

УДК 504.064.36

Устойчивость результатов лазерного флуоресцентного метода контроля состояния растений

Ю.В. Федотов, О.А. Булло, М.Л. Белов, В.А. Городничев*

*НИИ радиоэлектроники и лазерной техники,
Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана
107005, г. Москва, 2-я Бауманская, 5*

Поступила в редакцию 25.11.2015 г.

Рассмотрен лазерный флуоресцентный метод мониторинга состояния растительности. Описана лабораторная установка, и приведены результаты обработки экспериментальных спектров флуоресценции растений для длины волны возбуждения флуоресценции 532 нм. Показано, что средняя по небольшой серии измерений величина R отношения интенсивности флуоресценции на длине волны 685 нм к интенсивности флуоресценции на длине волны 740 нм характеризуется высокой стабильностью при измерениях разных образцов одного и того же растения. В большинстве случаев сумма доверительных интервалов величины R (при доверительной вероятности 95%) для нормального и стрессового состояний не превышает отклонения средних значений величины R для нормального состояния и стрессовых состояний растений, вызванных разными причинами.

Ключевые слова: лазерный флуоресцентный метод, контроль состояния растительности, спектры флуоресценции, стабильность; laser fluorescence method, vegetation monitoring, fluorescence spectra, stability.

Введение

Флуоресцентный анализ широко применяется в науке и технике в качестве высокочувствительного аналитического средства. На сегодняшний день одним из перспективных направлений использования флуоресцентного анализа является контроль состояния растительности (см., например, [1–18]).

Неблагоприятные внешние факторы приводят к стрессовым ситуациям для растений и невозможности их нормального роста.

Эффективным методом обнаружения стрессовых состояний растительности является метод лазерной индуцированной флуоресценции (ЛИФ) (см., например, [1–16]). У растения в стрессовом состоянии процесс фотосинтеза нарушается и спектр флуоресценции изменяется (по сравнению с растением в нормальном состоянии).

На сегодняшний день накоплены экспериментальные данные по спектрам флуоресценции различных видов здоровой растительности и растительности в различных стрессовых состояниях при разных длинах волн возбуждения от 266 до 635 нм.

Несмотря на то что число публикаций, посвященных экспериментальным исследованиям спектров флуоресценции растительности, достаточно велико,

остаются неясными некоторые важные вопросы. Одним из них является вопрос о стабильности формы спектров флуоресценции при измерениях разных образцов одного и того же растения.

Настоящая статья посвящена экспериментальным исследованиям спектров лазерно-индуцированной флуоресценции растений и анализу стабильности результатов лазерного флуоресцентного метода контроля состояния растений.

Такая задача представляет практический интерес для оценки возможности контроля состояния растений по результатам дистанционного измерения спектров флуоресценции растений.

1. Экспериментальная установка

Для измерения спектров флуоресценции была создана лабораторная установка, структурная схема которой представлена на рис. 1.

В качестве источника возбуждения излучения флуоресценции был использован твердотельный импульсный Nd:YAG-лазер Ekspla NL204 с диодной накачкой и с удвоением частоты.

Излучение флуоресценции собирается приемным объективом и вводится в оптическое волокно, диаметр сердечника которого 600 мкм, ахроматическим адаптером оптического волокна. В качестве спектрального прибора используется полихроматор M266. Полихроматор M266 полностью автоматизирован: смена решеток, оптических фильтров, выбор ширины входной щели осуществляются автоматически.

* Юрий Викторович Федотов (fed@bmstu.ru, ekomonit@bmstu.ru); Ольга Алексеевна Булло (ekomonit@bmstu.ru); Михаил Леонидович Белов (belov@bmstu.ru); Виктор Александрович Городничев (gorod@bmstu.ru, ekomonit@bmstu.ru).

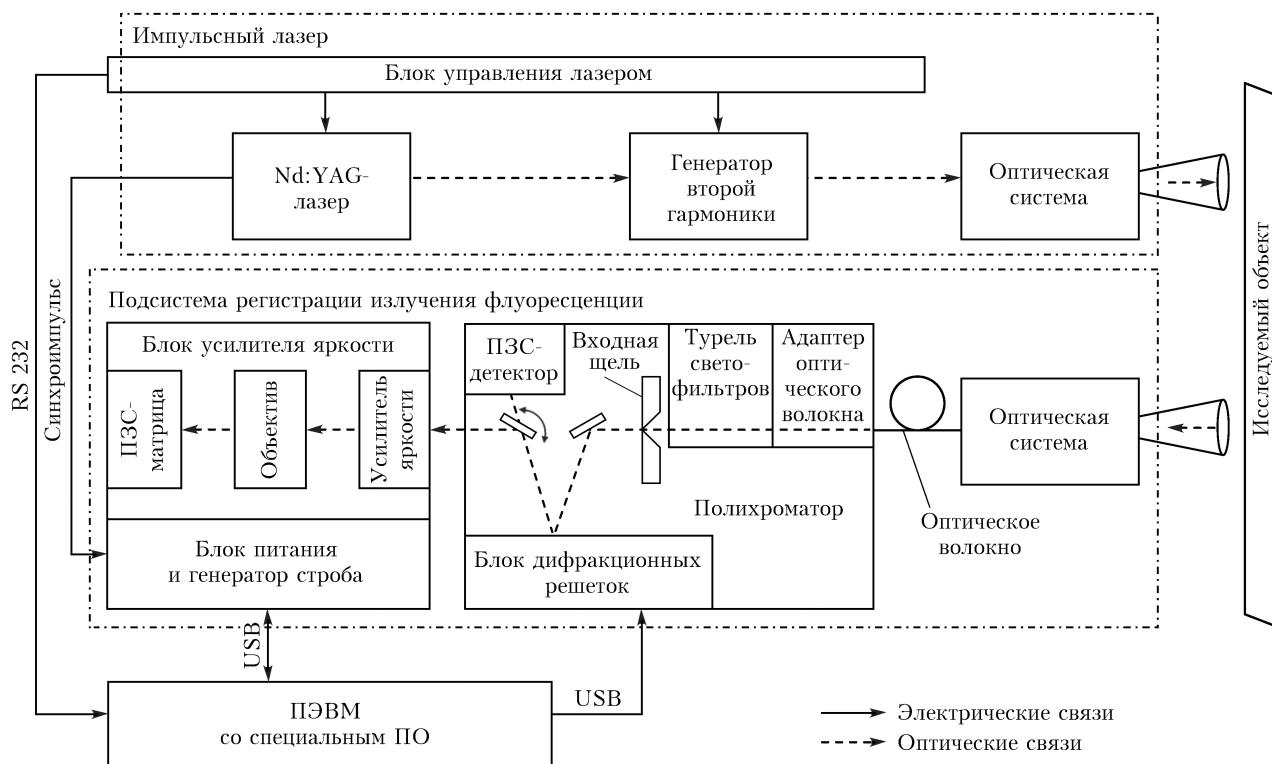


Рис. 1. Структурная схема лабораторной установки

Спектр флуоресценции регистрируется высокочувствительным матричным детектором с усилителем яркости. После усилителя яркости изображение переносится оптической системой на ПЗС-детектор. Детектор преобразует изображение в цифровой массив и по интерфейсу USB 2.0 передает этот массив на компьютер.

Для управления установкой использовалось специальное программное обеспечение, реализованное в среде визуального программирования LabVIEW.

Основные параметры лабораторной установки приведены ниже.

Энергия импульса лазера, мДж	2,1
Длительность импульса, нс	< 7
Длина волны возбуждения, нм	532
Диапазон регистрации спектра, нм	595–800
Частота повторения, Гц	до 500
Разрешение по спектру, нм	8
Диаметр приемного объектива, мм	15
Расстояние до растений, м	~ 1

2. Измерения и результаты

Перед экспериментальным исследованием спектров флуоресценции проводилась калибровка оборудования. Калибровка измерительной аппаратуры состояла из следующих этапов:

– калибровка полихроматора по длине волны с использованием стандартной методики и калибровочного источника света на основе ртутно-аргоновой лампы с линейчатым спектром. Проверка проводилась по трем длинам волн (253,65; 435,85 и 696,54 нм);

– калибровка системы регистрации по чувствительности в диапазоне от 250 до 750 нм осуществлялась по стандартной методике с помощью калиброванного источника света DH2000-CAL. Также проводилась регистрация фоновых шумов детектора на основе усилителя яркости, полученное распределение фоновых шумов записывалось в файл и в дальнейшем вычиталось из измеряемых спектров, что позволило частично устранить их влияние.

Экспериментальные исследования спектров ЛИФ растительности проводились для неприхотливых видов растений – горчица, земляника, шалфей, лещина, огуречная трава, газонная трава, различные виды салата, огурцов, томатов. Видимый диаметр лазерного пятна на образце растения составлял приблизительно 2,5 см.

При проведении измерений образцы ставились так, чтобы лазерное пятно попадало на листья образцов, которые находятся приблизительно на одной высоте, и не попадало на грунт, в который посажены растения. Эксперименты проводились с разными образцами одного и того же растения, выращенными в одинаковых условиях.

Для характеристики спектров флуоресценции растений часто используют параметр R , равный отношению интенсивностей флуоресценции в узких спектральных диапазонах (их ширина в разных публикациях может быть разной) на двух длинах волн (одна длина волны в области ~ 680...690 нм, а другая – в области ~ 735...745 нм).

На рис. 2 показаны типичные результаты, полученные после обработки экспериментальных спектров флуоресценции, для величины отношения R

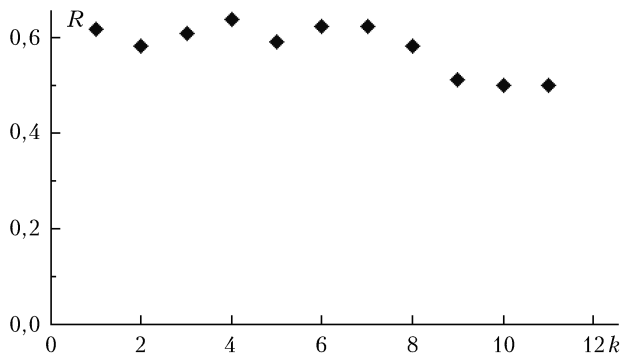


Рис. 2. Результаты измерений спектров флуоресценции для образцов горчицы

интенсивностей флуоресценции в узких спектральных диапазонах шириной 10 нм с центральными длинами волн 685 и 740 нм в зависимости от номера измерения k . Приведены данные для разных образцов горчицы, посаженных в одно и то же время.

Измерения проводились через 2 нед. после посадки растений в середине дня в течение нескольких часов (отметим, что влияние изменения естественной освещенности в течение дня на спектры флуоресценции на данном этапе работы не исследовалось). Каждый раз измерения проводились через 2 мин после включения лазера (для установления стабильного режима излучения лазера), после снятия спектра лазер выключался.

Среднее значение отношения R (рис. 2) – 0,58, стандартное отклонение – 0,051 (8,8% от среднего значения).

Для проведенных нами измерений с разными растениями в нормальном состоянии (рис. 3) величина стандартного отклонения R лежала в диапазоне 2,6–20,5% (от среднего значения). При одиночных измерениях (по крайней мере, в лабораторных условиях, когда лазерное пятно попадает на небольшой участок одного растения) возможны аномальные выбросы величины отношения R (которые могут приводить к ошибке определения состояния растения по величине этого отношения). Более надежным представляется контроль состояния растений по средней величине отношения R даже для небольшой серии измерений.

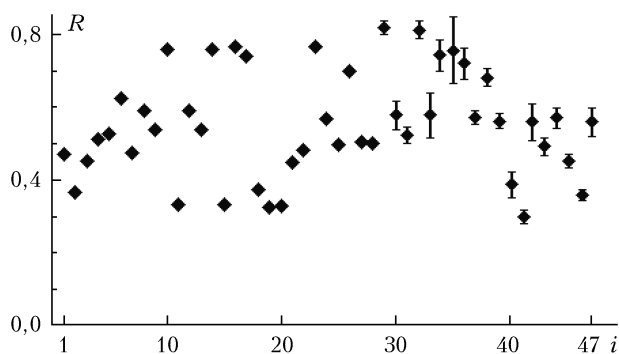


Рис. 3. Значение отношения R для экспериментальных спектров флуоресценции растений в нормальном состоянии

Значения отношения R для экспериментальных спектров флуоресценции растений в нормальном состоянии, по работам других авторов [1, 10–16] и по нашим данным измерений, приведены на рис. 3. Здесь показано отношение R (для спектральных диапазонов шириной 10 нм с центральными длинами волн 685 и 740 нм) для спектров листьев растений и листовенных деревьев (для растений в нормальном состоянии и верхней стороны листьев) при длине волны возбуждения около 532 нм по данным [1, 10–16] (точки 1–28). Каждая точка на рис. 3 соответствует спектру одного растения; i – номер растения в базе данных: 1, 2 – алоэ; 3 – фасоль; 4–9, 12, 13 – береза; 10, 14 – черная вишня; 11, 15 – колосняк мягкий (Dune Grass); 16, 17 – кукуруза; 18 – апельсиновое дерево; 19, 23 – тополь; 20–22 – пальма; 24, 25 – традесканция (Tradescantia); 26 – восковник (Wax Murtle); 27, 28 – спатифиллум (Spatifilium). Последние 19 точек (29–47) соответствуют средним значениям и доверительным интервалам для среднего значения (при доверительной вероятности 95%) величины R по нашим данным измерений (размер серии измерений для каждого растения в среднем ~ 16): 29 – огуречная трава через 5 нед. после посадки; 30 – горчица через 2 нед. после посадки; 31 – горчица через 1 нед. после посадки; 32 – кресс-салат в грунте через 8,5 нед. после посадки; 33 – кресс-салат в песке через 2,5 нед. после посадки; 34 – кресс-салат в перлите (в гидропоническом субстрате) через 6,5 нед. после посадки; 35 – огурец апрельский через 12 нед. после посадки; 36 – огурец Берендей через 7 нед. после посадки; 37 – трава из газонной смеси Декора Agos через 2,5 нед. после посадки; 38 – трава из газонной смеси Декора Agos через 4 нед. после посадки; 39 – трава из газонной смеси Декора Agos через 5,5 нед. после посадки; 40 – земляника через 8 нед. после посадки; 41 – лещина через 8 нед. после посадки; 42 – огурец Задор через 3 нед. после посадки; 43 – огурец Задор через 4 нед. после посадки; 44 – томат Балконное чудо через 4 нед. после посадки; 45 – томат черри через 8 нед. после посадки; 46 – томат черри через 9 нед. после посадки; 47 – шалфей через 8 нед. после посадки.

Из рис. 3 видно следующее:

– величина R для разных видов растений в нормальном состоянии (по данным других авторов и по нашим данным) может сильно отличаться;

– для одного вида растений (в похожих условиях) в большинстве случаев средняя величина отношения R (даже для небольшой серии измерений) характеризуется достаточно большой стабильностью (по данным наших измерений).

На рис. 4 приведены результаты обработки измеренных нами спектров ЛИФ растений в нормальном и стрессовом состояниях (размер серии измерений для каждого растения и каждого вида стресса в среднем ~ 10). Показаны средние значения и доверительные интервалы (для доверительной вероятности 95%) величины R (отношения интенсивностей флуоресценции в узких спектральных диапазонах шириной 10 нм с центральными длинами волн 685 и 740 нм) для нормального состояния растений

Заключение

Таким образом, полученные данные показывают устойчивость результатов лазерного флуоресцентного метода обнаружения стрессовых состояний растений при измерениях разных образцов одного и того же растения в случае использования для определения состояния растений средней величины отношения R по небольшой серии измерений.

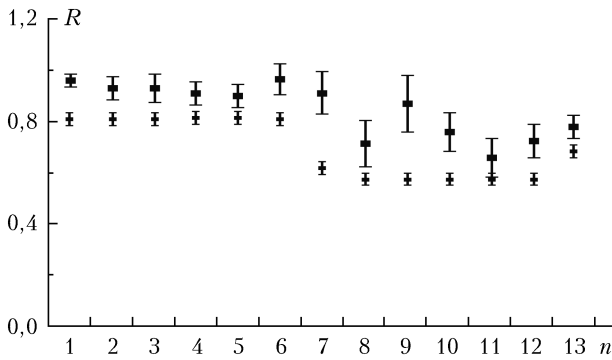


Рис. 4. Средние значения и доверительные интервалы величины R для нормального состояния растений и для стрессовых состояний, вызванных разными причинами

(нижний ряд данных на рис. 4) и для стрессовых состояний, вызванных разными причинами (верхний ряд данных).

На рис. 4 разные номера n соответствуют разным растениям и разным стрессам. Номера 1–7 — данные измерений для кресс-салата при стрессовых состояниях, вызванных примятием листьев (1), обрезанием листьев (2), повреждением корневой системы растения (3), избыточным поливом растений в течение 11 дней (4), 17 дней (5), 24 дней (6), отсутствием полива в течение 11 дней (7). Измерения спектров флуоресценции кресс-салата при механических повреждениях (примятии, обрезании листьев и обрезании корней) проводились в интервале времени от 20 до 40 мин после механического повреждения.

Номера 8–13 — данные измерений для газонной травы (выращенной из газонной смеси Декора Агос) при стрессовых состояниях, вызванных добавлением в почву разных загрязнителей — медного купороса CuSO_4 (5 г, разбавленные в 200 мл воды, на 3 образца; габаритные размеры горшка, в который высаживался образец, $9 \times 9 \times 10$ см), железного купороса FeSO_4 (10 г, разбавленные в 200 мл воды, на 3 образца) и соли NaCl (5 г на каждый образец). Номера 8 и 9 на рис. 4 соответствуют измерениям через 2 и 4 нед. соответственно после внесения в почву соли NaCl , номера 10 и 11 — измерениям через 2 и 4 нед. соответственно после внесения в почву железного купороса FeSO_4 , номер 12 — измерению через 4 нед. после внесения в почву медного купороса CuSO_4 , номер 13 — данные измерений для газонной травы при стрессовом состоянии, вызванном обрезанием корней. Измерения спектров флуоресценции травы в нормальном состоянии проводились до подрезания корней, а в стрессовом состоянии — в интервале времени от 25 до 45 мин после подрезания корней.

Из рис. 4 видно, что в большинстве случаев сумма доверительных интервалов величины R для нормального и стрессового состояний не превышает отличия средних значений величины R для нормального состояния и стрессовых состояний растений, вызванных разными причинами (механическими повреждениями, внесением в почву загрязнителей, избытком или недостатком количества воды).

1. Belasque J., Gasparoto M.C.G., Marcassa L.G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy // Appl. Opt. 2008. V. 47, N 11. P. 1922–1926.
2. Cecchi G., Bazzani M., Pantani L. Fluorescence lidar method for remote monitoring of effects on vegetation // Proc. SPIE. 1995. V. 2585. P. 49–56.
3. Fateeva N.L., Matvienko G.G. Application of the method of laser-induced fluorescence // Proc. SPIE. 2004. V. 5232. P. 652–657.
4. Matvienko G., Timofeev V., Grishin A., Fateyeva N. Fluorescence lidar method for remote monitoring of effects on vegetation // Proc. SPIE. 2006. V. 6367. P. 63670F-1–63670F-8.
5. Grishaev M.V., Sal'nikova N.S. A setup for remote recording of the spectrum of laser-induced fluorescence from crowns of woody plants // Instrum. Experim. Techn. 2010. V. 53, N 5. P. 746–749.
6. Фатеева Н.Л., Клишкин А.В., Бендер О.В., Зотикова А.П., Ямбургов М.С. Исследование лазерно-индуцированной флуоресценции хвойных и лиственных растений при азотном загрязнении почвы // Оптика атмосф. и океана. 2006. Т. 19, № 2–3. С. 212–215.
7. Gouveia-Neto A.S., da Silva E.A., Cunha P.C., Oliveira-Filho R.A., Silva L.M.H., da Costa E.B., Câmara T.J.R., Willadino L.G. Plant abiotic stress diagnostic by laser induced chlorophyll fluorescence spectral analysis of *in vivo* leaf tissue of biofuel species // Proc. SPIE. 2010. V. 7568. P. 75680G-1–75680G-8.
8. Luedeker W., Guenther K.P., Dahn H.-G. Laser induced fluorescence a tool for vegetation status- and stress-monitoring and optical aided agriculture // Proc. SPIE. 1997. V. 3059. P. 63–75.
9. Saito Y., Saito R., Nomura E., Kawahara T.D., Nomura A., Takaragaki S., Ida K., Takeda S. Performance check of vegetation fluorescence imaging lidar through *in vivo* and remote estimation of chlorophyll concentration inside plant leaves // Opt. Rev. 1999. V. 6, N 2. P. 155–159.
10. Corp L.A., McMurtrey J.E., Middleton E.M., Mulchi C.L., Chappelle E.W., Daughtry C.S.T. Fluorescence sensing systems: *In vivo* detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply // Remote Sens. Environ. 2003. V. 86. P. 470–479.
11. Hoge F.E., Swift R.N., Yungel J.K. Feasibility of airborne detection of laser-induced fluorescence emissions from green terrestrial plants // Appl. Opt. 1983. V. 22, N 19. P. 2991–3000.
12. Бункин Ф.В., Бункин А.Ф. Лидарное зондирование водоемов, почвы и растительности // Оптика атмосф. и океана. 2000. Т. 13, № 1. С. 63–68.
13. Hristov H.A., Borisova E.G., Avramov L.A., Kolev I.N. Applications of laser-induced fluorescence for remote sensing // Proc. SPIE. 2001. V. 4397. P. 496–500.
14. Афонасенко А.В., Иглакова А.И., Матвиенко Г.Г., Оулаков В.К., Прокорьев В.Е. Лабораторные и лидарные измерения спектральных характеристик листьев березы

- в различные периоды вегетации // Оптика атмосф. и океана. 2012. Т. 25, № 3. С. 237–243.
15. Middleton E., McMurtrey J.E., Entcheva Campbell P.K., Corp L.A., Butcher L.M., Chappelle E.W. Optical and fluorescence properties of corn leaves from different nitrogen regimes // Proc. SPIE. 2003. V. 4879. P. 72–83.
 16. Lee K.J., Park Y., Bunkin A., Nunes R., Pershin S., Voliak K. Helicopter-based lidar system for monitoring the upper ocean and terrain surface // Appl. Opt. 2002. V. 41, N 3. P. 401–406.
 17. Gouveia-Neto A.S., Silva E.A., Oliveira R.A., Cunha P.C., Costa E.B., Câmara T.J.R., Willadino L.G. Water deficit and salt stress diagnosis through LED induced chlorophyll fluorescence analysis in *Jatropha curcas* L. oil plants for biodiesel // Proc. SPIE. 2011. V. 7902. P. 79020A-1–79020A-10.
 18. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В. Концентрация пигментов и красная флуоресценция листьев *Elytrigia repens* в процессе вегетации растений // Оптика атмосф. и океана. 2013. Т. 26, № 12. С. 1106–1111.

Yu.V. Fedotov, O.A. Bullo, M.L. Belov, V.A. Gorodnichev. Stability of results of plant state detection by laser fluorescence method.

Laser fluorescence method of plant state detection is considered. Laboratory setup is described and analysis of plant fluorescence spectra excited at a wavelength of 532 nm are presented. It is shown that the measurement small series average of the fluorescence intensity ratio R at wavelengths of 685 and 740 nm is marked by high stability for different samples of a plant. Sum of confidential intervals of ratio R (for confidential probability 95%) in most cases is no more than difference of mean values of the ratio R for normal and stress states caused by various reasons.