

拉曼-荧光联合水下探测系统及初步试验

张 锋, 郭金家*, 刘春昊, 罗 昭, 郑荣儿

(中国海洋大学 信息科学与工程学院, 山东 青岛 266100)

摘 要: 深海热液环境中存在着巨大的化学和热梯度, 快速剧烈的混合和生物合作过程产生了多种多样的矿物合作过程, 并培养了大量的化学合成微生物。激光拉曼光谱非常适合于深海热液环境矿物过程的探测, 然而要对矿物与微生物作用过程进行研究, 还需要与荧光光谱技术进行联合。针对深海热液的探测需求, 研发了一套拉曼-荧光联合光谱水下原位探测原理样机。该联合系统主要通过双波长激光器和两个微型光谱仪实现, 双波长激光器同时发射 266 nm 和 532 nm 激光, 其中 532 nm 激光用来激发拉曼光谱, 266 nm 激光用来激发荧光光谱。根据波长不同, 双波长激光被分为两束分别经两片石英玻璃窗口照射到海水或液体样品上。产生的拉曼和荧光光谱经后向散射收集并分别耦合到拉曼和荧光光谱仪中。整个系统集成于 $L790\text{ mm}\times\Phi270\text{ mm}$ 的舱体内, 在舱体前端有光学窗口和水密插头, 舱体内部主要包括双波长激光器、光谱仪、嵌入式计算机和供电装置, 甲板控制终端通过电缆实现对系统的供电、控制和数据采集。利用搭建的原理样机在实验室对海水和拟菱形藻样品进行探测, 实验结果初步证明拉曼-荧光联合光谱探测装置的可行性, 之后系统在青岛近岸进行了实验并获得了实验数据。下一步将优化系统并应用于深海热液环境探测。

关键词: 拉曼-荧光联合探测; 水下原位光谱; 原理样机; 初步试验

中图分类号: O433.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201847.0606006

Development of an underwater combined Raman-fluorescence detection system and preliminary test

Zhang Feng, Guo Jinjia*, Liu Chunhao, Luo Zhao, Zheng Rong'er

(College of Information Science & Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: A variety of chemosynthetic micro-organisms inhabit the deep sea hydrothermal vent environments. Steep chemical and thermal gradient, rapid and turbulent mixing and biological processes produce a multitude of diverse mineral phases. Raman spectrometer system is well suited to mineral speciation measurements and has been successfully used for the detection in deep sea hydrothermal environments so far. However, to further understand the interaction of mineral and microbial processes, a Raman system optimized for mineral identification that incorporates a fluorescence for microbial processes is needed. In order to meet the requirement of deep sea hydrothermal research, a new compact spectroscopy Raman-fluorescence combined system prototype was presented. The combined system was composed of a double wavelength laser which can emit both 532 nm and 266 nm wavelength, the 532 nm

收稿日期: 2018-01-05; 修订日期: 2018-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(61575181), 国家重点研发计划项目(2016YFC0302101)

作者简介: 张锋(1992-), 男, 硕士生, 主要从事海洋激光探测技术方面的研究。Email: 17864272033@163.com

通讯作者: 郭金家(1979-), 男, 高级工程师, 主要从事海洋激光探测技术方面的研究。Email: optisc@ouc.edu.cn

wavelength was used for Raman spectroscopy excitation, and the 266 nm wavelength was used for fluorescence excitation, and two miniature optical fiber spectrometer. The double wavelength laser beam was split into two paths according to the wavelength and entered into the seawater or liquid solution by different quartz window. The produced Raman and fluorescence signals were collected by a back-scattering optical set-up and coupled into Raman spectrometer and fluorescence spectrometer separately. The whole system was housed in a $L790\text{ mm}\times\Phi270\text{ mm}$ capsule with an optical window on the end, and the computer, power were also contained into it. The power supply, system control, and signal delivery were provided through an 8 pins cable. Systematic experiments had been carried out with seawater and pseudo-nitzschia samples in laboratory. The results show that the Raman and fluorescence spectra could be obtained simultaneously with moderate sensitivity. Some experiment results were acquired at Qingdao coast. It is hoped this prototype could be fully developed in hydrothermal area detection in the near future.

Key words: Raman-fluorescence combined detection; underwater in-situ spectroscopy; principle sample machine; preliminary test

0 引言

深海热液环境中存在着巨大的化学和热梯度,快速和剧烈的混合和生物过程产生了多种多样的矿物合成过程,并培养了大量的化学合成微生物^[1-2]。热液环境的微生物通常与特定的矿物生长阶段密切相关,他们之间的相互作用过程以及重要性在近几年才被逐渐认识到。热液环境的矿物过程是在特定环境下形成的,深海热液环境的许多微生物也无法在实验室培养^[3],为了保证探测的真实性只能进行原位探测^[4]。

激光拉曼光谱具有快速、准确、无损的优点,非常适合于深海热液环境矿物过程的探测。美国、中国都有深海原位探测系统,然而要对矿物与微生物作用过程进行研究,还需要与荧光光谱技术进行联合。J. A. BREIER 总结了热液现场矿物探测和研究的需求,并提出未来要发展针对热液矿物识别的小型原位拉曼光谱系统并集成荧光探测^[4]。

美国 MBARI (Monterey Bay Aquarium Research Institute) 海洋研究所成功研制了世界首套深海激光拉曼光谱系统 DORISS (Deep-ocean Raman In Situ Spectrometer)^[5],该系统已被用于深海天然气水合物形成过程的原位探测^[6],自然状态下天然气水合物结构和成分的原位调查^[7],以及深海热液喷口流体及矿物质化学成分的原位检测^[6]。国内中国海洋大学在国

家 863 计划的支持下,完成了国内首台双波长运转的深海原位激光拉曼光谱仪(DOCARS)样机^[8],并成功进行 4 000 m 深海试验。“十二五”期间,研制完成了基于观测网和基于 ROV 的深海拉曼光谱系统并成功进行海试。中国科学院海洋研究所也研制了一套深海拉曼光谱系统,并成功应用于深海热液冷泉探测^[9]。

目前水下荧光原位测量多采用荧光计测量,其原理是对于特定荧光发射波长采用滤光片加光电探测器的做法进行单点探测,对于比较明确的荧光组分,采用这样的做法具有体积小、成本低、易于实现等很多优势,但对于很多未知组分的探测,例如要对热液区复杂未知生物荧光进行探测,则需要更多的光谱信息进行分析,这样的水下荧光探测设备研制较少。

针对热液环境拉曼-荧光联合探测的技术需求,中国海洋大学开展技术探索,2014 年在青岛近海进行了海试,并同时取得了叶绿素、CDOM 和 SO_4^{2-} 的信号^[10]。此文在此基础上进一步改进系统,搭建了一套拉曼-荧光联合光谱水下原位探测系统并在浅海进行了初步试验验证。

1 实验

1.1 系统装置

整个拉曼-荧光联合光谱水下原位探测系统如

图 1 所示, 系统由甲板控制和水下探测舱两部分构成。水上甲板控制部分由供电系统和计算机终端组成; 水下探测舱内主要包括激光器、拉曼/荧光光谱仪、控制模块(PC-104)和供电模块。

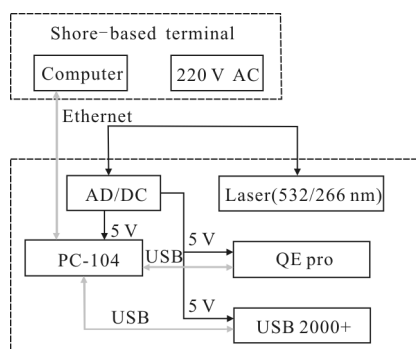


图 1 拉曼-荧光联合光谱水下原位探测系统结构框图

Fig.1 Block diagram of underwater combined Raman-fluorescence spectrum in situ detection system

系统采用一台 532 nm/266 nm 双波长激光器同时作为拉曼光谱和荧光光谱的激发光源, 其中拉曼光谱采用 532 nm 波长, 输出功率 100 mW, 荧光光谱采用 266 nm 波长, 输出功率 10 mW。拉曼和荧光信号采集分别采用海洋光学公司的 QE Pro 与 USB2000+ 光纤光谱仪。控制模块采用研祥 PC-104 嵌入式工控机, 系统采用明纬电源对激光器、光谱仪与 PC-104 进行供电, 供电电压 5 V。系统整体集成在 L79 cm×Φ27 cm 的铝合金密封舱内。系统指标见表 1。

表 1 拉曼-荧光联合光谱水下原位探测系统技术指标

Tab.1 Specification of underwater combine Raman-fluorescence spectrum in situ detection system

| Contents | Specification |
|---------------------|--|
| Excitating light | 532/266 nm double wavelength laser |
| Excitating power | 532 nm(100 mW);266 nm(10 mW) |
| Detector | QE Pro and USB 2000+ |
| Spectral range | Raman (200-3 000 cm^{-1});Fluorescence(200-850 nm) |
| Spectral resolution | QE Pro (9 cm^{-1});USB2000+(1.5 nm) |
| Power | <100 W |
| Volume | L790 mm×Φ270 mm |

系统设计要求可通过岸基操作平台对水下探测部分供电并进行实时状态监控和数据采集。岸基操作平台通过 8 芯电缆与水下探测部分相连, 为水下探测部分提供电源并与水下操作平台进行通信, 完成水上/水下两部分的双向控制及数据传输。岸基控制部分采用 Windows 自带的远程桌面实现对水下 PC-104 的控制, 通过安装在 PC-104 上的软件实现水下信号收集部分的控制。

1.2 光路部分

系统光路部分如图 2 所示。图中 BS 为分光镜, M 为反射镜, L 为透镜, DM 为二项色镜, LPF 为长通滤光片。双波长激光器发出的光束经分光镜分为两路, 一路是 532 nm 拉曼光路, 另一路是 266 nm 荧光光路。对于 532 nm 拉曼光路, 激光经过三次反射后由窗口透镜聚焦到海水中, 后向拉曼散射信号再经窗口透镜收集后通过长通滤光片耦合进入光纤, 然后导入到 QE Pro 光谱仪中进行探测, 在 532 nm 拉曼光路中, 文中采用长通滤光片实现后向散射光路同轴探测。对于 266 nm 荧光光路, 激光经过一个小棱镜反射后由窗口透镜聚焦到海水中, 与拉曼光路类似, 后向荧光信号由透镜收集后经长通滤光片耦合进入光纤, 然后导入到 USB2000+ 光谱仪中进行探测。在探测时可通过远程操控对两台光谱仪分别设置参数, 以满足拉曼光谱和荧光不同探测需求。

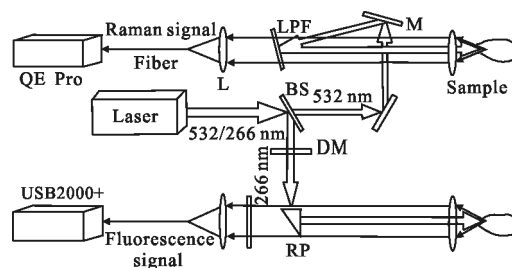


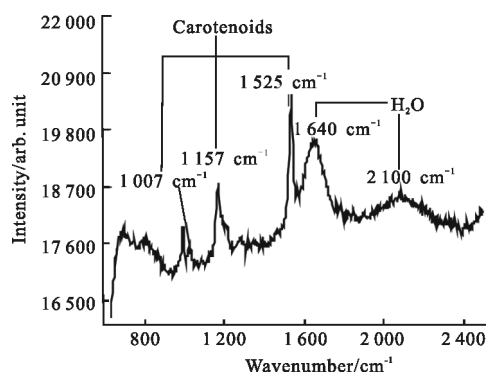
图 2 拉曼-荧光联合光谱探测光路图

Fig.2 Schematic diagram of the combined Raman-fluorescence spectroscopy detection light path

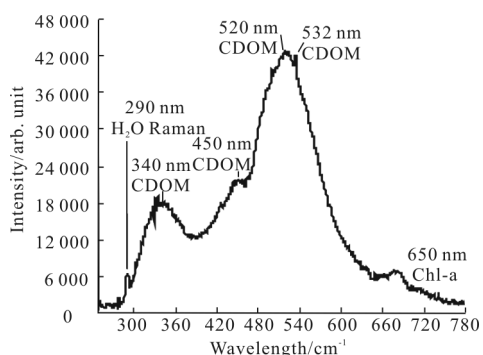
1.3 试验测试及结果

为了研究热液区矿物和生物相互作用, 文中对拟棱形藻样品进行了测试。图 3 为拉曼-荧光光谱联合探测系统探测得到的样品拉曼光谱和荧光光谱: 图 3(a)为 532 nm 激光激发得到的拟棱形藻样品的拉曼光谱, 光谱仪的积分时间 1 s; 图 3(b)为 266 nm 激光激发得到的拟棱形藻样品的荧光光谱, 积分时

间 10 s。从图 3(a)可以看到拟菱形藻样品中明显的 $1\ 007$ 、 $1\ 168$ 、 $1\ 536\ \text{cm}^{-1}$ 的拉曼峰，这些拉曼峰是类胡萝卜素的拉曼，另外还有 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 及 $2\ 100\ \text{cm}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}$ 的拉曼峰。从图 3(b)可以看到 $294\ \text{nm}$ 附近的水的拉曼峰、在 340 、 520 和 $680\ \text{nm}$ 处较强荧光峰、 $450\ \text{nm}$ 处的弱荧光峰以及 $532\ \text{nm}$ 处的尖峰，其中 $340\ \text{nm}$ 是类蛋白荧光峰， $450\ \text{nm}$ 和 $520\ \text{nm}$ 是类腐殖质荧光峰， $685\ \text{nm}$ 是叶绿体荧光峰。



(a) $532\ \text{nm}$ 激光激发获得的拉曼光谱
(a) Raman spectrum excited by $532\ \text{nm}$ laser



(b) $266\ \text{nm}$ 激光激发获得的荧光光谱
(b) Fluorescence spectrum excited by $266\ \text{nm}$ laser

图 3 拟菱形藻样品的拉曼光谱和荧光光谱信号

Fig.3 Raman spectrum and fluorescence spectrum of the Pseudo-nitzschia sample

为进一步验证系统性能，文中开展了现场试验。现场试验场地选在了青岛市的近海码头，考虑到在近海白天的太阳光照太强会对信号光谱产生干扰，故将试验时间定在傍晚，时间从下午 18 点到第二天早上 6 点。图 4 为拉曼-荧光光谱联合探测的原理样机实物照片。图 5(a)为 $532\ \text{nm}$ 激光激发得到的近海海水的拉曼光谱，积分时间 $10\ \text{s}$ ；图 5(b)为 $266\ \text{nm}$ 激光激发得到的荧光光谱，积分时间同样为 $10\ \text{s}$ 。从

图 5(a)可以清晰地看到 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 处水的拉曼峰和 $981\ \text{cm}^{-1}$ 处硫酸根的拉曼峰。另外由于近岸海水中含有较多的可溶性有机物等荧光物质，探测近海海水的拉曼光谱时会有较为强烈的荧光背景，这对拉曼光荧光峰、 $330\ \text{nm}$ 处的弱荧光峰以及 $532\ \text{nm}$ 处的强峰值， $293\ \text{nm}$ 附近的水的拉曼峰是 $266\ \text{nm}$ 激发水的拉曼产生的， $459\ \text{nm}$ 和 $497\ \text{nm}$ 的荧光峰

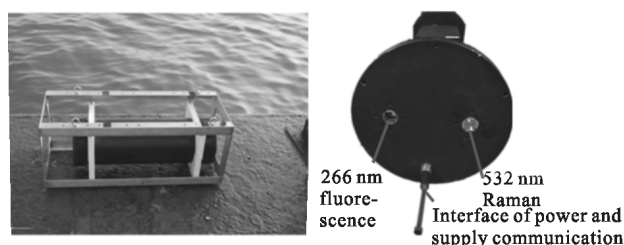
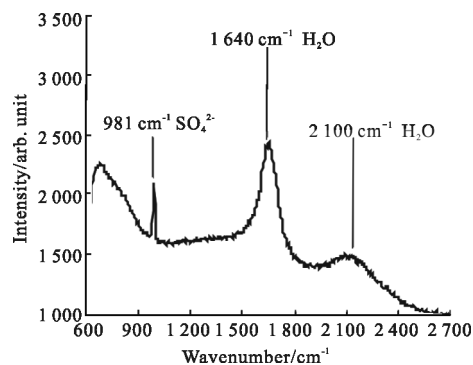
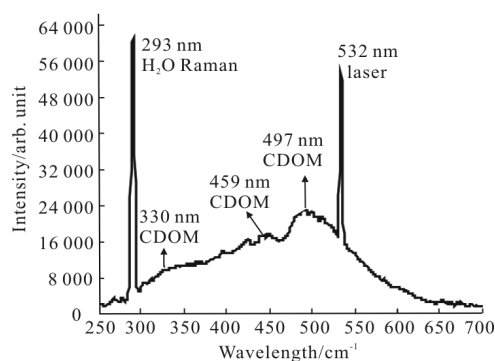


图 4 水下拉曼-荧光联合探测系统

Fig.4 Underwater combined raman-fluorescence detection system



(a) $532\ \text{nm}$ 激光激发获得的拉曼光谱
(a) Raman spectrum excited by $532\ \text{nm}$ laser



(b) $266\ \text{nm}$ 激光激发获得的荧光光谱
(b) Fluorescence spectrum excited by $266\ \text{nm}$ laser

图 5 青岛近海拉曼光谱和荧光光谱信号

Fig.5 Raman spectrum and fluorescence spectrum of the offshore in Qingdao

是近岸海水中的可溶性有机物(CDOM)里面的类腐殖质组分的,330nm 处的荧光峰是 CDOM 里面的类蛋白组分的,685 nm 处的荧光峰是海水中的叶绿素的,532 nm 处的尖峰是由于 532 nm 激光散射光产生的。

2 结 论

文中针对水下原位拉曼-荧光光谱联合探测的需求,搭建了一套拉曼-荧光联合光谱探测原理样机并进行了原理验证试验。该原理样机长 79 cm,直径 27 cm,通过电缆与甲板进行供电与通讯,内部利用一台双波长激光器同时作为拉曼光谱和荧光光谱的激发光源,其中拉曼光谱采用 532 nm 波长,荧光光谱采用 266 nm 波长,双波长激光器发出的光束经分光镜分为两路,经过后向散射光路收集的两路信号分别进入两个小型光纤光谱仪进行分光探测。利用该样机在试验室对拟棱形藻样品进行了探测,获得了类胡萝卜素拉曼光谱和类蛋白、叶绿素等荧光光谱,进一步对系统在青岛近海开展现场试验,获得了海水中硫酸根拉曼光谱和可溶性有机物(CDOM)荧光光谱,试验结果证明了拉曼-荧光联合光谱探测系统的可行性。下一步将对系统进行优化,并搭载深海 ROV 进行深海原位测试。

参 考 文 献:

- [1] Ken Takai, Satoshi Nakagawa, Takuro Nunoura. Comparative investigation of microbial communities associated with hydrothermal activities in the Okinawa trough[C]//Junichiro Ishibashi, Kyoko Okino, Michinari Sunamura. Subseafloor Biosphere Linked to Hydrothermal Systems: TAIGA Concept. Japan: Springer, 2015: 421-435.
- [2] He Tianliang, Zhang Xiaobo. Characterization of bacterial communities in deep-sea hydrothermal vents from three oceanic regions[J]. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(2): 232-241.
- [3] Wang Liling, Lin Jingxing, Hu Jianfang. Recent progress in deep sea hydrothermal vent communities [J]. *Adv Ances in Earth Science*, 2008, 23(6): 604-612. (in Chinese)
王丽玲,林景星,胡建芳.深海热液喷口生物群落研究进展[J]. *地球科学进展*, 2008, 23(6): 604-612.
- [4] Breier J A, White S N, German C R. Mineral-microbe interactions in deep-sea hydrothermal systems: a challenge for Raman spectroscopy [J]. *Phil Trans R Soc A*, 2010, 358: 3067-3086.
- [5] Brewer P G, White S N, Peltzer E T, et al. Raman spectroscopy in the deep ocean: successes and challenges[J]. *Applied Spectroscopy*, 2004, 58(7): 195-208.
- [6] White S N. Laser Raman spectroscopy as a technique for identification of seafloor hydrothermal and cold seep minerals [J]. *Chemical Geology*, 2009, 259(3-4): 240-252.
- [7] Rehder G, Leifer I, Brewer P G, et al. Controls on methane bubble dissolution inside and outside the hydrate stability field from open ocean field experiments and numerical modeling[J]. *Marine Chemistry*, 2009, 114: 19-30.
- [8] Du Zengfeng, Li Ying, Chen Jing, et al. Feasibility investigation on deep ocean compact autonomous Raman spectrometer developed for in-situ detection of acid radical ions [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 12: 1-6.
- [9] Zhang Xin, Du Zengfeng, Zheng Rong'er, et al. Development of a new deep-sea hybrid Raman insertion probe and its application to the geochemistry of hydrothermal vent and cold seep fluids [J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2017, 123: 1-12
- [10] Chen Jing, Ye Wangquan, Guo Jinjia. Diurnal variability in chlorophyll-a, carotenoids, CDOM and SO_4^{2-} intensity of offshore seawater detected by an underwater fluorescence-Raman spectral system[J]. *Sensors*, 2016, 16(7): 1-12.