

УДК 535.372: 577.355.2

ТРЕХПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОТКЛИКА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ ПРИ ИМПУЛЬСНОМ ЛАЗЕРНОМ ВОЗБУЖДЕНИИ

Д.В. Маслов, В.В. Фадеев, П.Н. Литвинов

(кафедра квантовой электроники)

E-mail: maslov@lid.phys.msu.su

Предложена трехпараметрическая модель фотофизических процессов в фотосинтезирующих организмах, сопровождающихся их флуоресценцией при импульсном лазерном возбуждении. Параметры этой модели: сечение возбуждения молекул хлорофилла-*a*, определяемое как прямым поглощением возбуждающего излучения, так и переносом энергии со вспомогательных пигментов; время жизни возбужденного состояния этих молекул, определяемое скоростью их линейной дезактивации; константа скорости синглет-синглетной аннигиляции.

Введение

В настоящей работе исследованы возможности описания процесса формирования флуоресценции фотосинтезирующих организмов (ФСО) при импульсном лазерном возбуждении с помощью трехпараметрической модели. Эта задача возникла при разработке лазерных методов диагностики ФСО, в частности фитопланктона (ФП) [1]. Лазерная диагностика ФП осуществляется путем зондирования проб природной воды или непосредственно водной толщи последовательностью лазерных импульсов, которые в большинстве случаев имеют длину волны 532 нм (2-я гармоника YAG:Nd-лазера), длительность импульса 10 нс, частоту следования 10 Гц, плотность мощности в импульсе от нескольких кВт/см² до нескольких МВт/см² (соответственно плотность потока фотонов F от 10^{21} до 10^{25} см⁻²·с⁻¹).

Типичный спектр флуоресценции ФП при возбуждении излучением с длиной волны $\lambda_{\text{exc}} = 532$ нм представлен на рис. 1. Спектр содержит единственную полосу флуоресценции ФП с максимумом на длине волны 685 нм, одинаковую по форме и положению для всех групп водорослей (исключая сине-зеленые водоросли, в отклике которых, помимо этой полосы, обусловленной хлорофиллом-*a* (Хл-*a*), появляется полоса флуоресценции фикобилинов [2]).

Центральной проблемой во флуоресцентной диагностике ФП является определение видовой принадлежности и состояния водорослей. Эти данные важны сами по себе (в частности, для оценки экологического состояния акватории), но без них нельзя определить и концентрацию ФП по интенсивности его флуоресценции. В литературе описано несколько подходов к решению этой задачи. В работе [3] предлагается определять группы водорослей на основании спектров возбуждения флуоресценции, для получения которых при неконтактной диагностике необходим лазер с перестраиваемой длиной волны.

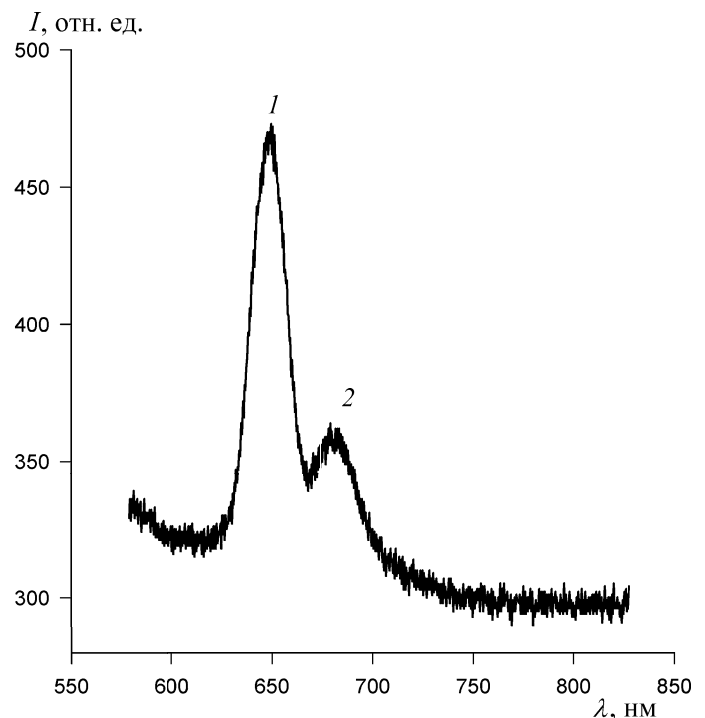


Рис. 1. Типичный спектр морской воды (длина волны возбуждения $\lambda_{\text{exc}} = 532$ нм): полоса комбинационного рассеяния молекул воды (1) и полоса флуоресценции фитопланктона (2)

Этот метод не получил распространения из-за сложности реализации и недостаточной избирательности.

Для определения фотосинтетической активности водорослей применяются методы pump-and-probe [4–6], FRR (fast repetition rate) [7] и PAM (pulse amplitude modulation) [8]. Эти методы позволяют определить показатель фотосинтетической активности как квантового выхода первичного разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтетической единицы. Это очень важная характеристика, но ее недостаточно для описания состояния водорослей, особенно если их использовать для биоиндикации качества окружающей среды (в данном случае воды).

Более полную информацию как о видовой принадлежности, так и о состоянии водорослей могли бы дать фотофизические параметры фотосинтетической единицы, которыми можно описать процесс формирования флуоресценции этих объектов. Полный набор таких параметров составляет полтора-два десятка (см. ниже). В настоящее время единственным методом, позволяющим, в принципе, определить одновременно молекулярные фотофизические параметры нативных ФСО, является метод нелинейной флуориметрии (флуориметрии насыщения) [1, 9, 10]. Однако сейчас этим методом можно с удовлетворительной точностью определять не более трех параметров в рамках единой трехпараметрической обратной задачи. Такое ограничение числа определяемых параметров объясняется особенностями кривых насыщения флуоресценции $N_{\text{fl}}(F)$, которые представляют собой исходные данные для решения обратной задачи (N_{fl} — число фотонов флуоресценции, F — плотность потока фотонов возбуждающего излучения).

Таким образом, возникает задача сокращения числа параметров модели до трех без потери качества описания процессов формирования флуоресценции фотосинтетической единицы, и в частности кривых насыщения флуоресценции. Очевидно, что при двух десятках исходных фотофизических параметров фотосинтетической единицы едва ли можно рассчитывать на выделение среди них трех доминирующих при реальных интервалах изменения внешних параметров, в частности плотности потока фотонов возбуждающего излучения F . Остается второй путь — поиск обобщенных параметров, зависящих от исходных. Желательно, чтобы эти параметры имели достаточно ясный физический смысл. В настоящей работе показана возможность создания такой трехпараметрической модели.

1. Исходная многопараметрическая модель формирования флуоресценции ФСО

В литературе рассмотрено несколько моделей формирования флуоресцентного отклика ФСО при их оптическом возбуждении [1, 11]. На данный момент наиболее убедительной представляется мультицентральная, рекомбинационная модель [1], для которой при возбуждении лазерным излучением с указанными выше параметрами населенности возбужденных состояний молекул Хл-а (n_{Chl}) и вспомогательных пигментов (n_{AP}) подчиняются следующей системе кинетических уравнений:

$$\frac{dn_{\text{AP}}}{dt} = F\sigma_{\text{AP}}(n_{\text{AP}}^0 - n_{\text{AP}}) - \frac{n_{\text{AP}}}{\tau_{\text{AP}}} - \gamma_{\text{AP}}n_{\text{AP}}^2 - k_{12}n_{\text{AP}}(n_{\text{Chl}}^0 - n_{\text{Chl}}),$$

$$\begin{aligned} \frac{dn_{\text{Chl}}}{dt} &= (F\sigma_{\text{Chl}} + k_{12}n_{\text{AP}})(n_{\text{Chl}}^0 - n_{\text{Chl}}) - \\ &\quad - \frac{n_{\text{Chl}}}{\tau_{\text{Chl}}} - \sum p_i^{\text{rc}} n_{\text{Chl}} \frac{N_i}{N_0} - \gamma_{\text{Chl}}n_{\text{Chl}}^2 + \xi N_4 p_r, \\ \frac{dN_1}{dt} &= -\frac{dN_2}{dt} = -p_1^{\text{rc}} n_{\text{Chl}} \frac{N_1}{N_0}, \quad N_1 + N_2 = N_1^0, \\ \frac{dN_3}{dt} &= -\frac{dN_4}{dt} = -p_3^{\text{rc}} n_{\text{Chl}} \frac{N_3}{N_0} + N_4 p_r, \\ &\quad N_3 + N_4 = N_3^0. \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь n_{Chl}^0 , n_{AP}^0 — соответственно концентрации молекул Хл-а и вспомогательных пигментов; N_1 , N_2 , N_3 , N_4 — концентрации реакционных центров (РЦ) в открытом, первом промежуточном, закрытом и втором промежуточном состояниях; N_1^0 и N_3^0 — начальные концентрации РЦ в открытом и закрытом состояниях; $N_0 = N_1 + N_2 + N_3 + N_4 = N_1^0 + N_3^0$ — общая концентрация РЦ; σ_{Chl} и σ_{AP} — сечения поглощения молекул хлорофилла и вспомогательных пигментов; τ_{Chl} и τ_{AP} — собственные времена жизни возбужденных состояний молекул Хл-а и вспомогательных пигментов; γ_{Chl} и γ_{AP} — константы синглет-синглетной аннигиляции возбужденных состояний молекул Хл-а и вспомогательных пигментов; k_{12} — константа скорости переноса энергии с молекул Хл-а на молекулы вспомогательных пигментов; p_1^{rc} , p_2^{rc} , p_3^{rc} , p_4^{rc} — скорости захвата экситонов РЦ в открытом, первом промежуточном, закрытом и втором промежуточном состояниях (в [11] было показано, что $p_1^{\text{rc}} = p_2^{\text{rc}}$); p_r — скорость рекомбинации зарядов в закрытых РЦ, ξ — вероятность возврата образовавшегося в результате рекомбинации экситона обратно в антенну.

Очевидно, что перечисленные параметры модели так или иначе зависят от видовой принадлежности водорослей и их состояния, которые, в свою очередь, в большой степени определяются факторами окружающей среды (термодинамическими параметрами, освещенностью, химическим составом среды, в том числе присутствием в ней токсикантов).

Число фотонов флуоресценции N_{fl} , испускаемых облучаемым объемом среды, связано с концентрацией возбужденных состояний n_{Chl} следующим образом:

$$N_{\text{fl}} = K_{\text{Chl}}^{\text{fl}} \int_V dV \int_0^\infty n_{\text{Chl}}(r, z, t) dt, \quad (2)$$

где $r = \{x, y\}$ — координата в поперечном сечении лазерного пучка, z — координата вдоль направления распространения, $K_{\text{Chl}}^{\text{fl}}$ — квантовый выход флуоресценции возбужденных состояний молекул Хл-а. Таким образом, если исходить из модели, описываемой системой (1), то кривая насыщения флуоресценции ФП $N_{\text{fl}}(F)$ является функцией около 20 параметров. Восстановить такое число параметров при решении обратной задачи не представляется возможным.

2. Трехпараметрическая модель

Попытаемся свести параметры исходной модели к трем (назовем их обобщенными), которые могут быть определены в рамках трехпараметрической обратной задачи флуориметрии насыщения [9, 10].

Первый шаг на этом пути сделан в работе [11] (см. также [1]): был введен обобщенный параметр σ и первые два уравнения системы (1) записаны в виде

$$\begin{aligned} \frac{dn_{\text{ChI}}}{dt} &= F\sigma (n_{\text{ChI}}^0 - n_{\text{ChI}}) - \frac{n_{\text{ChI}}}{\tau_{\text{ChI}}} - \\ &\quad - \sum p_i^{\text{rc}} n_{\text{ChI}} \frac{N_i}{N_0} - \gamma_{\text{ChI}} n_{\text{ChI}}^2 + \xi N_4 p_r, \\ \frac{dN_1}{dt} &= -\frac{dN_2}{dt} = -p_1^{\text{rc}} n_{\text{ChI}} \frac{N_1}{N_0}, \quad N_1 + N_2 = N_1^0, \\ \frac{dN_3}{dt} &= -\frac{dN_4}{dt} = -p_3^{\text{rc}} n_{\text{ChI}} \frac{N_3}{N_0} + N_4 p_r, \\ &\quad N_3 + N_4 = N_3^0. \end{aligned} \quad (3)$$

Очевиден физический смысл параметра σ — это поперечное сечение возбуждения молекул Хл-а, определяемое как прямым поглощением ими возбуждающего излучения, так и переносом энергии на них со вспомогательных пигментов, которые также поглощают возбуждающее излучение (при $\lambda_{\text{exc}} = 532$ нм этот канал возбуждения превалирует). Ниже будет получено выражение, связывающее параметр σ с параметрами исходной модели.

Теперь сделаем и второй шаг — введем обобщенный параметр τ и заменим всю систему (1) на одно уравнение с тремя параметрами:

$$\frac{dn_{\text{ChI}}}{dt} = F\sigma (n_{\text{ChI}}^0 - n_{\text{ChI}}) - \frac{n_{\text{ChI}}}{\tau} - \gamma_{\text{ChI}} n_{\text{ChI}}^2. \quad (4)$$

Физический смысл обобщенного параметра τ также ясен: τ^{-1} — скорость линейной дезактивации возбужденных состояний молекул Хл-а, равная сумме скоростей внутримолекулярных переходов (излучательного и безызлучательного) и скорости переноса возбуждения с молекул Хл-а на РЦ. Последний канал дезактивации возбужденных состояний молекул Хл-а (синглет-синглетная аннигиляция), сокращающий их время жизни в возбужденном состоянии, описывается отдельным членом, который содержит третий параметр — константу скорости этого процесса γ или максимальную его скорость γn_{ChI}^0 .

Были получены аналитические выражения, связывающие параметры σ и τ с параметрами исходной многопараметрической модели. Далее выполнялась процедура численного расчета σ и τ с использованием уравнений (1), (3), (4) и выражения (2) и проводилось сравнение результатов этого расчета со значениями σ и τ , определенными по аналитическим формулам.

Для параметра σ было получено следующее приближенное аналитическое выражение:

$$\sigma = \sigma_{\text{ChI}} + \frac{k_{12} \sigma_{\text{AP}} n_{\text{AP}}^0}{1/\tau_{\text{AP}} + k_{12} n_{\text{ChI}}^0}. \quad (5)$$

Как видно из (5), σ не зависит от плотности потока фотонов возбуждающего излучения F . Численные расчеты (рис. 2) подтвердили это предположение. Только при значениях F , превышающих 10^{24} см⁻²·с⁻¹, начинает заметно проявляться зависимость σ от F . Таким образом, в диапазоне $F < 10^{24}$ см⁻²·с⁻¹ эффективное сечение возбуждения σ молекул Хл-а в строгом смысле этого слова является параметром.

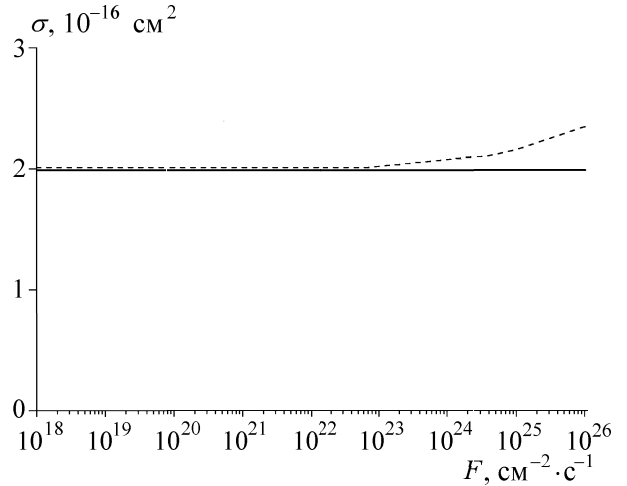


Рис. 2. Зависимость параметра σ от плотности потока фотонов F : результат аналитического (сплошная линия) и численного (пунктирная) расчета

Отметим, что в области $F < 10^{24}$ см⁻²·с⁻¹ результаты численных и аналитических расчетов совпадают с точностью $\sim 2\%$, что позволяет сделать вывод о хорошей точности выражения (5).

Для параметра τ было получено следующее приближенное аналитическое выражение:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{\text{ChI}}} + \frac{N_3^0}{N_0} p_4^{\text{rc}} \left(1 + \frac{\alpha - 1}{\beta \sigma F \tau + 1} \right) + \frac{N_1^0}{N_0} p_1^{\text{rc}}, \quad (6)$$

где $\beta = p_3^{\text{rc}} \frac{n_{\text{ChI}}^0/N_0}{p_r}$ и $\alpha = \frac{1 - \xi}{p_4^{\text{rc}}/p_3^{\text{rc}}}$.

Зависимости τ от плотности потока фотонов возбуждающего излучения F , рассчитанные по формуле (6) и полученные путем численного расчета (рис. 3), показывают, что ошибка аналитического расчета не превышает 10%.

Параметр τ в отличие от σ зависит от F , и эта зависимость имеет следующие закономерности.

Если до действия лазерного импульса все РЦ находятся в открытом состоянии ($N_1^0 = N_0$; $N_3^0 = 0$), то $(1/\tau) = (1/\tau_{\text{ChI}}) + p_1^{\text{rc}}$, т.е. τ не зависит от F . Это является следствием отмеченных в [1] соотношений между длительностью лазерного импульса $\tau_{\text{laser}} = 10$ нс и временами процессов в РЦ с учетом предположения о том, что $p_1^{\text{rc}} = p_2^{\text{rc}}$ [11].

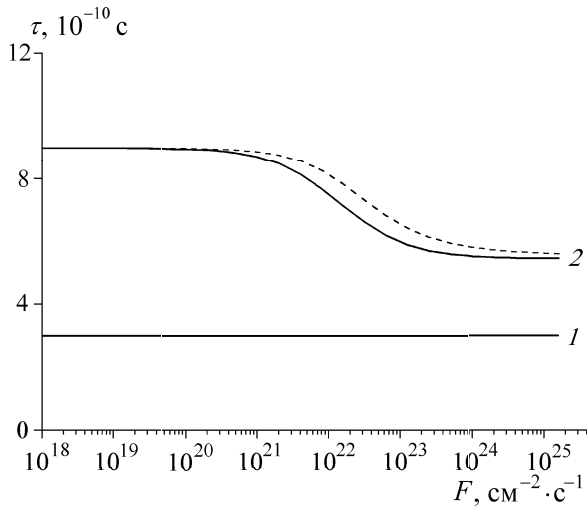


Рис. 3. Зависимость параметра τ от плотности потока фотонов F : результаты аналитического (сплошные линии) и численного (пунктирные) расчета в случае изначально открытых (1) и закрытых (2) реакционных центров; для открытых реакционных центров результаты численного и аналитического расчетов совпадают

Если же все РЦ до начала действия лазерного импульса находятся в закрытом состоянии ($N_3^0 = N_0$; $N_1^0 = 0$), то поведение $\tau(F)$ существенно различается для разных соотношений фотофизических параметров, и это может быть использовано для уточнения модели первичных стадий фотосинтеза. Особенно сильное влияние на зависимость $\tau(F)$, меняющее качественно поведение кривой $\tau(F)$, оказывает параметр ξ (рис. 4). При некотором его значении ($\xi = 0.5$) параметр τ становится постоянным и не зависит от F . В любом случае существуют две области значений F , где параметр τ (при изначально закрытых РЦ) практически постоянен. В случае малых F ($F < 10^{22} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) значение τ определяется выражением $(1/\tau) = (1/\tau_{\text{сн}}) + p_3^{\text{rc}}(1 - \xi)$, а в случае больших F ($F > 10^{24} \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) — выражением $(1/\tau) = (1/\tau_{\text{сн}}) + p_4^{\text{rc}}$. Эти уравнения получаются из (6) в предельных случаях малых и больших значений F .

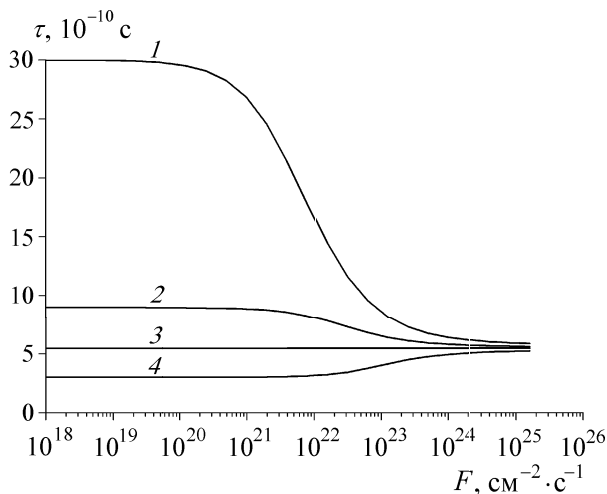


Рис. 4. Влияние параметра ξ на зависимость $\tau(F)$: $\xi = 1$ (1), 0.74 (2), 0.5 (3) и 0 (4)

Заключение

Таким образом, фотофизические процессы в фотосинтезирующих организмах, сопровождающиеся их флуоресценцией при импульсном лазерном возбуждении, могут быть описаны трехпараметрической моделью. Параметры этой модели σ , τ , γ имеют ясный физический смысл. Получены приближенные аналитические выражения, связывающие эти параметры с параметрами исходной многопараметрической модели. Параметры σ , τ , γ могут быть определены с помощью уже отработанных алгоритмов решения трехпараметрической обратной задачи флуориметрии насыщения [9, 10], в частности с использованием техники искусственных нейронных сетей [12].

Формулы (5) и (6) дают основание предположить, что эти обобщенные параметры будут чувствительны к видовой принадлежности фотосинтезирующих организмов и их состоянию и, следовательно, могут быть использованы для контроля *in situ* за окружающей средой, в частности за водными экосистемами.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Мировой океан» (проекты 6.1 и 6.3) и программы «Фундаментальная спектроскопия».

Литература

1. Фадеев В.В., Бунин Д.К., Венедиктов П.С. // Квант. электроника. 1996. **23**, № 11. С. 963.
2. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984.
3. Mumola P.B., Jarret O., Brown C.A. // Proc. Second Joint Conf. on Sensing Environmental Pollutants. Washington, D.C., 1973. P. 53.
4. Kolber Z., Falkowski P. // Limnol. Oceanogr. 1993. **38**, № 8. P. 1646.
5. Маторин Д.Н. // Биофизика. 2000. **45**, № 3. С. 491.
6. Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1991. № 6. С. 63 (Moscow University Phys. Bull. 1991. No. 6. P. 59).
7. Kolber Z., Prasil O., Falkowski P. // Biochim. et Biophys. Acta. 1998. **1367**. P. 88.
8. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. // Photosyn. Res. 1986. **10**. P. 51.
9. Fadeev V.V., Dolenko T.A., Filippova E.M., Chubarov V.V. // Opt. Commun. 1999. **166**. P. 25.
10. Fadeev V.V., Filippova E.M., Maslov D.V. et al. // Proc. EOS/SPIE Intern. Symp. «Envirosense». Munich, Germany, 1999. 3821. P. 248.
11. Бунин Д.К., Горбунов М.Ю., Фадеев В.В., Чекалюк А.М. // Квант. электроника. 1992. **19**, № 5. С. 421.
12. Dolenko S.A., Dolenko T.A., Fadeev V.V. et al. // Pattern Recogn. and Image Analysis. 1999. **9**, No. 3. P. 510.

Поступила в редакцию
23.07.01