

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 58.085

PACS 87.64.Kv, 87.85. Fk

ХЛОРОФІЛ-СЕНСОРИ ПОЛЬОВИХ ПРИЛАДІВ

Д. М. Артеменко, Ю.С. Колесник, В.О. Романов, В.С. Федак

Інститут кібернетики імені В.М.Глушкова НАН України

ХЛОРОФІЛ-СЕНСОРИ ПОЛЬОВИХ ПРИЛАДІВ

Д. М. Артеменко, Ю.С. Колесник, В.О. Романов, В.С. Федак

Анотація. В статті представлено огляд сучасних польових приладів для дослідження та аналізу стану рослин на основі оптичних властивостей хлорофілу основних фірм-виробників. Проведено порівняльний аналіз за функціональними та конструктивними ознаками, на основі якого визначені технічні вимоги до проектування високотехнологічного хлорофіл-сенсора. Розглянуті особливості проектування такого сенсора.

Ключові слова: відбиття світла, поглинання хлорофілу, індукція флуоресценції хлорофілу, хлорофіл-сенсор

CHLOROPHYLL-SENSOR OF FIELD DEVICES

D.M. Artemenko, J.S. Kolesnik, V. O. Romanov, V. S. Fedak

Abstract: In article the review of modern field devices for research and the analysis of a condition of plants on the basis of optical properties of a chlorophyll of the basic firms-manufacturers is presented. The comparative analysis behind functional and constructive signs on which basis technical requirements to designing of a highly technological chlorophyll-sensor are defined is carried out. The surveyed features of designing of such sensor control.

Keywords: reflection of light, chlorophyll absorption, an induction of fluorescence of a chlorophyll, a chlorophyll-sensor

ХЛОРОФИЛЛ-СЕНСОРЫ ПОЛЕВЫХ ПРИБОРОВ

Д.М. Артёменко, Ю.С. Колесник, В.О. Романов, В.С. Федак

Аннотация. В статье представлен обзор современных полевых приборов для исследования и анализа состояния растений на основе оптических свойств хлорофилла основных фирм-производителей. Проведен сравнительный анализ за функциональными и конструктивными признаками, на основе которого определены технические требования к проектированию высокотехнологического хлорофилл-сенсора. Рассмотрены особенности проектирования такого сенсора.

Ключевые слова: отражение света, поглощения хлорофилла, индукция флуоресценции хлорофилла, хлорофилл-сенсор

Показники відбиття, поглинання та індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) викликають інтерес у дослідників фотосинтезу та аграріїв, як діагностичні ознаки стану рослин та впливу на цей стан ендо- та екзогенних чинників.

Визначення структурних та функціональних показників стану нативного хлорофілу інтактного листка рослини є необхідною складовою вивчення процесів фотосинтезу та опрацювання на їх основі способів діагностики стану рослин. Діагностичні показники можуть бути структурними та функціональними. Серед структурних показників, що визначають інструментальними методами, кількісні значення концентрації різних пігментів, зокрема хлорофілу, які визначають у вигляді хлорофільних індексів, а також співвідношення вмісту різних хлорофілів (Хл.а і Хл.б). Серед функціональних діагностичних ознак використовують, наприклад, різні аномалії показників кривої індукції флуоресценції хлорофілу.

Визначення структурних та функціональних показників стану рослин інструментальними експресними методами у польових умовах особливо цінується аграріями, які працюють в галузі рослинництва.

Сучасні прилади з вбудованими хлорофіл-сенсорами.

Під хлорофіл-сенсором будемо розуміти оптоелектронний пристрій перетворення властивостей відбиття, поглинання та флуоресценції нативного хлорофілу інтактного листка рослини в електричний сигнал з подальшою його обробкою. Такі пристрої за визначенням [1] можна вважати сенсорними елементами, а за класифікацією [2] - біосенсорами, бо їх чутливим елементом є нативний хлорофіл.

Нами розглянуті хлорофіл-сенсори польових приладів визначення стану хлорофілу та фотосинтетичного апарату, зокрема хлорофіл-спектрометрів, хлорофіл-флуорометрів та хлорофілометрів. Найбільший асортимент таких приладів представлений фірмами: Qubit Systems Inc, Канада; PSI – Photon Systems Instruments, Чехія; Hansatech instruments, Велика Британія; ADC BioScientific, Велика Британія; OPTI-sciences, США; WALZ, Німеччина та ін.

Малогабаритні польові флуорометри фірми PSI [3] представлені рядом моделей серії FloraPen FP-100, які відрізняються комплектом поставки зовнішніх функціональних вузлів та відповідним програмним забезпеченням. Це

прилади модуляційного типу, мають подібні сенсорні модулі, до яких належать вузли програнованого опромінювання, прийому, виділення та вимірювання сигналів флуоресценції. Інтенсивність актинічного опромінення регульована в межах від 0 до 3000 мкЕ на хвилях 450 та 650 нм. Прийом сигналів флуоресценції відбувається в діапазоні хвиль від 697 до 750 нм. Сенсорний модуль розміщено в середині приладу, а опромінення листка і прийом флуоресценції здійснюють через спеціальне вікно.

Малогабаритні хлорофіл-флуорометри та хлорофіл-спектрометри фірми GUBIT [4] випускаються у зручному корпусі габаритами 120 x 57 x 30 мм. Флуорометри серії Z990 FloraPen за номенклатурою алогічні до серії FP100 фірми PSI і доповнені моделлю FAR-PEN FP-MAX-LM, яка додатково вимірює падаючу сонячну радіацію (FAR). Крім того фірма GUBIT додатково випускає серію хлорофіл-спектрометрів Z950 PlantPen, двох версій MPP для вимірювання індексів фотохімічного відбиття та версії NDVI для нормування різних рослинних індексів (відбиття). Технічні та експлуатаційні характеристики сенсорів цих приладів подібні до аналогічних характеристик хлорофіл-флуорометрів фірми PSI. Слід відзначити, що хлорофіл-флуорометри потребують виділення сигналів флуоресценції на фоні освітлення з допомогою світлофільтрів, а хлорофіл-спектрометри при заданій довжині хвилі опромінення можуть приймати відбите світло безпосередньо, без використання світлофільтрів. Це, як правило, роблять послідовно на двох-трьох довжинах хвиль. Хлорофіл-спектрометр Z 950 дозволяє визначати до 15 хлорофільних індексів. Випромінення від джерела світла через вікно корпусу поступає на листок, а відбите світло через це ж вікно поступає на фотоприймач, який розташовано в середині приладу.

До приладів лабораторно-польового типу належить флуорометр PAM-2500 фірми WALZ [5]. Сенсорний модуль флуорометра PAM-2500 конструктивно розділений на виносний затискач листка та оптоелектронний вузол, які з'єднані оптоволоконним кабелем. Затискач листка має сидло для підключення оптоволоконного кабелю, та світлоізолюючу металеву шторку на одній з двох пластин, між якими розміщують листок рослини. Оптоелектронний вузол сенсорного модуля забезпечує різні режими опромінення: ML, AL, SP та режим модуляції. Імпульси вимі-

рювального світла тривалістю 1-3 мкс на частоті 10-5000 Гц мають 20 градацій інтенсивності в межах 0,01 – 100 мкЕ. При синьому варіанті актинічне світло на хвилі 455 нм має 20 градацій інтенсивності в діапазоні 10-800 мкЕ. При червоному варіанті актинічне світло AL на хвилі 630 нм має 20 градацій інтенсивності в діапазоні 0-4000 мкЕ. Червоні насичуючі імпульси SP на хвилі 635 нм мають 20 градацій інтенсивності в діапазоні 100-25000 мкЕ при тривалості 0,1-0,8 с. В режимі багаторазових спалахів червоного світла інтенсивність має 20 градацій в діапазоні 0-25000 мкЕ при тривалості в діапазоні 0-800 мкс. В режимі разових спалахів червоного актинічного світла при інтенсивності до 125000 мкЕ тривалість знаходиться в діапазоні 5-50 мкс. Крім того, використовуються імпульси далекого червоного світла на хвилі 735 нм.

Сенсорний модуль PAM флуорометру OS5P фірми Opti-Sciences, США [6], конструктивно розділений на затискач листка та оптоелектронний блок, який розміщений в приладі і з'єднаний з затискачем оптоволоконним кабелем. Затискач має сидло для кабелю та світлоізолюючу шторку. Сенсорний модуль створює режими двохколіорового освітлення на хвилях 450 та 660 нм в діапазоні інтенсивностей 0-3000 мкЕ, частота модуляції 25Гц – 1 МГц, а також використовується далеке червоне світло (735 нм) для визначення F_0 кривої ІФХ. Фотоприймачем слугує Pin-фотодіод в спектральній області 700-759 нм.

Сенсорний модуль базової моделі флуорометра FM-1 фірми Hansatech, Велика Британія [7], конструктивно розділений на затискач листка та оптоелектронний вузол, який розміщено у блоці керування і з'єднаний з затискачем оптоволоконним кабелем. Сенсорний модуль включає джерела опромінення з параметрами: довжина хвилі опромінення 470, 594, 735 нм, інтенсивність AL -0-3000 мкЕ, 50 кроків, SP 0-20000 мкЕ 100 кроків. Джерело світла – галогенна лампа. В моделі FM-2 до затискача включено різні сенсори: температури, CO_2 , O_2 , а також обладнання: кювету, чашку Петрі та ін. Можлива довжина оптоволоконного кабелю 1,5-10 м. Пляма опромінення має діаметр 7 мм.

Модель Pocket PEA, «КИШЕНЬКОВА ГОРОШИНА», фірма SADEF - HANSATECH використовує як флуорометр у наборі FLUO для розподіленої системи збору інформації у польових умовах. Модель «ЗРУЧНА ГОРО-

ШИНА» має сенсорний модуль, подібний до попередньої моделі: опромінення здійснюється трьома надяскравими світлодіодами на хвилі 650 нм з інтенсивністю 0-3000 мкЕ, освітлена пляма має діаметр 4 мм. Модульна конструкція сенсора дозволяє використовувати його в різних моделях флуорометрів.

Сенсори портативних флуорометрів сімейства «Флоратест» [8] та PAM-флуорометр [9,10] розроблені в Інституті кібернетики ім. В.М.Глушкова НАН України, конструктивно автономні, чипляються на листок рослини з допомогою затискача. В сенсорі розташовані світлодіоди, ключі керування, світлофільтр та фотоприймач з підсилювачем. У сенсорі PAM-флуорометра на другій пластині затискача розташовано термометр-нагрівач, який може нагрівати фрагмент листка діаметром 8 мм до температури 80°C з регульованою швидкістю нагріву. Віддаленість сенсора від вимірювального приладу (довжина кабелю) складає до 1,5 м.

Прилади вимірювання спектрального поглинання хлорофілу інтактного листка використовують для визначення хлорофільного індекса – показника, наближеного до концентрації хлорофілу. Враховуючи кореляцію між вмістом хлорофілу в листку та забезпеченістю рослини ґрунтовим азотом, хлорофільний індекс використовують як показник вмісту азоту в ґрунті, а прилади для його вимірювання - як N-тестери. Сенсори приладів ССМ-200 фірми ADC Bioscientific, Велика Британія [11], та SPAD-502 Plus фірми Spectrum Technologies Inc, США [12], подібні до сенсорів хлорофіл-спектрометрів та хлорофіл-флуорометрів, тому що мають джерело опромінення, здебільшого на хвилі поглинання хлорофілу, та фотоприймач у вигляді фотодіода, інтегрованого з підсилювачем, які орієнтовані на освітлену пляму діаметром 4–8 мм з протилежної до опромінення сторони листка.

Порівняння параметрів сенсорів польових приладів (див. таблицю), виконано за функціональними та конструктивними ознаками. Серед функціональних ознак слід відзначити показники опромінення, поглинання, відбиття, флуоресценції, виділення та перетворення оптичних сигналів в електричні. Серед показників опромінення виділяють: довжину хвилі, інтенсивність, частоту модуляції, тривалість та амплітуду імпульсів тощо, а також можливість вибору та регулювання цих показників, їх вимірювання

та облік. Серед показників прийому і виділення оптичних сигналів розрізняють довжини хвиль пропускання, відбиття та флуоресценції, чутливість та коефіцієнт підсилення фотоприймача, а також його смугу пропускання.

Особливістю розглянутих приладів з хлорофіл-сенсорами є представлення результатів у відносних одиницях, приведених до максимального значення їх шкали. В більшості випадків розраховані показники являють собою відношення вимірних величин. Метрологічні показники таких приладів в технічних описах, як правило, не наводяться, тому співставляти результати вимірювань багатьох величин, отриманих різними флуорометрами, важко.

Фірма Hansantech вбудувала в сенсор «Паритет» датчик інтенсивності актинічного та насичуючого опромінення. Це дозволяє тестувати весь вимірювальний тракт, включаючи сенсор.

Серед конструктивних ознак виділяють масогабаритні показники, параметри енергоспоживання та тип джерела живлення, кількість та номенклатуру сенсорів і їх віддаленість від вимірювального блоку приладу, модульність конструкції та метрологічні показники.

Як видно з огляду, невід'ємною частиною приладів для вимірювання показників відбиття, поглинання та ІФХ є оптоелектронний хлорофіл-сенсор, від параметрів якого залежать можливості приладу, тип вимірюваних

показників та їх метрологічні характеристики. Важливе місце серед флуорометрів, спектрометрів та хлорофілометрів займають портативні польові прилади, як правило, орієнтовані на обмежений перелік діагностичних задач, тому сенсори таких приладів теж спеціалізовані. Переорієнтація приладу на іншу діагностичну задачу полягає у зміні режиму роботи сенсора [8,12,13] та алгоритму обробки, орієнтованого на одну задачу.

Спеціалізовані сенсори мають спільні риси:

1. Безпосередній нерухомий контакт з листком рослини на час вимірювання здійснюється у діапазоні від 1 до 10 хв.
2. Опромінення фрагмента листка має діаметр від 1 до 10 мм.
3. Віддаленість сенсора від вимірювального приладу складає від 0 до 15 м.
4. Передбачено виділення необхідних довжин хвиль опромінення та вимірювання.
5. Передбачено програмований режим опромінення.
6. Використовується фотодіодний фотоприймач з інтегрованим вимірювальним підсилювачем.
7. Джерело управління та живлення - зовнішнє.
8. Умови експлуатації – польові.

Зазначені хлорофіл-сенсори мають також відмінності:

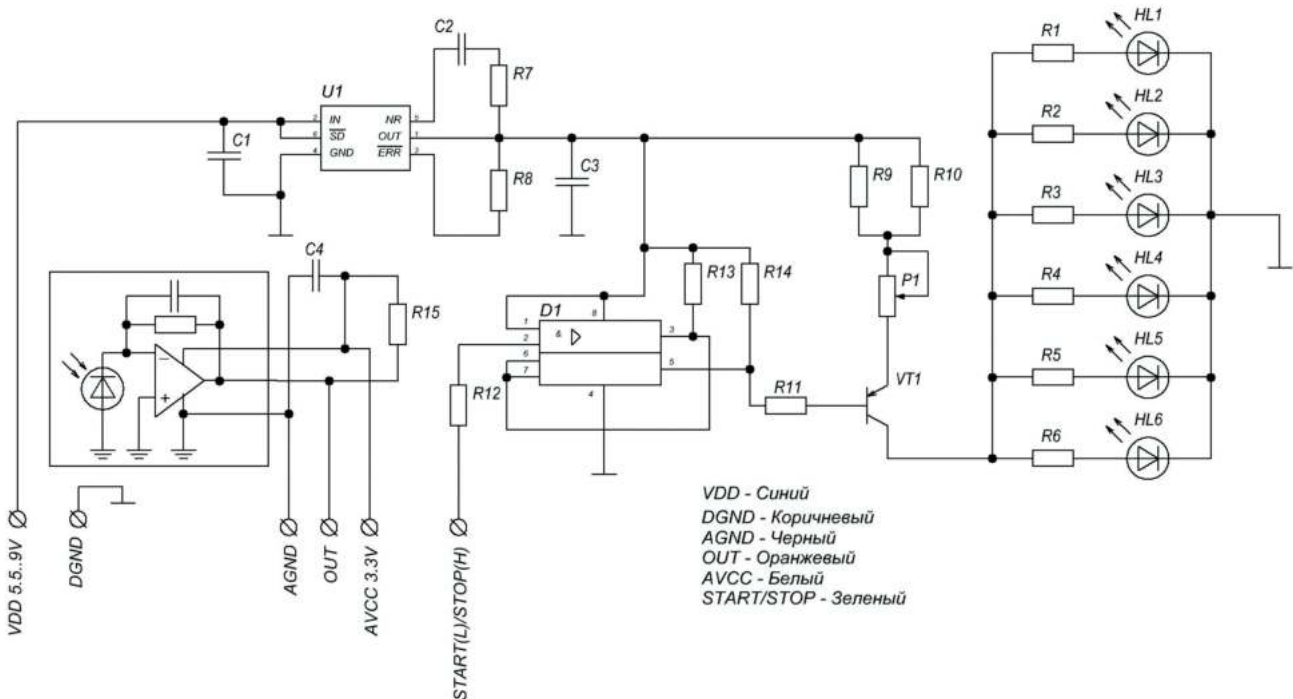


Рис.1. Принципова електрична схема сенсора.

1. Різний час вимірювання.
2. Різні довжини хвиль опромінення та вимірювання.
3. Опромінення може відбуватися з різних сторін листка.

Зазначені особливості хлорофіл-сенсорів доцільно використати при проектуванні типового високотехнологічного сенсора. Переорієнтацію такого сенсора на спеціалізовані задачі здійснюють шляхом додавання нових функціональних пристроїв та розміщення їх безпосередньо у корпусі сенсора [12,13]. Тому розробка високотехнологічних сенсорів для польових приладів вимірювання показників ІФХ, відбиття та поглинання є актуальною задачею.

Сформулюємо вимоги до хлорофіл-сенсорів.

1. Конструктивні: мініатюрні габарити, малі вага та енергоспоживання. Захищеність від пилу, вологи, сонячного опромінення. Модульність структури та можливість модернізації.
2. Метрологічні: широкий діапазон вимірювання, малі похибки, наявність засобів калібровки.
3. Експлуатаційні: стійкість до змін кліматичних умов, простота вимірювання, тестування працездатності, можливість калібровки.
4. Ергономічні: простота експлуатації, вибору режимів, тестування працездатності, кріплення на, або біля об'єкту, утримання при вимірюваннях, простота переноски та транспортування, яскраві, контрастні та зручні органи керування,
5. Висока технологічність: сучасні матеріали та технології виготовлення корпусу, уніфіковані SMD-компоненти, юстування оптичних вузлів, захист фотоприймача від паразитного опромінення, автоматичне складання, простота настройки, калібровки, тестування.
6. Економічні: невелика вартість, серійнопридатність.

Враховуючи ці вимоги та особливості проектування [1], в Інституті кібернетики ім. В.М.Глушкова НАН України розроблено і передано у виробництво типовий технологічний хлорофіл-сенсор.

Принципова електрична схема типового оптоелектронного хлорофіл-сенсора наведена на рис. 2.

Сенсор включає світлодіоди HL1 – HL6, резистори R1 – R6, ключ VT2, узгоджувачий інвертор, стабілізатор напруги та фотоприймач, інтегрований з підсилювачем. Сенсор працює

наступним чином: при подачі команди «старт» на узгоджувачий елемент, останній через ключ VT2 включає джерело живлення світлодіодів HL від стабілізатора ADP. Опромінення листка рослини збуджує флуоресценцію хлорофілу. Сигнал флуоресценції виділяється світлофільтром і поступає на фотоприймач, інтегрований з вимірювальним підсилювачем. Сигнал з фотоприймача подається на вимірювальний прилад для подальшої обробки та запам'ятовування. Елементи сенсора розміщені на платі габаритами 42x22x6 мм. Розводку друкованої плати та розміщення елементів перевірено на моделях в середовищі SPRINT Layout та S-PLAN.

Технологія виготовлення корпусу сенсора:

1. За спеціалізованими засобами САПР створений 3D ескіз напівкорпуса сенсора.
2. За допомогою 3D - принтера на підтримую-

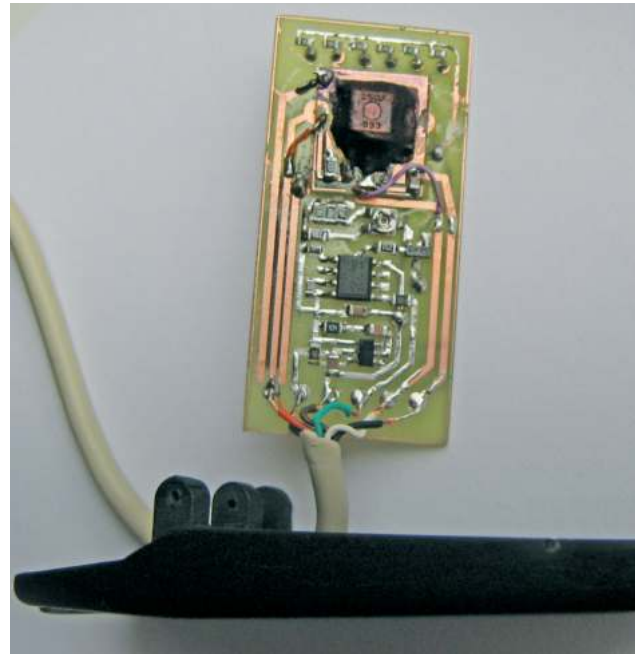


Рис.2 Конструкція хлорофіл-сенсора.



Рис.3 Хлорофіл-сенсор.

Таблиця

Порівняльні характеристики хлорофіл-сенсорів.

N	Прилад	Фірма	Країна	Параметри опромінення						Габарити				Примітка	
				Довж хвилі	Інтенсивність	F	T	Вікно	Відстан до сенсора	Довжина хвилі прийому	Довжина	Ширина	Висота		Маса
				нм	МкЕ	Гц	с	мм	м	мм	мм	мм	мм	г	
1	FluoroPen Z990 флуорометр	Qubit Systems	Канада		3000			5	0	120	57	30	300		Прилад
2	Plant Pen Z950 Спектрометр	Qubit Systems	Канада					5	0	120	57	30	300		Прилад
3	FluoroPen Fm-100 Флуорометр	PSI, Photon Systems Instruments	Чехія		3000			5	0	120	57	30	300		Прилад
4	FMS-1 флуорометр			470	3000	100	1	7	15 10						
5	Горошина	Nansatech Instruments	Велика Британія	594 735	28000			4	1,5	170	85	40	300		Прилад
6	FLUODEF								1,5						
7	OS – 5P PAR флуорометр	OPTI-Sciences	США	450 660 735	3000 600 15000	25-10 ⁵	var	5	1,5	180	130	140	1400		Прилад
8	RAM – 2500 RAM флуорометр	Walz	Німеччина	460 630	800 2000 15000	10- 2x10 ⁵	1	1 4	1,5	230	105	10,5	2500		Прилад
9	CCV-200 плюс хлорофілометри	ADC Bisientigic	Велика Британія	653 931	-			15,7	0	152	82	25	162		
10	SPAD 502 Plus Хлорофілометри	Spectrum Technologies	США	650 940	-			23	0	164	78	49	200		Прилад
11	Флоратест флуорометр	ІК НАНУКРАЇНИ	Україна	470	100	-	0,8	5	1	55	35	30	25		Прилад
12	RAM – флуорометр	ІК НАНУКРАЇНИ	Україна	470	800		0,3	3,5	1	70	25	25	15		Прилад

чий шар пошарово нанесено синтетичний матеріал з дискретністю 0,02 мм і отримано майстер-модель.

3. Після очистки та поліровки майстер-моделі з неї відлито силіконову форму.
4. У силіконовій формі способом вакуумного лиття з полімеру відлито напівкорпус сенсора.

Проектування плати, складання сенсора та його настройка

Конструкція сенсора, рис.3, містить світлодіоди навкруги отвору, в якому розміщується світлофільтр. Над ним розміщено фотоприймач. Оптичні вісі фотоприймача і світлодіодів повинні перетинатись на листку рослини і утворювати рівномірно освітлену пляму діаметром 1,3÷5мм. Це досягають шляхом використання шести синіх SMD-світлодіодів, розміщених по колу діаметром 7мм таким чином, щоб їх випромінювання утворювало пляму з рівномірними освітленням. Запропоновану конструкцію сенсора моделювали у середовищі САПР з урахуванням вимог високотехнологічного обладнання для складання друкованих плат.

Складання сенсора (рис. 3) полягає в розміщенні друкованих плат в напівкорпусах, їх закріпленні і з'єднанні напівкорпусів.

Настройка сенсора включає перевірку працездатності підключеного до приладу сенсора в режимі тестування. Для перевірки працездатності, калібровки та повірки використовують еталон флуоресценції хлорофілу, який являє собою пластину з кольорового скла [14]. Рівень калібрування дорівнює 0,65 Um, де Um - максимальне значення шкали флуорометру.

Висновки

Розробка та проектування типових високотехнологічних оптоелектронних хлорофіл-сенсорів для діагностики стану рослин є актуальною задачею сучасного високопродуктивного землеробства.

Висока технологічність виготовлення хлорофіл-сенсорів є необхідною умовою серійного виробництва і широкого застосування діагностичних приладів, заснованих на використанні явища флуоресценції хлорофілу і вимірюванні параметрів відбиття та поглинання світла нативним хлорофілом інтактного листка рослини

Розроблений в Інституті кібернетики ім. В.М.Глушкова НАН України сенсор відповідає конструктивним, метрологічним, експлуатаційним та ергономічним вимогам до польових хло-

рофіл-флуорометрів, хлорофіл-спектрометрів та хлорофілометрів.

Література.

1. Романов В.О., Груша В.М., Артеменко Д.М., Скрипник О.В., Вілк Н.М. Інтелектуальні сенсори, особливості та проблеми проектування // Комп'ютерні засоби, мережі та системи. №7 / 2008.
2. Біосенсори. WWW. Wikipedia. com
3. FlaroPen FP-100. Photon Systems Instruments. <http://www.Psi.GZ/products/pocket-sized-instruments/fluorpen>.
4. Z990. FluorPen Handheld Chlorophyll Fluorometer www. Gubitsystems. com.
5. PAM – 2500, High-Performance Field and Laboratory Chlorophyll Fluorometer. <http://www.Walz.com/produkt/Icell-p700/pam-2500/introduction.html>
6. OS – 5p. Chlorophyll Fluorometer – Pulse Modulated, Multi-Mode, Field Portable. OPTI–Sciences. www. Optisci.com.
7. FMS1. Fluorescence Monitoring System. Hansgtech Instruments <http://www.Hansatech-instruments.com>.
8. Романов В.А., Галелюка И.Б., Сарахан Е.В. Портативный флуориметр и особенности его применения // Сенсорная электроника и микросистемные технологии – 2010-1. (7) №3 – С 146 -152.
9. Артеменко Д.М., Китаев О.І., Федак В.С. Портативний ПАМ хлорофіл- флуорометр з вимірюванням термоіндукції / Комп'ютерні засоби, мережі та системи. №9 / 2010.
10. Патент України на корисну модель №54901 Артеменко Д.М., Войтович І.Д., Китаев О.І., Клочан П.С., Колесник Ю.С., Романов В.О. Федак В.С. «Сенсор» Бюл. №22, 2010.
11. CCM-200 plus, Chlorophyll Content Meter ADC Bioscientific ltd. <http://www.adc.co.UK/Products/CCM-200pluschlorophyllContentMeter/>
12. SPAD 502 plus @ 502 DL plus Chlorophyll Meter <http://www.Specmeters.com/chlorophyllMeters/Minolta>.
13. Патент України на винахід. Сенсор хлорофілу. Бюл. № 2011.
14. Патент України на корисну модель №37737, Брайко Ю.О., Войтович І.Д., Китаев О.І., Клочан П.С., Колесник Ю.С., Романов В.О., Федак В.С. «Оптоелектронний сенсор», Бюл. №23, 2008 р.