

**С.Ф. Растопов**

## **ОПТИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЖИВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ**

Описан метод и аппаратура для измерений подвижности живых микроорганизмов в воде, основанный на регистрации собственных биений интенсивности в спектре рассеянного излучения. Приведены результаты измерений средних скоростей движения микроорганизмов в приповерхностных пробах воды реки Волги.

Оптические методы исследования свойств конденсированных сред и происходящих в них процессов к настоящему времени достаточно полно разработаны как теоретически, так и экспериментально. По величине характерного сдвига (уширения) частотного спектра прошедшего среду излучения эти методы можно разделить на две основные группы [1]:

1) относительный частотный сдвиг составляет  $10^{-7} - 10^{-5}$  и более от частоты падающего излучения, порядка  $10^{15}$  Гц для видимого излучения (процессы, связанные с внутриаомными и внутримолекулярными взаимодействиями). Такие частотные сдвиги измеряются классическими интерферометрическими приборами;

2) относительный частотный сдвиг составляет  $10^{-8} - 10^{-15}$  (движение среды как целого, вихри, броуновское движение частиц и т.п.).

Такие частотные сдвиги недоступны по разрешению для интерферометрических приборов (даже для интерферометра Фабри–Перо), но, с другой стороны, характерные временные масштабы протекающих процессов уже могут быть измерены радиофизическими методами корреляционной спектроскопии. В частности, в спектроскопии, основанной на собственных биениях интенсивности, амплитудно-частотный спектр рассеянного излучения измеряется либо коррелятором (через корреляционную функцию интенсивности), либо непосредственно спектр-анализатором. К последнему случаю и относятся измерения, о которых сообщается в данной статье.

### **2. Методика измерений**

Геометрия измерений спектра света, рассеянного на неоднородностях среды, приведена на рис. 1. Поле  $E_s$ , рассеянное  $j$ -м элементом в точку  $R_0$ , удаленную от рассеивающего объема с характерным размером  $a$  ( $r \gg a$ ) имеет вид

$$E_s = \sum_j A_j \exp(i(\varphi_j - \omega_0 t)), \quad (1)$$

где  $A_j$  и  $\varphi_j$  – амплитуда и фаза поляризованной  $j$ -й компоненты рассеянного света;  $\omega_0$  – круговая частота падающего света. Фаза  $\varphi_j$  зависит от расположения  $j$ -го элемента относительно начала координат [1]

$$\varphi_j = \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j, \quad (2)$$

где  $\mathbf{q} = \mathbf{k}_0 - \mathbf{k}_s$  – волновой вектор рассеяния (здесь рассматривается только однократное рассеяние). Поскольку в нашем случае  $|\mathbf{k}_0| \approx |\mathbf{k}_s|$ , то

$$|q| = |k_0 - k_s| \approx 2 |k_0| \sin(\Theta/2) = (4\pi n / \lambda_0) \sin(\Theta/2), \quad (3)$$

где  $\lambda_0$  – длина волны падающего света в вакууме;  $n$  – показатель преломления среды.

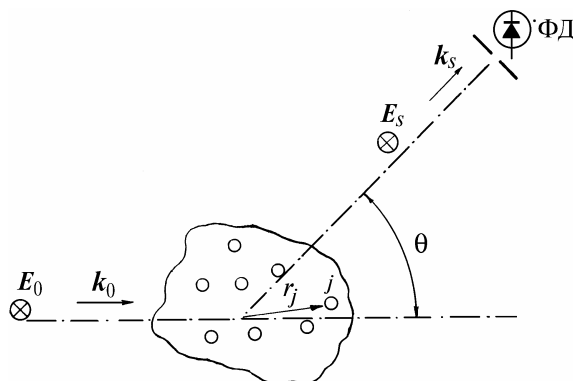


Рис. 1. Геометрия эксперимента по рассеянию света. Расстояние до регистрирующего фотодиода ФД гораздо больше характерного размера зондируемого объема

Суммируя по всем рассеивающим элементам, получим среднюю интенсивность падающего на фотодиод света:

$$I_s = \langle |E_s|^2 \rangle = \langle \sum_j \sum_k A_j A_k \exp(i \mathbf{q} (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)) \rangle. \quad (4)$$

При движении центров масс рассеивающих элементов фазовый множитель  $(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)$  изменяется со временем, соответственно  $I_s$  флуктуирует.

Нас интересуют именно эти флуктуации средней интенсивности рассеянного излучения. По их частотному спектру можно определить спектр скоростей движения рассеивающих частиц.

Из [1] следует, что при наличии в среде  $N$  одинаковых невзаимодействующих сферических рассеивателей, каждый из которых дает интенсивность рассеивания  $I$  в угол  $\Theta$ , спектр оптического сигнала имеет лоренцеву форму:

$$I(\omega) = N I (\Omega / \pi) / [(\omega - \omega_0)^2 + \Omega^2], \quad (5)$$

максимум которого расположен на частоте  $\omega_0$ , а полуширина, определяемая на уровне половины максимума, связана с коэффициентом трансляционной диффузии частиц  $D_t$ :

$$\Omega = D_t q^2. \quad (6)$$

Коэффициент диффузии связан с параметрами среды (формула Стокса–Эйнштейна):

$$D_t = k T / 6\pi \eta r_h, \quad (7)$$

где  $\eta$  – вязкость среды;  $r_h$  – гидродинамический радиус частиц;  $k$  – постоянная Больцмана;  $T$  – абсолютная температура.

Оптический спектр (5) при регистрации его фотодиодом даст спектр мощности фототока, который и измеряется экспериментально. Он также имеет лоренцеву форму, но с максимумом на нулевой частоте и полушириной, в два раза большей, чем (5):

$$P(\omega) = N^2 P (2\Omega / \pi) / (\omega^2 + 2\Omega^2). \quad (8)$$

Полуширина спектра (8) в герцах для сферических частиц в воде при комнатной температуре (из (3), (6) и (7)) составляет

$$f = 2\pi \Omega \approx 9,8 \sin(\Theta/2) / \lambda_0 r_h. \quad (9)$$

В наших экспериментах использовался диодный лазер с  $\lambda_0 = 0,86$  мкм и угол рассеяния  $\Theta$  составлял 20 град. Тогда полуширина спектра для броуновских частиц диаметром 4 мкм составляет всего 0,2 Гц. Однако при наличии в среде подвижных микроорганизмов, скорости которых, как правило, в десятки раз выше броуновской, полуширина спектра (8) составляет 10–100 Гц. На рис. 2 приведены спектры, рассчитанные по формуле (8) при различных  $\Omega$ . Видно, что чем больше полуширина спектра (т.е. средняя скорость объектов в жидкости), тем шире начальный (практически горизонтальный в логарифмических координатах) участок спектра. Точка перегиба графика (точнее – уменьшение амплитуды сигнала на 6 дБ) соответствует полуширине функции (8).

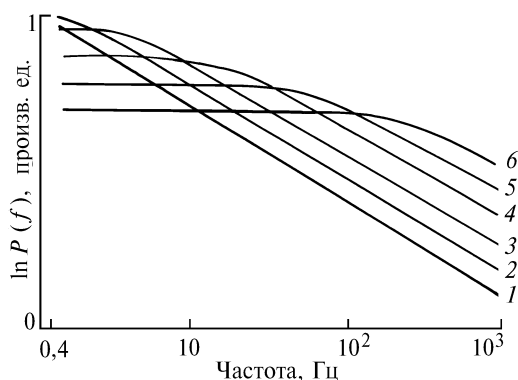


Рис. 2. Расчетный спектр мощности фототока (8) в логарифмическом масштабе: кривые 1–6 – для полуширин 0,25; 1; 4; 16; 64; 256 Гц соответственно

В нашем эксперименте измерялся именно частотный спектр мощности фототока (8), и по его полуширине находилась средняя абсолютная скорость движения (скорость миграции) микроорганизмов, поскольку средний квадрат смещения частицы линеен по времени (формула Эйнштейна) [2]:

$$\langle X^2 \rangle = 2 D_i t. \quad (10)$$

Откуда средняя скорость миграции с учетом (6) для наших параметров эксперимента составляет

$$V = \sqrt{\langle X^2 \rangle} / t \approx 0,85 \sqrt{f}, \quad (11)$$

где  $f$  – измеренная частота полуширины (8), Гц, а  $V$  – в мкм/с. После измерения  $V$  для контроля кювета с исследуемой пробой (около 0,1 см<sup>3</sup>) нагревалась погружением в кипяток на 1–2 мин, остужалась и спектр снимался вновь. При этом регистрировался спектр чисто броуновского движения механических загрязнений и погибших микроорганизмов в воде.

### 3. Экспериментальные результаты

На рис. 3 приведен типичный вид экспериментальных спектров. Из рисунка видно, что, несмотря на невысокую точность измерений (спектр снимался поточно селективным вольтметром типа В6-9 с усреднением в каждой точке около 10 с) полуширина спектра является вполне измеримой величиной. Отношение сигнал-шум для реальных проб речной воды составляло 20–30 дБ и разброс измерений связан в основном со статистическим характером самой измеряемой величины. Средний размер броуновских частиц (после кипячения пробы) в нашем эксперименте измерить не удастся из-за слишком узкой полуширины распределения (см. выше).

В нашем эксперименте нижняя граничная частота составляла 3 Гц. Этим, кстати, объясняется то, что на экспериментальных кривых максимум спектра броуновского движения располагается ниже соответствующего спектра живых микроорганизмов.

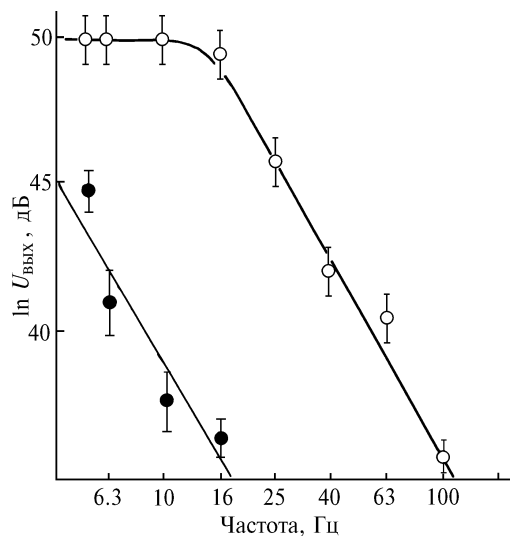


Рис. 3. Типичный вид экспериментальных кривых: кривая 1 – проба номер 10; 2 – то же, после кипячения пробы

На рис. 4 приведены результаты измерений средних скоростей движения микроорганизмов в приповерхностных пробах воды реки Волги, проведенных в рамках экологической экспедиции Москва – Нижний Новгород – Москва 27 июня – 7 июля 1993 г. Видно, что подвижные микроорганизмы обнаружены во всех пробах, т.е. чувствительность прибора достаточна для работы с природной водой без какой-либо предварительной подготовки проб.

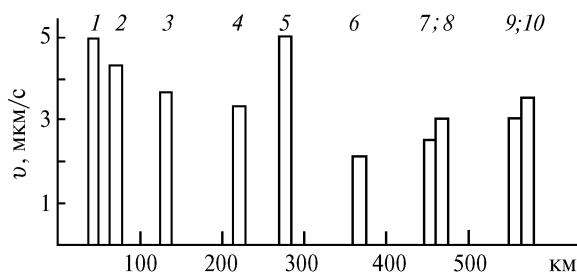


Рис. 4. Измеренная подвижность микроорганизмов в зависимости от расстояния от Москвы вниз по Волге: 1 – через час после отхода от Северного речного вокзала; 2 – через 2,5 часа после отхода; 3 – район г. Дубна; 4 – район г. Калязина; 5 – г. Углич; 6 – выход из Рыбинского шлюза; 7,8 – рейд г. Ярославля, приповерхностный и придонный слой воды; 9 – район г. Костромы; 10 – река Кострома при впадении в Волгу

Для сравнения отметим, что при контрольных наблюдениях через микроскоп с увеличением до 900 раз подвижные частицы практически не обнаруживались, т.е. на поле наблюдения приходилось менее одной частицы.

Но информативность таких измерений в данном случае невелика, поскольку отсутствует априорная информация о типе регистрируемых микроорганизмов (фитопланктон, бактерии ..?), поэтому даже нельзя ответить на вопрос: высокая подвижность – хорошо это или плохо для данного водоема?

Данный метод мог бы быть достаточно эффективен для мониторинга, например, био- и фитопланктона в открытой морской воде, где известно, что они составляют основную биомассу и их жизнедеятельность напрямую связана с экологическим состоянием вод.

1. С п е к т р о с к о п и я оптического смешения и корреляция фотонов / Под ред. Г. Камминса, Е. Пайка/ Пер. с англ. под ред. Ф.В. Бункина. М.:Мир, 1978. 583 с.
2. Х и р К. Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы/ Пер. с англ. под ред. А.Г. Башкирова. М.:Мир, 1976. 600 с.

Институт общей физики РАН,  
Москва

Поступила в редакцию  
20 января 1994 г.

S. F. R a s t o p o v. **Optical Detection of Alive Microorganisms in Water.**

This paper describes a technique and instrumentation for measuring mobility of alive microorganisms in water. The technique is based on detection of self-beating of intensity in the spectrum of scattered radiation. Some measurement results on the mean speed of motion of microorganisms in samples of surface water from Volga river are presented.