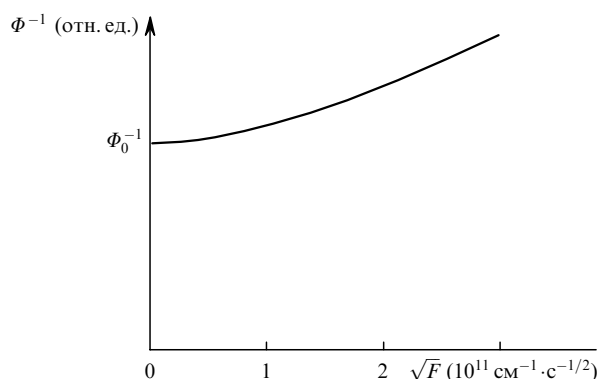


Рис.2. Кривая насыщения флуоресценции фитопланктона в представлении $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$; $A = 9 \times 10^{-24} \text{ см}^2 \cdot \text{с}$.

лет-сигнлетной аннигиляции на порядок и более превышает скорость внутримолекулярной релаксации возбужденного состояния (как, например, в клетках водорослей), кривая насыщения флуоресценции имеет сложный характер как раз в области очень низких значений F ; именно это приводило к ошибкам в определении параметра Φ_0 в предшествующих работах.

В более общем случае произвольного пространственно-временного распределения фотонов возбуждающего лазерного импульса выражение (7) для зависимости $\Phi^{-1}(F)$ усложняется. Однако принципиально характер кривой насыщения флуоресценции не изменяется: зависимость $\Phi^{-1}(F)$ можно с точностью до нескольких процентов аппроксимировать выражением, аналогичным (7):

$$\Phi^{-1}(F) = \Phi_0^{-1}[\alpha_1 + (\alpha_2 + \alpha_3 AF)^{1/2}], \quad (8)$$

где коэффициенты α_1 , α_2 и α_3 зависят главным образом от типа распределения (при этом $\alpha_1 + \sqrt{\alpha_2} = 1$) и слабо зависят от диапазона изменения F и параметров σ , τ и γn_0 . Если распределение фотонов лазерного импульса во времени подчиняется распределению «тангенс гиперболический»

$$g(\tau/\tau_p) = \begin{cases} \frac{1}{\ln 2} \frac{\tanh(2\tau/\tau_p)}{\cosh^2(\tau/\tau_p)}, & \tau \geq 0, \\ 0, & \tau < 0, \end{cases}$$

а в поперечном сечении – прямоугольному распределению, то коэффициенты α_1 , α_2 и α_3 имеют следующие приближенные значения: $\alpha_1 \approx 0.64$, $\alpha_2 \approx 0.13$, $\alpha_3 \approx 0.43$. Данный случай имел место в наших экспериментах при получении кривых насыщения флуоресценции.

3. Эксперимент

3.1. Экспериментальная установка

Схема экспериментальной установки, специально созданной нами для исследования флуоресценции объектов с высокой локальной концентрацией флуорофоров, при-

ведена на рис.3. Для возбуждения флуоресценции используется импульсный ИАГ: Nd-лазер с удвоением частоты (длина волны излучения $\lambda = 532$ нм). Основное излучение лазера с длиной волны 1064 нм подавляется фильтром СЗС-21. Лазерное излучение на $\lambda = 532$ нм имеет следующие характеристики: максимальная энергия в импульсе 10 мДж, длительность импульса по полувысоте 12 нс, частота следования импульсов 10 Гц.

Лазерное излучение проходит через ячейку Поккельса, набор ослабляющих светофильтров, линзовый телескоп и падает на диафрагму, выделяющую центральную часть пучка. Ослабляющие фильтры используются для того, чтобы установить выбранное значение максимальной плотности потока F_{\max} , относительно которого производится плавное ослабление излучения ячейкой Поккельса.

Излучение, возбуждаемое в кювете с образцом, собирается линзовым объективом и фокусируется им на вход первого канала системы регистрации, который состоит из монохроматора МУМ (решетка 1200 штр./мм, обратная линейная дисперсия 3 нм/мм) и фотоэлектронного умножителя ФЭУ-100, работающего в токовом режиме. Сигнал с анода ФЭУ после усиления и аналогоцифрового преобразования поступает в компьютер.

Развертка спектра в монохроматоре осуществляется шаговым двигателем. При снятии кривой насыщения монохроматор настраивается на длину волны максимума полосы флуоресценции (в наших экспериментах – флуоресценции Хл *a* фитопланктона, $\lambda = 685$ нм). Спектральная ширина щелей монохроматора равна 3 нм.

Второй канал регистрации служит для получения реперного сигнала, в качестве которого используется излучение лазера, направляемое отводной пластиной на фотодиод ФД-7К (работает в фотодиодном режиме). Сигнал со второго канала поступает в компьютер одновременно с основным сигналом. Эта система регистрации была разработана в нашей лаборатории и описана в [22].

Минимальная плотность потока фотонов F , при которой можно надежно регистрировать сигнал в основ-

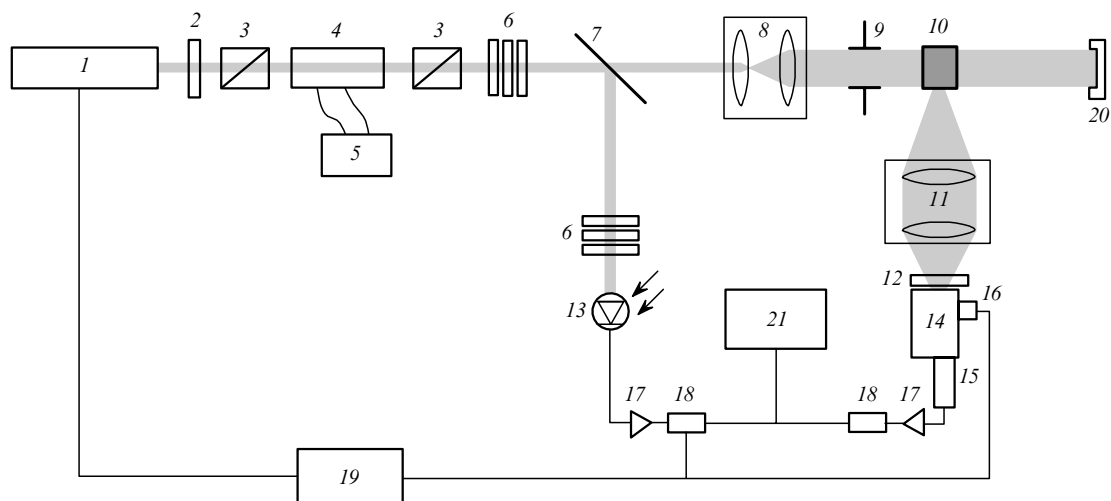


Рис.3. Схема экспериментальной установки:

1 – ИАГ: Nd-лазер с удвоением частоты (длина волны 532 нм); 2 – светофильтр СЗС-21; 3 – поляризатор (призма Глана); 4 – электрооптический элемент DKDP; 5 – источник регулируемого высокого напряжения ГИН-7; 6 – набор ослабляющих светофильтров; 7 – отводная пластинка; 8 – линзовый телескоп; 9 – диафрагма; 10 – кювета с образцом; 11 – линзовый объектив; 12 – светофильтр ОС-14; 13 – фотодиод ФД-7К; 14 – монохроматор МУМ; 15 – ФЭУ-100; 16 – шаговый двигатель; 17 – усилитель; 18 – АЦП; 19 – блок синхронизации; 20 – пироэлектрический измеритель энергии лазерных импульсов; 21 – компьютер.

ном канале, определяется средней концентрацией молекул Хл *a*, т. е. содержанием клеток ФП в регистрируемом объеме пробы. Подбирается такое содержание ФП в пробе, при котором, с одной стороны, обеспечивается надежная регистрация сигнала флуоресценции, а с другой – выполняется условие оптически тонкого слоя. Для увеличения отношения сигнал/шум применяется усреднение по 128 импульсам лазера.

3.2. Методика измерений

Перед началом измерений производили калибровку показаний (числа отсчетов) в реперном канале $N_{\text{репер}}^{\text{max}}$ при максимальной плотности потока фотонов F_{max} . Форму и длительность лазерного импульса измеряли с помощью коаксиального фотоэлемента ФК15 (полоса пропускания 1 ГГц) и скоростного осциллографа Tektronix TDS5104B (полоса пропускания 1 ГГц). Оказалось, что форма лазерного импульса с большой степенью точности аппроксимируется распределением «тангенс гиперболический» с длительностью импульса по полувысоте $\tau_p = 12$ нс.

Распределение интенсивности излучения в поперечном сечении пучка после диафрагмы было близким к прямоугольному, диаметр пучка в кювете составлял 7 мм. Энергию лазерного импульса измеряли пирозлектрическим датчиком PE25 (ORHIR, США), откалиброванным в соответствии со стандартом NIST (погрешность измерения 5 %).

После измерения F_{max} и $N_{\text{репер}}^{\text{max}}$ снимали кривую насыщения флуоресценции. Первую экспериментальную точку регистрировали при максимальной плотности потока фотонов F_{max} , затем лазерное излучение калиброванно ослабляли при помощи ячейки Поккельса. В каждой точке кривой насыщения измеряли сигналы N_{fl} и $N_{\text{репер}}$ в обоих каналах системы регистрации. Плотность потока фотонов F определяли по величине реперного сигнала: $F = F_{\text{max}}(N_{\text{репер}}/N_{\text{репер}}^{\text{max}})$. Специальными тестами было установлено отсутствие повреждений клеток водорослей в процессе эксперимента.

Для нахождения параметров Φ_0 и A из полученной экспериментально кривой насыщения $\Phi^{-1}(F)$ флуоресценции использовали следующую процедуру. Экспериментальную кривую аппроксимировали модельной функцией вида (8), где Φ_0^{-1} и A – варьируемые параметры, а коэффициенты α_1 , α_2 и α_3 равны соответственно 0.64, 0.13 и 0.43. Путем минимизации среднеквадратичного отклонения между экспериментальной и модельными кривыми (функции невязки) были найдены значения параметров Φ_0 и A .

3.3. Объект

Материалом для работы послужили монокультуры эвригалинной диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii*. Водоросль культивировали при естественном освещении на среде, приготовленной на основе морской воды с соленостью 18 ‰.

Фотосинтезирующие организмы (в том числе ФП) являются очень интересным объектом лазерно-флуоресцентных исследований не только из-за их известной роли в природе, но и по методическим соображениям. Свойство ФП изменять свои фотофизические параметры при различных воздействиях открывает широкие возможности для апробации новых методических подходов, к числу которых относится нелинейная флуориметрия. В частности известно [17, 19], что обработка ФП гербицидом

диуроном приводит к изменению времени жизни возбужденного состояния молекул Хл *a*. Такая возможность апробации развиваемого метода была использована в данной работе. При этом принимались во внимание и перспективы практического выхода – развитие метода лазерной диагностики состояния фотосинтетического аппарата водоросли путем измерения фотофизических параметров методом нелинейной флуориметрии. Данный аспект работы выходит за рамки статьи, и высказанные по этому поводу соображения носят предварительный характер.

3.4. Экспериментальные результаты и их обсуждение

На рис.4 изображены экспериментальные кривые насыщения флуоресценции $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$, полученные в экспериментах с водорослью *T. weissflogii*, находящейся в двух функциональных состояниях: после темновой адаптации и после добавления диурана.

Из рис.4 видно, что экспериментальные кривые насыщения флуоресценции имеют, в полном согласии с аналитическим выражением (8), следующие особенности: при «больших» значениях F ($AF \gg \alpha_2/\alpha_3$) флуоресцентный параметр Φ^{-1} линейно зависит от \sqrt{F} ; при уменьшении F линейность нарушается и зависимость $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ выходит на стационарный уровень $\Phi^{-1}(\sqrt{F}) \approx \Phi_0^{-1}$.

То, что параметр Φ_0 различен у кривых насыщения флуоресценции, полученных для одной и той же пробы (т. е. с одной и той же концентрацией молекул Хл *a*, рис.4), находящейся в разных состояниях, отражает изменение квантового выхода флуоресценции (сечения флуоресценции) при переходе водоросли из одного состояния в другое.

Кривая насыщения флуоресценции *T. weissflogii* в состоянии с открытыми РЦ (после предварительной темновой адаптации) изображена на рис.4 квадратами. Вычисленный для этого случая параметр $A_{\text{open}} = (1.6 \pm 0.2) \times 10^{-23}$ см²·с.

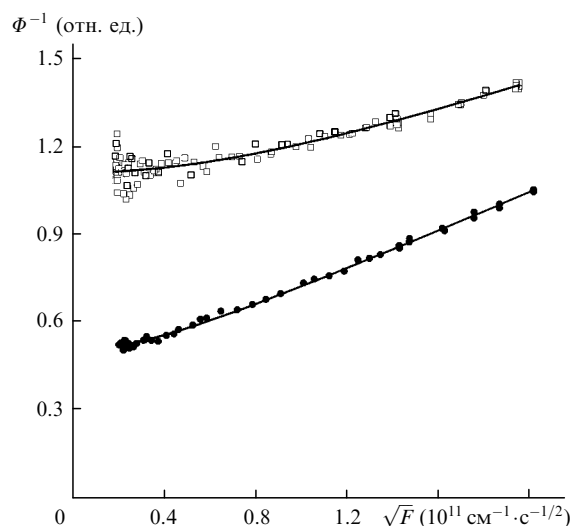


Рис.4. Кривые насыщения флуоресценции водоросли *T. weissflogii*, находящейся в двух функциональных состояниях, в представлении $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$. Квадраты – водоросль в состоянии с открытыми РЦ (после предварительной темновой адаптации), кружки – водоросль в состоянии с закрытыми РЦ (после добавления диурана и включения небольшой фоновой подсветки). Каждая точка – результат усреднения по 128 импульсам лазера. Сплошные кривые – результат аппроксимации. Диапазон изменения плотности потока фотонов F $4 \times 10^{20} - 4 \times 10^{22}$ см⁻²·с⁻¹.

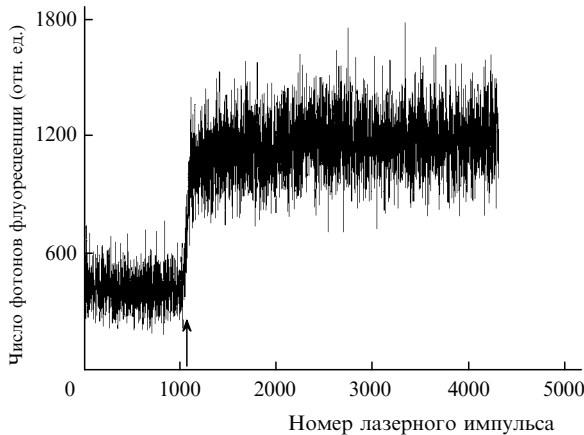


Рис.5. Изменение интенсивности флуоресценции водоросли при добавлении диурана. Стрелка – момент добавления диурана в концентрации 10^{-5} М и включения небольшой фоновой подсветки. Частота следования импульсов лазера $f = 10$ Гц, плотность потока фотонов $F \approx 7 \times 10^{20}$ см $^{-2}$ ·с $^{-1}$.

Кривая насыщения флуоресценции водоросли в состоянии с закрытыми РЦ (после добавления диурана и включения небольшой фоновой подсветки) изображена на рис.4 кружками; $A_{\text{close}} = (1.5 \pm 0.2) \times 10^{-22}$ см 2 ·с.

При добавлении диурана блокируется цепь электронного транспорта в реакционных центрах [17, 19], что приводит к возрастанию времени жизни τ возбужденных состояний молекул Хл a . Если предположить, что при добавлении диурана параметры σ и γn_0 не изменяются, то, поскольку $A = \sigma \tau^2 \gamma n_0$, увеличение параметра A в девять раз означает, что параметр τ увеличивается в три раза: $\tau_{\text{close}}/\tau_{\text{open}} = 3$.

На рис.5 представлен результат эксперимента, в котором было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции водоросли после добавления диурана в 2.5–3 раза. Плотность потока фотонов зондирующих лазерных импульсов $F \approx 7 \times 10^{20}$ см $^{-2}$ ·с $^{-1}$. При таком значении F насыщение флуоресценции практически не проявляется, и можно считать, что число фотонов флуоресценции $N_{\text{fl}} \sim \sigma \tau F$ [1]. Поэтому полученный результат означает, что время жизни τ (в предположении постоянства σ) увеличивается: $\tau_{\text{close}}/\tau_{\text{open}} \approx 2.5 - 3$. В пределах погрешностей эксперимента это значение совпадает с оценкой, сделанной на основе измерения значений параметра A методом нелинейной флуориметрии.

Ранее, в работах [9, 10], кривые насыщения флуоресценции снимались в диапазоне «больших» значений F , в котором зависимость $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ была линейной. При этом было замечено, что с уменьшением F зависимость $\Phi^{-1}(\sqrt{F})$ начинает отклоняться от линейной. Однако этот участок кривой насыщения не использовался. В то же время, как показали проведенные измерения, именно эта часть кривой насыщения флуоресценции представляется наиболее информативной в свете определения параметров A и Φ_0 .

4. Заключение

В работе теоретически исследовано насыщение флуоресценции сложных органических соединений с высокой локальной концентрацией флуорофоров. Получено аналитическое выражение для кривой насыщения флуорес-

ценции в случае возбуждения «прямоугольными» лазерными импульсами. Показано, что в квазистационарном приближении кривая насыщения флуоресценции зависит от трех параметров – Φ_0 , A и B , из которых первый пропорционален концентрации флуорофоров, а остальные два являются произведением фотофизических параметров σ , τ и γn_0 : $A = \sigma \tau^2 \gamma n_0$, $B = \sigma \tau$.

Экспериментально получены кривые насыщения флуоресценции комплексов с высокой локальной концентрацией, в качестве которых использовалась монокультура диатомовой водоросли *T. weissflogii*. Показано, что экспериментальные кривые насыщения флуоресценции близки к кривым, рассчитанным в рамках принятой модели. Из кривых насыщения определены значения параметра A водоросли *T. weissflogii*, находящейся в двух состояниях.

Экспериментально отработана предложенная процедура определения из кривой насыщения флуоресценции ненасыщенного флуоресцентного параметра Φ_0 .

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 03-02-16628).

Авторы выражают благодарность сотрудникам биологического факультета МГУ Л.В.Ильяш и С.И.Погосяну за предоставление образцов водоросли и консультации по вопросам фотосинтеза.

1. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Filippova E.M., Chubarov V.V. *Opt. Commun.*, **166**, 25 (1999).
2. Chekalyuk A.M., Fadeev V.V., Georgiev G.M., Nickolov Zh.S. *Opt. Commun.*, **38** (3), 177 (1981).
3. Фадеев В.В., Чекалюк А.М., Чубаров В.В. *ДАН СССР*, **262** (2), 338 (1982).
4. Джасим С.Я., Серов Н.Я., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. *Квантовая электроника*, **18** (4), 425 (1991).
5. Patsayeva S., Barbini R., Colao F., Fantoni R., Palucci A., Reuter R., in *Proc. 3rd EARSeL Workshop on Lidar Remote Sensing of Land and Sea* (Tallinn: EARSeL, 1998, p. 33).
6. Пацаева С.В., Южаков В.И., Варламов В.Г., Крыжановский В.И., Паперный С.Б. *Изв. РАН. Сер физич.*, **63** (6), 1138 (1999).
7. Rubin L.B., Braginskaya O.V., Isakova M.L., Efremov N.A., Paschenko V.Z. *J. Luminescence*, **29**, 399 (1984).
8. Bittner T., Irrgang K.-D., Renger G., Wasielewski M.R. *J. Phys. Chem.*, **98**, 11821 (1994).
9. Иванов И.Г., Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **15** (1), 191 (1988).
10. Бунин Д.К., Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. *Квантовая электроника*, **19** (5), 421 (1992).
11. Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии* (М.: Мир, 1986).
12. Рубин Л.Б., Пашенко В.З. *Изв. РАН. Сер физич.*, **31** (2), 192 (1982).
13. Межерис Р.М. *Лазерное дистанционное зондирование* (М.: Мир, 1987).
14. Hoge F.E., Lyon P.E., Wayne Wright C., Swift R.N., Yungel J.K. *Appl. Opt.*, **44** (14), 2857 (2005).
15. Chekalyuk A.M., Hoge F.E., Swift R.N., Yungel J.K. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5155**, 22 (2003).
16. Фадеев В.В., Бунин Д.К., Венедиктов П.С. *Квантовая электроника*, **23**, (11), 963 (1996).
17. Клейтон Р. *Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели* (М.: Мир, 1984).
18. Маслов Д.В., Фадеев В.В., Литвинов П.Н. *Вестник Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия*, № 1, 34 (2002).
19. Krause G., Weis E. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Molec. Biol.*, **42**, 313 (1991).
20. Кочубей С.М. *Организация фотосинтетического аппарата высших растений* (Киев: Альтерпресс, 2002).
21. Фадеев В.В. *Квантовая электроника*, **5** (10), 2221 (1978).
22. Козырева О.В., Чубаров В.В. *ПТЭ*, № 3, 157 (2001).