

UNIVERZITET U BEOGRADU
FIZIČKI FAKULTET

Katarina M. Miletić

PRIMENA NEDESTRUKTIVNIH OPTIČKIH
METODA U PROCENI STANJA I
METABOLIZMA BILJAKA

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICS

Katarina M. Miletic

NONDESTRUCTIVE OPTICAL METHOD FOR
PLANT OVERALL HEALTH EVALUATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Bećko Kasalica, redovni profesor
Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Ivan Belča, redovni profesor
Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miloš Vičić, redovni profesor
Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Aneta Sabovljević, redovni profesor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Marija Petković-Benazzouz, naučni saradnik
Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Dejan Jeremić, naučni saradnik
Inovacioni centar Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u Laboratoriji za primenjenu fiziku i metrologiju Fizičkog fakulteta u Univerziteta u Beogradu. Neizmerno sam zahvalna svom mentoru prof. dr Bečku Kasalici na osmišljavanju i izradi metode, na savetima koji su mi pomagali u prepoznavanju značajnih biofizičkih fenomena, kao i nesebičnoj pomoći tokom celog istraživanja.

Posebno se zahvaljujem dr Mariji Petković-Benazzuou od koje sam naučila da rešavanju naučnih problema prilazim na pravi način i sa velikom istrajnošću. Zahvaljujem joj se na dobronamernim sugestijama, podršci i pomoći u toku pisanja disertacije.

Dr Dejanu Jeremiću se zahvaljujem na pomoći u toku esperimentalnog rada, prenesenim znanjima iz biologije i neorganske hemije, kao i brizi i posvećenosti u svakodnevnom radu.

Prof. Dr Milošu Vičiću i prof. dr Ivanu Belči se zahvaljujem na prenesenom znanju iz oblasti elektronike, korisnim sugestijama u završnoj fazi izrade naučnih radova, kao i tumačenju dobijenih rezultata.

Kolegi Milošu Mošiću se zahvaljujem na prijateljstvu, diskusijama i pruženoj podršci.

Prof. dr Aneti Sabovljević, prof. dr Danijeli Đunisijević-Bojović, prof. dr Sonji Veljović-Jovanović, Marijani Milutinović, prof. dr Slobodanu Milanoviću, prof. dr Miloradu Vujičiću i Nikoli Šušiću, dugujem zahvalnost na saradnji i uloženom trudu u toku prikupljanja i tumačenja dobijenih podataka.

Zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima na strpljenju, podršci, brizi i razumevanju.

Jedan od značajnih doprinosa kvaliteta ovog istraživačkog rada ostvaren je kroz publikovanje rezultata ove teze, koji je nastao iz saradnje sa različitim grupama sa Biološkog i Šumarskog fakulteta.

Katarina

Primena nedestruktivnih optičkih metoda u proceni stanja i metabolizma biljaka

Rezime

Cilj ove doktorske disertacije je razvijanje nove i pouzdane metode za procenu stanja i metabolizma biljaka. Merenje spektralnih karakteristika listova biljaka optičkim metodama u periodu njihovog rasta, može da nam donese korisne informacije o zdravlju biljke.

U okviru doktorske disertacije predstavljen je novi metod, koji omogućava da merenjem koeficijenata optičke transmisije i refleksije pratimo stanje i metabolizam biljaka.

Dosadašnji postupci merenja ovih parametara putem optičkih metoda su usmereni na trenutne vrednosti ovih koeficijenata, pre svega, refleksije lista, dok su vrlo retke metode koje se bave detekcijom vrednosti optičke transmisije. Ne postoje nedestruktivne optičko-detekcione metode i sistemi koji sa pozdanom tačnošću i osetljivošću mogu da prikupljaju podatke o fotosintetičkim procesima biljaka u dužim vremenskim intervalima (nekoliko dana ili meseci). Postojeće optičko-detekcione metode i sistemi omogućavaju samo trenutna merenja jednog mernog mesta koja su praćena nizom ograničenja.

U prvih nekoliko poglavlja predstavljene su neke opšte fizičke zakonitosti, kao i osnovne ideje i karakteristike korišćenih elemenata za izradu optičko-detekcionog sistema.

U jednom od poglavlja objašnjen je fenomen fotosinteze i njegova veza sa kvantno-mehaničkim procesima.

Posebna pažnja posvećena je izradi softvera za prikupljanje podataka, kao i postupcima za kalibraciju celog mernog sistema.

U poslednjem odeljku prikazani su dobijeni rezultati. Po prvi put su, eksperimentalno, nedestruktivnom metodom, dobijeni Cirkadijumski ritmovi biljaka u realnom vremenu. Takođe su detektovane promene u optičkim karakteristikama lista pri različitim eksperimentalnim tretmanima, a dobijeni podaci su upoređeni sa dosadašnjim biološkim metodama.

Ključne reči: transmisija lista, apsorpcija lista, 665 nm crvena LED dioda, Cirkadijumski ritam, zdravlje biljaka, optičke metode, nedestruktivne metode

Naučna oblast: Fizika

Uža naučna oblast: Primenjena fizika

UDK broj:

Nondestructive optical method for plant overall health evaluation

Abstract

The research presented in this dissertation is focused on development of reliable optical method for providing useful information for overall plant health evaluation. Measuring the optical properties of plant leaves, by spectrophotometric methods, could potentially provide very useful information of the plant's health.

This dissertation describes a novel experimental method that enables continuous measurements of the optical reflection and transmission coefficients of broad-leaved of the plant's metabolism.

The present measurement procedures of these parameters by optical methods are focused on current values of the leaf reflection coefficients, while methods which detect the values of optical transmission are quite rare. However, there is no nondestructive optical-detection method which is used to collect data about photosynthetic processes in plants in long time intervals (several days or months). Existing optical detection systems are designed to be used as a single measuring point, but also faced with a numerous limitation.

The first few chapters present some general physical laws, as well as the main ideas and characteristics of all elements used to create our optical detection system.

One chapter is customized for the process of photosynthesis and its connection with quantum mechanical processes.

Special attention is given to the development of data collection software, as well as procedures for calibration of the measuring system.

The last section presents obtain results. For the first time, nondestructive method was used to detect Circadian rhythms in real time. In addition, different optical changes are observed on plant leaf in various experimental treatments and compared with present biological methods.

Key words: leaf transmittance, leaf absorption, 665 nm red LED diode, Circadian rhythm, plant health, optical methods, nondestructive methods

Scientific field: Physics

Research area: Applied physics

UDC number:

SADRŽAJ

I UVOD.....	1
II INTERAKCIJA EM ZRAČENJA I MATERIJE.....	4
2.1. Elektromagnetno zračenje (EM zračenje)	4
2.2. Prelazi elektrona unutar atoma i jona	7
2.3 Molekulski spektri.....	8
2.4. Optička fluorescentna i fosforescentna spektroskopija.....	10
2.5. Fosforescencija.....	11
2.6. Fluorescencija.....	12
2.7. Interna konverzija.....	12
2.8. Vibraciona relaksacija	12
2.9. Interkombinacioni prelazi.....	13
2.10. Interakcija objekta i elektromagnetnog zračenja.....	13
III PROCES FOTOSINTEZE	18
3.1. Hloroplasti	19
3.2. Svetla i tamna faza fotosinteze.....	20
3.3. Fotosintetički pigmenti.....	21
3.4. Uticaj jačine svetlosti i koncentracije ugljen-dioksida na proces fotosinteze	23
3.5. Fluorescencija hlorofila.....	24
3.6. Fotosistem	25
3.7. Tipovi metabolizma kod biljaka.....	28
IV IZVORI I DETEKTORI EM ZRAČENJA KORIŠĆENI U EKSPERIMENTALNOJ POSTAVCI.....	30
4.1. LED diode	30
4.1.1. Emisija fotona u p-n spoju LED dioda	30
4.1.2. Kvantna efikasnost dioda.....	33
4.1.3. Prednost LED dioda.....	33
4.1.4. Nedostaci LED dioda.....	34
4.2. Fotodiode.....	34
4.2.1. Apsorpcija svetlosti u p-n spoju fotodiode	35
4.2.2. Kvantna efikasnost fotodiode	36
4.2. 3. Primene fotodioda.....	37
4.3. LED paneli za osvetljavanje biljaka	38
4.3.1. Karakteristične veličine LED panela	38
4.4. Ostali izvori svetlosti (koji nisu korišćeni u eksperimentalnoj postavci).....	38
4.4.1. Sijalica sa užarenim vlaknom (žarulja).....	38
4.4.2. Fluosijalice.....	39

4.4.3. Halogene sijalice.....	39
V SEGMENTI SISTEMA ZA MERENJE	41
5.1. Polimetil metakrilat	41
5.2. Optička vlakna (svetlovodi)	42
5.3. LED diode korišćene u eksperimentalnoj postavci	42
5.4. Fotodiode korišćene u eksperimentu	43
5.5. LED paneli kao optimalni izvori zračenja.....	44
5.6. Optički filteri	45
5.7. Karakteristike Grow Box-a za gajenje biljaka	46
5.8. Šematski prikaz sistema	47
5.8.1. Pokretanje sistema	48
VI KALIBRACIJA SISTEMA	50
6.1. Kalibracija električnog signala sa LED dioda.....	50
6.2. Kalibracija mernih mesta po vrednosti optičke transmisije	50
6.3. Kalibracija mernih mesta po vrednosti optičke refleksije	50
6.4. Rezultati kalibracije vrednosti optičke transmisije	51
6.5. Rezultati kalibracije vrednosti optičke refleksije	52
6.6. Kalibracija osetljivosti sistema.....	54
6.7. Podešavanje mernog sistema na jačinu i period osvetljavanja signalne LED diode.....	54
Slika 6.8. Rezultati dobijeni snimanjem intenziteta celog spektra novom metodom	57
VII PROGRAMSKI PAKET LABVIEW.....	58
7.1. Uvod u LabView	58
7.2. Osnovni koncept LabVIEW-a	58
7.3. Virtuelni elementi (VI) LabVIEW-a	59
7.4. Šema blok dijagrama korišćenog za automatizaciju sistema	60
VIII REZULTATI.....	66
8.1. Dokaz koncepta rada aparature	66
8.2. Detekcija nutritivnog stresa hidroponski gajenih biljaka	70
8.2.1. Uvod	70
8.2.2. Određivanje efikasnosti fotosistema II	72
8.2.3. Određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata.....	73
8.2.4. Određivanje težine izdanaka i korena.....	73
8.2.5. Statistička analiza	73
8.2.6. Rezultati.....	73
8.2.7. Diskusija dobijenih rezultata	80
8.2.8. Zaključak	81
8.3. Reakcija biljaka na različitu jačinu svetla	81
8.4. Test merenja rađena na različitim biljnim vrstama	83

IX ZAKLJUČAK.....	84
X REFERENCE.....	86
XI PRILOZI.....	91

I UVOD

Poznavajući osnovne principe fotosinteze kao primarnog procesa u prirodi i uloge hlorofila u tom sistemu [1, 2], nameće se ideja za razvojem nove nedestruktivne optičke metode, kojom bi se merenjem apsorpcije svetlosti lista dobile korisne informacije o stanju biljaka. Apsorpcioni spektri hlorofila su dobro poznati i sadrže karakteristične apsorpcione maksimume čije talasne dužine određuju tip odgovarajućeg svetlosnog izvora za obasjavanje lista biljke. Apsorpcija lista se ne meri direktno, ali se informacije o njoj mogu dobiti na osnovu vrednosti optičke transmisije i refleksije.

Najnoviji izveštaji Ujedinjenih nacija pokazuju da uticaj klimatskih promena dovodi do snažne degradacije tla i promene sastava vazduha, a to dalje za utiče na kvaliteta hrane¹ i prati brojne ekonomske probleme. Naučnici su složni u ideji da bi ovaj globalni problem mogao da se reši, ako se posveti posebna pažnja istraživanjima u oblasti fiziologije biljaka fokusirajući se na praćenje *in situ*.

Dosadašnje metode koje se bave proučavanjem biljaka i prate njihovo stanje, zasnivaju se na fizičko-hemijskim analizama tkiva biljaka, vremenski su zahtevne, destruktivne, često zahtevaju ozbiljnu i dugotrajnu pripremu uzorka, a neretko su praćene subjektivnim zapažanjima [3, 4]. Kako bi se omogućilo efikasnije kontrolisanje svih faza u procesu rasta biljaka (počev od hortikulturnih vrsta namenjenih za ishranu ljudi), neophodan je adekvatan metod za nadgledanje kontinualnog stanja biljaka i određivanje optimalnih uslova koji podstiču brži rast, razvoj i prinos.

Savremeni pristup gajenja biljaka podrazumeva neprekidno kontrolisanje različitih parametara koji utiču na njihovo stanje i zdravlje. Procena stresa biljke u ranoj fazi daje vredan faktor koji može da predvidi uspešnost gajenja neke biljne vrste [5]. Stres se definiše kao odgovor biljke na različite spoljne faktore (stresore) i može biti biotski (infekcije biljnim patogenima) i abiotički (izloženost različitim fizičkim i hemijskim uticajima). Primer abiotičkog stresora je osmotski stres, a nedostatak hranljivih materija utiče kako na fotohemijske i nefotohemijske procese u fotosintezi, tako i na odnos koncentracije pigmenta i ukupan rast i razvoj kod viših biljaka [6-8].

Poznato je da je opšte stanje biljke u korelaciji sa intenzitetom svih fotosintetičkih procesa u njenim listovima [1]. Molekuli hlorofila obezbeđuju konverziju apsorbirane svetlosti u biohemijsku energiju kroz Calvin-Bensonov ciklus [9]. Detekcija stresa biljaka povezuje se i sa koncentracijom hemijskih elemenata: azot, magnezijum, gvožđe, fosfor, kalijum itd. Količina hlorofila i drugih fotosintetičkih pigmenta u listu je dobar pokazatelj fiziološkog statusa biljke i može ukazati na to da li je biljka izložena stresoru. Stresovi iz okoline negativno utiču na sintezu hlorofila i dovode do razlaganja molekula, što dalje vodi ka smanjenju produktivnosti vegetacije [10-13]. Karotenoidi su druga fotosintetička grupa pigmenta koja je takođe važna za detekciju stresa. Kroz parametre fotosistema I i II i antenskih sistema (LH i LHC centara za prikupljanje svetlosti), ovi fotosintetički pigmenti učestvuju u: prikupljanju svetlosne energije, zaštiti reakcionih centara fotosistema od fotooksidacije (rasipanje viška svetlosne energije) i odbrani protiv oksidativnog stresa [6].

Ideja o korišćenju refleksione spektroskopije za nedestruktivno određivanje koncentracije hlorofila listova nije nova ideja. Prvi put su je predložili Admas i Arkin 1977. godine [14], a dalje su je razradile i brojne druge studije [14-24].

¹ Porast svetske populacije i evidentne klimatske promene su najveći aktuelni problemi opstanka ljudske rase. Nedavna studija Islam-a i Talukder-a iz 2017. godine [3] govori o potrebi za hranom na globalnom nivou. Ova studija takođe predviđa da će ljudska populacija dostići 9,8 milijardi do kraja 2050. godine. Osim toga, očekuje se da će emisije gasova staklene bašte koja je povezana promenom temperature, kao i sve manje snabdevanja slatkom vodom uticati na kompletnu vegetaciju Zemlje.

Već postoje sistemi gde se reflektovano zračenje meri sa listova biljaka na mestu njenog rasta. U nedavnom istraživanju [25] je opisan primer gde se ova metoda koristi kako bi se na najbolji mogući način optimizovao proces proizvodnje soje, odnosno, kako bi se odredio trenutak njenog najvećeg prinosa u toku žetve na poljima u Brazilu.

U revijalnom radu iz 2008. godine, časopisa *Senzori* [26] navode se primeri optičkih metoda koje su razvijene kao nadzorni sistemi za praćenje stanja biljaka. Naime, jedan od najzastupljenijih neinvazivnih pristupa monitoringa stanja biljaka podrazumeva interakciju svetlosti sa listom i sposobnost identifikacije promene spektralnih karakteristika kao odgovor na specifične varijacije. Sa tim u vezi, mnoga istraživanja [22-24] otvaraju mogućnost rane predikcije stresa biljaka na osnovu promene koeficijenta refleksije svetlosti sa lista. Pokazuje se da je ovo izuzetno precizan metod za ranu detekciju invazija patogena pre vizuelno opaženih simptoma.

Primer jedne nedestruktivne metode za detekciju stresa je putem merenja relativnih vrednosti koncentracije hlorofila preko optičke transmisije lista. Podaci se dobijaju merenjem transmisije lista u crvenom (650 nm) i infracrvenom (940 nm) delu spektra. Nedostatak ove metode je u tome što je tumačenje dobijenih rezultata otežano jer na optička očitavanja dosta utiče struktura lista i lokalna mikromorfologija na mestu merenja [12].

Osim praćenja reflektovanog i propuštenog zračenja, postoje i metode za prikupljanje podataka o apsorbovanoj svetlosti, koje rade na principu vizuelne detekcije [27]. Zdravi listovi, izloženi vidljivoj svetlosti, intenzivno apsorbuju zračenje iz plavog i crvenog dela spektra, reflektujući pritom zeleno. Biljke čije je zdravlje ugroženo smanjiće ili će u potpunosti prestati da proizvode hlorofil, pa će se absorpciona traka u tom regionu pomerati ka kraćim talasnim dužinama.

Fluorescencija hlorofila je još jedna uobičajena nedestruktivna metoda koja se koristi za procenu stresa u biljkama. Pruža detaljne informacije o stanju fotosistema II i njegovim odgovorima na odgovarajuće promene. Merenjem minimalne (F_0) i maksimalne (F_m) fluorescencije, iz odnosa $(F_0 - F_m)/F_m$ se određuje efikasnost fotosinteze. Ovaj metod se i najčešće koristi za procenu stresa u listovima [28].

Još jedna nedestruktivna optička metoda podrazumeva da se CCD (charge-coupled device) kamere postave iznad listova biljaka i u određenom vremenskom intervalu sakupljaju odgovarajuće slike zelenih i nezelenih regiona [29]. Uz pomoć RGB (Red Green Blue) analize računa se odnos njihovih površina. Ova vrednost se upoređuje sa prethodnom, pri čemu povećavanje nezelenih površina u odnosu na zelene signalizira uzbunu, dajući informaciju da je zdravlje biljke nečim ugroženo. Napredniji sistemi imaju i senzore za termalnu analizu površine lista [30].

Na osnovu svega navedenog, merenje optičke refleksije i optičke transmisije kao metode za praćenje zdravstvenog stanja biljaka, pruža sredstvo za rano otkrivanje izvesnih stresova. Međutim, ne treba zaboraviti da praktičnu primenu ovog metoda prati nekoliko eksperimentalnih izazova.

Osnovni zadaci ovog eksperimentalnog istraživanja morali su da zadovolje sledeće uslove:

1. Da metoda bude nedestruktivna.
2. Da merenja koja se vrše na posmatranoj biljci ne ometaju proces rastenja i razvića (da listovi mogu slobodno da zauzimaju svoj prirodni položaj).
3. Da ne postoje vremenska ograničenja u procesu praćenja fiziološkog stanja biljke, i da se tako jasno mogu uočiti Cirkadjumski ritmovi².

² Ciklične oscilacije bioloških funkcija koje se dešavaju u periodu dvadesetčetvoročasovnog ciklusa.

4. Da ima pouzdanu statistiku. Merenja na živim organizmima zahtevaju veliki broj uzoraka i kontrolne grupe.

Ovaj metod je ispunio sve gore navedeno.

Novom metodom se prikupljanje podataka vrši na više različitih mernih mesta tokom dužeg vremenskog intervala. Sistem za merenje sadrži dvadeset mernih segmenata koji su odlična osnova za statističku obradu podataka o stanju biljke ili grupe biljaka koje se gaje pod različitim uslovima. U isto vreme, sistem je potpuno metrološki kontrolisan. Po prvi put neka metoda omogućava neinvazivno snimanje cirkadijurnih ritmova biljaka gde se jasno detektuju dnevni i noćni ritmovi praćeni promenom fizioloških parametara.

Tokom izrade magistarske teze [31] predstavljena je preliminarne postavka optičko-detekcionog sistema. Cilj daljeg istraživanja bio je da se otklone uočeni nedostaci i time unapredi osnovna verzija sistema, da se počne sa merenjima na živim biljnim sistemima i utvrde određene zakonitosti. Ova teza je pisana sa idejom da može poslužiti u daljem istraživanju fiziologije biljaka. Prikupljanjem podataka iz kontinualnog merenja Cirkadijalnog ritma biljke dobila bi se baza koja povezuje informacije određene biljne vrste sa najboljim uslovima rasta.

II INTERAKCIJA EM ZRAČENJA I MATERIJE

2.1. Elektromagnetno zračenje (EM zračenje)

Svetlost ima dualnu prirodu. Prenos energije se vrši pomoću čestica (prema Njutnu) ili talasa (prema Hajgensu). Odnosno, u određenim pojavama svetlost se ponaša kao skup čestica (fotoelektrični efekat i Komptonov efekat), dok u drugim pojavama ispoljava osobine talasa (difrakcija, interferencija itd.). Talasi su određeni frekvencijom (ν) i talasnom dužinom (λ), a karakteristike čestica su energija (E), masa (m) i impuls ($\vec{p}$). Zračenje koje se prenosi putem čestica (proton, neutron, itd.) zove se korpuskularno zračenje, dok se zračenje koje se prenosi u obliku talasa naziva elektromagnetno zračenje [32].

Elektromagnetno zračenje je promena elektromagnetnog polja u funkciji vremena. Fotoni su čestice koje kvantifikuju elektromagnetno zračenje. Poznato je da svako naelektrisanje promenom brzine kretanja generiše određeno elektromagnetno polje, a osobine odgovarajućeg elektromagnetnog talasa koji se prostire brzinom svetlosti, direktno se vezuju za dinamiku promene kretanja naelektrisanja. Drugim rečima, ako elektromagnetno zračenje posmatramo kao emisiju fotona (čestica), energija koju one nose direktno se vezuje za talasnu dužinu, odnosno frekvenciju talasa. Veća frekvencija ukazuje na veću energiju fotona. Ova zavisnost je određena Plankovom relacijom [33, 34]:

$$E = h\nu \quad (2.1)$$

gde su: E energija fotona, h je Plankova konstanta³, a ν je frekvencija talasa.

Vrsta elektromagnetnog zračenja zavisi od talasne dužine. Usled raspona energije talasnih dužina u elektromagnetnom spektru, njega delimo na radio i mikro-talasi, infracrveno, vidljivo, ultraljubičasto, X-zrake i gama zrake. Ceo opseg frekvencija i talasnih dužina elektromagnetnog zračenja je elektromagnetni spektar (Slika 2.1.). Spektar predstavlja sliku emitovanog, apsorbovanog ili reflektovanog zračenja uređenog po energijama, talasnim dužinama ili frekvencijama [33, 34].

Vidljiva svetlost je jedini deo elektromagnetnog spektra koji je vidljiv golim okom. Opseg vidljive svetlosti prostire se između infracrvenog i ultraljubičastog zračenja (od 760 nm do 380 nm).

Celokupna savremena spektroskopija bazira se na kvantnoj teoriji u čijoj osnovi leže fundamentalni zakoni kvantne fizike. Svaki prelaz sistema iz jednog stanja u drugo, praćen je apsorpcijom ili emisijom fotona čija frekvencija zadovoljava drugi Bohr-ov postulat⁴.

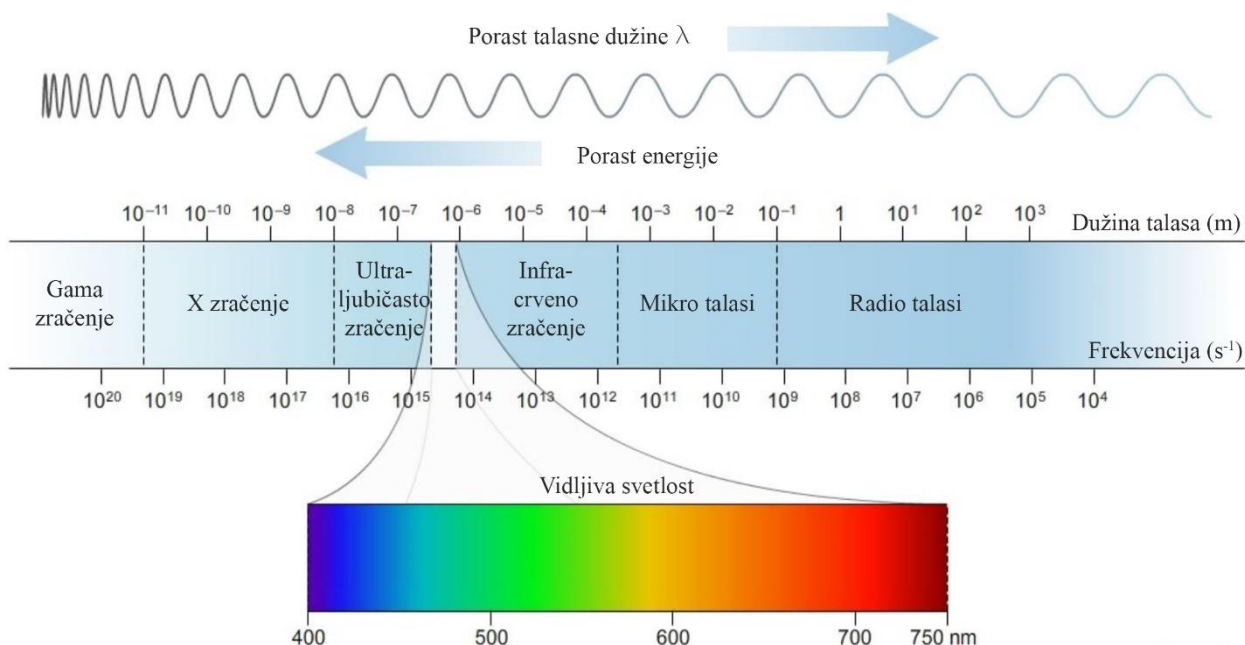
Pri prelasku elektrona sa više na nižu orbitu, elektron emituje energiju u vidu fotona, alternativno, kada elektron asporbuje energiju u vidu fotona, može da prelazi sa niže na višu orbitu. Na slici 2.2 prikazana je interakcija fotona između dva energetska nivoa atoma ili molekula. Upadni foton može da bude apsorbovan ako je energija fotona $h\nu$ upravo razlika energetske nivo atoma ΔE . U tom slučaju, elektron u atomu prelazi sa nižeg na viši energetski nivo (Slika 2.2 a)). Ukoliko se atom nalazi u pobuđenom stanju, odnosno elektron se nalazi na višem energetskom nivou tada prilikom prelaska na niži nivo dolazi do emisije fotona energije jednake razlici energetske nivo atoma. Do

³ Plankova konstanta: $h = 6,626176 \cdot 10^{-34}$ Js.

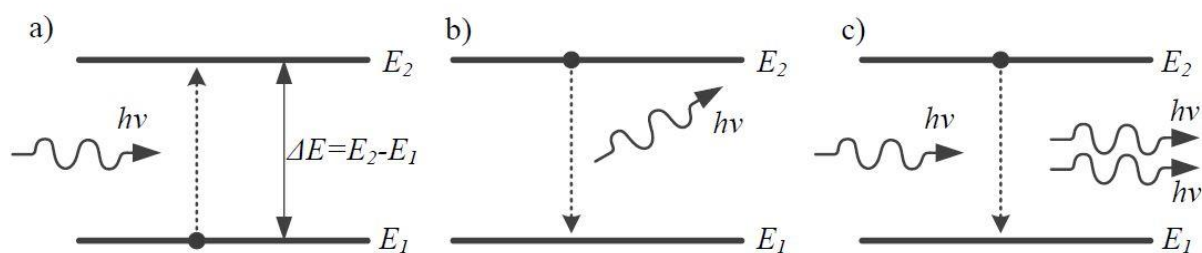
⁴ Elektroni se oko jezgra kreću po kružnim putanjama (orbitama) za koje moment impulsa jednak proizvodu celog broja i redukovane Plankove konstante $\hbar$.

prelaska elektrona sa višeg na niži nivo najčešće dolazi spontano (Slika 2.2 b)), ali prelazak može da bude indukovan i drugim fotonom (stimulisana emisija, Slika 2.2 c)) [33, 34].

Pri spontanoj emisiji nemoguće je predvideti fazu i smer emitovanog fotona. Dok pri stimulisanoj emisiji emitovani foton zadržava isti smer, fazu, polarizaciju i energiju kao foton koji je indukovao emisiju ($h\nu = E_2 - E_1 = \Delta E$). Stimulisana emisija može da se posmatra kao pojačanje svetlosti (jedan foton na ulazu, a dva identična fotona na izlazu) [33, 34].



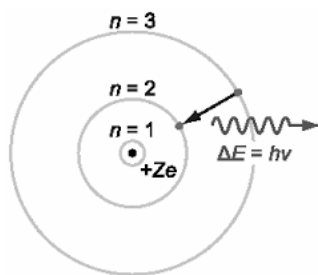
Slika 2. 1. Elektromagnetni spektar zračenja



Slika 2.2 Interakcija fotona i materijala: a) apsorpcija, b) spontana emisija i c) stimulisana emisija [33]

Najmanju energiju elektron ima u prvoj orbiti. Pomerajući se prema višim orbitama, raste energija elektrona, ali se korak njenog porasta znatno skraćuje. Upravo zbog te činjenice, najveći energetska razmak je između prve i druge orbite, dok je najmanji između šeste i sedme. Pri spontanm prelasku elektrona u atomu (ili jonu) između nivoa m i n , dolazi do zračenja kvanta energije (Slika 2.3):

$$h\nu = E_m - E_n \quad (2.2)$$



Slika 2.3. Emitovanje fotona energije $h\nu$ [33]

Elektron u omotaču atoma može da bude u osnovnom ili pobuđenom stanju. Svaki elektron teži da se nađe u stanju sa minimalnom energijom, (prva orbita ima najmanju energiju) i elektron tu provodi najviše vremena. Boravak u svakoj višoj orbiti predstavlja pobuđeno stanje i elektron se u njoj kratko zadržava.

Emisioni spektar atoma nastaje prelascima elektrona sa viših na niže orbite. Pri svakom prelazu elektron emituje jedan foton čija se talasna dužina može izračunati iz Ridbergovog obrasca:

$$\frac{1}{\lambda} = Z^2 \cdot R \cdot \left(\frac{1}{n^2} + \frac{1}{m^2} \right) \quad (2.2)$$

gde je Z redni broj elementa (broj protona u jezgru njegovog atoma), $R \approx 1,1 \cdot 10^7 \frac{1}{m}$ Ridbergova konstanta, a λ talasna dužina fotona elektromagnetnog zračenja koju elektron emituje pri prelasku sa m -te na n -tu orbitu.

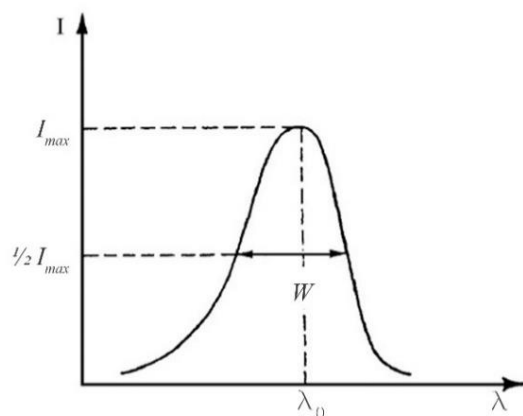
Intenzitet odgovarajuće spektralne linije (energija izračena iz jedinice zapremine plazme⁵ u jedinici vremena) dat je kao:

$$I_{mn} = n_m h\nu_{mn} A_{mn} \quad (2.3)$$

gde su: n_m - koncentracija atoma (jona) pobuđenih u stanje m , A_{mn} - verovatnoća spontanog radijativnog prelaza između nivoa m i n (Ajnštajnov koeficijent).

Verovatnoća prelaza u atomu je data kao tablična vrednost, izračunata ili izmerena i ne zavisi od okruženja u kome se nalazi atom koji zrači. Alternativno, popunjenost gornjeg nivoa određenog prelaza, odnosno raspodela elektrona po nivoima, određuje se sudarima sa drugim česticama i uzajamnim dejstvom sa zračenjem. [33]

Svaki foton izračen iz atoma ima tačno određenu talasnu dužinu. Međutim, kako se tokom eksperimenta uvek posmatra veliki broj emitera, zračenje koje se dobija iz izvora je polihromatsko⁶, sa tačno određenom spektralnom raspodelom intenziteta, odnosno spektralnom linijom (Slika 2.4).



Slika 2.4. Profil spektralne linije

⁵ Plazma je jonizovan gas, koji se zbog jedinstvenih osobina smatra posebnim agregatnim stanjem materije.

⁶ Polihromatska svetlost predstavlja skup talasa različitih talasnih dužina, a monohromatska svetlost je skup talasa iste talasne dužine.

Spektralni intenzitet zračenja je najveći u centru spektralne linije, a zatim brže ili sporije opada sa udaljenjem od nje (tzv. krila linije). Svaka spektralna linija određena je centralnom talasnom dužinom λ_0 koja odgovara maksimalanom intenzitetu linije I_{max} , i poluširinom linije W (Slika 2.4). Poluširina linije predstavlja širinu spektralne linije na mestu gde je spektralni intenzitet I jednak polovini svoje najveće vrednosti I_{max} . Važno svojstvo spektralnih linija je i simetričnost profila, odnosno pojava eventualne asimetrije krila linije. [33, 34]

2.2. Prelazi elektrona unutar atoma i jona

Pozicija elektrona u elektronskom omotaču, određena je kvantnim brojevima:

1. $n \in \{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7\}$ – glavni kvantni broj (određuje redni broj orbite, odnosno energetkog nivoa u kome se elektron nalazi).
2. $l \in \{1, 2, (n - 1)\}$ – orbitalni kvantni broj
3. $m \in \{0, \pm 1, \pm 2, \dots \pm l\}$ – magnetni kvantni broj
4. $s \in \left\{-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}\right\}$ – spinski kvantni broj (spin)

Prva tri kvantna broja predstavljaju celobrojne parametre koji se javljaju pri rešavanju Šredingerove jednačine⁷ koja opisuje elektron u atomu kao de Brojjev stojeći talas⁸. Vrednosti ovih brojeva pokazuju ograničenja kvantnih brojeva koja posledica uslova pod kojima se rešava Šredingerova jednačina.

Orbitalni moment impulsa elektrona se računa preko orbitalnog kvantnog broja l :

$$\vec{L} = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{l \cdot (l - 1)} \quad (2.4)$$

Ako bi se elektron u atomu uneo u spoljašnje magnetno polje, pri čemu je z – osa usmerena u smer tog polja, tada magnetni kvantni broj određuje z – projekciju orbitalnog momenta impulsa:

$$L_z = \frac{h}{2\pi} \cdot m \quad (2.5)$$

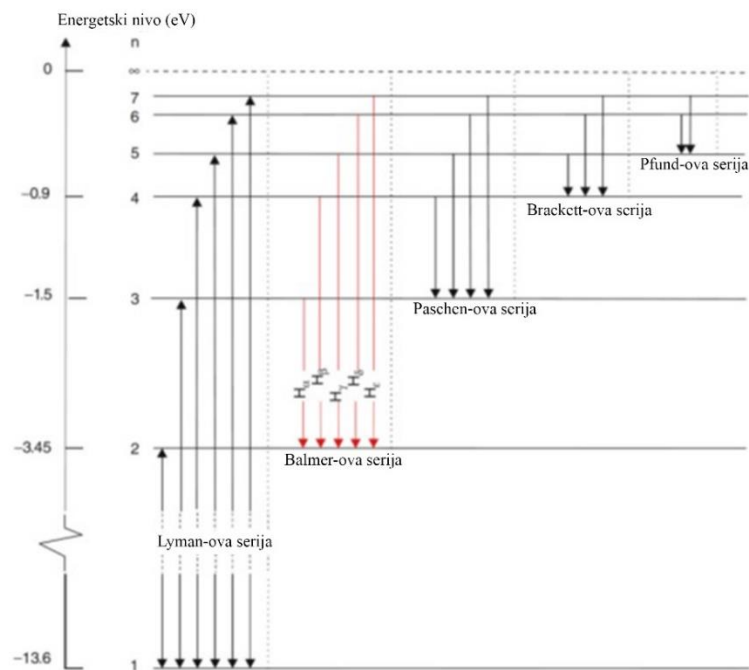
Spin (spinski kvantni broj) određuje sopstveni moment impulsa elektrona:

$$L_s = \frac{h}{2\pi} \cdot s \quad (2.6)$$

Elektronski prelazi atoma su tačno određenih energija i vezani su za prelaze elektrona sa jednih na druge atomske orbitale u elektronskom omotaču atoma. Prvi elektronski prelazi atomskih i molekulskih sistema uključuju energije koje odgovarajuće spektre daju u oblasti bliske infracrvene, vidljive i ultraljubičaste svetlosti. Na slici 2.5. prikazan je primer prelaza unutar atoma vodonika.

⁷ $i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(x, t) = H\psi(x, t)$ gde je ψ talasna funkcija (stanje sistema), H – Hamiltonijan sistema (operator energije sistema), a $\hbar$ redukovana Plankova konstanta, odnosno $\frac{h}{2\pi}$

⁸ Stojeći talas nastaje superpozicijom dva linijska (talasi koji se prostiru duž jednog pravca) talasa istih amplitude i frekvencija koji se prostiru u suprotnim smerovima.



Slika 2.5 Energetski nivoi unutar atoma vodonika i serije prelaza

2.3 Molekulski spektri

Za razliku od atomskih, molekuli emituju trakaste spektre. Na elektronske nivoe molekula nadograđuju se oscilatorni nivoi, na koje se dalje dodaju fini rotacioni nivoi koji se odlikuju diskretnošću. Ovakav odnos između energija elektronskih, oscilatornih i rotacionih stanja odražava se na rezultujućem molekulskom spektru. Sve tri vrste karakterističnih prelaza postoje za gasove, u tečnostima je u većoj mjeri sprečeno rotaciono kretanje molekula, ali u određenim slučajevima linearni molekuli mogu da pređu u ugaone oscilacije, tzv. libracije. Čvrsta tela, kao i sistemi stalnih dimenzija, karakteriše stalni prostorni raspored čestica u kome su rotacioni nivoi potpuno zamrznuti. Toplotno kretanje u ovim sistemima se svodi na oscilovanje čestica oko svojih ravnotežnih položaja i može da se predstavi modelom spregnutih oscilatora.

Ukupna energija molekula predstavlja zbir energije translacija centra mase, energije elektrona (nekoliko reda eV), energije rotacije (reda 10^{-2} do 10^{-1} eV) i energije vibracija (10^{-5} do 10^{-2} eV).

Translacija predstavlja kretanje atoma ili molekula kao celine kroz prostor, duž prave linije, sve do sudara sa drugim molekulom. Translacija može da se opiše kao kretanje centra mase molekula duž neke od koordinata (x, y ili z ose). Svaki molekul ima tri stepena slobode translacije. Međutim, translacija nije od posebnog značaja za pojavu molekulskih spektara, jer zavisi samo od temperature i ne predstavlja unutrašnje kretanje pojedinačnih atoma.

Rotacija je okretanje molekula kao celine oko osa koje prolaze kroz njegov centar mase. Kod dvoatomskih molekula predstavlja rotaciju molekula oko ose koja je normalna na pravac veze, a prolazi kroz centar mase. Kada su u pitanju višeatomski molekuli, rotaciono kretanje je mnogo složenije. Budući da u ovom sistemu važe zakoni kvantne mehanike, molekul može da rotira tačno određanim talasnim dužinama i može da ima samo određene vrednosti rotacione energije. Rotacioni spektri nastaju u prelazima između rotacionih nivoa osnovnog vibracionog i osnovnog elektronskog

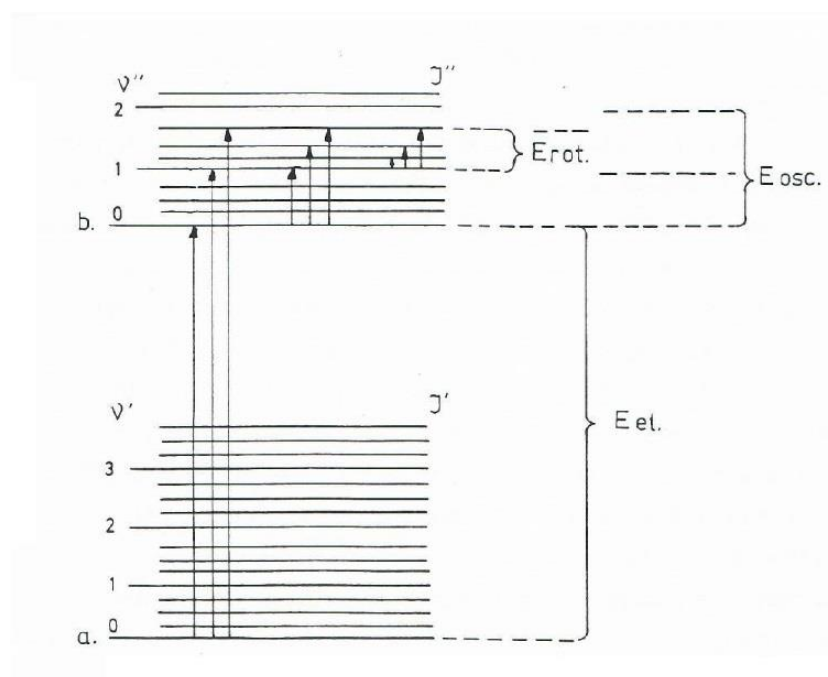
stanja (Slika 2.6.). Talasna dužina fotona koji se otpušta ili apsorbira prilikom ovih prelaza nalazi se u dalekoj infracrvenoj ili mikrotalasnoj oblasti.

Vibracija je kretanje pri kome se ravnotežni položaj jezgara u molekulu periodično menja. U slučaju dvoatomskog molekula, vibracija predstavlja periodično udaljavanje i približavanje jezgara u odnosu na ravnotežni položaj duž linije veze. Kada je veza između molekula jača, a mase atoma veće, amplituda vibracije je manje i obrnuto. Vibraciona energija, takođe, za određenu frekvenciju može da ima tačno određene vrednosti. Vibracioni spektri nastaju pri prelazima između vibracionih energijskih nivoa osnovnog elektronskog stanja molekula (Slika 2.6.), i pripadaju IC oblasti.

Često je svaki vibracioni prelaz praćen nizom rotacionih prelaza, pa je ukupni spektar vibraciono-rotacioni spektar. On zapravo sadrži dve grupe linija koje zajedno daju vibraciono-rotacionu traku.

Kada su u pitanju slobodni molekuli ne postoje ni čisto elektronski prelazi (i spektri), jer je svaki elektronski prelaz praćen vibracionim i rotacionim prelazima (promenom vibracione i rotacione energije). Tada je reč o elektronsko-vibraciono-rotacionom spektru vidljivoj i ultraljubičastoj oblasti, a retko u infracrvenoj. Spektri su takođe trakasti i sadrže veliki broj linija skupljenih u niz traka (Slika 2.6.).

Ograničenja prelazaka elektrona određena su selekcionim pravilima u kojima su jasno definisani dozvoljeni i zabranjeni prelazi. Kada su sve linije molekula jednostruke, to predstavlja singletno stanje, nasuprot tome, tripletnim stanjem se označava multipletnost [33].



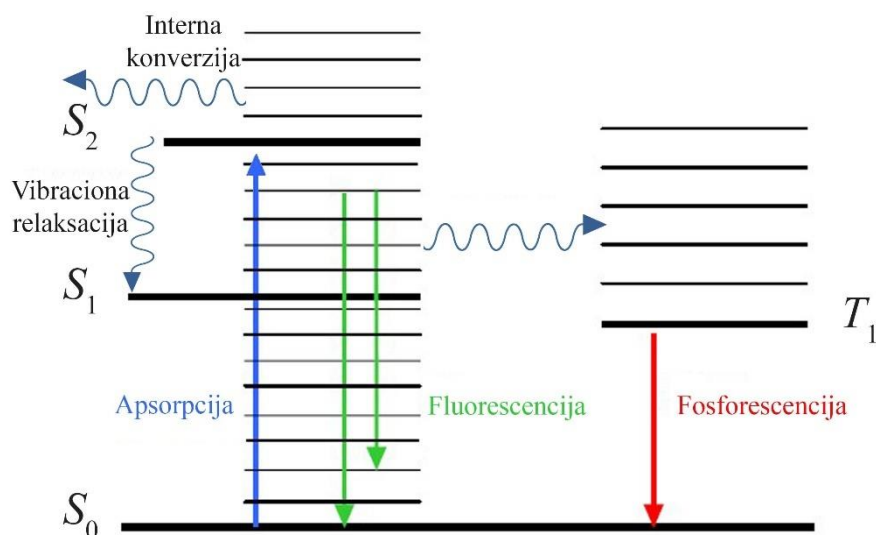
Slika 2.6. Šematski prikaz elektronsko-vibraciono-rotacionih prelaza molekula [33]

2. 4. Optička fluorescentna i fosforescentna spektroskopija

Pri delovanju ultraljubičaste ili vidljive svetlosti na neke molekule, ređe i atome, dolazi do pojave fotoluminescencije, odnosno sekundarne emisije svetlosti talasne dužine koja je veća od pobudne (Slika 2.7.). U slučaju da emisija svetlosti traje koliko i pobuda, reč je o fluorescenciji, a ukoliko traje i nakon gašenja pobudne svetlosti, govorimo o fosforfescenciji [33].

Fluorescentna spektroskopija predstavlja jedinstvo apsorpcione i emisione spektrometrije. Fizički proces se sastoji od apsorpcije fotona energije $h\nu_1$ i emisije fotona manje energije $h\nu_2$. Izgled fluorescentnog spektra zavisi od agregatnog stanja supstance i njene prirode, a može da bude vezan za atome, molekule ili kristale [34].

Kada su u pitanju atomi, pobuđeni nivo ima mogućnost deekscitacije, preko različitih kaskadnih prelaza, a intenziteti pojedinih linija zavise od koeficijenata granjanja. Za posmatranje emisionog procesa najpogodnije su linije većeg intenziteta. U atomima može da dođe do rezonantne fluorescencije, u tom slučaju je emitovani foton iste energije kao i pobudni, ali ima drugačiji pravac. Pri pobudi nekog nivoa, deo energije može da se izgubi sudarom ili nekim drugim procesom, kada elektron prelazi na niže pobuđeno stanje sa koga se vrši emisija. Kada atom apsorbuje pobudni foton, deo energije može da dobije ili izgubi preko toplotne energije, pri tom je moguće da se emituje foton manje (stoksovska komponenta) ili veće energije (antistoksovska komponenta).



Slika 2.7. Mogući prelazi u molekulima (apsorpcija, fluorescencija, fosforescencija, vibraciona relaksacija, interna konverzija).

Šema elektronskih energetskih nivoa kod molekula je složenija, pa se kaskadni prelazi ređe javljaju. Međutim, postojanje vibracionih i rotacionih nivoa omogućava pojavu velikog broja prelaza, i zbog toga su fosforescentni spektri trakasti. Kod molekula je karakteristično postojanje delimičnog preklapanja vibracionih nivoa različitih elektronskih pobuđenih stanja.

Kada je reč o slobodnm molekulima u gasnom stanju jasno je vidljiva trakasta struktura kako apsorpcionih, tako i emisionih spektara. Alternativno, postoji interakcija između pojedinih molekula u rastvorima ili u čvrstoj fazi, upravo zahvaljujući malim rastojanjima, kod kojih su mogući i dodatni mehanizmi deekscitacije: fosforescencija, fluorescencija, interna konverzija, vibraciona relaksacija i interkombinacioni prelazi [33, 34].

2.5. Fosforescencija

Fosforescencija predstavlja direktnu radijacionu deekscitaciju tripletnog nivoa na singletni osnovni nivo (Slika 2.7.). Ovaj proces je spinski zabranjen, a to znači da mu je verovatnoća mala i reč je o metastabilnim nivoima. Ta osobina odgovara veoma dugom vremenu života ovog stanja, reda od 10^{-3} do 10^{-1} s. Ako se temperatura rastvora ili čvrstog tela snizi do temperature tečnog azota, molekuli su prilično izolovani, tada im je vibraciono kretanje onemogućeno, pa verovatnoća za radijacionu deekscitaciju postaje veća od verovatnoće za neradijacionu [33, 34].

Pri apsorpciji radijacije iz spoljašnjeg izvora, kao posledicu, pobuđeni atomi emituju zračenje. Fluorescencija se najčešće posmatra pod uglom od 90° u odnosu na snop svetlosti koji se apsorbuje.

Fluorescencija daje signal koji je proporcijalan koncentraciji molekula, te je osetljivost proporcionalna intenzitetu upadne svetlosti. Širina spektralne linije u izvoru ne igra bitnu ulogu pošto se posmatra radijacija čiji intenzitet zavisi jedino od intenziteta u oblasti u kojoj atom apsorbuje.

Apsorpcijom svetlosti jedino se pobuđuju optički dozvoljeni prelazi, za koje važe selekciona pravila.

Idealan izvor za fluorescentnu analizu je izvor koji bi davao veliku spektralnu radijanciju u opsegu apsorpcije od 0.001 nm. Veoma često se koriste izvori kao što su lampe sa metalnim parama, specijalne lampe sa šupljom katodom, lučna pražnjenja, varnica, bezelektrodna pražnjenja, kao i izvori kontinualnog zračenja. Najčešće se kao pobuda za fluorescenciju koristi živina lampa, i to četiri linije iz UV oblasti na 366 nm (365.02 nm, 365.48 nm, 366.29 nm i 366.33 nm) koje se izdvajaju odgovarajućim filtrima. Idealan izvor za pobudu fluorescencije je laser sa organskim bojama [33, 34].

Kvantna efikasnost (Y_F) fluorescencije se definiše kao odnos broja izračenih i broja apsorbovanih fotona. Ona zavisi od prirode rastvarača, temperature, koncentracije, ali i talasne dužine svetlosti kojom se vrši pobuđivanje. Sa povećanjem temperature snižava se intenzitet fluorescencije, jer se povećava verovatnoća neradijativnih kanala deekscitacije. Neke supstance ne fluoresciraju u rastvoru, ali počinju sa fluoresciranjem pri očvršćavanju. Fluorescentna jedinjenja moraju da imaju kvantnu efikasnost veću od 0.01.

Promena intenziteta fluorescentne svetlosti sa koncentracijom ispitivane supstance je potpuno drugačija u oblasti razblaženih rastvora u odnosu na rastvore sa velikom koncentracijom supstance.

U oblasti malih koncentracija intenzitet fluorescencije raste sa povećanjem koncentracije do saturacione tačke. Ukupan intenzitet izotropne fluorescencije se može dobiti iz Lambert-Berovog zakona, uz poznavanje kvantne efikasnosti:

$$I_F = Y_F(I_0 - I_0 e^{-\mu Cx}) \quad (2.7)$$

gde su: Y_F - kvantna efikasnost, I_0 - intenzitet upadne svetlosti, μ - koeficijent apsorpcije po jedinici koncentracije, C - koncentracija ispitivane supstance, x - dužina asorpcione ćelije.

Kada je ukupan intenzitet apsorbovane svetlosti manji od 5%, jednačina se može napisati u uprošćenom obliku:

$$I_F = 2.303 \cdot Y_F I_0 \mu Cx \quad (2.8)$$

Ova jednačina predstavlja osnovu za primenu fluorescentne optičke spektroskopije za određivanje koncentracije pojedinih elemenata.

U oblasti velikih koncentracija, sa povećanjem koncentracije supstance opada intenzitet fluorescencije. Tada dolazi do gašenja fluorescencije usled povećanja broja sudarnih deekscitacija. U ovoj oblasti je zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije data jednačinom:

$$I_F = Y_F I_0 e^{-\beta C} \quad (2.9)$$

gde je β - konstanta gašenja fluorescencije sa koncentracijom.

Za potrebe kvantitativne⁹ analize koriste se spektrofotometri za koje je potrebno odrediti kalibraciju po talasnim dužinama i kalibracionu zavisnost. Kalibracija se svodi na nalaženje koeficijenta pravca prave jednačine 2.6. To se obično izvodi konstrukcijom kalibracione krive pomoću uzoraka poznate koncentracije. Grške mogu da nastanu usled fluorescencije rastvarača [33, 34].

2.6. Fluorescencija

Fluorescencija se kod slobodnih čestica dešava emisijom fotona prilikom dozvoljenog prelaza između dva energetska stanja. Kod tečnih i čvrstih stanja prelaz se vrši sa osnovnog vibracionog nivoa prvog pobuđenog singletnog stanja u osnovno stanje (singletan nivo). Energija emitovanog kvanta se razlikuje od energije pobudnog zračenja i često je manja, pa je fluorescencija pomerena ka većim talasnim dužinama (Slika 2.7.). Međutim, ponekad se može emitovati foton čija energija je veća od energije upadnog fotona, tada se dodatna energija dobija na račun toplote (antistoksovska fluorescencija).

2.7. Interna konverzija

Zbog preklapanja, odnosno male energetske razlike između vibracionih nivoa raznih elektronskih pobuđenih stanja, moguće je da procesom interne konverzije dođe do prelaska iz jednog u drugo elektronsko stanje (Slika 2.7.). Verovatnoća interne konverzije zavisi od energetske razlike dva nivoa, a sa smanjivanjem energetske razlike verovatnoća tog procesa raste. Upravo se zbog ove osobine, putem interne konverzije i vibracione relaksacije, relaksiraju viša pobuđena singletna stanja među kojima je energetska razlika mala. Energetska razlika između prvog pobuđenog i osnovnog elektronskog stanja je obično znatno veća, pa se prvo pobuđeno stanje najčešće relaksira emisijom, tj. fluorescencijom.

2.8. Vibraciona relaksacija

Molekul koji se nalazi u nekom vibracionom stanju pobuđenog elektronskog nivoa može da pređe u osnovno vibraciono stanje istog pobuđenog elektronskog nivoa emisijom infracrvene svetlosti ili predajom viška energije pri sudaru (Slika 2.7.). Kod slobodnih molekula verovatnija je emisiona relaksacija i srednje vreme života pobuđenih stanja je reda 10^{-9} s. Kada je reč o molekulima u tečnosti ili čvrstom stanju, međusobni sudari su veoma retki, tako da se sudarna relaksacija izvrši za vreme od 10^{-11} do 10^{-13} s. Imajući u vidu brzinu ovog procesa, treba primetiti da on predstavlja dominantan način vibracione relaksacije u rastvoru. Sa osnovnog vibracionog nivoa pobuđenog elektronskog nivoa molekul može da relaksira emisijom fotona - fluorescencija.

⁹ Kvantitativna analiza podrazumeva određivanje sadržaja poznate supstance (elementa, jedinjenja ili jona), koji ulazi u sastav ispitivanog materijala.

2.9. Interkombinacioni prelazi

Interkombinacioni prelazi predstavljaju spinski zabranjene prelaze između singletnog i tripletnog nivoa (Slika 2.7.). Dešavaju se između energetski bliskih vibracionih nivoa dva elektronska singlet-triplet nivoa, a pri ovim prelazima dolazi do promene spina. Kao posledica pojave elektrona u tripletnim stanjima dolazi do pojave fosforescencije [33, 34].

2.10. Interakcija objekta i elektromagnetnog zračenja

Kada elektromagnetni talas dođe u dodir sa nekim objektom, može da dođe do transmisije, refleksije ili apsorpcije zračenja.

Transmisija predstavlja prolazak elektromagnetnog zračenja kroz neku optičku sredinu. Refleksija je interakcija elektromagnetnog zračenja između dve optičke sredine kada se deo upadnog talasa vrati u prvobitnu sredinu iz koje je došao.

Na slici 2.8 šematski je prikazano ponašanje svetlosti između dve optičke sredine. Na primeru a) je prikazan idealan prelaz svetlosti između dve prozirne optičke sredine, zanemarujući refleksiju svetlosti na graničnim površinama i apsorpciju svetlosti unutar tih sredina. Svaka realna prozirna optička sredina (npr. staklo), na koju padaju svetlosni zraci pod nekim uglom u odnosu na vertikalu, reflektuje deo upadne svetlosti (reda nekoliko procenata). Relacija koja opisuje refleksiju na ravnim graničnim površinama u zavisnosti od ugla pod kojim pada svetlost je veoma složena. Nepostojanje idealne provedne sredine implicira da uvek postoji apsorpcija svetlosti pri prolazu svetlosti kroz neku sredinu.

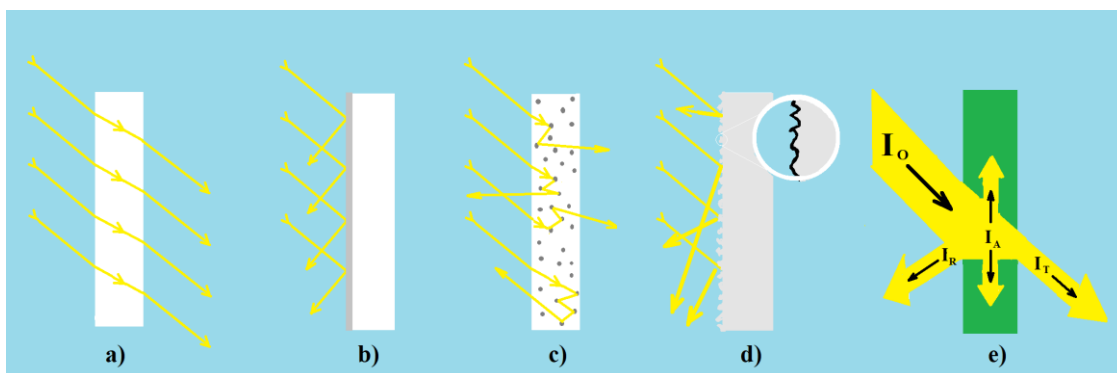
Na slici 2.8 c), prikazana je ogledalska refleksija sa glatkih površina (ne i idealno glatkih) metala (nikal, hrom, aluminijum, srebro itd.), pri čemu ne dolazi do idealne refleksije. U najboljem slučaju može da se postigne refleksivnost do 95-98% i ona predstavlja funkciju talasne dužine upadne svetlosti.

Kada se u prozirnoj sredini nalaze primese mikroskopskih veličina koje odbijaju svetlost koja padne na njih dolazi do difuzne refleksije. Ove optičke sredine nazivamo difuzorima i najpoznati primer ovih sredina su mlečna stakla (Slika 2.8. c)).

Pri pojavi refleksije sa mikroskopski neravnih površina, dolazi do refleksije svetlosti u svim pravcima (Slika 2.8 d)). Najčešći naziv za ovakve površine su mat površine.

Na slici 2.8 e) prikazan je svetlosni snop koji pada na optičku graničnu površinu, pri čemu se deo snopa reflektuje, deo apsorbuje (od strane posmatrane prozirne sredine) i deo prolazi kroz optičku sredinu. Ovaj primer ne važi kada nema transmitovane svetlosti (kroz neprozirne sredine određene debljine).

Apsorpcija zračenja može da se opiše i kao pojava u kojoj energija zračenja pri interakciji sa materijom prelazi u neki drugi vid energije - najčešće toplotu. Apsorbovano zračenje dovodi do energetskih promena u atomima, molekulima i jonima interagujuće supstance. Zakon kojim se opisuje apsorpcija zračenja poznat je kao Lambert-Beer-ov zakon [35].



Slika 2.8. Transmisija i refleksija zračenja (šematski prikaz)

Budući da sve tri pojave (transmisija, refleksija i apsorpcija) zavise od talasne dužine zračenja, pri kvantifikaciji ovih pojava mora da se naglasi da li je reč o monohromatskom ili polihromatskom zračenju.

Ako monohromatski zrak intenziteta I_0 prolazi kroz sloj supstance debljine db , smanjenje intenziteta zračenja zavisice od početnog inteziteta zračenja i debljine sloja, odnosno dužine optičkog puta (Slika 2.9 e)).

$$-dI = kI db \quad (2.10)$$

k je koeficijent apsorpcije koji zavisi od temperature i talasne dužine za datu optičku sredinu. Ako se jednačina 2.10 integrali u odgovarajućim granicama, imajući u vidu da je pri debljini sloja $b = 0$ intenzitet propuštenog zračenja jednak intenzitetu upadnog zračenja $I = I_0$, sledi:

$$\int_{I_0}^{I_T} \frac{dI}{I} = - \int_0^b k db \quad (2.11)$$

$$\ln \frac{I_T}{I_0} = -kb \quad (2.12)$$

Koeficijent apsorpcije k se može da se računa kao proizvod ekstinkcionog koeficijenta ϵ^{10} i vrednosti apsorbovane koncentracije zračenja u materijalu c , pa jednačina 2.12 postaje:

$$\frac{I_T}{I_0} = e^{-\epsilon cb} \quad (2.13)$$

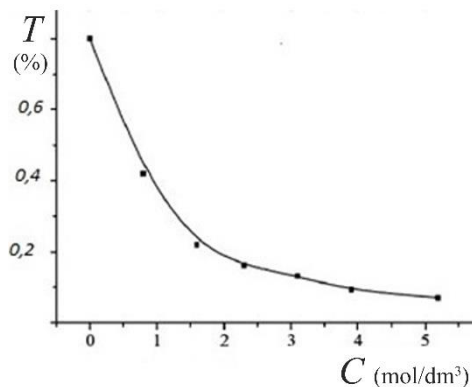
Količnik iz jednačine 2.13 predstavlja transmisiju ili propustljivost zračenja, odnosno količnik intenziteta propuštenog i upadnog zračenja. Na osnovu izraza 2.13 vidi se da će propustljivost zračenja da bude manja, ukoliko je vrednost koncentracije veća. Drugim rečima, vrednost transmisije je veća, ako je sposobnost date supstance za apsorbcijom energije zračenja većamanja. Sa matematičkog aspekta gledišta, transmisija eksponencijalno opada sa koncentracijom (Slika 2.10.). Transmisija T može da ima vrednosti od 0 ($I = 0$, ukoliko ništa od zračenja nije propušteno) do 1 ($I = I_0$ u slučaju da je upadno zračenje u potpunosti propušteno), ako se zapisuje u procentima, transmisija uzima vrednosti od 0 do 100%.

Jednačina (2.13) može da se transformiše logaritmovanjem, i tako se dobija veličina apsorbanca.

¹⁰ Molarna apsorptivnost, apsorbcioni koeficijent, zavisi od debljine apsorbujućeg sloja (b) i koncentracije (c): $\epsilon = \frac{A}{bc}$ izražava se u $\frac{cm^2}{mol}$.

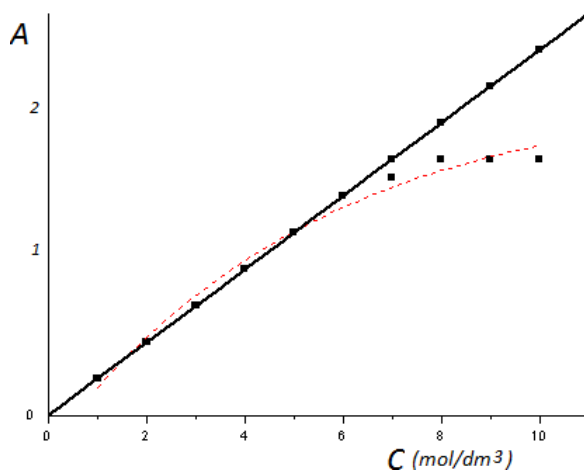
$$-\ln \frac{I_T}{I_0} = \ln \frac{I_0}{I_T} = A = \epsilon cb \text{ odnosno } -\log \frac{I_T}{I_0} = \log \frac{I_0}{I_T} = A = \epsilon cb \quad (2.14)$$

Dakle, apsorbanca predstavlja negativan logaritam¹¹ količnika intenziteta upadnog i propuštenog zračenja. Na osnovu jednačine 2.14 može se zaključiti da će apsorbanca zračenja da bude veća ukoliko je veća koncentracija c , odnosno ako je njihova sposobnost da apsorbiraju energiju zračenja veća. Apсорbanca linearno raste sa koncentracijom [35].



Slika 2.9. Grafik zavisnosti transmisije od koncentracije supstance [35]

Lambert-Beer-ov zakon predstavlja osnovni zakon u spektrometrijskoj kvantitativnoj analizi. Na osnovu linearne zavisnosti apsorpcije od koncentracije, crtaju se kalibracioni dijagrami za određivanja koncentracija različitih supstanci u gotovo svim oblastima elektromagnetnog spektra (Slika 2.10.).



Slika 2.10. Zavisnost apsorbanije od koncentracije prema Lambert-Beer-ovom zakonu [35]

Lambert-Beer-ov zakon važi samo pod sledećim uslovima:

1. upadno je zračenje monohromatsko i pada normalno na površinu supstance koja apsorbira;
2. apsorbirajuća supstanca nije homogena;

¹¹ Kada se apsorbanca definiše dekadnim logaritmom, ekstinkcioni koeficijent se množi faktorom 0,4343 ($10^{0,4343} = e$).

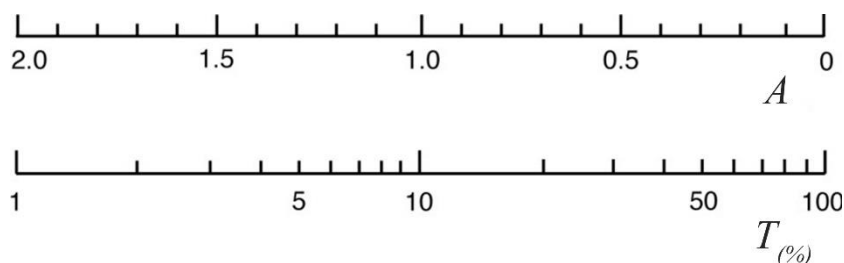
3. zanemarena jaka međumolekulske interakcije u koncentrovanim rastvorima.

U literaturi se za ekstinkcioni koeficijent ϵ veoma često mogu naći nazivi kao: apsorbcioni koeficijent, molarna apsorptivnost, linearni molarni apsorbcioni koeficijent ili apsorptivnost). Najpravilnije bi trebalo da se koristi termin linearni molarni apsorbcioni koeficijent, budući da je Lamberert-Beer-ov zakon definisan za monohromatsko zračenje. Ekstinkcioni koeficijent zavisi od talasne dužine zračenja i kada se definiše za više talasnih dužina, zove se integralni molarni apsorbcioni koeficijent.

Radi lakše interpretacije optičkih spektara bitno je poznavati međusobni odnos skala vrednosti transmisije i apsorpcije. Kao što je već pomenuto, skala transmisije je linearna dok je skala apsorpcije logaritamska (Slika 2.11). Vrednosti transmisije i apsorpcije povezani su u sledećem odnosu:

$$A = -\log \frac{\%T}{100} \quad (2.15)$$

Na osnovu jednačine 2.15 lako se pokazuje da je apsorbanca nuli u slučaju kada je transmisija jednaka 100%.



Slika 2.11. Odnos skala apsorbance i transmisije [35]

Važna osobina apsorpcije je da je aditivna veličina, a to znači da u sistemu koji sadrži više komponenti (koje apsorbuju elektromagnetno zračenje date talasne dužine, a koje međusobno ne reaguju), apsorbanca sistema jednaka je zbiru apsorbanca pojedinačnih komponenti.

$$A_{ukupna} = \sum_{i=1}^n A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (2.16)$$

Fenomen refleksije zračenja je u osnovi nekih tehnika spektroskopije, kao što je tehnika difuzione refleksije (*Diffuse reflectance, DR*). Da bi se ova tehnika uspešno primenjivala na date uzorke, neophodno je poznavati odnos refleksije i apsorpcije. U najširem smislu, refleksija predstavlja odnos intenziteta reflektovanog upadnog zračenja u odnosu na uzorak.

$$R = \frac{I_R}{I_0}, \%R = \frac{I_R}{I_0} \cdot 100 \quad (2.17)$$

Gde I_R predstavlja intenzitet zračenja reflektovanog od strane uzorka, a I_0 intenzitet upadnog zračenja. Pojmu refleksije treba pristupiti sa velikom pažnjom, jer pojavu veoma često prati i pojava apsorpcije zračenja. Prema Fresnel-ovoj jednačini refleksija zraka koji pod pravim uglom dospeva na ravnu površinu je data jednačinom 2.18.

$$R = \left[\frac{(n^2 - 1) + K^2}{(n^2 + 1) + K^2} \right] \quad (2.18)$$

Gde n predstavlja indeks prelamanja supstance, a K predstavlja konstantu koja povezuje ekstinkcioni koeficijent ϵ i talasnu dužinu λ (jednačina 2.19)

$$K = \frac{\varepsilon\lambda}{4} \quad (2.19)$$

U slučajevima kada zračenje dospeva na površinu pri uglu koji je različit od normalnog, izraz za refleksiju predstavlja kompleksnu trigonometrijsku funkciju koja uzima u obzir i rasipanje zračenja. S obzirom da refleksija predstavlja kompleksan pojam na čiju vrednost utiču indeks prelamanja, ekstinkcioni koeficijent, talasna dužinu i rasipanje zračenja, kod primene refleksionih tehnika veoma je važno poznavanje ovih parametara. Da bi primena refleksionih tehnika bila omogućena u kvantitativnoj analizi, potrebno je naći linearnu zavisnost između refleksije i koncentracije, analogno odnosu apsorpcije i koncentracije u Lambert-Beer-ovom zakonu. U novijim komercijalnim softverima koji se koriste za obradu spektara često se koristi sledeća jednačina:

$$A \approx \log \frac{1}{R} \quad (2.20)$$

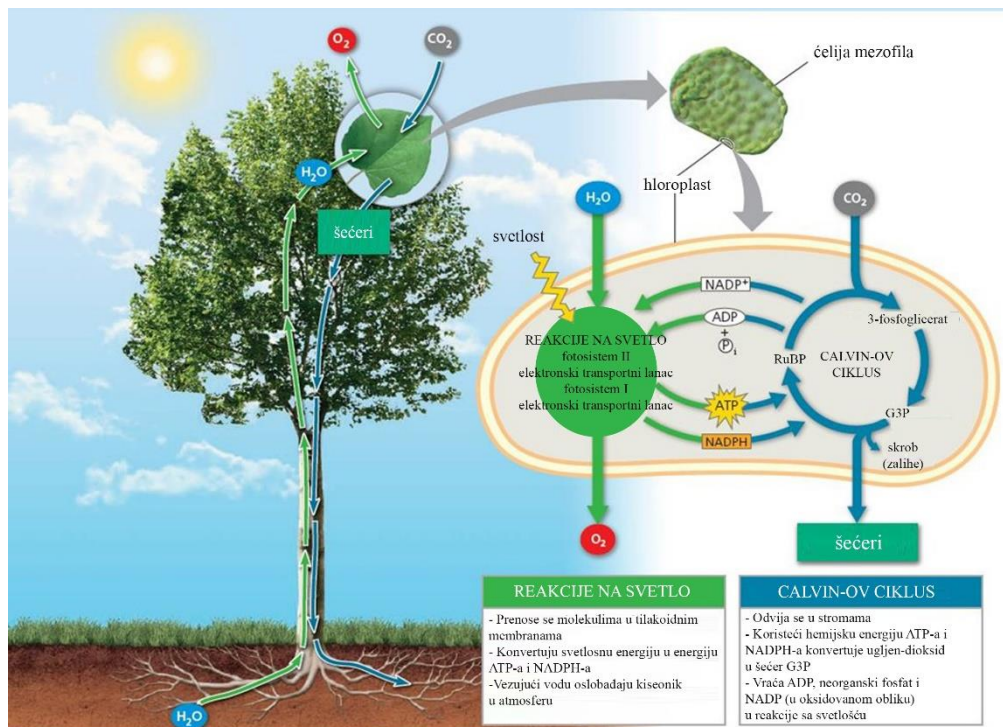
Na osnovu gornje formule, moglo bi se zaključiti da je zavisnost refleksije i koncentracije linearna, međutim to ipak nije slučaj zbog uticaja rasipanja zračenja na različitim talasnim dužinama. U svrhe kvantitativne analize zgodnije da se koriste Kubelka-Munk jedinice. Korišćenjem Kubelka-Munk jedinica eliminišu se negativni efekti uticaji rasipanja na linearnost između refleksije i koncentracije i time se povećava tačnost kvantitativnih analiza. Kubelka-Munk vrednost za određenu frekvenciju se definiše jednačinom:

$$KM = \frac{(1-R)^2}{2R} = 2,303 \varepsilon \frac{c}{s} \quad (2.21)$$

Pri čemu s predstavlja koeficijent rasipanja zračenja. Ukoliko je njegova vrednost konstantna za određeni interval talasnih dužina, primena Kubelka Munk-a jedinica je utoliko efikasnija, a kvantitativna određivanja preciznija [35].

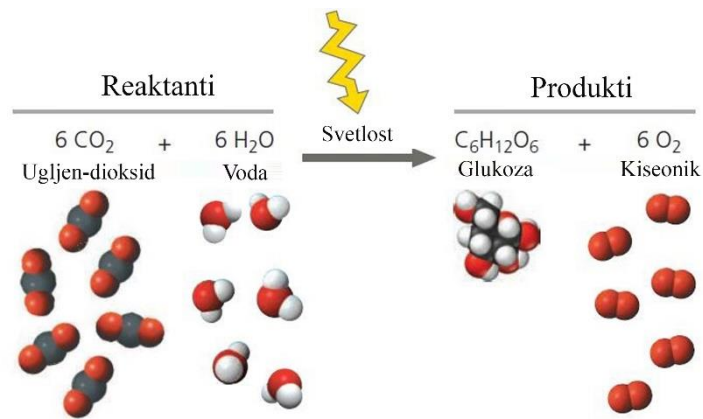
III PROCES FOTOSINTEZE

Fotosinteza je osnovni biološki proces biljaka i fotosintetskih bakterija u toku kojeg se svetlosna energija kvantno-mehaničkim procesim pretvara u hemijsku. Biljke apsorbiraju ugljen-dioksid, vodu, mineralne materije iz zemljišta i Sunčevu energiju, a zatim ih sintetišu u šećere i ugljenohidrate, tj. hranu, pa su tako i primarni poducenti lanca ishrane (Slika 3.1.). Smatra se da sva organska jedinjenja i celokupan kiseonik, koji danas postoje, potiču upravo iz procesa fotosinteze. Poznato je da biljke poseduju različite načine usvajanja, fiksacije i redukcije atmosferskog ugljen-dioksida i sinteze šećera u procesu koji se naziva Kalvinov ciklus (za ova istraživanja Calvin je dobio Nobelovu nagradu 1961. god. za hemiju). Izuzev nuklearne energije, svi energetske izvori savremenog društva potiču od fotosinteze postojećih biljaka ili davno izumrlih biljaka [7, 36].



Slika 3.1. Proces fotosinteze [36]

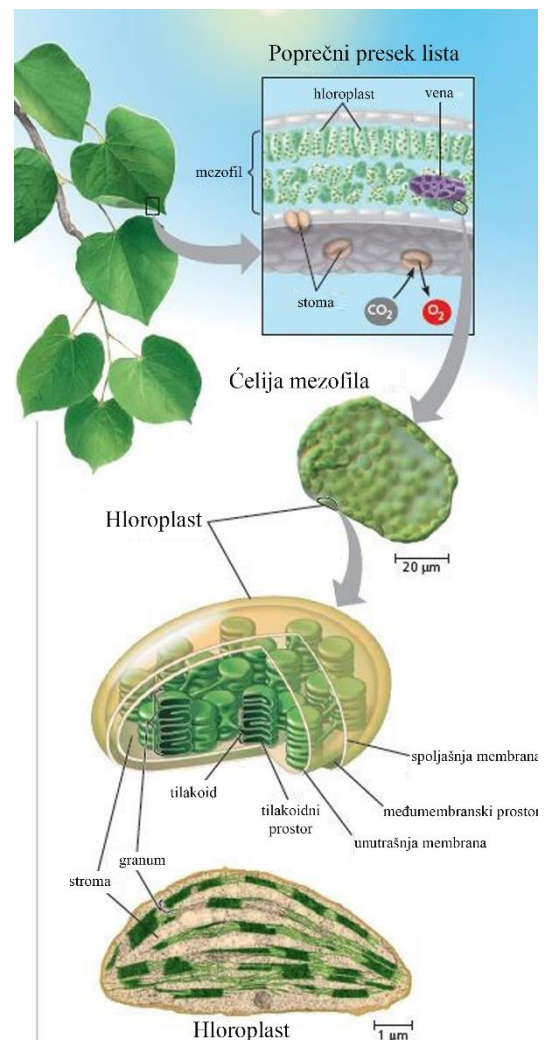
Pre više od 200 godina (1817. god.) prvi put je izolovan zeleni pigment iz lista biljke i nazvan je hlorofil, a 1845. god. je formulisan zakon o konverziji energije [37] u kome se objašnjava da biljke apsorbiraju jednu vrstu energije (svetlosnu), a zatim je pretvaraju u drugu vrstu (hemijsku) koja je vezana u produktim fotosinteze. Ovako je izgledala opšta jednačina fotosinteze nastala krajem XIX veka (Slika 3.2). Dakle, uz molekul ugljen-dioksida i vode, prisustvu svetlosti, zeleni delovi lista vrše proizvodnju organskih jedinjenja- šećera (glukoze) uz oslobađanje kiseonika.



Slika 3.2. Šematski prikaz prve jednačine fotosinteze [36]

3.1. Hloroplasti

U hloroplastima se razlaže molekul vode na vodonik i kiseonik, otkriće C.B. van Niel (od 1930. godine). Ranije se smatralo da se kiseonik dobija upravo iz molekula ugljend-dioksida. Svaki zeleni deo biljke sadrži hloroplast, ali listovi su osnovna mesta gde se odvija proces fotosinteze kod većine biljaka. Na poprečnom preseku površine oko 1 mm^2 ima ih oko pola miliona. Hloroplasti su smešteni u ćelije mezofila, u tkivima unutar lista. Ugljen-dioksid ulazi, a kiseonik izlazi iz lista kroz pore koje se zovu stome. Voda koja se apsorbira preko korena dolazi preko lisne nervature do lista. Na taj način se, takođe, vrši transport šećera iz lista do korena. U prosečnoj ćeliji mezofila se nalazi oko 30-40 hloroplasta, dimezija od $2\text{-}4 \text{ }\mu\text{m}$ do $4\text{-}7 \text{ }\mu\text{m}$. Hloroplast ima dvojni membranu koja okružuje stromu (tečnost kojom je ispunjen). Hloroplasti sadrže unutrašnji membranski sistem koji se sastoji od veoma spljoštenih membranskih vezikula koje se zovu tilakoidi (Slika 3.3.). Unutrašnjost tilakoida zove se lumen. Na pojedinim mestima, grupisan je veći broj tilakoida koji grade stub, naslagani jedni na drugi, nalik na stub novčića. Hlorofil, zeleni pigment koji daje biljkama zelenu boju, nalazi se u tilakoidnim membranama hloroplasta. Svetlosna energija koji apsorbira hlorofil pokreće sintezu organskih molekula u hloroplastu [36].



Slika 3.3. Hloroplast lista [36]

3.2. Svetla i tamna faza fotosinteze

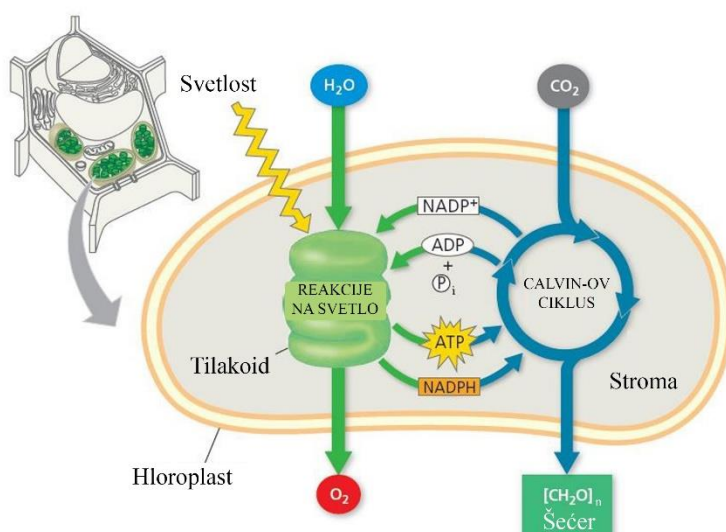
Najveći pomak u istraživanju procesa fotosinteze zapažen je tek posle 50-ih godina XX veka. Mnoga otkrića o biohemijskim procesima u živim ćelijama, doprinela su da se i činioci u fotosintezi identifikuju kao opšti metabolički posrednici. Kako je otkrivena uloga dehidrogenaza vezanih za prostetične grupe NAD i NADP u oksido-reduktivnim procesima, moglo je da se poveže da je i jedinjenje koje se redukuje u fotosintezi upravo NADP, koji sa protonima i elektronima iz vode daje NADPH. Kada je identifikovan adenozin trifosfat (ATP) kao opšti prenosilac energije, otkriveno je da je i ovo jedinjenje produkt konverzije svetlosne energije u hemijsku [38].

Izgradnja ATP u fotosintezi nazvana je fotosintetička fosforilacija. Tako je potvrđeno da fotosintezu čine dva procesa: svetla i tamna faza.

Dakle, svetla faza obuhvata: oksidaciju vode, redukciju NADP (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) u NADPH, fosforilaciju ADP (adenozin difosfat) u ATP (adenozin trifosfat) uz oslobađanje O_2 .

Tamna faza obuhvata: redukciju CO_2 , $-NO_2^-$ i $-SO_3^{2-}$ i sintezu ugljenih hidrata i drugih organskih jedinjenja (Kalvinov ciklus).

Kada se molekul vode razloži na dve komponente, dajući O_2 kao produkt, hlorofil apsorbuje svetlost i transportuje elektrone i jone vodonika iz vode do acceptora $NADP^+$. Svetlosnom energijom dolazi do redukcije $NADP^+$ u NADPH. Ove reakcije takođe generišu ATP fotosintetičkom fosforilacijom. Dakle, svetlosna energija je inicijalno konvergovana u hemijsku energiju dveju komponentama: NADPH i ATP [36].



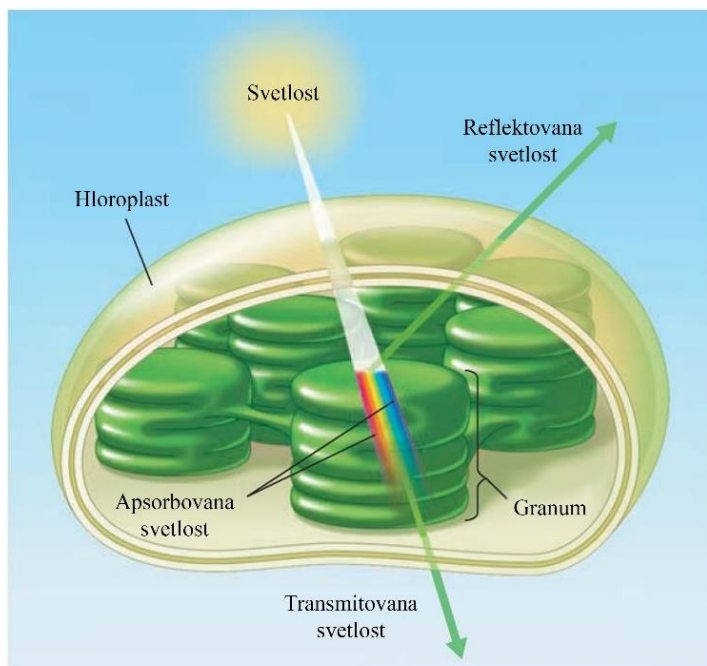
Slika 3.4. Veza između svetlosnih reakcija i Kalvinovog ciklusa [36]

U toku Kalvinovog ciklusa, proces počinje fiksacijom molekula ugljen-dioksida iz vazduha. Dodavanjem elektrona dolazi do redukcije CO_2 u karbonhidrat za šta je neophodna hemijska energija iz ATP-a. Proces redukcije se odvija pomoću NADPH koji je dobio elektron iz reakcija svetle faze fotosinteze. U Kalvinovom ciklusu nastaje šećer, koji nastaje samo uz produkte prethodne faze (Slika 3.4.)

U tilakoidima hloroplasta dolazi do pretvaranja sunčeve energije u energiju ATP-a i NADPH koji se na dalje koriste za sintezu glukoze i drugih molekula koji se skladište kao izvori energije.

3.3. Fotosintetički pigmenti

Kada svetlost dođe do interakcije sa materijom, može da bude reflektovana (odbijena), propuštena (prolazi bez interakcije) ili apsorbovana (zadržana) (pogledati prethodno poglavlje II). Svetlost različite talasne dužine apsorbuju odgovarajući pigmenti. Kada bismo pigmente osvetlili belom svetlošću (Slika 3.5.), ono što vidimo u vidu refleksije je zelena boja, upravo jer hlorofili apsorbuju plavu i crvenu boju iz vidljivog dela spektra. Svi hlorofili imaju dve zone apsorpcije, jednu u plavom, drugu u crvenom delu spektra. Hlorofil-**a** u etarskom rastvoru apsorbuje najviše svetlost od 430 i 663 nm, a hlorofil-**b** na 450 i 643 nm. Za neke biljke ovaj opseg svetlosti je na oba kraja nešto proširen. Tako, dugotalasno ultraljubičasto zračenje (320 – 390) nm ima aktivnost u nekim pokretima biljaka, a blisku infracrvenu svetlost (do 1000 nm) izvesne bakterije mogu da koriste u fotosintezi [36].

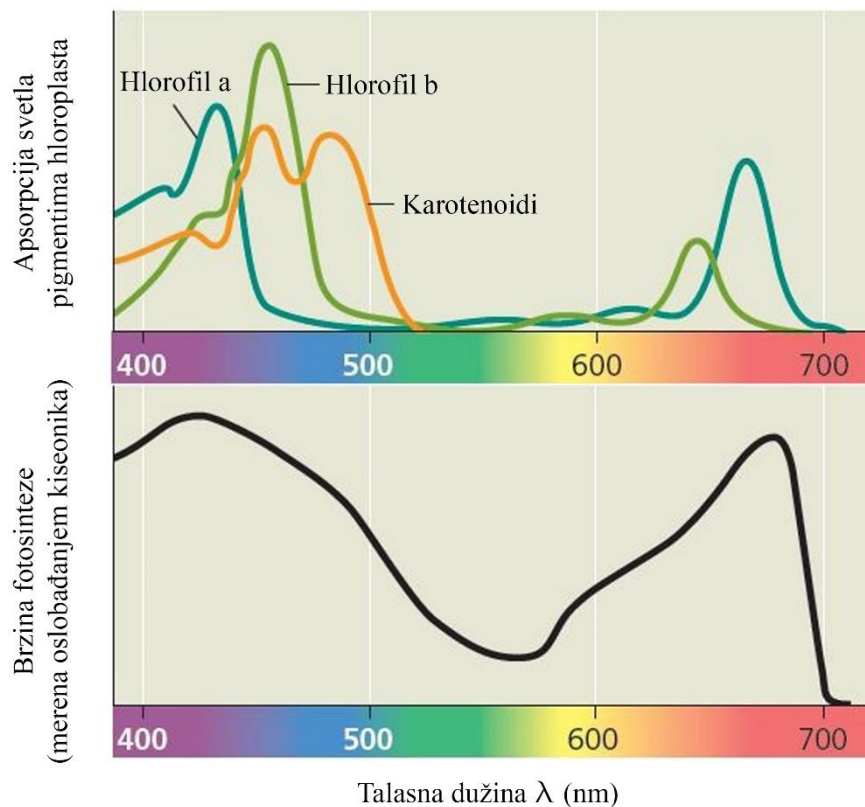


Slika 3.5. Svetlosna energija u interakciji sa pigmentima lista [36]

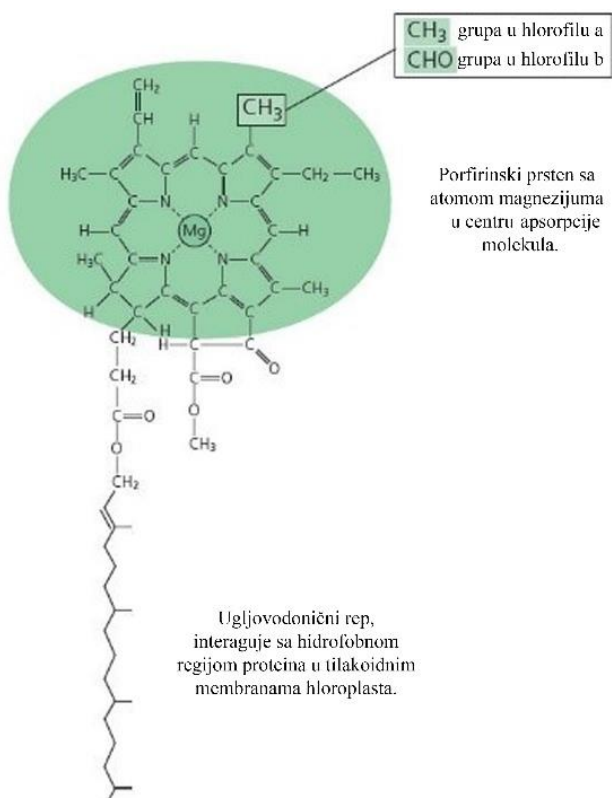
U fotosintezi je utvrđeno učešće tri grupe pigmentata: hlorofila, karotenoida i fikobilina. S obzirom da svi fotosintetički organizmi imaju više od jednog pigmenta, jasno je da je ukupna apsorpcija dosta široka i predstavlja zbir apsorpcija pojedinih pigmentata.

Grafik zavisnosti apsorbovane svetlosti u zavisnosti od talasne dužine zove se apsorpcioni spektar. U zavisnosti od apsorpcije svetlosti različite talasne dužine, postoje tri tipa hlorofila kod viših biljaka: hlorofil-**a**, hlorofil-**b** i karotenoidi (Slika 3.6.) [39-41].

Molekul hlorofila je zeleni pigmenti za koji je karakteristično da ima atom magnezijuma u centru prstena (jer su hlorofili derivati cikličnih tetrapirola koji grade porfirinski prsten) [36, 42]. Postoji više vrsta hlorofila, koji su označeni slovima **a**, **b**, **c** i **d**. Njihovo rasprostranjenje kod biljaka je različito. Svi fotosintetički organizmi sadrže hlorofil **a**. Više njih hlorofil **a** i **b** a mrke alge, recimo, **a** i **c**, itd. U molekulima hlorofila **a**, **b** i **d** ne postoje velike razlike (Slika 3.7.). Hlorofil-**a** ima na C-7 atomu metil-grupu, a hlorofil-**b** ima aldehidnu na tom mestu; hlorofil-**d** ima aldehidnu grupu na mestu C-3. Struktura hlorofila-**c** je znatno drugačija. Pre svega, postoje dva njegova oblika c_1 i c_2 koji na C-8 atomu imaju različite grupe [7].



Slika 3.6. a) Asorpcioni spektar hlorofila-*a*, hlorofila-*b* i karotenoida b) akcioni spektar [36]



Posmatrajući apsorpcione spektre ovih pigmenta, možemo da vidimo da je za proces fotosinteze najznačajnija apsorpcija plave i crvene boje iz vidljivog spektra.

Uloga karotenoida je najvažnija, a to je zaštita od jake svetlosti koja bi oštetila hlorofil-*a* i *b* kao i zaštita od oksidativnih molekula koji su opasni po ćelije [43].

Osim osnovnih pigmenta, ne treba zaboraviti fitohrom, koji takođe učestvuje u kontroli razvika i rasteća biljaka. U procesu fotomorfogeneze, svetlost je nosilac informacija o promenama u spoljašnjoj sredini na osnovu kojih biljke usklađuju rasteće i razvika sa uslovima sredine. Pigmenti koji apsorbuju aktivnu svetlost u fotomorfogenezi, imaju drugačiji zadatak od fotosintetičkih pigmenta koji učestvuju direktno u procesu fotosinteze.

Slika 3.7. Molekul hlorofila-*a* i hlorofila-*b* [36]

Informaciju o svetlosti odnosno mraku, intenzitetu svetlosti i njenom kvalitetu, pravcu zračenja, kao i dužinu/periodičnost osvetljavanja, biljka dobija u procesu fotomorfogeneze. U fotomorfogenezi, pigmenti koji apsorbuju svetlost su fitohromi i kriptohromi. Za fitohrome je karakterističan asorpcioni maksimum na 660 nm talasne dužine, dok je za kriptohrome asorpcioni maksimum u plavom odnosno ultraljubičastom delu spektra [7].

Fitohrom su otkrili Borthwich i Hendricks (1950. godine), tako što su osvetljavali semena salate (koja su postavljena u potpunom mraku) periodično crvenim svetlom (1 min.) i tamno crvenim svetlom (3 minuta). Ispostavilo se da impulsno crveno svetlo stimuliše proces klijanja, dok je tamno crveno poništavalo efekat crvenog svetla.

Fitohrom predstavlja hromoprotein koji se sastoji iz subedinica, a svaka sadrži dve komponente: hromofor (neproteinski deo) i apoprotein (proteinski deo). Hromofor je deo molekula koji nije proteinske prirode, a koji apsorbuje svetlost. Fitohrom se sintetiše u obliku koji apsorbuje svetlost od 660 nm i u tom obliku se nalazi u biljakama koje rastu u mraku. Označava se sa fitohrom 660, P_{660} ili Pr (phytochrome red). Kada se osvetli crvenom svetlošću, Pr se konvertuje u drugi oblik čiji je maksimum asorpcije na 730 nm, to je sada P_{730} ili Pfr. Pri apsorpciji svetlosti, menja se i njegova struktura, a na hromoforu dolazi do cis-trans izomerizacije između odgovarajućih prstena. Dakle, apsorpcija svetlosti dovodi do prelaska stanja fitohroma iz neaktivnog P_{660} u aktivan P_{730} oblik [7, 36].

Plava svetlost izaziva otvaranje stoma, a to dalje stimuliše aktivnost protonske ATP-aze na ćelijskoj membrani i samim tim povećava polarizaciju membrane i otvaranje ulaznih jonskih kanala. Efekti plave svetlosti su fototropska reakcija, inhibira izduživanja stabla, stimuliše razvitak kotiledona, otvaranje apikalnog pupoljka, otvaranje stoma, sintezu flavonoida, modifikuje mnoge metaboličke procese, stimuliše pomeranje hloroplasta u ćeliji [36].

3.4. Uticaj jačine svetlosti i koncentracije ugljen-dioksida na proces fotosinteze

Na osnovu detekcije koncentracije oslobađanja O_2 , detektovan je i akcioni spektar koji je u slaganju u odnosu na asorpcioni spektar hlorofila. Kao što se vidi na slici 3.6, asorpcioni spektar hlorofila-*a* i hlorofila-*b* se razlikuje po talasnim dužinama, što se može detektovati odgovarajućim bojama refleksije (zelena i maslinasto zelena boja, respektivno). S druge strane, karotenoidi apsorbuju oblast ljubičaste i plavo-zelene, reflektujući žutu i narandžastu.

Dalja istraživanja fotosinteze bila su usmerena ka proučavanju faktora koji učestvuju u procesu, tj koncentracije CO_2 i inteziteta svetlosti [7].

Kada je svetlost varijabilan faktor, intezitet fotosinteze raste linearno do tačke koja je određena datom koncentracijom CO_2 . Proces se dalje može pojačati samo ako se poveća koncentracija CO_2 do izvesne vrednosti.

Može se zamisliti i obrnuti slučaj, da je koncentracija CO_2 varijabilna, a svetlost data u dva različita inteziteta. Dobiće se slična porodica krivih koja važi za interakciju svetlosti i CO_2 .

Dakle, proces fotosinteze može se pojačati samo kontrolom oba faktora. Kasniji eksperimenti su ispitivali uticaj temperature na intezitet fotosinteze u uslovima kada je ili intezitet svetlosti ili koncentracija CO_2 bila ograničavajući faktor [7].

Kada je koncentracija CO_2 bila dovoljno visoka da ne ograničava fotosintezu, a svetlost varijabila (A), temperatura između (1–25)°C nije imala nikakvog uticaja na brzinu procesa.

Obratno, kad je intezitet svetlosti bio dovoljno visok da ne ograniči fotosintezu (B), onda bi sa povećanjem koncentracije CO₂ fotosinteza rasla znatno brže na 25°C, nego na 1°C.

Iz toga je izveden zaključak da fotosinteza obuhvata dve komponente koje su nazvane:

1. fotohemijska faza, koja zavisi od svetlosti a ne zavisi (kao svi fotohemijski procesi) od temperature
2. biohemijska faza, koja zavisi od CO₂, a koja zavisi (kao svi enzimski procesi) od temperature

Ovim ogledima je fotosinteza prvi put jasno razdvojena na dve faze, koje se danas još nazivaju svetla i tamna faza fotosinteze.

Svetla faza podrazumeva procese koje direktno pokreće svetlost, a tamna procese u kojima učestvuje CO₂ i za koje je svetlost potrebna kao regulator, ali ne kao izvor energije.

Pošto je identifikovan adenzin-trifosfat (ATP) kao opšti prenosilac energije, otkriveno je i da je ovo jedinjenje produkt konverzije svetlosne energije u hemijsku [44].

3.5. Fluorescencija hlorofila

U molekulu složene strukture, kao što je hlorofil, svako elektronsko stanje ima nekoliko bliskih energetskih stanja ili vibracionih nivoa. Elektroni koji prelaze iz jedne orbite u drugu, mogu poći sa raznih vibracionih nivoa osnovne orbite i dospeti na razne vibracione nivoe ekscitovanog stanja. Otuda jedna populacija organskih molekula ne apsorbuje samo zrake jedne talasne dužine, nego širi deo spektra oko jedne glavne talasne dužine. Spektri takvih organskih molekula su trakasti (nisu diskretni).

U većoj populaciji molekula najveći broj ipak apsorbuje jednu određenu talasnu dužinu i ona predstavlja maksimum u apsorpcionom spektru. Stoga se apsorpcioni spektar karakteriše talasnom dužinom maksimalne apsorpcije i poluintezitetskom širinom, tj. širinom spektra (u nm) na delu na kome je intezitet apsorpcije 50% od maksimalnog.

Svaki molekul hlorofila apsorbuje tačno energiju fotona koja odgovara određenoj talasnoj dužini iz apsorpcionog spektra tog pigmenta. U molekulu hlorofila postoje dve moguće orbite ekscitiranog stanja; viša orbita odgovara energiji fotona plave (drugi singlet), a niža fotonu crvene svetlosti (prvi singlet). U trenutku kada hlorofil apsorbuje plavu svetlost, ekscitirano stanje (drugi singlet) traje svega 10⁻¹² s. Elektron gubi deo energije u vidu toplote i vraća se prvo u nižu moguću orbitu ekscitiranog stanja; ova orbita inače odgovara energiji kvanta crvene svetlosti i na nju prelaze elektroni pri apsorpciji crvene svetlosti. Zbog toga se maksimumi apsorpcije hlorofila nalaze u plavom i crvenom delu spektra, te apsorpcija ove svetlosti dovodi hlorofil u ekscitovano stanje [7, 36, 45].

Kada molekul apsorbuje jedan kvant svetlosti, foton, dolazi u pobuđeno stanje u sledeću orbitalu sa više potencijalne energije (Slika 3.7.).

Ekscitarno stanje je nestabilno i kratkotrajno. Vrlo brzo dolazi do deekscitacije, pri čemu se hlorofil oslobađa primljene energije i vraća u osnovno stanje. Prema tome, bilo da hlorofil apsorbuje plavu, bilo crvenu svetlost, pobuđeni elektron se nađe uvek na istoj orbiti. Ovo pobuđeno stanje je nešto stabilnije i traje 10⁻⁹ s (prvi singlet). U ovom vremenu elektron pada na prvi najniži vibracioni nivo iste orbite, pri čemu se mali višak energije gubi kao toplota. Zatim može doći do potpune deekscitacije, kada se elektron vrati na osnovnu orbitu.

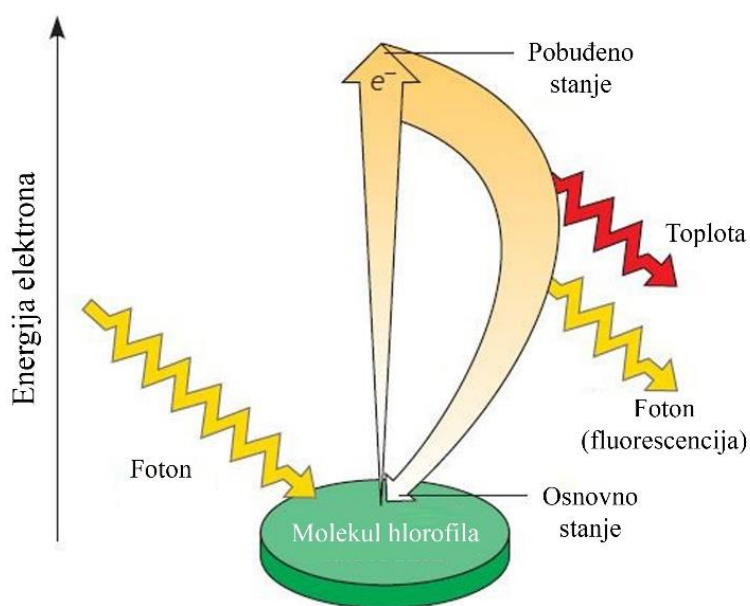
Energija koja se tada oslobađa ponovo se emituje kao kvant svetlosti i ova svetlosna emisija je poznata kao fluorescencija.

Prema tome, ponovo emitovana svetlost ima manju energiju nego apsorbovana. Drugim rečima, talasna dužina emitovane svetlosti je uvek veća od apsorbovane.

Hlorofil a u etarskom rastvoru apsorbuje na 430 i 665 nm, a fluorescira na 680 nm.

Kada apsorpcija fotona dovede elektron u pobuđeno stanje, ovo stanje ne može da traje dugo jer je nestabilno. U momentu kada se pobuđeni elektron vrati u osnovno stanje, oslobađa određenu količinu energije u vidu toplote i odavanjem svetlosti određene talasne dužine. Ovaj proces zove se fluorescencija hlorofila (slika 3.8.).

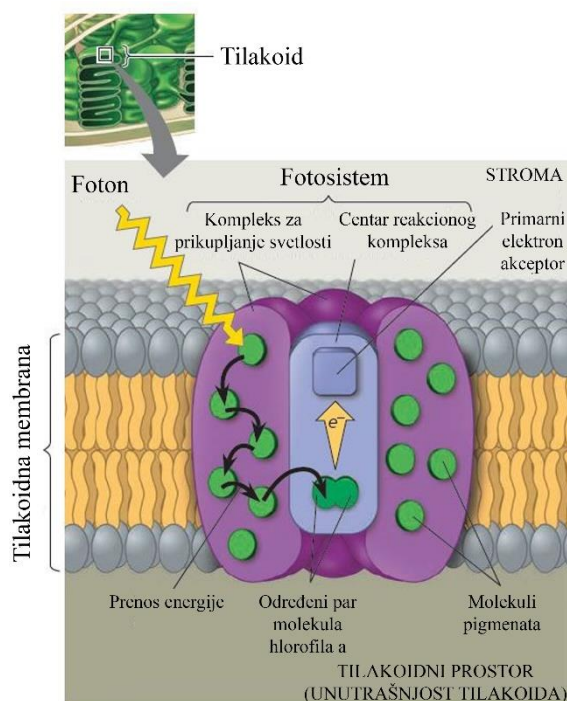
Pobuđeni molekuli hlorofila daju različite produkte. U prirodnom okruženju tilakoidne membrane, raspoređeni su uz druge manje organske molekule i proteine u kompleks koji se zove fotosistem (Slika 3.9.).



Slika 3.8. Fluorescencija hlorofila [36]

3.6. Fotosistem

Grupa proteina i pigmenata čiji reakcioni spektar apsorbuje svetlost talasne dužine 700 nm zove se fotosistem I (PSI). Smešten je u tilakoidima strome i u delovima membrane po obodu grana koje su u kontaktu sa stromom. Njegova osnovna funkcija sastoji se u redukciji feredoksina i oksidaciji plastocijanina. Ceo kompleks može da se razdvoji na jezgro i na antena pigmente. Jezgro obuhvata najmanje 7 polipeptida kod kojih neki nose reakcioni centar i primarne receptore elektrona. Reakcioni centar se sastoji od dva molekula hlorofila a koji gube boju pri apsorpciji svetlosti talasne dužine 700 nm. Polipeptidi za koje su vezani još oko 100 molekula hlorofila-a imaju pomoćnu funkciju kao i 16 karotenoida koji štite hlorofil od fotooksidacije (razdvajanja naelektrisanja) [36]



.Slika 3.9. Fotosistem [36]

PSI na stromalnoj strani ima mesto za koje vezuje feredoksin-NADP-oksidoireduktazu (FNR), a na luminalnoj strani je vezivanje plastocijanina.

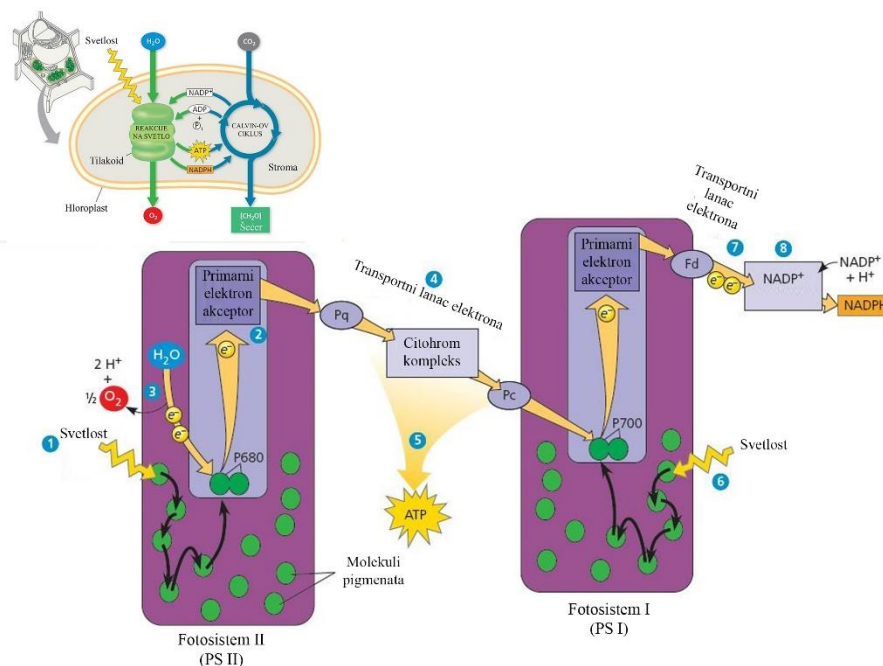
Iako su imena fotosistema I i II dodeljena prema redosledu otkrića, u fotosistemu II se prvo odvijaju reakcije.

Fotosistem II (PSII) se sastoji od jezgra i antena pigmenata. Jezgro sadrži najmanje 6 polipeptida od kojih dva nose reakcioni centar. P680 sadrži 4 molekula hlorofila od kojih dva grade dimer koji se fotooksiduje. Posebni polipeptidi koji su sastavljeni od 20-25 antena pigmenata su antena pigmenti fotosistema II. Tri asociirana polipeptida u lumenu tilakoida čine kompleks koji oksiduje vodu i razvija O_2 . Ovaj kompleks je vezan za PSII kome predaje elektron iz vode [7, 36].

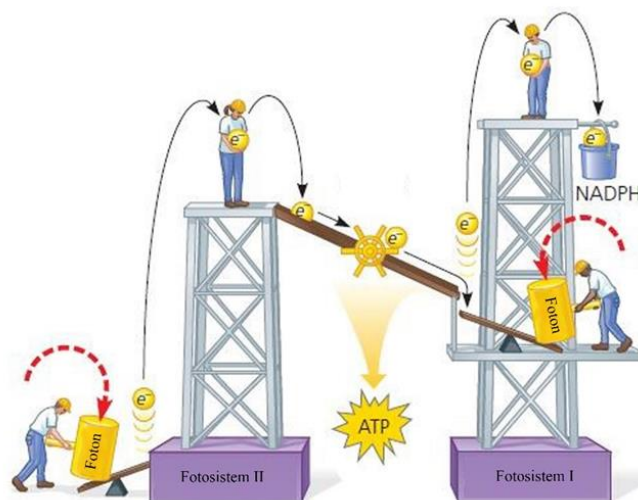
Reakcije između PSI i PSII (Slika 3.10. i Slika 3.11) [36]:

1. Foton svetlosti udara molekul hlorofila iz PSII, pobuđujući elektron u njemu u više energetske stanje. Taj elektron vraćajući se u osnovno stanje, emituje foton koji pobuđuje elektron u lokalnom pigmentu koji pritom prelazi takođe u pobuđeno stanje. Energija se, na taj način, prenosi do drugih molekula sve dok ne dođe do P680 para molekula hlorofila a u reakcionom kompleksu PSII i time dovodi ovaj elektronski par u pobuđeno stanje.
2. Ovaj elektron se prenosi do primarnog akceptora elektrona.
3. Enzim razlaže molekul vode u dva elektrona, dva jona vodonika i atom kiseonika. Atom kiseonika se kombinuje sa drugim atomom kiseonika nastalim iz drugog molekula vode i tako formira molekul kiseonika.
4. Svaki pobuđeni elektron prolazi od primarnog akceptora elektrona iz PSII u PSI transportnim lancem elektrona koji je napravljen od plastokinina (Pq), kompleksa citohroma i proteina plastocijanina (Pc). Svaka komponenta oslobađa energiju koja pumpa protone vodonika u tilakoidni prostor.
5. Potencijalna energija gradijenta protona se koristi za nastajanje ATP-a u procesu hemioze.

6. U međuvremenu, svetlosna energija je usmerena prema kompleksu pigmenata reakcionog centra PSI , pobuđujući elektron iz elektronskog para hlorofila-a P700. Elektron putuje do primarnog akceptora elektrona kreirajući šupljinu, P700+. Sada je P700+ akceptor elektrona iz transportnog lanca PSII.
7. Pobuđeni elektroni prolaze nekoliko redoks procesa od primarnog akceptora PSI formirajući drugi transportni lanac elektrona putem proteina feredoksina (Fd).
8. Enzim NADP⁺ redukuje transfer elektrona iz Fd do NADP⁺, za šta su potrebna 2 elektrona do redukcije NADPH. Elektroni iz NADPH su na većem energetskom nivou nego što su bili u molekulu vode, odakle i potiču, pa su dostupniji reakcijama Kalvinovog ciklusa. Ovaj proces takođe uklanja jedan jon H⁺ iz strome.



Slika 3.10. Reakcije između fotosistema I i fotosistema II [36]



Slika 3.11. Ilustracija reakcija između PSII i PSI [36]

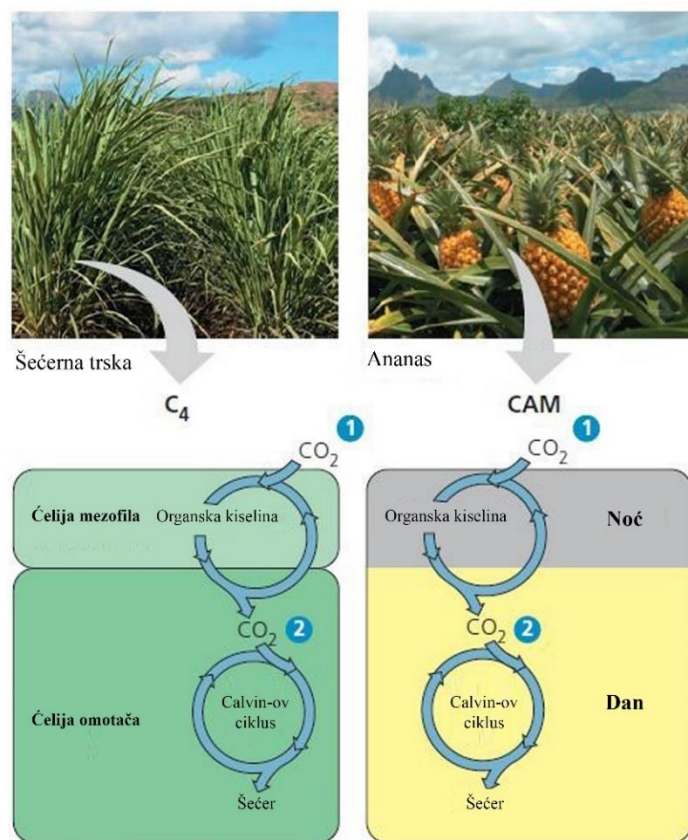
3.7. Tipovi metabolizma kod biljaka

Postoje tri grupe biljaka koje se međusobno razlikuju u pogledu apsorpcije i redukcije ugljendioksida i označavaju se kao C3, C4 i CAM biljke.

C3 metabolizam se smatra osnovnim, dok je C4 i CAM metabolizam (Slika 3.12.) rezultat adaptacije biljaka na različitu dostupnost vode, temperature i svetlosti u okruženju, odnosno na klimatsko područje koje nastanjuju. C3 tip metabolizma je zastupljen u oko 90 % današnjih biljnih vrsta, npr. pšenica, pirinač, krompir, šljiva, šargarepa, kupus, hrast itd. Ova grupa biljaka pretvara atmosferski CO₂ u jedinjenja sa 3-ugljenika koje smešta u sve ćelije mezofila lista (meko tkivo unutar lista). Iako najzastupljeniji, C3 tip fotosinteze je neefikasan. U uslovima vodnog deficita i visokih temperatura (35°C) kod C3 biljaka se pojačava proces fotorespiracije. Ona se ogleda u tome da ključni enzim u procesu fiksacije CO₂ može, umesto ugljen-dioksida, da veže kiseonik. Intenziviranje procesa fotorespiracije smanjuje produktivnost biljaka, jer se u ovom procesu oslobađa velika količina fiksiranog CO₂. Često mogu da nastanu i štetni molekuli poznati kao radikali.

Kod C3 biljaka fotorespiracijom se oslobađa oko 25 % ukupne količine fiksiranog CO₂, sa tendencijom povećanja u uslovima stresa, visokih temperatura i suše. Posledično dolazi do smanjenja produktivnosti biljaka.

C4 tip metabolizma zastupljen je kod raznih trava, većinom iz sušnijih krajeva. Najpoznatiji predstavnici su kukuruz i šećerna trska. Ova grupa biljaka pretvara atmosferski CO₂ u jedinjenja sa 4-ugljenika. Kod njih je interesantno da se fiksacija ugljen-dioksida i redukcija obavljaju na različitim mestima. Kod C4 biljaka proces fotorespiracije je sveden na minimum i one mogu biti visoko produktivne u uslovima visokih temperatura i intenziteta svetlosti.



Slika 3.12. Poređenje fotosinteze kod C4 i CAM biljaka [36]

CAM tip metabolizma zastupljen je skoro isključivo kod biljaka sušnih krajeva. Najpoznatiji predstavnik je ananas, a i mnoge pustinjske vrste kaktusa i mlečika. Ova vrsta metabolizma najbolje ekonomiče raspoloživom vodom. Usvajanje ugljen-dioksida i njegova redukcija su, za razliku od C4 biljaka, vremenski odvojene. Obzirom da ove biljke žive na staništima koja su veoma suva, a dnevne temperature visoke, one su se tokom evolucije adaptirale na takve uslove prilagodivši svoju građu, a i metabolizam. Preko dana, kada su visoke temperature, zatvaraju stome i na taj način smanjuju transpiraciju, a noću ih otvaraju, čime se omogućava razmena gasova tj. usvajanje ugljen-dioksida [36].

Zanimljivo je da ananas, u zavisnosti od uslova staništa, može da menja tip metabolizma. Presudan faktor da li će biljka uključiti C3 ili C4 metabolizam zavisi upravo od količine dostupne vode u podlozi.

IV IZVORI I DETEKTORI EM ZRAČENJA KORIŠĆENI U EKSPERIMENTALNOJ POSTAVCI

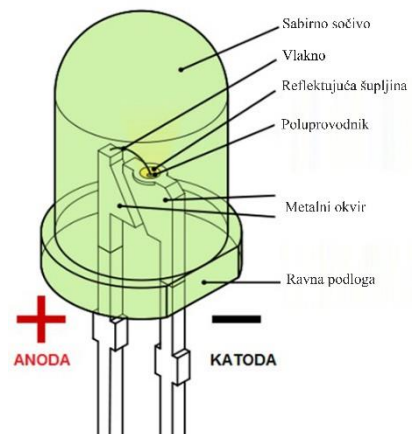
Poluprovodnički materijali su veoma popularna oblast istraživanja kada se govori o modernim tehnologijama. Rad optoelektronskih komponenti, kao i celokupne poluprovodničke tehnike, zasniva se na generaciono-rekombinacionim procesima [47]. Do oslobađanja energije u poluprovodnicima dolazi kroz proces rekombinacije sa šupljinama, odnosno do apsorpcije energije dolazi kroz proces generacije elektrona i šupljina. Dakle, u osnovi rada ovih materijala je upravo interakcija elektrona i fotona, o kojoj je bilo reč u prvom poglavlju.

Mehanizmi apsorpcije, spontane i stimulisane emisije predstavljaju osnovu rada fotodetektora, svetlosno emitujućih dioda (*LED – Light Emitting Diodes*) i lasera (*LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*).

4. 1. LED diode

LED dioda (light emitting diode) je izvor svetlosnog zračenja poluprovodničkog porekla. Najčešće se koriste se kao lampice indikatori u većini elektronskih uređaja, ali u skorije vreme, nalaze primenu i kao izvori osvetljenja. Iako je prva LED dioda predstavljena kao praktična elektronska komponenta 1962. godine, Nobelova nagrade za otkriće plave led diode dodeljena je japanskim naučnicima tek 2015-e godine [47]. Prve led diode koje su se pojavile zračile su crvenu boju slabog intenziteta, a novije verzije su već dostupne u širokom spektru talasnih dužina (od opsega vidljive svetlosti preko ultraljubičastih, infracrvenih, praćene velikom snagom osvetljenja).

LED diode pokazuju veliku prednost u odnosu na druge izvore svetlosti, a ono što ih izdvaja je manja potrošnja energije, velika energetska efikasnost, manje dimenzije, duži radni vek, velika fizička izdržljivost, kao i kraće vreme uključivanja odnosno isključivanja [46].



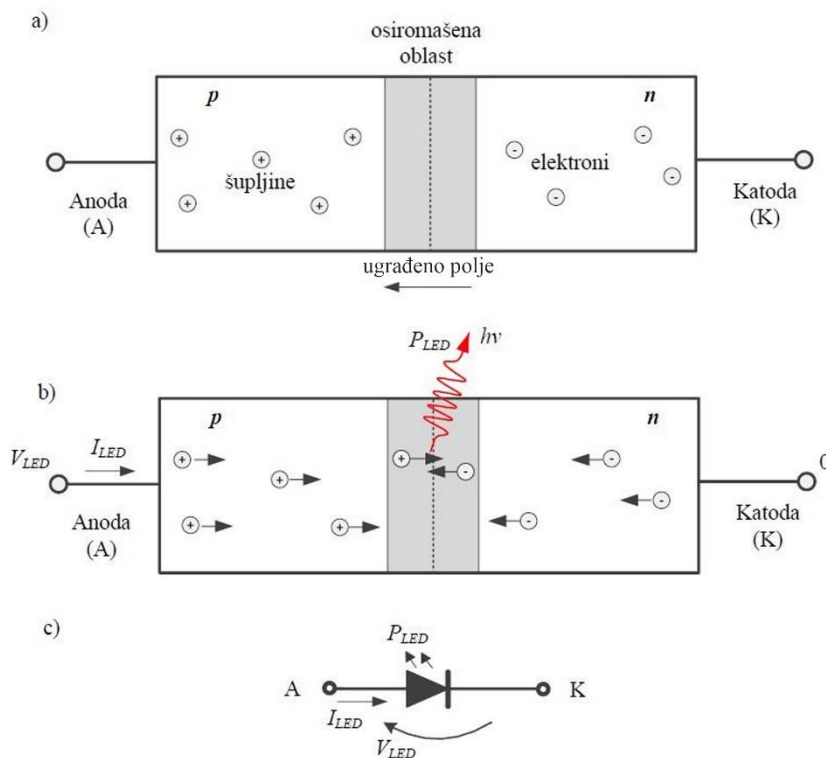
Slika 4.1 Komponente LED diode

4.1.1. Emisija fotona u p-n spoju LED dioda

Optički izvor zračenja je neophodan deo svakog optičkog sistema. U optičkim sistemima signali se prenose putem fotona. Postoje različiti oblici optičkih izvora zračenja, ali poluprovodnički optički izvori su najzastupljeniji u optičkim sistemima zahvaljujući pouzdanosti u radu, malim dimenzijama i najvažnije karakteristike, njihov optički izlaz može da bude brzo modulisan injektovanom električnom strujom. Upravo ova metoda se često naziva i direktna modulacija. Rad poluprovodničkih lasera i LED dioda se zasniva na direktno polarisanom p-n spoju a izlazna optička snaga je proporcionalna injektovanoj električnoj struji. Na slici 4.1. su prikazane komponente LED diode [48].

U poluprovodniku n tipa postoji višak negativnih nosilaca naelektrisanja- elektrona, dok unutar samostalnog poluprovodnika p tipa višak pozitivnih nosilaca naelektrisanja- šupljina. U trenutku spajanja poluprovodnika p i n tipa, zbog različite koncentracije elektrona i šupljina na p i n strani,

doći će do pojave difuzije¹² nosilaca naelektrisanja. Slobodni elektroni se prenose difuzijom iz n u p poluprovodnik. Usled odlaska elektrona, formira se pozitivno naelektrisan sloj na poluprovodniku n-tipa. Analogno, negativno naelektrisan sloj se formira na poluprovodnika p-tipa zbog gubitaka šupljina. Zbog ove preraspodele naelektrisanja dolazi do uspostavljanja ugrađenog polja i potencijalne barijera na p-n spoju, koja povlači slobodne elektrone (koji su prethodno difuzijom prešli u p tip) nazad u n tip, a šupljine u p tip. Ovaj proces se čese zove drift nosilaca naelektrisanja. Zbog ugrađenog električnog polja, ni slobodni elektroni, ni šupljine ne mogu da se nalaze u oblasti oko spoja i upravo zbog te karakteristike se taj region dobija naziv oblast osiromašenja ili oblast „prostornog tovara” (Slika 4.2.a)). Sve dok nema spoljašnje polarizacije, nema ni prenosa nosilaca naelektrisanja kroz p-n spoj zbog balansa difuzije i drifta nosilaca [49].



Slika 4.2. a) p-n spoj u odsustvu spoljašnje polarizacije, b) direktno polarisan p-n spoj i emisiona rekombinacija i c) električni simbol LED diode [49].

Kada se p-n spoj direktno polariše, kao što je prikazano na Slici 4.2.b), višak elektrona i šupljina se injektuje u n ili p stranu. Pojava injekcije smanjuje potencijalnu barijeru i dovodi do difuzije viška elektrona i šupljina kroz spoj. U toku procesa višak elektrona i šupljina rekombinuje se u oblasti osiromašenja i dolazi do generisanja fotona. Ovaj proces je poznat kao emisiona ili radijativna rekombinacija u kojoj važe zakoni održanja energije i impulsa. Osim emisione rekombinacije postoji i neemisiona rekombinacija koja ne proizvodi fotone. Razne vrste nečistoća i odstupanja od idealne strukture poluprovodnika mogu da dovedu do stvaranja energetskih nivoa unutar energetskog procepa poluprovodnika koji predstavljaju neki vid energetske „zamke”. Tada najčešće dolazi do apsorpcije

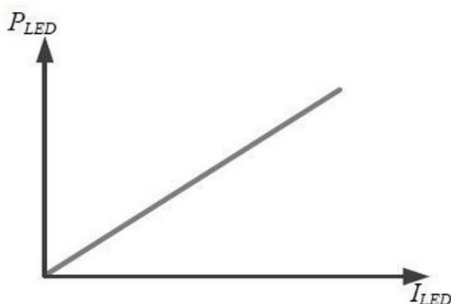
¹² Difuzija predstavlja kretanje čestica od mesta veće ka mestu manje koncentracije.

energije oslobođene u procesu rekombinacije. U tom slučaju dolazi do razmene energije u vidu vibracije kristalne rešetke (ili fonona koji razmenjuju toplotnu energiju sa materijalom) [49].

Na osnovu oblika energetskog procepa, poluprovodnički materijali se dele na dve grupe: sa direktnim i indirektnim energetskim procepom. Kada je reč o direktnim poluprovodnicima, šupljine na vrhu valentne zone imaju isti impuls kao elektroni na dnu provodne zone. U ovom slučaju, elektroni se direktno rekombinuju sa šupljinama i emituju fotone, a energija fotona je jednaka energiji energetskog procepa. Alternativno, kod indirektnih poluprovodnika šupljine u vrhu valentne zone i elektroni na dnu provodne zone imaju različit impuls. Bilo koja rekombinacija između elektrona u provodnoj zoni i šupljina u valentnoj zoni zahtevala bi promenu impulsa. Kako foton može imati značajnu energiju $h\nu$, njegov impuls $h\nu/c$ će biti mnogo manji i neće moći da kompezuje razliku impulsa između elektrona i šupljina. Upravo iz ovog razloga emisiona rekombinacija nije moguća kod materijala sa indirektnim energetskim procepom bez prisustva treće čestice (na primer fonona kreiranog vibracijom kristalne rešetke) koja bi obezbedila potreban impuls [49].

Rad LED dioda (Light Emitting Diodes) zasniva se na spontanoj emisiji direktno polarisanog p-n spoja. Na slici 4.2.c) prikazan je simbol LED diode.

Emitovana optička snaga LED diode proporcionalna je injektovanoj električnoj struji (Slika 4.3.) [49, 50]. Rekombinacija svakog para elektrona i šupljina proizvodi foton (u idealnom slučaju).



Slika 4.3. Emitovana snaga svetleće diode u zavisnosti od injektovane struji [49]

Kada je LED dioda priključena u električno kolo (direktno polarisana), elektroni se rekombinuju sa šupljinama i tako oslobađaju energiju u vidu fotona. Ovaj efekat je poznat kao elektroluminiscencija. Boja dobijene svetlosti (za odgovarajuću energiju fotona) određena je energijom energetskog procepa poluprovodnika.

Stvaranjem novih materijala, omogućena je konstrukcija LED dioda koje proizvode svetlost različitih boja. To su izvori svetla izgrađeni od p-n čipa prekrivenog emisionim slojem od legura metala III-a i V-a grupe periodnog sistema elemenata (PSI): Al, Ga, As, P, N i In.

Zračenje koje emituje većina LED dioda ne napušta poluprovodnik jer se nalazi u frekventnom opsegu infracrvenog zračenja. Međutim, adekvatnim izborom odgovarajućeg materijala i geometrije svetlost postaje vidljiva. U zavisnosti od materijala poluprovodnika može da se dobije različit spektar svetlosti tj. talasna dužina fotona (od ultraljubičastog do infracrvenog). Materijal koji se koristi za ovu vrstu LED dioda je uglavnom galijum-arsenid GaAs. Napon potencijalne barijere dioda određuje boju svetlosti koju će da emituje LED dioda. Napon diode zavisi od talasne dužine fotona i nalazi se u opsegu od 1.2 V za crvenu boju, do 2.4 V za ljubičastu [46].

4.1.2. Kvantna efikasnost dioda

Jedan od faktora koji utiče na nagib prave $P_{LED}(I_{LED})$ smanjujući njen koeficijent pravca je unutrašnja kvantna efikasnost η_e . Naime, ako sa R_r i R_{nr} označimo koeficijente emisije i neemisije rekombinacije, respektivno, tada je unutrašnja kvantna efikasnost η_e ili odnos broja generisanih fotona i ubačenih nosilaca naelektrisanja dat kao:

$$\eta_e = \frac{R_r}{R_r + R_{nr}} \quad (4.1)$$

i doprinosi smanjenju nagiba prave $P_{LED}(I_{LED})$ na slici 4.3.

Drugi faktor koji smanjuje koeficijent pravca prave $P_{LED}(I_{LED})$ je zadržavanje jednog dela fotona u uređaju. Razni drugi efekti doprinose smanjenju efikasnosti: gubici unutar materijala, refleksija i ugao emisije.

Spoljašnja efikasnost η_e se računa iz odnosa:

$$\eta_e = \frac{R_{emit}}{R_r} \quad (4.2)$$

gde je R_{emit} je broj generisanih fotona koji zapravo napuste LED diodu, a R_r koeficijent emisije rekombinacije.

Kada se uzmu u obzir unutrašnja i spoljašnja kvantnu efikasnost, emitovana optička snaga P_{LED} LED diode za jačinu struje I_{LED} biće:

$$P_{LED} = \eta_i \eta_e \frac{h \cdot c}{\lambda \cdot q} I_{LED} \quad (4.3)$$

gde su: η_{tot} ukupna kvantna efikasnost LED diode, q naelektrisanje elektrona ($1.6 \cdot 10^{-19}$ C), h Plankova konstanta ($6.62 \cdot 10^{-34}$ J·s), c brzina svetlosti ($3 \cdot 10^8$ m/s u vakuumu) i λ talasna dužina [49].

Unutrašnja kvantna efikasnost LED diode je oko 70 %, dok je spoljašnja efikasnost obično manja od 5%. Koeficijent praga prave $P_{LED}(I_{LED})$ je oko 12 μ W/mA, za $\eta_q=75$ %, $\eta_{ext}=2$ % i talasnu dužinu od $\lambda=1550$ nm.

4.1.3. Prednost LED didoda

LED diode emituju mnogo više svetlosti nego obične svetiljke sa užarenim vlaknom, a moguća je korekcija jačine svetlosti podešavanjem jačine struje. Na efikasnost ne utiče oblik i veličina, kao što je to slučaj kod većine fluorescentnih svetiljki. Moguće je da emituju određenu boju bez korišćenja filtera koji su se inače koristili pri tradicionalnim metodama osvetljavanja. Zbog svoje veličine idealne su za montažu na štampane pločice, a najčešće se koriste kao LED indikatorske lampice upravo zbog kratkog vremena odziva. Standardna crvena LED indikatorska lampica dobija svoj puni sjaj za manje od μ s. Pokazale su se jako efikasne kada se koriste u sastavu uređaja koji se često pale i gase, što im daje prednost u odnosu na fluorescentne lampe koje se brzo kvare nakon kratkih ciklusa između gašenja i paljenja. LED zrači veoma malu količinu toplote u obliku IR, za razliku od drugih izvora svetlosti, koja bi mogla da prouzrokuje oštećenja na tkaninama ili osetljivim predmetima, a višak energije se otklanja kroz bazu diode. U poređenju sa fluorescentnim osvetljenjem, imaju od 10 do 15 puta duži vek trajanja, čak preko 50 000 sati. Zbog čvrste strukture, teško ih je oštetiti za razliku od drugih vrsta sijalica koje su lako lomljive [51].

4.1.4. Nedostaci LED dioda

Karakteristike LED dioda zavise od nekoliko faktora, ali one pokazuju najveću osetljivost u odnosu na promenu temperature. Visoka temperatura sredine može da dovede do pregrevanja i brzog otkazivanja rada LED diode. Upravo zbog ove karakteristike, neophodno je adekvatno hlađenje kako bi se omogućilo njihovo precizno funkcionisanje. Zbog izražene naponske osetljivosti, jako je važno da im se dovede struja i napon sa tačno određenim karakteristikama, a upotrebom odgovarajućih otpornika. Za razliku od svetiljki sa užarenim vlaknom, postoji opasnost od oštećenja ljudskog vida, ukoliko dođe do prevelike izloženosti plavim i hladno belim diodama („Plava opasnost”). Do trajnog pada efikasnosti dioda može da dođe od samo jednog povećanja struje, što dovodi do tamnjenja LED dioda. Promene radnih karakteristika praćene visokim vrednostima struje i temperature mogu da izazovu pojavu difuzije atoma nekih metala (indijum i srebro) iz elektroda u ostale aktivne delove LED diode. Kao posledica ove pojave, javljaju se električni proboji na katodi. Za preventivu ovih efekata najčešće se koriste katodne paste galijum-nitrida i indijum-galijum-nitrida. Mehanizam degradacije aktivnih delova katoda u LED diodama izaziva i povećanje dislokacija na graničnoj površini p-n spoja, kao i u katodnim prevlakama difuzijom tačkastih dislokacija. Budući da su galijum i arsenidi, kao i selen i indijum veoma toksični, ovaj nedostatak bi mogao da se zaobiđe korišćenjem nemetalnih jedinjenja tipa supstituisanih aromatičnih ugljovodonika i tionitrida, međutim ove supstance pokazuju još izraženiju temperaturnu karakteristiku uz mogućnost eksplozije nemetalnih nitrida [51].

4. 2. Fotodiode

Fotodiode poznate kao fotodetektori, fotosenzori ili svetlosni detektori su posebna vrsta senzora koji konvertuje svetlosnu energiju u električnu. Princip rada fotodioda zasniva se na unutrašnjem fotoefektu na poluprovodnicima pod uticajem svetlosti. Budući da je fotodioda tip poluprovodnika sa pn spojem, površina fotodiode prihvata svetlosnu energiju kao ulaz za generisanje električne struje.

Karakteristike fotodiode se obično definišu kao :

- a) kvantna efikasnost,
- b) spektralna osetljivost,
- c) brzina rada,
- d) struja mraka.

Fotodioda ima optičke filtere ugrađene u sočivo na površini diode. Vreme odziva ovih elemenata je inverzno povezano sa aktivnom površinom fotodiode [50].

Osetljivost fotodioda se računa iz odnosa gustine fotostruje i intenziteta upadnog zračenja. Korišćenjem specijalnog anti-refleksionog sloja osetljivost može da se poveća i do 25 % u nekoj oblasti spektra.

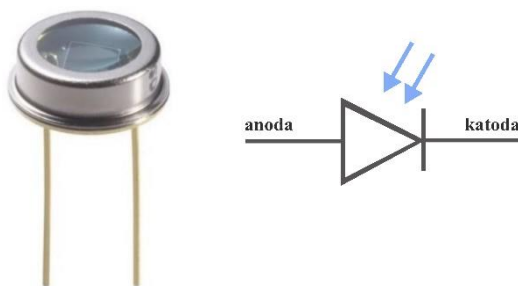
Prosečna kvantna efikasnost fotodioda je oko 80 %, a uz promenu temperature može da varira za oko 1 %.

Brzina odgovora (risetime) fotodioda zavisi od inverznog napona i za zračenje talasne dužine. Na primer, na 1064 nm je od 15 do 20 ns, dok je za zračenje ispod 900 nm brzina odgovora ispod 2 ns.

Fotodiode se najčešće izrađuju od Silicijuma (Si), koji je osetljiv u oblasti od 0.2 μm do 1.1 μm , Germanijuma (Ge) (0.4 - 1.8) μm , Indijum arsenida (InAs) (1.0 - 3.8) μm , Indijum antimonid InSb (1.0 - 7.0) μm , Živa kadmijum telurida (HgCdTe) uz dodatno hlađenje na 77 K (1.0 - 25.0) μm [46].

Fotodiode od silicijuma se prave od monokristala silicijuma, pri čemu se zahteva velika čistoća kristala. Sastoje se od poluprovodnika p i n tipa. Osnovu čini n-tip poluprovodnika- silicijum, dok se tanak p-tip stvara na površini dopiranjem borom (B). Od debljine dopiranog sloja zavisi i spektralni odgovor fotodiode. Na istoj strani se nalazi mala metalna elektroda (anoda), a na suprotnu stranu se nanosi metalni premaz (katoda). Kada se pravi niz fotodiode, anode se međusobno odvajaju izolatorom kao što su silicijum nitrat (SiN), silicijum oksid (SiO_2) [48].

Svaka dioda sastoji se iz dva segmenta, kraći koji uzima ulogu katode i duži koji izgleda kao anoda. Simbol za fotodiodu je sličan kao za LED samo što strelice usmerene prema unutra (Slika 4.4) [48].



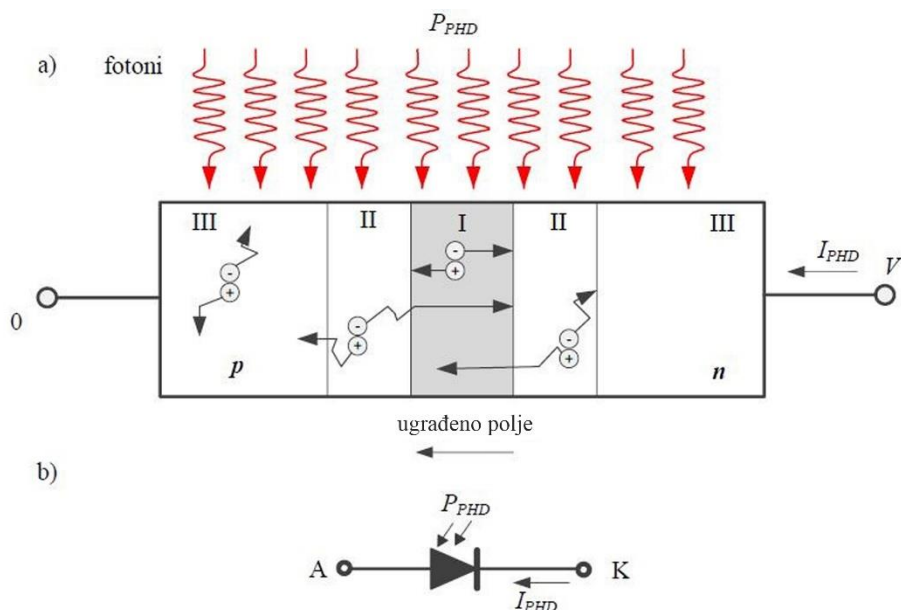
Slika 4.4. Fotodioda (levo) sa odgovarajućim simbolom (desno)

4. 2. 1. Apsorpcija svetlosti u p-n spoju fotodiode

Najrasprostranjeniji tip fotodetektora su poluprovodnički fotodetektori. Fotodioda koja sadrži samo p-n spoj predstavlja najjednostavniji tip poluprovodničkih fotodetektora. Fotoni koji padnu na fotodiodu formiraju parove elektrona i šupljina koji se skupljaju oko p-n spoja. Koncentracija parova elektron/šupljina zavisi od intenziteta upadne svetlosti. Intenzitet apsorpcije fotona i energija fotona su direktno proporcionalne veličine. Kada je energija fotona manja, apsorpcija će da bude manja i obrnuto. Ovaj proces je poznat kao unutrašnji fotoelektrični efekat. Na fotodiodu se dovodi odgovarajući napon i koncentracija nastalih nosioca se određuje merenjem struje koja protiče kroz p-n spoj (fotoprovodnost). Na Slici 4.5. prikazan je inverzno polarisan p-n spoj. Prilikom apsorpcije fotona u p-n spoju generiše se par elektron-šupljina (fotogenerisani nosioci naelektrisanja), ali samo na mestu gde postoji električno polje može da dođe do transporta nosilaca naelektrisanja u određenom smeru. Budući da p-n spoj podržava električno polje samo u osiromašenoj oblasti (oblast I na slici 4.5.) upravo je ta oblast pogodna za apsorpciju upadnog zračenja. Elektroni i šupljine generisani u osiromašenoj oblasti brzo driftnu u suprotnim smerovima pod uticajem jakog električnog. Kako je smer električnog polje od n ka p strani, fotogenerisana struja je uvek inverzna (od n ka p). Nosioci naelektrisanja koji su generisani daleko od osiromašene oblasti (oblast III na slici 4.5.) ne mogu da se transportuju zbog odsustva električnog polja i lutaju nasumično sve dok ne dođe do rekombinacije, tako da nemaju doprinose fotostruji. Elektroni i šupljine generisani u blizini osiromašene oblasti mogu da uđu u osiromašenu oblast putem nasumične difuzije i na taj način mogu doprineti fotostruji. Ne treba zanemariti činjenicu da je proces difuzije nosilaca generisanih u oblasti II daleko sporiji od

procesa drifta u osiromašenoj oblasti pa se u cilju bržeg odziva fotodiode ali i veće osetljivosti fotodiode, nastoji svesti na minimum detekcija zračenja izvan osiromašene oblasti [49].

Slika 4.5. Fotogenerisani nosioci naelektrisanja u inverzno polarisanom p-n spoju [49].



Kako bi fotodioda radila u režimu fotoprovodnosti, na fotodiodu se dovodi inverzni napon. Inverzna fotostruja je linearna funkcija intenziteta upadne svetlosti. Red veličine inverzna struje je reda μA - mA .

Za normalan rad fotodiode, neophodno je da korišćeni inverzni napon bude manji od kritičnog kako ne bi došlo do proboja i uništenja fotodiode.

4.2.2. Kvantna efikasnost fotodiode

Kvantna efikasnost η predstavlja broj parova elektron-šupljina odnosno fotonosilaca, koje generiše jedan foton upadnog zračenja, a to je zapravo verovatnoća da jedan upadni foton generiše par nosilaca. Ukoliko upadno zračenje pada na p stranu spoja (to je najčešći slučaj kod fotodiode izrađene u planarnoj tehnologiji) deo upadne svetlosti se reflektuje od površine poluprovodnika (p tipa), a preostali deo prodire u materijal u kome može da bude apsorbovan ili propušten do oblasti osiromašenja i n tipa poluprovodnika. Kvantna efikasnost fotodiode u potpunosti je određena količinom upadnog zračenja apsorbovanog u oblasti osiromašenja. Da bi se dobila što veća kvantna efikasnost fotodiode, potrebno je smanjiti refleksiju i apsorpciju u materijalu pre oblasti osiromašenja, a sa druge strane povećati apsorpciju u oblasti osiromašenja [51].

Stuja fotodiode (I_{PHD}) generisana usled upadnog zračenja snage (P_{PHD}) računa se preko:

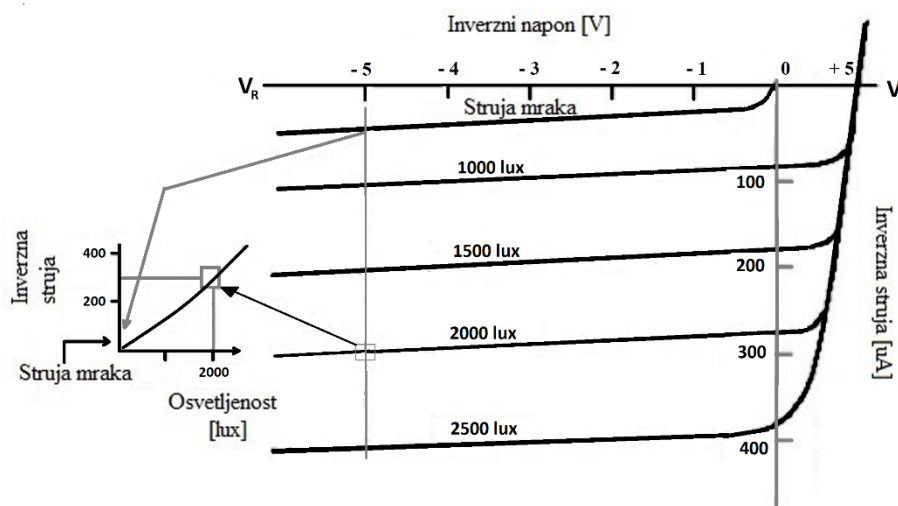
$$P_{PHD} = \eta_i \eta_e \frac{h \cdot c}{\lambda \cdot q} I_{PHD} \quad (4.4)$$

Kada je reč fotodiodama koje rade u inverznom režimu, inverzna struja linearno zavisi od intenziteta upadne svetlosti.

Inverzni naponi su iscrtani duž V ose u voltima, a inverzna struja duž I ose u mikroamperima (slika 4.6). Kada nema osvetljenja, inverzna struja ima vrednost 0. Minimalna vrednost struje nastale u ovom procesu zove se struja mraka. U momentu kada se osvetljenje svetlosti poveća, inverzna struja raste linearno.

$$i_p = r_\phi \cdot \phi_e \quad (4.5)$$

Za određenu talasnu dužinu ϕ_e je fluks zračenja, r_ϕ je osetljivost fotodiode (diode flux responsivity) a i_p je struja fotodiode.



Slika 4.6. Zavisnost odvetljenja fotodiode od inverznog napona [50]

4. 2. 3. Primene fotodiode

Fotodiode se koriste u raznim jednostavnim svakodnevnim aplikacijama. Razlog za njihovu upotrebu je upravo jednostavni linearni odgovor na svetlosno osvetljenje. Ukoliko veća količina svetlosti padne na senzor, on proizvodi veliku količinu struje.

Fotodiode su elementi koji pomažu da se obezbedi električna izolacija uz pomoć optokaplera (izolacionih pojačavača sa optičkom spregom). U slučaju da su dva izolovana kola osvetljena svetlošću, optokapleri se koriste za optičko povezivanje kola. Pri poređenju sa konvencionalnim uređajima, optokapleri su se pokazali kao mnogo brži prenosioci signala.

Fotodiode su našle primenu u sigurnosnoj elektronici za detektore požara i dima.

Kada su sastavni elementi u kamerama, deluju kao foto senzori. Takođe se koriste u scintilatorskim uređajima sa spregnutim naelektrisanjem, fotokondukterima i fotomultiplikatorima.

Fotodiode imaju primenu u brojnim medicinskim instrumentima kao što su detektori za kompjutersku tomografiju, instrumenti za analizu uzoraka, itd. [46].

4.3. LED paneli za osvetljavanje biljaka

Preporučuje se da LED paneli za gajenje biljaka sadrže optimalan odnos LED dioda različitih talasnih dužina koje odgovaraju krivoj maksimuma apsorpcije svetlosti, opisanom u prethodnom poglavlju. Zbog jednog od glavnih nedostataka LED dioda (temperaturne zavisnosti), montaža LED panela je praćena odgovarajućim sistemom za hlađenje, odnosno ventilatorima za odvođenje viška toplote nastale usled grejanja panela. Da bi se odredili adekvatni parametri za rast biljaka u određenom periodu, potrebno je izmeriti neke od karakterističnih veličina LED panela.

4.3.1. Karakteristične veličine LED panela

PAR (Photosynthetically Active Radiation) je fotosintetički aktivno zračenje. PAR definiše tip izvora svetlosnog zračenja koji može podržati fotosintezu biljaka. To je veličina koja predstavlja osnovni parametar značajan za proizvodnju biomase koja direktno utiče na rast, razvoj, prinos i kvalitet biljaka. Opseg talasnih dužina izvora svetlosnog zračenja za stimulisanje zelenog rasta mora da bude širi od fotosintetički aktivnog opsega talasnih dužina zračenja i najčešće je u opsegu od 300 do 800 nm.

PPF (Photosynthetic Photon Flux) predstavlja broj emitovanih fotona u sekundi, drugim rečima, ovaj parametar daje informaciju koliko fotosintetički aktivnog zračenja emituje iz izvora svetlosti. PPF se izražava u mikromolima u sekundi ($\mu\text{mol/s}$).

PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) predstavlja broj fotosintetički aktivnih fotona izračenih po jedinici površine svake sekunde. PPFD se meri na području od jednog metra kvadratnog u sekundi ($\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$).

4.4. Ostali izvori svetlosti (koji nisu korišćeni u eksperimentalnoj postavci)

4.4.1. Sijalica sa užarenim vlaknom (žarulja)

Klasična električna sijalica (žarulja) predstavlja veštački izvor svetlosti, koja nastaje kada električna struja, prolazeći kroz tanku volframsku nit, zagreje nit do usijanja usled čega dolazi do emitovanja svetlosti. Danas izum ove klasične sijalice pripisuju naučniku Thomas-u Edison-u, međutim, ideja se javila još mnogo ranije, ali je samo Edison uspeo da napravi jači vakuum u balonu i time povećao otpornost sijalice. Princip rada klasične sijalice se zadržao i do danas, jer su jednostavne konstrukcije i mogu da rade kako sa jednosmernim, tako i sa naizmeničnim izvorima struje. Električna energija koja protiče kroz volframovu nit emituje kontinualni spektar svetlosti u svim pravcima. Za različite voltaže, daje različitu efikasnost¹³, ali se uobičajeno smatra da se više od 90 % električne energije potroši na toplotno zračenje, dok se u svetlost pretvara nešto manje od 10 % [52].

Užarena nit emituje svetlo približno stalnog spektra (Slika 4.7.) Kao što se vidi na grafiku, žarulja nema dovoljan opseg talasnih dužina potreban za stimulisanje fotosinteze. Postoji dominantan

¹³ Žarulja od 100W, koja zrači fluks od oko 1700 lumena, dnevno u proseku može da potroši 1 kWh struje.

priraštaj intenziteta iz crvenog dela spektra zračenja, dok je obast plavog dela spektra gotovo potpuno izostavljena [52].

4.4.2. Fluosijalice

Kompaktne neintegrisane fluorescentne sijalice su štedljive sijalice koje otklanjaju nedostatke sijalica sa užarenim vlaknom. Pri prolasku električne energije kroz gas u cevi, počinje da se emituje UV zračenje. Ono pobuđuje tri sloja fosfora (P) kojima su cevi iznutra premazane tako da dolazi do emisije svetlosti, ali u nešto izmenjenom delu spektra u odnosi na klasičnu sijalicu. Iako se na prvi pogled čini da je svetlost ovih izvora svetlosti manjeg intenziteta, ima isti broj lumena, samo što je prostorija osvetljena drugom, prirodnijom bojom, koja je slična dnevnom svetlu.

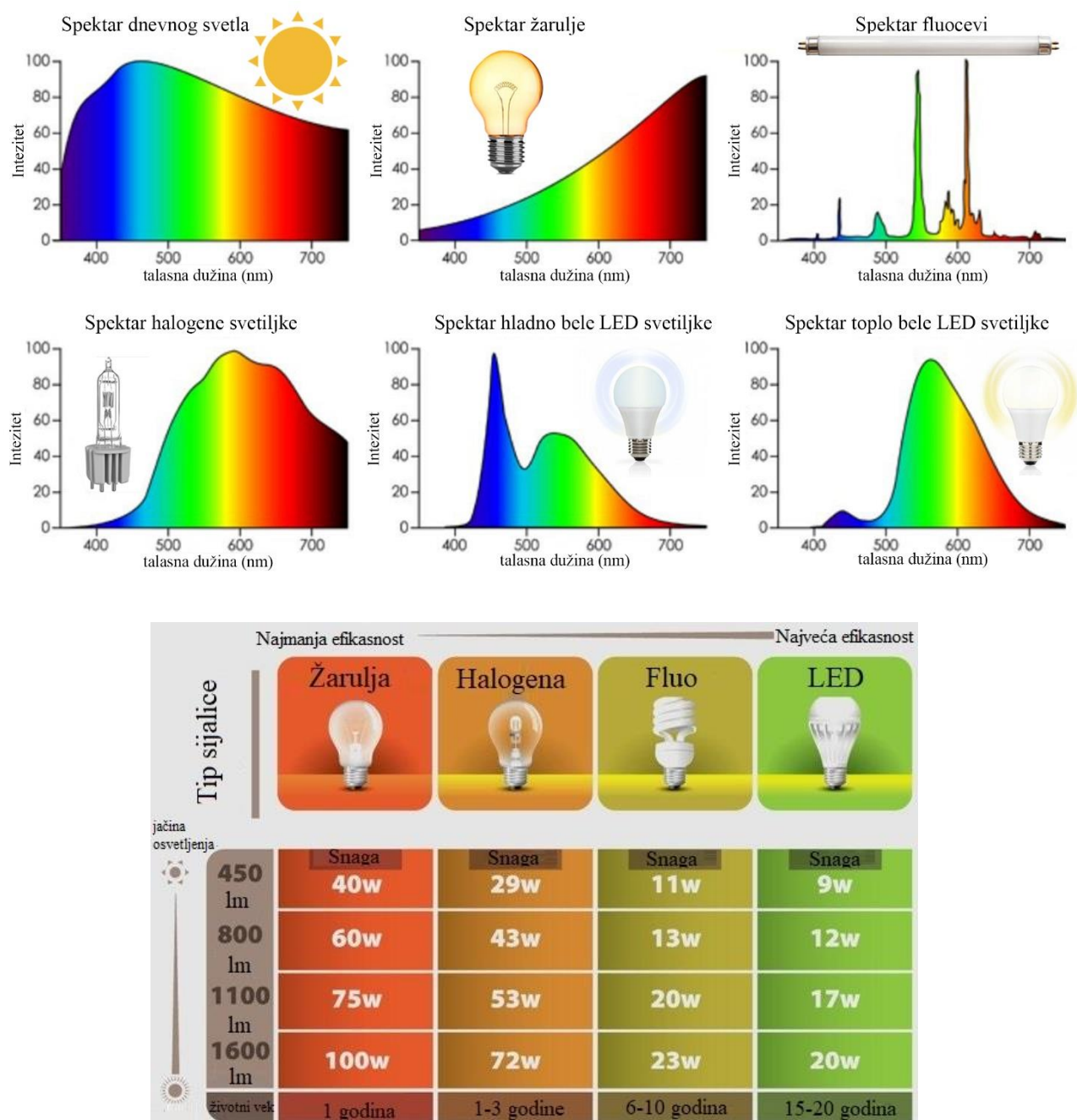
Kompaktne fluo lampe (CFL) su evolutivni naslednici fluorescentnih cevni sijalica. Za ove izvore osvetljenja je karakteristično gasno pražnjenje u kojima se nevidljivi UV zraci proizvedeni u sudaru atoma žive i elektrona sa elektrode u sijalici pretvara u vidljivo zračenje pomoću fosfora koji emituje svetlost [52].

Česta paljenja i gašenja kompaktnih fluo rasvetnih tela značajno skraćuju njihov radni vek. Spektar zračenja ovih sijalica prikazan je na Slici 4.7. Sa grafika se vidi da su maksimumi emisije bliski aorpcionom spektru hlorofila a i b, ali po vrednostima nisu u potpunosti odgovarajući izvori svetlosti za adekvatno gajenje biljaka.

4.4.3. Halogene sijalice

Za razliku od žarulje, volfram koji isparava sa užarene niti se kombinuje sa halogenim gasom (Kriptonom (Kr) ili Ksenonom (Xe)) unutar staklenog balona (najčeće napravljenog od topljenog kvarca) i tako se stvara volfram- halogen molekul. Zatim taj molekul posle nekog vremena migrira nazad, tako „reciklir” nit i na taj način eliminiše pocrnjenje staklenog omotača. Na spektru prikazanom na slici 4.7. se vidi da opseg talasnih dužina dobro pokriva oblast crvenog dela apsorpcije zračenja fotosintetičkih pigmenata, ali to nije slučaj sa plavim delom spektra [52].

Upravo zbog prilagođenih spektralnih karakteristika LED panela, odlučeno je da se za izvore EM zračenja u eksperimentu koriste prilagođeni LED paneli.

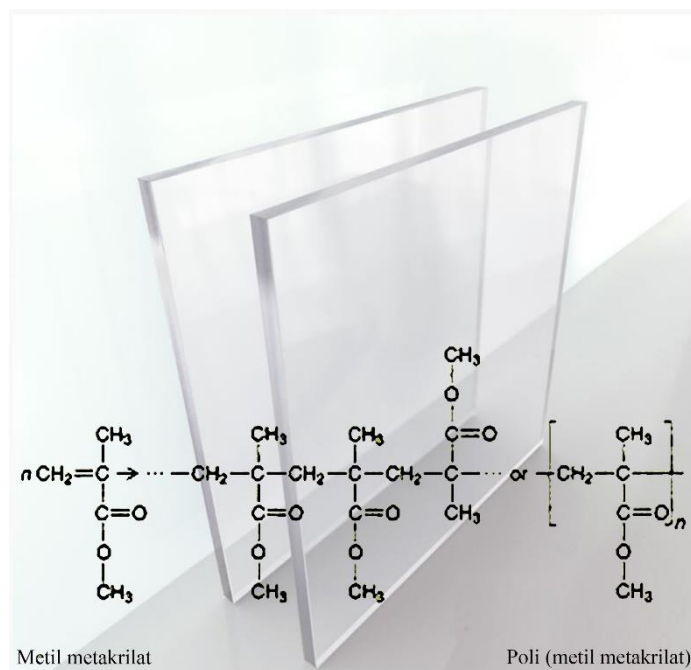


Slika 4.7. Spektri različitih izvora EM zračenja, energetska efikasnost, snaga i životni vek različitih sijalica

V SEGMENTI SISTEMA ZA MERENJE

5.1. Polimetil metakrilat

Poznatiji kao pleksiglas, predstavlja transparentni polimerni materijal, hemijske strukture prikazane na slici 5.1. Ono što je osnovna odlika ovog materijala je velika otpornost na habanje i velike promene temperature [53]. Transparentnost materijala u vidljivom spektru EM zračenja je potvrđena u celom opsegu preko UV-VIS spektrofotometra a zbog te karakteristike je korišćen u svrhu konstrukcije držača lista.



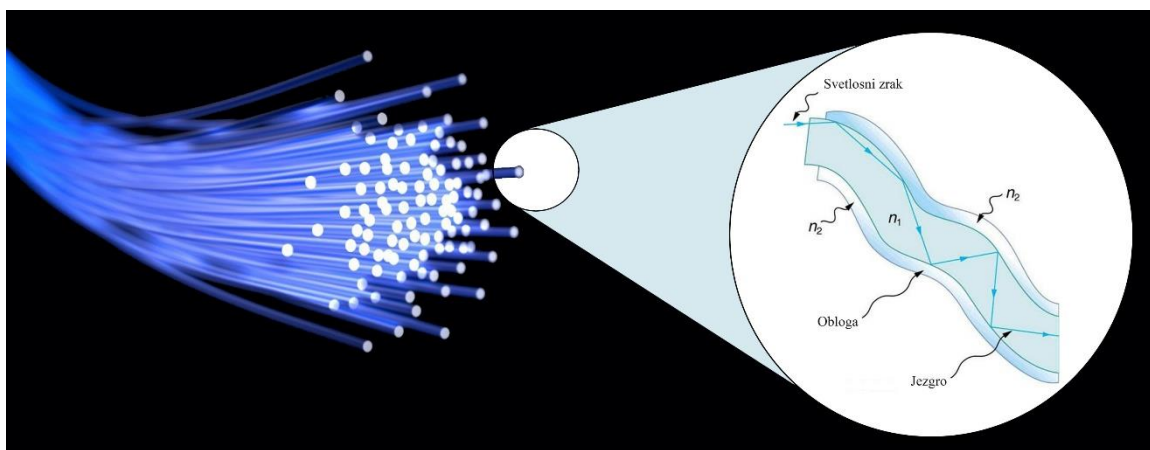
Slika 5.1. Uzorci polimetil metakrilat sa odgovarajućom hemijskom formulom

Pleksiglas se odlikuje izuzetnim optičkim karakteristikama i zbog takvih svojih osobina, najčešće se koristi kao zamena za staklo na različitim uređajima. Transparentnost mu daje izgled kao optičko staklo, budući da je njegova ukupna providnost preko 90 %. Za razliku od drugih materijala ima veliku otpornost na lomljenje, čak 6-17 puta veću otpornost od običnog stakla, ali ukoliko se razbije, delovi se raspadaju malom brzinom zbog lakoće materijala. Klirit ima izuzetnu otpornost na većinu hemikalija, počev od neorganskih baza i kiselina preko aromatičnih rastvarača do organskih kiselina. Pleksiglas je takođe poznat po svojoj dvodimenzionalnoj stabilnosti, budući da je otporan na deformisanje tokom dužeg vremenskog perioda eksploatacije. Na klirit mogu da utiču visoke temperature, ali pri jako niskim temperaturama ne dolazi do lomljenja. Pleksiglas može da se koristi i kao izolator budući da ima visoku otpornost u odnosu na druge materijale. Zbog jednostavnosti izrade, može da se seče, buši, mašinski obrađuje kao metal ili drvo. U slučajevima kada se zagreje do odgovarajuće temperature može da formira bilo koji oblik [53].

5.2. Optička vlakna (svetlovodi)

Za razliku od koaksijalnih kablova koji prenose električne signale kroz provodnike, optička vlakna prenose snop svetlosti kroz staklenu ili plastičnu sredinu [54]. Prilikom postavljanja optičkih vlakana sa staklenim jezgrom potrebno je voditi računa o savijanju, jer veliki ugao može da spreči prostiranje svetlosti ili dovede do oštećenja svetlovoda.

Sistemi prenosa signala optičkim kablovima sastoje se iz tri osnovna funkcionalna dela, a to su predajnik (izvor svetlosti: LED ili laserska dioda), optičko vlakno (svetlovod, optički fiber) i prijemnik (foto senzor). Pri svetljenju LED diode, svetlost putuje optičkim vlaknom koje na drugom kraju ima postavljen detektor (prijemnik,) koji pretvara svetlosni signal u električni konverziju posle koje se dobija standardni električni signal. Princip prenošenja informacije duž optičkog vlakna odvija se putem totalne refleksije (slika 5.2.) [54].



Slika 5.2. Totalna refleksija u optičkom vlaknu

Svako optičko vlakno sastoji se iz jezgra koga čini staklo ili plastika određenog indeksa prelamanja i omotača presvučenog oko jezgra. Omotač je takođe izrađen od stakla, ali ima drugu vrednost indeksa prelamanja. Svetlost se usmerava u jezgro pod određenim uglom da bi došlo do totalne refleksije, zbog koje se svetlosni zrak neprestalno odbija od granične površine jezgro/omotač putujući tako duž svetlovoda do prijemnika. Kada je optičko jezgro izrađeno od plastike dozvoljen je veći ugao savijanja, međutim ta vrsta materijala daje ograničenje razdaljine prenosa signala.

Zbog veoma malog slabljenja optičkog signala koji putuje svetlovodom, pomoću optičkih vlakana može se vršiti prenos na velike udaljenosti .

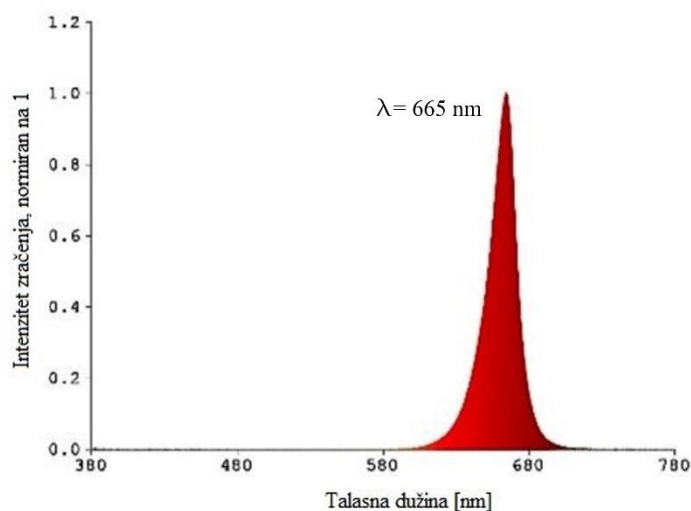
Pobrojane karakteristike odredile su optički fiber kao medijuma prenosa optičkog signala, koji je korišćen u eksperimentalnoj postavci.

5.3. LED diode korišćene u eksperimentalnoj postavci

Spektralne karakteristike LED dioda koje se dobijaju od proizvođača pokazuju njihov spektar i intenzitet zračenja zavisi od struje napajanja, temperature okoline i ugla zračenja. LED diode su

korišćene kao signalne kojima se obasjava list tokom zadatog vremenskog intervala tokom eksperimenta.

Da bi se eliminisala zavisost promene temperature, LED diode su izolovane i termostatisane tokom eksperimenta u odgovarajućoj kutiji. Spektar korišćene LED diode dat je na slici 5.3.

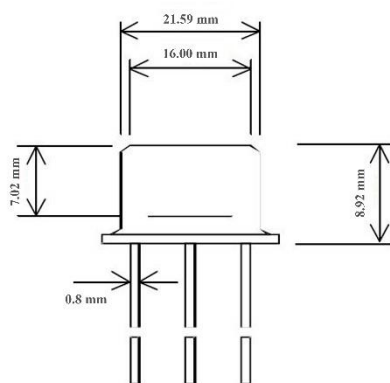


Slika 5.3. Spektar signalnih LED dioda

5.4. Fotodiode korišćene u eksperimentu

Fotodiode koje smo koristili u eksperimentalnoj postavci su silicijumske fotodiode proizvodnje IHTM (institute za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Beograd).

Ove fotodiode odlikuje veća aktivna površina površinu (kvadratna, 80 mm^2), brza reakcija, široko spektralno područje, linearnost u širokom spektralnom osegu i visoku pouzdanost pri radu (slika 4.5).



Slika 5.4. Silicijumske fotodiode

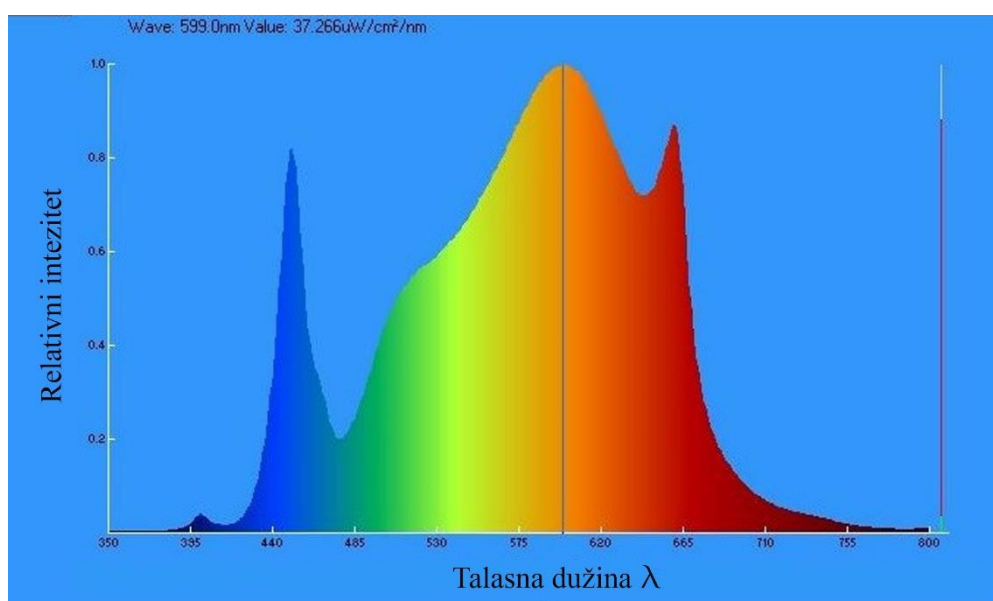
Kada je fotodiode obasjana vidljivim ili bliskim infracrvenim zračenjem, ponaša se kao strujni izvor, a fotostruja je srazmerna snazi zračenja. Inverzna polarizacija povećava paralelnu unutrašnju otpornost i smanjuje kapacitivnost diode. Smanjenje kapacitivnosti i otpora opterećenja smanjuje vreme odziva. Niska kapacitivnost sa relativno niskom polarizacijom kod ove fotodiode postiže se korišćenjem izuzetno čistog silicijuma visoke otpornosti. Fluks pozadinskog zračenja povećava struju šuma, zbog čega proizvođači preporučuju filter ili zamračivanje da bi se smanjilo ovo zračenje.

Silicijumska fotodioda koju pravi IHTM zadovoljava uslove potrebne za implementaciju u ovoj aparaturi: poseduje značajno veliku aktivnu površinu za snop optičkih vlakana, linearnost u širem spektralnom području, brz odziv i pouzdanost pri radu. Ove fotodiode su postavljene u toplotno i svetlosno izolovano kućište da bi se smanjila struja šuma, i kako bi snop svetlovoda pravilno i konstantno bio naslonjen na aktivnu površinu fotodiode. Postavljena su 4 snopa po 10 svetlovoda na svaku od 4 fotodiode (slika 5.4).

U okviru prateće elektronike omogućeno je da se odgovarajućim izborom otpornika izvrši podešavanje rada fotodiode na odgovarajuću osetljivost da bi se dobio jači signal kako za vrednosti optičke transmisije tako i za optičku refleksiju. Pri testiranju aparature bez listova, došlo je do saturacije fotodiode, pa je odgovarajućim podešavanjem parametara omogućena kompletna priprema rada sistema.

5.5. LED paneli kao optimalni izvori zračenja

Korišćeni LED paneli imaju mogućnost kontinualnog osvetljenja, a važna prednost pri izboru im je mogućnosti podešavanja jačine osvetljenja. Površina iznad panela je dizajnirana tako da se pomoću odgovarajućeg seta ventilatora odvodi toplota nastala usled rada ovih panela i time u potpunosti očuva spektralna karakteristika data na slici (5.5.).



Slika 5.5. Spektar LED panela

Pre svake eksperimentalne postavke meren je PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density), odnosno gustina fotosintetičkog fotonskog fluksa na svim potencijalnim pozicijama biljaka kako bi se na vereme odredili precizni početni parametri za svaku biljnu vrstu (slika 5.6.).

Kao kontrola jačine osvetljenja, postavljen je kalibrisani data logger luksmetar u centar panela na visini listova biljaka koji poseduje mogućnost snimanja podataka i do nekoliko meseci u zavisnosti od izabranog vremenskog intervala.

PPFD raspodela prema rastojanju panela od biljaka



Slika 5.6. PPFD raspodela po rastojanju od biljaka

5. 6. Optički filteri

Optički filteri su elementi koji menjaju spektralni sastav ili intenzitet upadne svetlosti. Osnovna karakteristika filtera je spektralna kriva propustljivosti (transmisije), odnosno zavisnost transmisije od talasne dužine zračenja. Poželjno je da oblast propustljivosti bude što uža, dok propustljivost van te jedne uske oblasti bude nula.

Filteri koji propuštaju samo jednu određenu oblast talasnih dužina selektivni filteri (interferentni). Interferentni filteri (Slika 5.7. a) rade na principu interferencije i izdvajaju veoma usku spektralnu oblast (traku od 10 do 20 nm). U njihov sastav ulaze dva paralelna delimično prozirna metalna ogledala (srebro), a između njih se postavlja sloj transparentnog dielektrika (MgF_2) čija je debljina polovina talasne dužine koju treba izdvojiti (Slika 5.7. f). Svetlosni zrak se, pri prolasku kroz filter, odbija od ogledala i pri svakom reflektovanju delimično transmituje, pa se iz filtra dobija beskonačan niz zraka opadajućih amplituda, sa istom putnom razlikom.

Putna razlika je određena sledećom relacijom:

$$b = k \cdot \lambda = 2d \cdot \cos\varphi \quad (5.1)$$

gde je k - ceo broj, φ - ugao pod kojim se zraci odbijaju, d - debljina sloja dielektrika.

Po zakonu interferencije, putna razlika je jednaka celobrojnomo umnošku talasnih dužina. Budući da je talasna dužina upadnih zraka λ , sledi da je $b = \frac{2\lambda}{2} = \lambda$, jer je debljina sloja dielektrika $d = \frac{\lambda}{2}$.

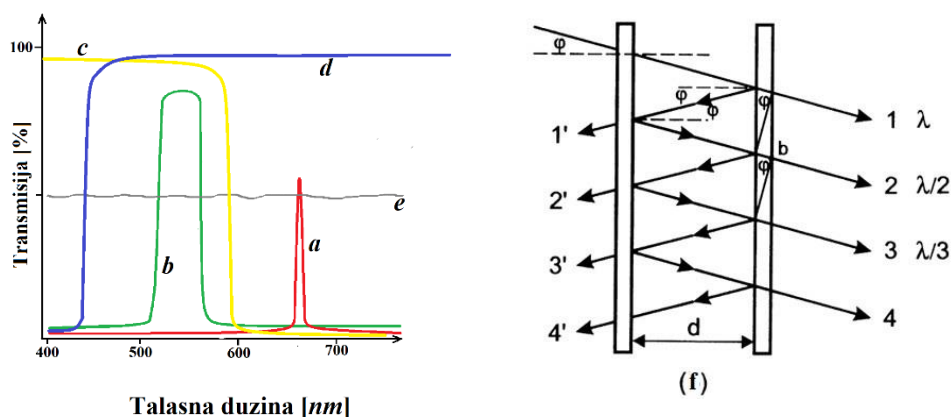
Bojeni filteri su dizajnirani tako da propuštaju zračenje iz tačno određene oblasti talasne dužine vidljivog dela spektra (crveni, plavi, zeleni itd.) [Slika 5.7. b].

IR filteri pripadaju „cut off” filterima koji blokiraju oblast iz IR oblasti zračenja, a transmituju vidljivu svetlost [Slika 5.7. c].

UV filteri su takođe vrsta cut off filtera koji propuštaju vidljivu svetlost, a blokiraju oblast UV zračenja. Najčešće se koriste da zaštite sičiva i druge filtere [Slika 5.7. d].

Filteri koji propuštaju podjednako sve talasne dužine u određenoj spektralnoj oblasti su neutralni filteri. Osnovna karakteristika neutralnih filtera je optička gustina čija vrednost definiše količinu propuštenog zračenja (transmisije). Što je veća optička gustina, to je manja transmisija i obrnuto [Slika 5.7. e].

Osim navedenih filtera, postoji još drugih vrsta kao što su notch filteri (ne propuštaju samo jednu talasnu dužinu) itd.



Slika 5.7. Optički filteri (a-e), princip rada interferentnog filtera (f)

5.7. Karakteristike Grow Box-a za gajenje biljaka

Za eksperimentalnu postavku korišćena su dva Grow Box-a dimenzija 240 x 120 x 200 cm (slika 5.8.). U svakom se može gajiti i do 50 biljaka. GrowBox omogućava da se sa lakoćom kontroliše i „podešava” dan i noć, jer oni ne propuštaju spoljašnje svetlo. Uz pomoć GrowBox-a kontrola temperature i vlažnosti vazduha je takođe olakšana, jer je prostor gde je ta kontrola neophodna znatno manji. Sve ostale parametre je takođe mnogo lakše kontrolisati, npr. mirisi, prisustvo insekata, CO₂, u ovoj sobnoj verziji staklene bašte.

Spoljašnjost ovog Grow Boxa izrađena je od unapređenog materijala koji ne propušta svetlost ni spolja ni iznutra, dok je unutrašnjost obložena MYLAR folijom koja reflektuje i do 98% svetlosti. Unutrašnjost je takođe i vodootporna, tako da se može vršiti i orošavanje biljaka bez ikakve bojazni da će se nešto desiti GrowBox-u.



Slika 5.8. Grow box

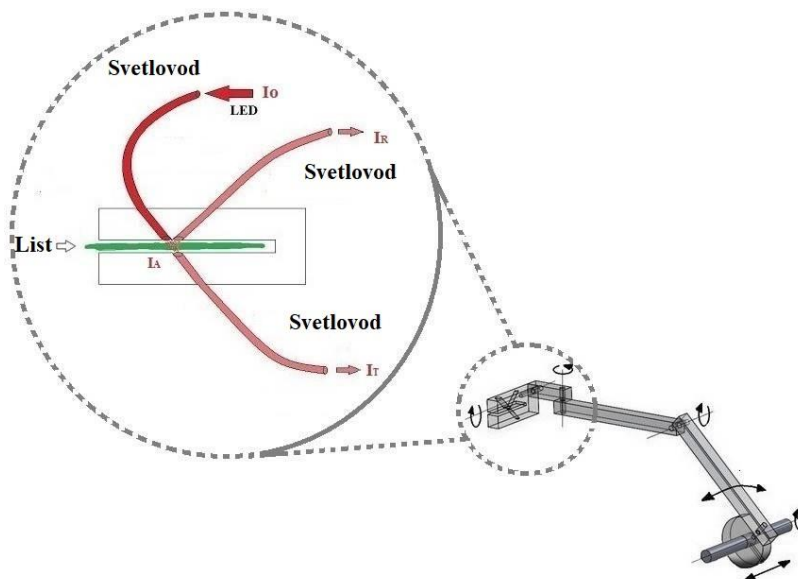
5.8. Šematski prikaz sistema

Sistem se sastoji od 20 identičnih segmenata (postavljen u dve grupe po 10), pri čemu svaki od njih odgovara jednom mernom mestu na koji se postavlja uzorak-list biljke [55].

Držać lista (slika 5.9.) je napravljen od providnog pleksiglasa i ima mogućnosti pomeranja u 6 stepeni slobode kako bi pratio prirodno pomeranje lista koji raste. U delu koji je predviđen za postavljanje lista napravljena su tri proreza za optička vlakna konstruisani pod uglom od 45° stepeni u odnosu na ravan lista. Optička vlakna ili svetlovodi su namenjeni za obasjavanje lista LED diodom (koja odgovara talasnoj dužini najveće apsorpcije hlorofila a 665 nm), prikupljanje reflektovane i prikupljanje propuštene svetlosti, respektivno.

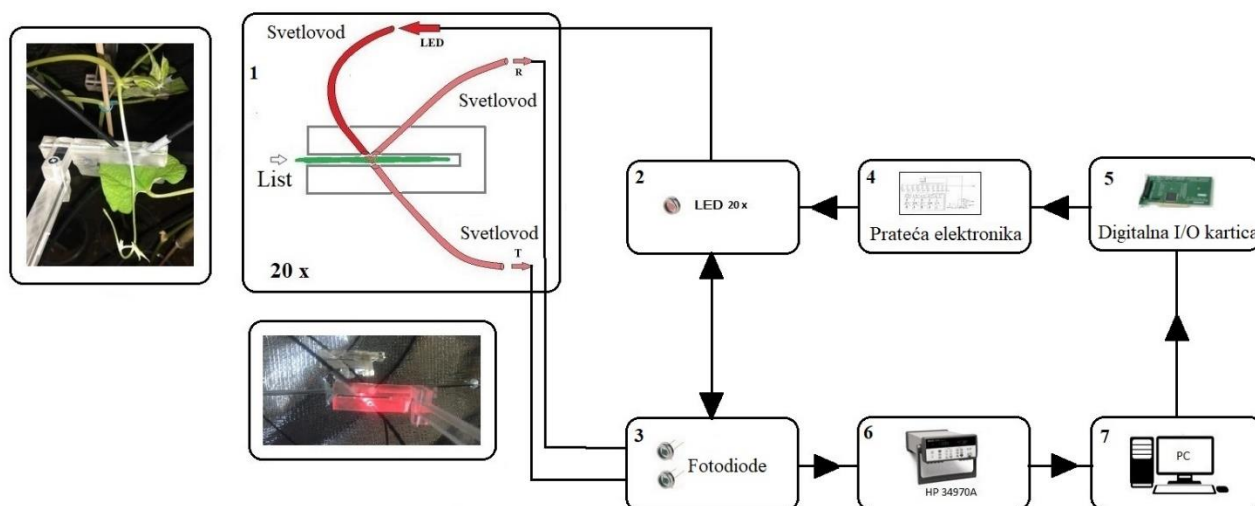
Jedan kraj svetlovoda je postavljen neposredno do lista, dok drugi kraj prenosi signal do odgovarajuće fotodiode koja pretvara svetlosni signal u električni. Iznad površine fotodiode postavljen je filter koji propušta svetlost samo određene talasne dužine (koja odgovara talasnoj dužini diode koja obasjava list). Uz pomoć sabirnog sočiva snop svetlosti se fokusira na što manju površinu (da ne dođe do rasipanja svetlosti) i tako putuje do uređaja za snimanje.

Fotodiode, prateća elektronika, kao i signalne (LED diode) postavljene su u kutiju koja je termostatisirana i izloluovna od spoljašnjih uticaja. Sa fotodiode se signal šalje na uređaj za merenje (I/O karticu) koja uz pomoć odgovarajuće elektronike i softvera omogućava da se ovezbedi napajanje dioda, kao i kružni ciklus za kontinualno merenje, o čemu će detaljnije da bude reč u glavi 6 koja je posvećena softveru. Na osnovu izmerenih parametara crta se grafik zavisnosti koeficijenta apsorpcije u vremenu i time se, na osnovu snimljenog Cirkadijuskog ritma biljke, dolazi do zaključka o stanju biljke.



Slika 5.9. Šematski prikaz držača lista [55]

Blok dijagram eksperimentalne postavke prikazan je na slici 5.9.



Slika 5.10. Šematski prikaz blok dijagrama celog sistema [55].

- 1- držač od pleksiglasa sa tri svetlovoda (svetlovod za transmisiju- T, svetlovod za refleksiju R i svetlovod za led signal – LED)
- 2- kutija sa led diodama
- 3- kutija sa fotodiodama
- 4- termostatirano napajanje sa pratećom elektronikom
- 5- kartica za snimanje
- 6- multiplexer za menjanje kanala
- 7- računar sa softverom
- 8- držač sa upaljenom led diodom
- 9- držač sa listom

5. 8.1. Pokretanje sistema

List žive biljke se postavi u jedan od segmenata držača (1) tako da biljka može neometano da raste u 5 stepeni slobode. Eksperimentalna postavka podrazumeva 20 nezavisnih kanala od kojih svaki odgovara pojedinačnom segmentu. U svakom od držača kroz jedan svetlovod dolazi signal sa led diode koja odgovara maksimumu apsorpcije hloofila (665 nm), a svih 20 signalnih dioda se čuvaju u termoizolovanoj kutiji (4). Preostala dva optička vlakna prikupljaju reflektovanu, odnosno propuštenu svetlost, respektivno. Svetlost se, nadalje, prenosi na odgovarajuću fotodiodu (3). Na svakoj od fotodioda je postavljen interferentni filter koji propušta samo svetlost koja odgovara 660 nm talasne dužine.

Sekvence paljenja led dioda dirigovane su računarom koji se kontroliše karticom (5), a signali sa fotodioda se usmeravaju uspomoc analognog multipleksa (6). U programu (7) se podesi u kom vremenskom intervalu će ciklus snimanja da se ponavlja. Preporuka je da taj interval bude 15 minuta, jer se time postižu 4 snimanja na sat, što je približno 100 ciklusa dnevno. Podaci se čuvaju u fajlovima

u odvojenim tabelama za svaki kanal. Grafik zavisnosti vrednosti koeficijenta refleksije i transmisije u vremenu daje upravo izgled Cirkadijuskog ritma merene biljke.

Tokom eksperimenta temperatura se održava konstantnom na 22 °C. Relativna vlažnost vazduha je takođe konstantna i iznosi 70 %. Jačina svetlosnih panela korišćenih za osvetljavanje biljaka kontrolisana je luksmetrom i kreće se u opsegu od 5-10 000 lx-a.

Slike uređaja i njihovih karakteristika date su u odeljku X Prilozi ove teze.

VI KALIBRACIJA SISTEMA

6. 1. Kalibracija električnog signala sa LED dioda

Kalibracija mernih mesta aparature podrazumeva poznavanje funkcionalne zavisnosti električnog signala sa fotodioda od inteziteta reflektovane i propuštene svetlosti sa lista.

Konstrukcija i način izrade aparature zahteva poznavanje karakteristika svakog mesta pojedinačno zbog:

1. različitog inteziteta zračenja korišćenih LED dioda,
2. fizičkih svojstava površine optičkih vlakna, budući da su ručno rađeni i polirani,
3. pozicije optičkih vlakana u odnosu na aktivnu površinu fotodiode,
4. položaja držača lista u odnosu na aktivne LED panele,

6. 2. Kalibracija mernih mesta po vrednosti optičke transmisije

Kalibracija mernih mesta po vrednosti optičke transmisije vrši se pomoću etaloniranih neutralnih filtera, različite optičke gustine. Budući da je optičko vlakno koje prikuplja propuštenu svetlost sa lista, postavljeno pod uglom od 45°, etaloniranje neutralnih filtera je izvedeno pod geometrijom od 45°, na kontrolnom spektrofotometru.

Vrednost električnog signala sa fotodiode koja je uzeta kao 100% optičke transmisije je uzeta u slučaju kada je nosač uzorka bio prazan, odnosno kada između LED diode i svetlovoda za propuštenu svetlost nije imalo prepreka. Vrednosti optičke transmisije svetlosti snimljene su na kontrolnom spektrofotometru korišćenih neutralnih filtera poznate transparencije.

6. 3. Kalibracija mernih mesta po vrednosti optičke refleksije

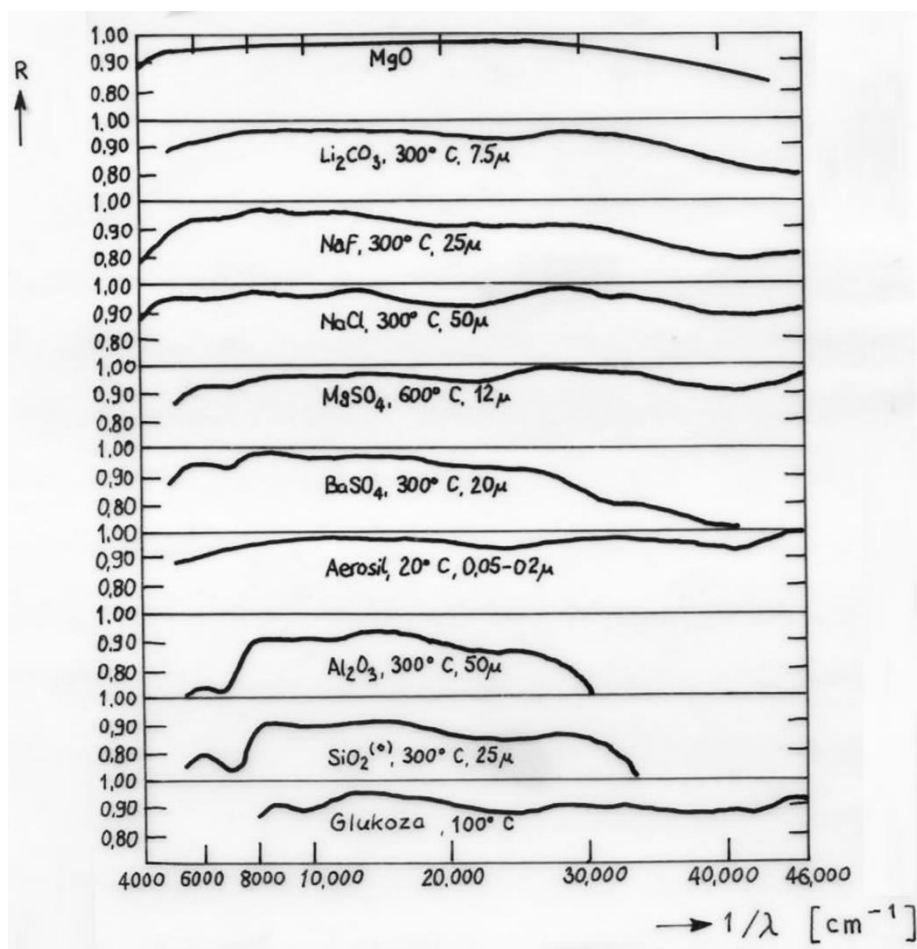
Refleksija upadne svetlosti na list biljke je difuznog oblika i kalibracija mernog mesta vrši se pomoću etalona za difuznu refleksiju. Budući da kalibracija na vrednosti optičke refleksije zahteva još dodatnih ispitivanja, izdvojicemo samo deo kalibracije. Naime, vrednost optičke refleksije sa neke površine leži između dva granična slučaja koji podrazumevaju:

1. ogledalsku refleksiju, koja nastaje na idealno glatkoj površini,
2. difuznu refleksiju, koja nastaje na idealno difuznoj (mat) površini.

Odnos relativne uloge ogledalske i difuzne refleksije određen je koeficijentom apsorpcije materijala. Analize pokazuju da su „apsolutno belom telu” najbliži etaloni izrađeni od MgO, MgCO₃, BaSO₄ itd. Funkcionalna zavisnost reflektancije od talasnog broja supstancija koje se najčešće koriste kao standardi (slika 6.1.) [31].

Vrednost električnog signala sa fotodiode koja je uzeta kao 100 % difuzne refleksije po svim talasnim dužinama je uzeta za uzorke napravljene od mat bele površine od MgO i BaSO₄.

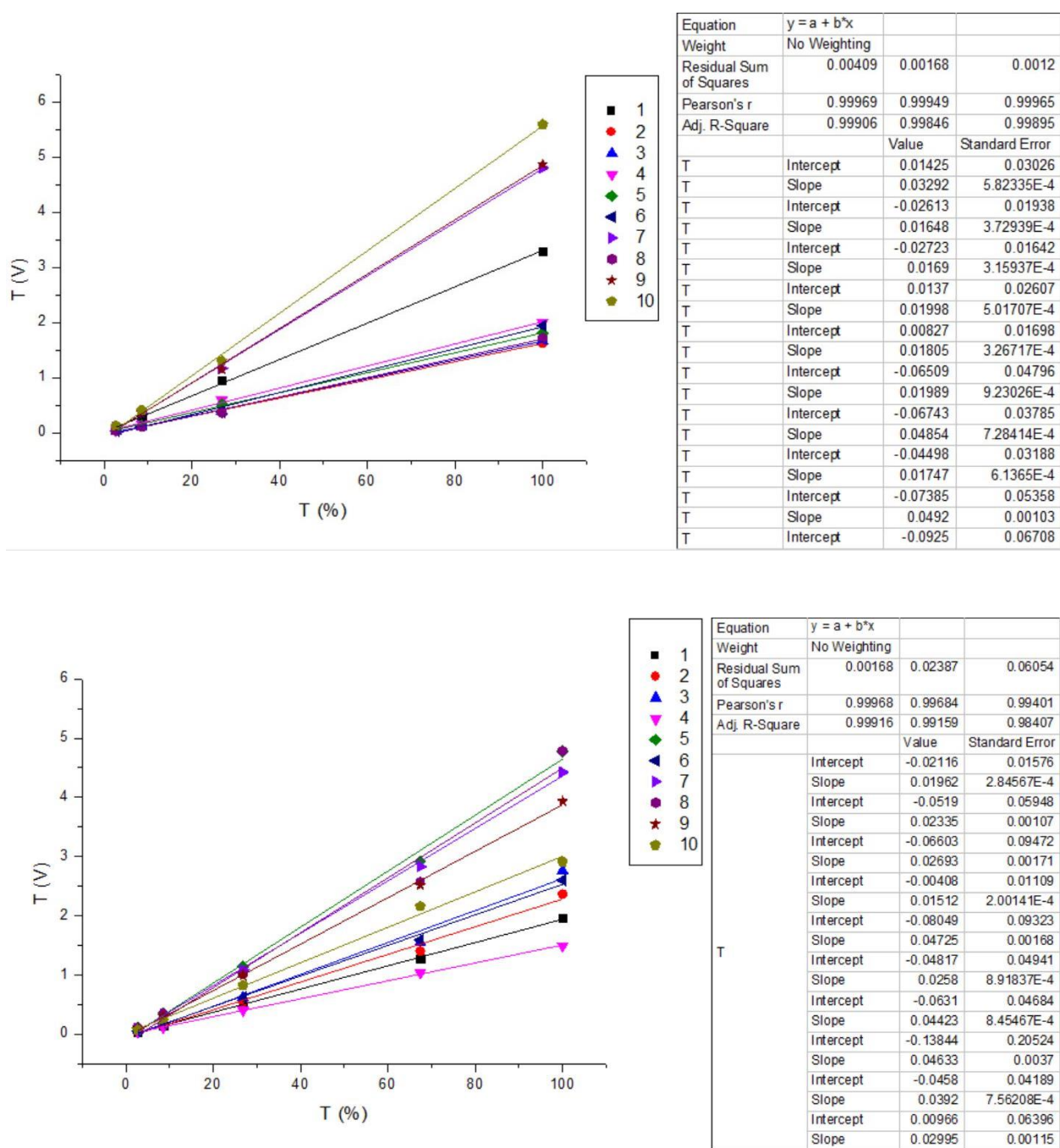
Za potrebe kalibracije korišćen je i uzorak BaSO₄ koji je imao približno 50 % reflektivnosti kada se postavi na merno mesto [31].



Slika 6.1. Funkcionalna zavisnost reflektancije od talasnog broja supstancija koje se najčešće koriste kao standardi [56]

6. 4. Rezultati kalibracije vrednosti optičke transmisije

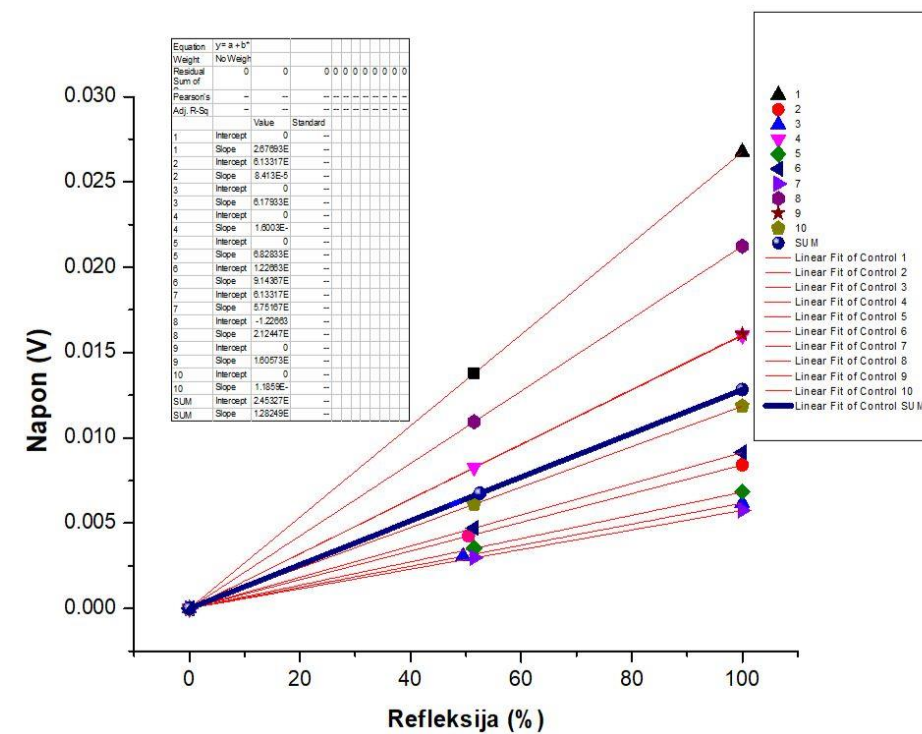
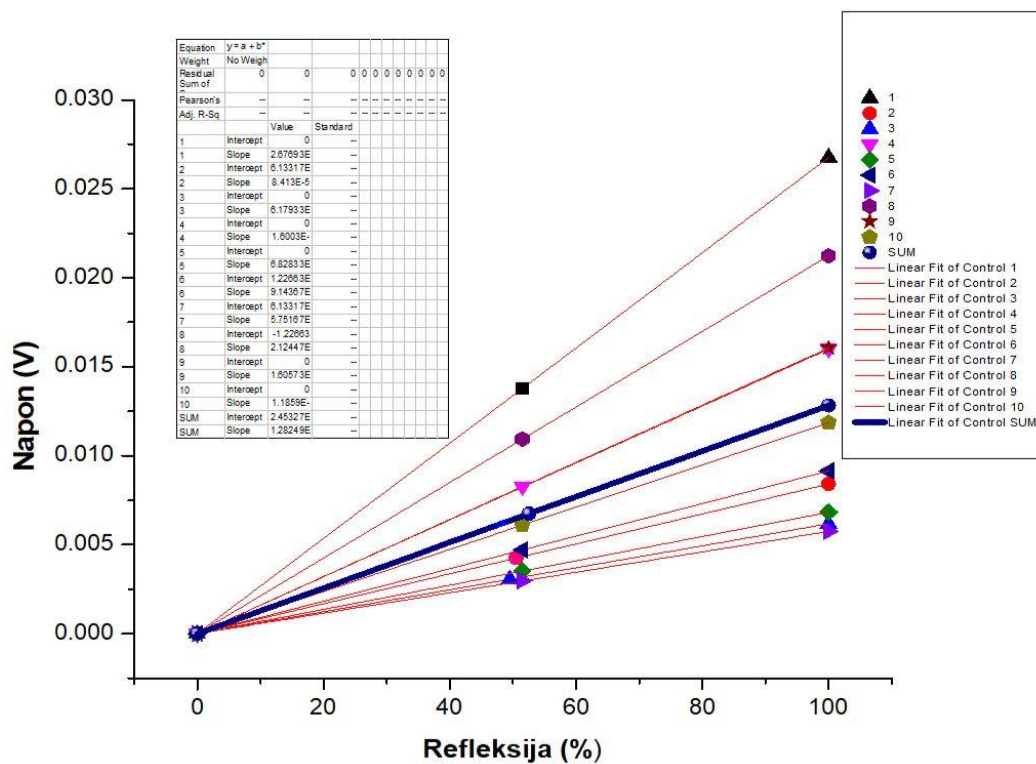
Na Slici 6.2 su prikazani grafici na kojima je prikazana funkcionalna zavisnost napona od koeficijenata optičke transmisije u procentima za dve grupe po 10 mernih mesta.



Slika 6.2. Grafici zavisnosti vrednosti napona od koeficijenata transmisije poznatih uzoraka za obe grupe

5. 5. Rezultati kalibracije vrednosti optičke refleksije

U prilogu su grafici na kojima je prikazana funkcionalna zavisnost napona od koeficijenata optičke refleksije u procentima za dve grupe po 10 mernih mesta.



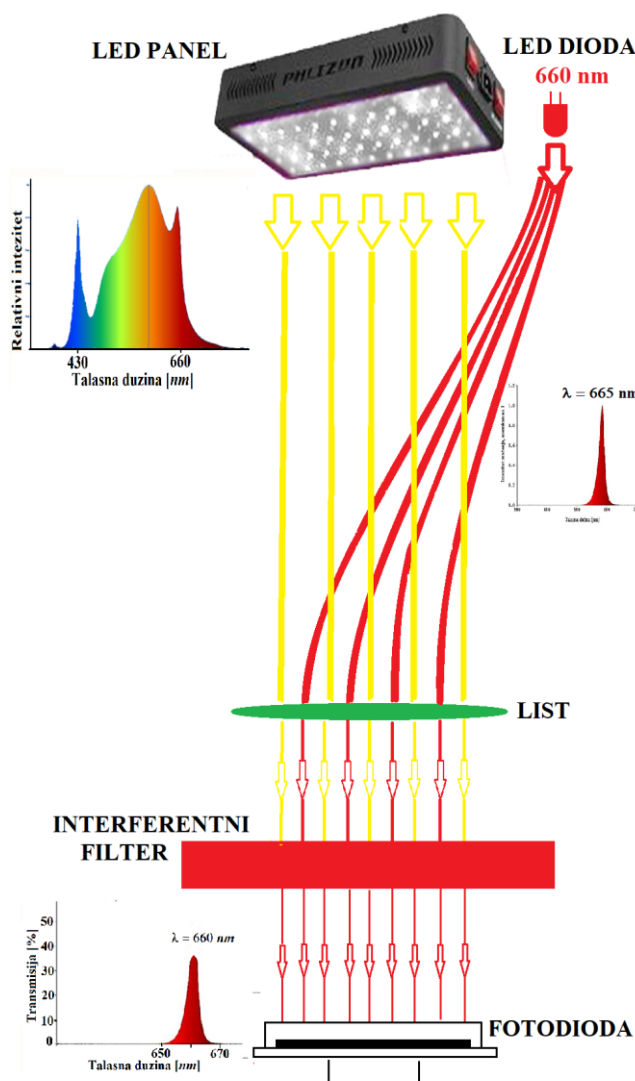
Slika 6.3. Grafici zavisnosti vrednosti napona od koeficijenata transmisije poznatih uzoraka za obe grupe [31]

6. 6. Kalibracija osetljivosti sistema

Kalibracija osetljivosti sistema podrazumeva jasno definisane granice rezultata merenja između struje šuma i saturacije fotodioda.

Budući da je sistem konstruisan tako da ima četiri grupe sa po 10 svetlovoda (jedna grupa ima 10 svetlovoda za refleksiju i 10 za transmisiju), iako je fotodioda smeštena u tamnu kutiju zajedno sa krajevima snopova optičkih fibera, njena struja šuma je prividno svedena na minimum. Naime, signal se sakuplja sa jednog optičkog vlakna dok ostalih 9 u snopu koji su neaktivni u datom trenutku mogu prividno da doprinose šumu sistema upravo zbog dnevne svetlosti. Ovaj problem je rešen tako što je neposredno na površinu svake fotodiode postavljeno sabirno sočivo i interferentni filter (Slika 5.4.) koji propušta samo talasnu dužinu koju daje signalna LED dioda.

Takođe, prikupljanje podataka se vrši tako što se prvo snimi signal pre paljenja LED diode (tako se dobija vrednost šuma) i posle tokom paljenja LED diode. Njihovom razlikom dobijamo realnu vrednost signala sa datog mernog mesta.



Slika 6.4. Funkcija interferentnog filtera 665 nm

Dugotrajnim razmatranjima i merenjima dobijenih pri različitim uslovima rada sistema, izvršeno je podešavanje najboljeg položaja svetlovoda u odnosu na površinu lista na rastojanju od 2 mm kao i podešavanje konstantnih ambijentalnih uslova u vidu stalne temperature u prostoriji koji dovode do čistijeg signala i veće osetljivosti i stabilnosti kompletnog sistema.

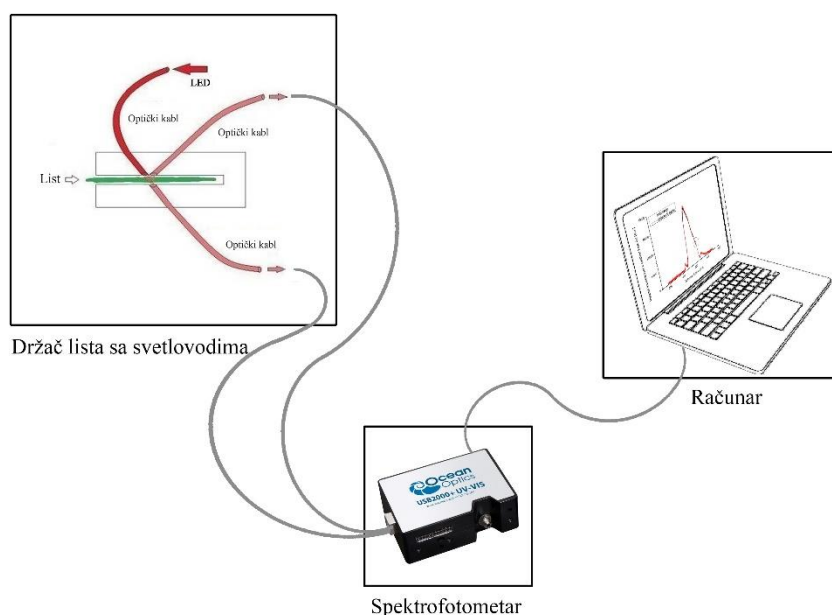
6.7. Podešavanje mernog sistema na jačinu i period osvetljavanja signalne LED diode

Da bi se proverio mogući uticaj zračenja pobudne LED diode na stimulisanje fitohroma (poglavlje 2) u kratkom vremenskom intervalu svetljenja (3 sekunde) u toku prikupljanja signala rađeni su odgovarajući testovi. Intenzitet svetlosti treba da bude dovoljno jak kako bi mogao da daje pouzdane vrednosti intenziteta transmisije i refleksije, dok sa druge strane, mora da bude dovoljno slab da ne izazove fiziološke promene lista i time ošteti biljku. Kako se intenzitet svetlosti pobudinih led dioda

podešava pojedinačno (menjajući jačinu struje napajanja strujnog izvora), ovaj faktor se eliminiše jednostavnim određivanjem optimalne jačine struje izvora.

Osim intenziteta svetlosti pobudnih led dioda, trebalo je odrediti i optimalan vremenski interval osvetljenja. Lokalno osvetljavanje površine lista tokom dužeg vremenskog intervala ne bi dalo pozdane informacije o Cirkadijumskom ritmu. Ispostavilo se da je izbor osvetljavanja lista od 3 sekunde i intenzitet svetlosti od $I = 1\,200\text{ lx}$ ($22.3\text{ }\mu\text{mol/m}^2$)¹⁴ sasvim dovoljan vremenski interval koji ne utiče na pokretanje odgovarajućih procesa.

Provere eventualnih pozadinskih biohemijskih procesa u listu urađene su pomoću odgovarajućih merenja spektrofotometra koji je bio postavljen prema šemi na slici 6.5.

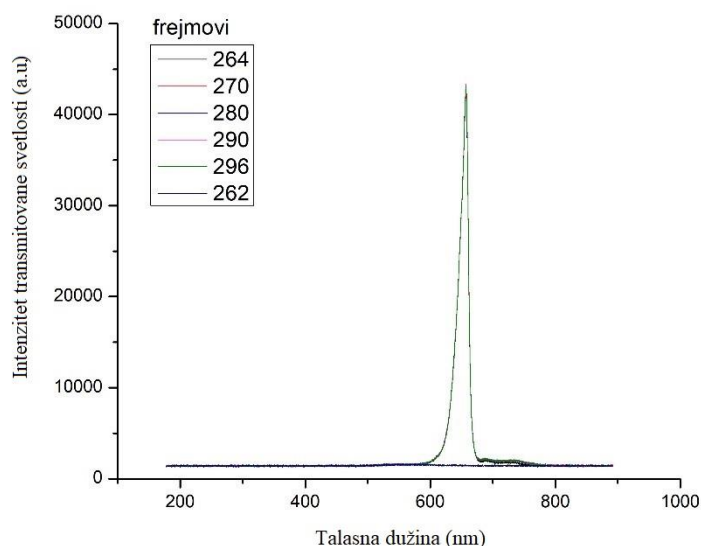


Slika 6.5. Šematski prikaz provere uticaja dopunskog svetla upotrebljenih led dioda pomoću spektrofotometra

Svetlovod spektrometra postaljen na mestu merenja refleksije lista, odnosno na mestu merenja transmisije svetlosti kroz list. Cilj ove provere je da se vidi da li tokom zadatog vremenskog intervala prilikom osvetljavanja lista LED diodom, dolazi do promena u listu koja bi se mogla odraziti na naknadno odvijanje fotohemijskih procesa. Odgovarajućom instrumentalnom postavkom je određeno snimanje određenog broja spektara u toku perioda osvetljavanja lista signalnom LED diodom. Poređenjem pojedinačnih spektara prikazanih na slici 6.6. očekuje se da li će da se uoči odgovarajuća promena.

Proces snimanja ovih parametara pomoću spektrofotometra traje pre, tokom i nakon osvetljavanja LED diode. Vremenski interval snimanja pojedinačnih spektara treba da bude kratko, manje od 1 sekunde kako bi se se uočile eventualne promene u obliku spektra, ukoliko do njih dođe. Optimalno vreme od 30 ms davalo je pouzdane grafike za analizu.

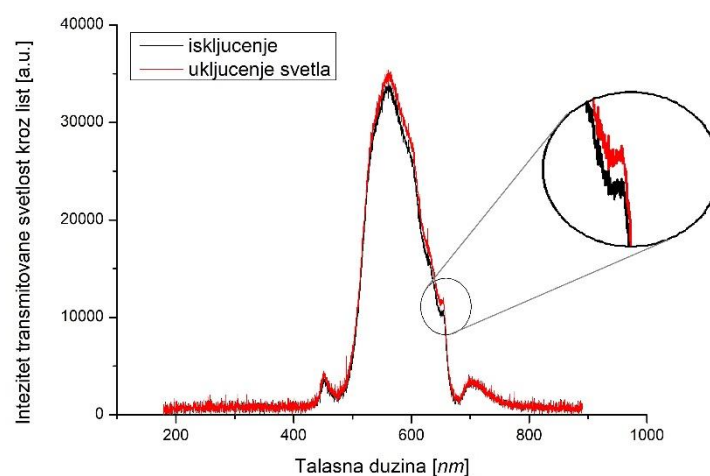
¹⁴ Korekcionni faktor je različit prilikom konverzije jačine svetlosti iz lx u $\mu\text{mol/m}^2$ u zavisnosti od izvora svetlosti. Primer za Sunčevu svetlost: $10\text{ }\mu\text{mol/m}^2$ predstavlja 540 lx-a .



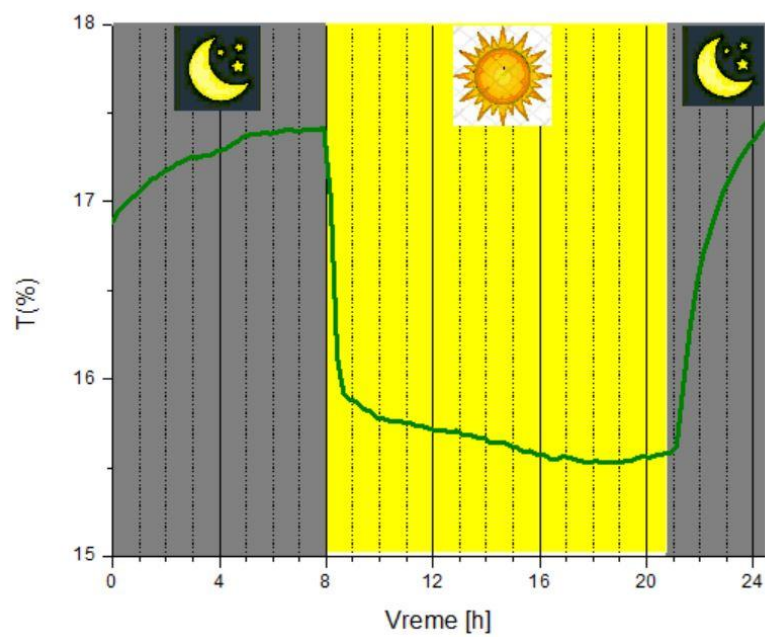
Slika 6.6. Slaganje pojedinačnih spektara merenjem celog spektra

Spektri pre i nakon uključenja LED diode su ravne linije, dok su spektri snimljeni tokom obasjavanja međusobno preklopljeni odgovarajućim maksimumom intenziteta na 665 nm. Ovi rezultati ukazuju na to da izabrani parametri, intezitet i vreme obasjavanja lista LED diodom ne menjaju fotosintetičke aktivnosti unutar lista odnosno da su izvršena merenja i dobijeni rezultati su potpuno relevantni.

Spektrofotometrom je takođe izvršena provera ispravnosti predstavljene nove metode sa odgovarajućom aparaturom. Izvršeno je ispitivanje da li se stanje biljke može pouzdano pratiti merenjem optičkih osobina lista na maksimumu apsorpcije hlorofila u realnom vremenu. Dobijeni spektri paralelno ukazuju na jasnu razliku u kvalitetu i rezoluciji dobijenih rezultata. Na Slici 6.7 je predstavljen su spektr snimljen spektrofotometrom pri uključenju i isključenju svetla, a to su vremena pri kojima je najveća razlika u vrednostima refleksije i transmisije svetlosti kroz list. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da se razlike koje su snimljene spektrofotometrom mogu uočiti, ali su neznatne. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima dobijenim novom metodom i aparaturom se pokazuje jasna promena optičkih osobina lista (transmisije) na dnevnom nivou pri maksimumu apsorpcije hlorofila-a (Slika 6.8). Ovi rezultati su zahtevali detaljnu biološku analizu.



Slika 6.7. Rezultati dobijeni snimanjem intenziteta celog spektra



Slika 6.8. Rezultati dobijeni snimanjem intenziteta celog spektra novom metodom

VII PROGRAMSKI PAKET LABVIEW

7.1. Uvod u LabView

LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) je platforma namenjena vizuelnim programskim jezicima National Instruments-a, u literaturi poznatija kao „G” jezik. Lab View je razvojno okruženje namenjeno za kontrolu instrumenata, prikupljanje podataka i automatizaciju sistema različitih platformi, počev od Microsoft Windows-a, Linux-a i Mac operativnog sistema [57].

LabVIEW je programski paket koji je izrađen tako da omogućava brzo povezivanje automatskog prikupljanja podataka i sistema za njihovu analizu. Kompletan programski set odlikuje široki spektar mogućnosti koje su prilagođene potrebama najzahtevnijih korisnika. Za razliku od ostalih programskih platformi, LabView je vrsta grafičkog programa čiji je blok dijagram poput crteža neke složene elektornske šeme, a korisnički interfejs je dat kao front panel.

Bilo koji virtuelni instrument označen sa VI predstavlja funkcionalnu celinu koja lako može da se pretvori u modul koji je potprogram drugog VI. Upravo zbog ove karakteristične osobine, LabView je hijerarhijski program, što je analogno konceptu programiranja kod konvencionalnih programskih jezika.

Dakle, LabVIEW ima takav dizajn da se može proširivati. Opciono mogu da se dodaju moduli pomoću različitih uređaja. Proizvođač nekog mernog instrumenta može da se implementira pomoću odgovarajućeg drajvera u LabVIEW softveru koji će da se ponaša ka VI koji predstavlja merni instrument sa odgovarajućim funkcijama u LabVIEW okruženju.

Ukoliko ne postoji mogućnost za dodavanjem drajvera, korisnik može sam da napravi LabVIEW modul i da ga koristi kao virtuelni instrument (VI) u drugim programima. Takođe, može da se napiše modul koji se slaže sa LabVIEW u drugim jezicima poput C ili C++. Ovakvi moduli označeni su kao pod VI i ne razlikuju se od VI, osim što je njihov interfejs određen za drugi nivo obrade podataka. Pod VI koji se implementiraju u C ili C++ mogu da budu od izuzetnog značaja kada je potrebno da se izvede složeni numerički postupak pomoću podataka koji nisu pokriveni u standardnom LabVIEW okruženju [58].

7. 2. Osnovni koncept LabVIEW-a

Kao što je pomenuto u prethodnom odeljku, za LABVIEW su karakteristična dva aktivna prozora virtuelnog instrumenta: front panel i blok dijagram. Front panel predstavlja korisnički interfejs, odnosno ono što se vidi na ekranu tokom rada mernog sistema. U osnovnoj formi sadrži kontrole, indikatore, a pored njih LABVIEW ima veoma bogat meni ostalih alatki koje omogućavaju lakše upravljanje mernim sistemom.

Blok dijagram predstavlja pozadinu front panela koja pokazuje vezu između svih kontrola i indikatora kao i skrivene module gde se odvija kompletna programska obrada podataka. Izgled blok dijagrama je poput elektroničkog šematskog dijagrama i čini se da je makar konceptualno ožičen na sličan način. Ovakav prikaz često izgleda veoma složen kao u elektronskoj šemi realnog elektroničkog mernog instrumenta [57].

Jedan od najvažnijih zadataka u LabVIEW programiranju je određivanje tajminga i redosled operacija. Dok je u konvencionalnom programskom jeziku ovo svojstvo ostvareno redosledom naredbi i korišćenjem različitih programskih petlji (FOR, WHILE itd.), može se reći da LabVIEW radi na potpuno isti način. Jedina razlika je u tome što je način na koji se određuje redosled izvršenja naredbi u LabVIEW-u na neki način prefinjeniji.

Koncept korišćen u LabVIEW-u je tako zvani dataflow (radnja se na nekom elementu izvršava kad su svi njegovi ulazi na raspolaganju). To označava paralelnost u izvršenju radnje (ili pseudoparalelizam). Uobičajeno je izvršavanje radnji je s leva na desno, s obzirom da su ulazi obično na levom delu elementa, a izlazi na desnom. Naravno, to nije pravilo već samo neka vrsta dogovora. Programske petlje kao i redosled kojim se odvijaju naredbe odvija se pomoću struktura koje izgledaju kao knjige s brojevima stranica ili kao odsecci filmske trake [59].

7. 3. Virtuelni elementi (VI) LabVIEW-a

Virtuelni instrumenti (VI) imaju tri osnovna dela:

1. Front panel
2. Blok dijagram
3. Icon/connector

Front panel definiše ulaze i izlaze VI-a.

U blok dijagramu se nalazi izvršni kod koji kreiramo koristeći čvorove, terminale i provodnike.

Uz pomoć icon/connectora možemo koristiti VI i pod VI u blok dijagrame drugih VI-a.

Paleta alatki sadrži grafičke lebdeće palete. U front panel-u ovu paletu možemo koristiti za kreiranje, editovanje i debugiranje VI-a.

Neki od najčešće korišćenih alata su:

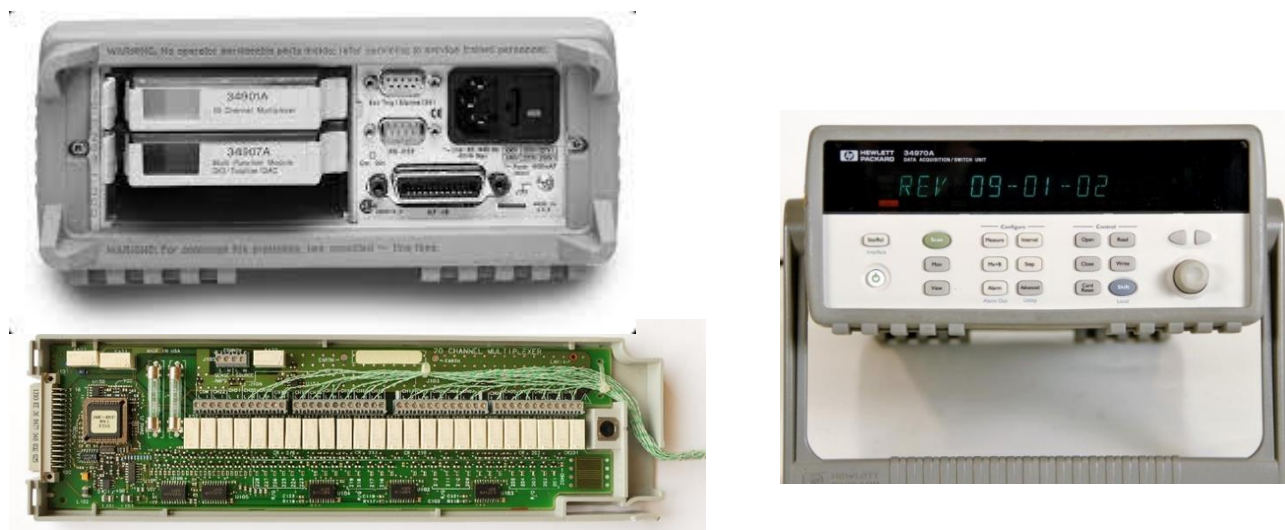
1. Alat za pozicioniranje koristimo za selektovanje, pozicioniranje i „resize-ovanje” objekata.
2. Alat za označavanje koristimo za kreiranje „nalepnica” i upisivanje teksta.
3. Alat za povezivanje koristimo da povežemo međusobno željene objekte u blok dijagramu.
4. Alat za bojenje koristimo za promenu boje prednje strane i pozadine prozora, kontrola, indikatora itd.

Front panel i blok dijagram sadrže paletu alatki u kojima se nalazi dugme za startovanje zajedno sa ostalim dugmićima i kontrolama za izvršavanje VI-a. U front panel-u iz palete kontrola postavljamo kontrole i indikatore da označimo ulaze i izlaze VI-a. Na blok dijagramu razvijamo dijagram izvora povezivanjem čvorova i terminala alatom za povezivanje. Koristimo paletu funkcija da postavimo čvorove na blok dijagram i na taj način razvijamo sekcije za pokretanje instrumenata, izvršavanje procesa i skladištenje podataka [58].

7. 4. Šema blok dijagrama korišćenog za automatizaciju sistema

Za realizaciju merenja korišćeni su instrumenti sa sledećim karakteristikama:

1. Multiplekser HP 34970A. Kompatibilan je sa standardnim komandama za programabilne instrumente i omogućava kontinualno prikupljanje podataka. Daje mogućnost preciznog merenja sa fleksibilnim konekcijama, veoma stabilnog signala, multimetarske tačnosti od 61/2 digita. Posедуje tri slota u koja mogu da se postave različiti moduli koji omogućavaju različite kombinacije akvizicije podataka. Putem dve standardne vrste konekcije je povezan sa računarom i fotodiodama. Putem RS-232 konekcije je povezan sa računarom, a pomoću modula HP 34901A povezan je sa izlazima sa fotodiode. Modul 34901A je višenamenski 20-kanalni multiplekser koji je pogodan za široki spektar primena u prikupljanju podataka od kojih su korišćena 4 kanala za fotodiode sa kojih dolazi signal [31].



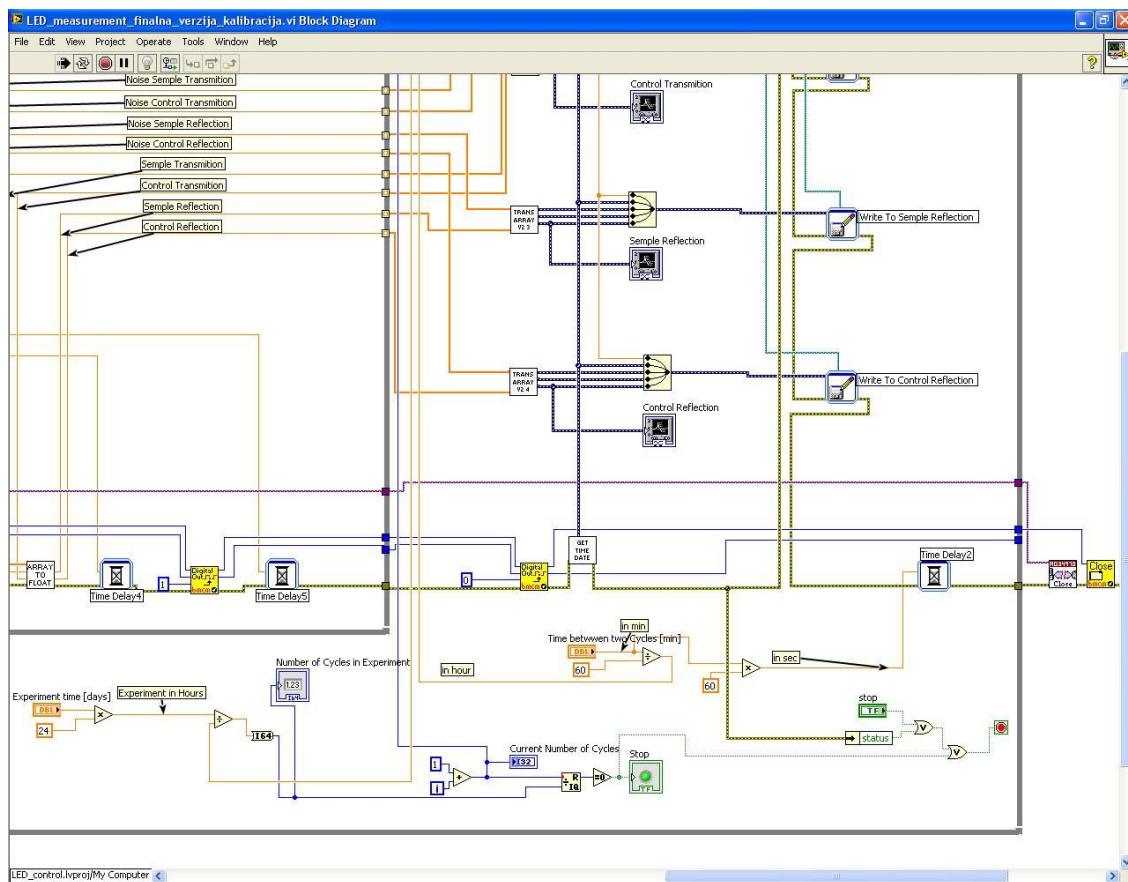
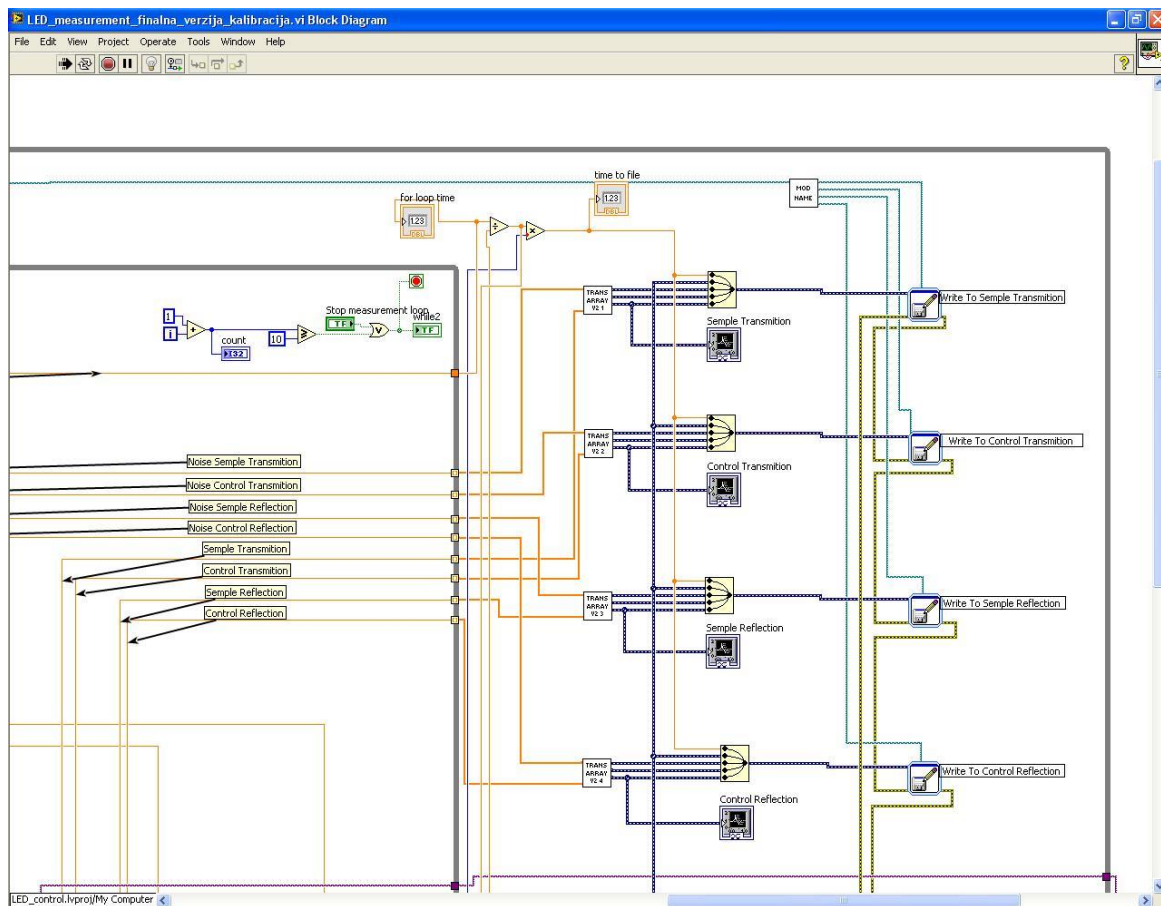
Slika 7.1. Multiplekser HP 34970A

2. Digitalna I/O kartica. Poseduje dva 16-obitna bidirekionalna digitalna porta. Zadatak I/O kartice je da u odgovarajućim intervalima obezbedi napon od 5 V za LED diode i fotodiode preko prateće elektronike sa kojom je povezana preko 37-pinskog konektora. Elektronika je napravljena tako da njen zadatak bude napajanje led diode, s druge strane kružni ciklus za napajanje LED diode tako da one svelte jedna po jedna od 1-10 u obe grupe istovremeno, u taktu predviđenim u softveru [31].

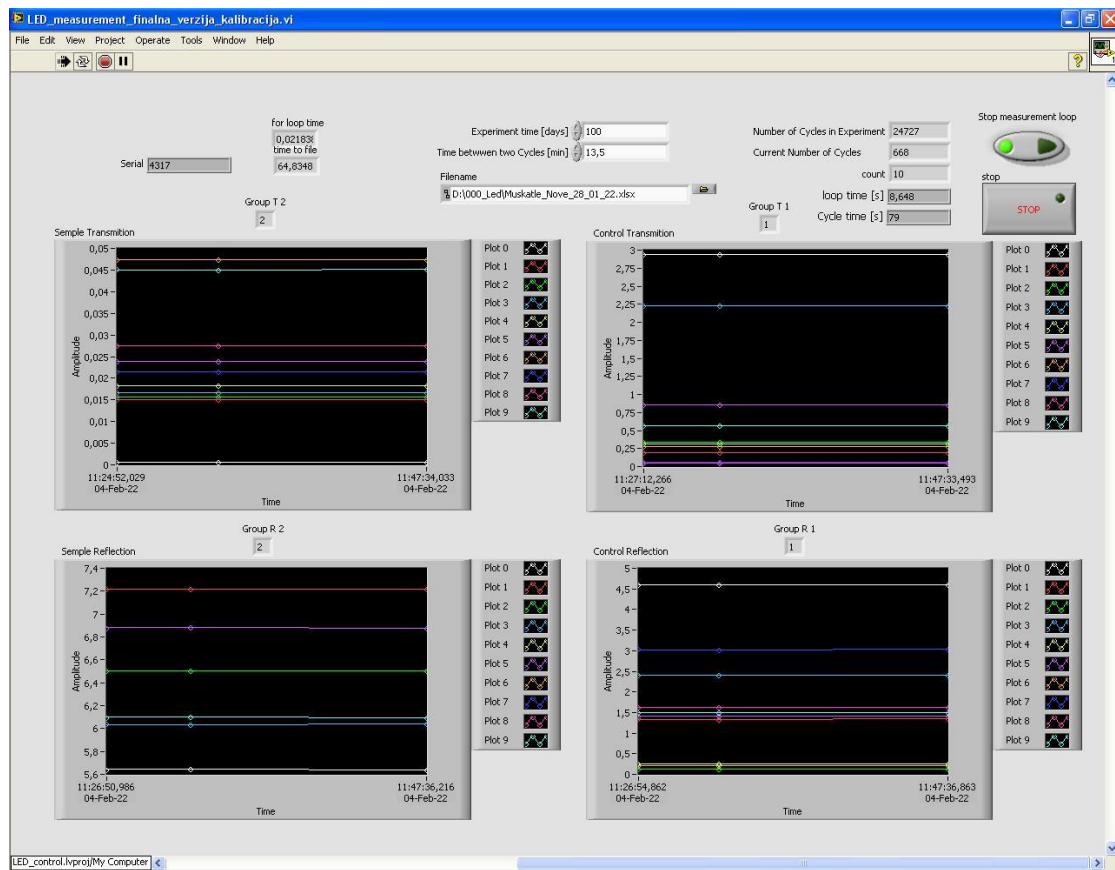


Slika 7.2. Digitalna I/O kartica

Na slikama 7.3 - 7.6 prikazan je blok dijagram u vidu šeme realizovan preko platforme grafičkog jezika programskog paketa LabVIEW.



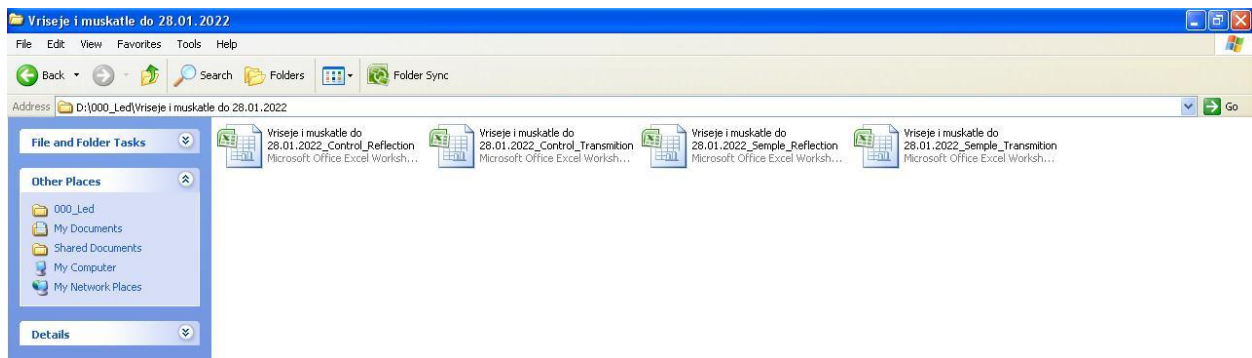
Slika 7.3 b) Blok dijagram segmenata korišćenog program



Slika 7.4 Front panel korišćenog programa

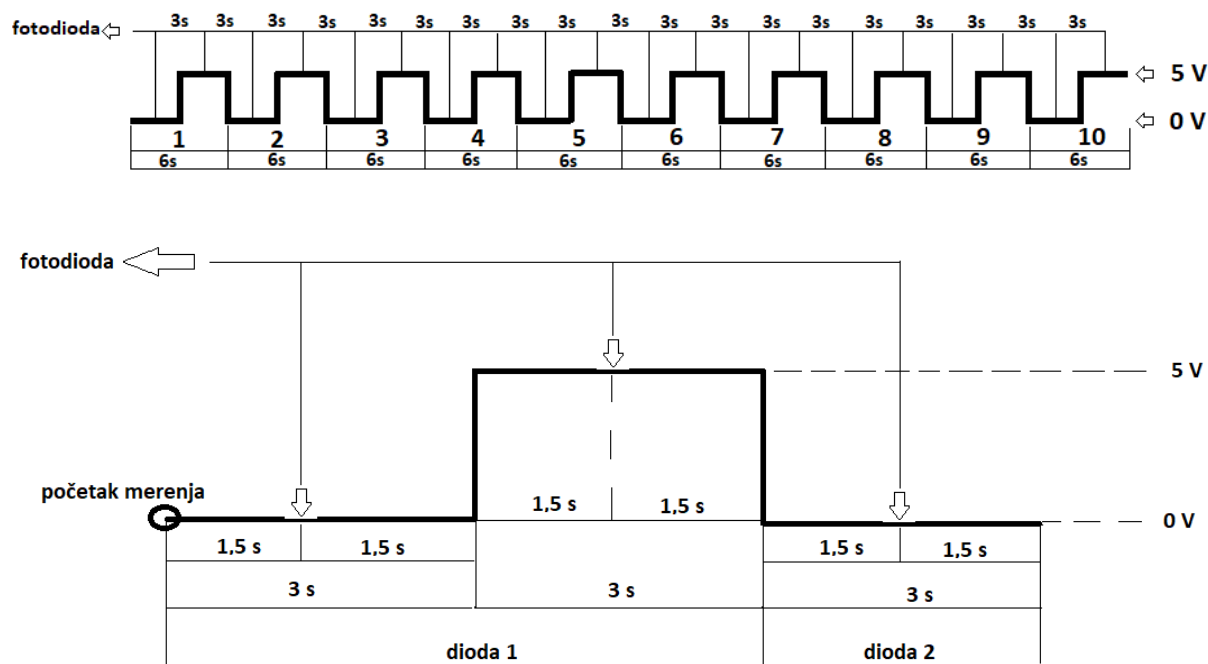
The screenshot shows an Excel spreadsheet titled "Vrseje i muskatle do 28.01.2022_Control_Transmission - Microsoft Excel". The spreadsheet contains a large table of numerical data. The columns are labeled C through U, and the rows are numbered 7 through 44. The data appears to be experimental results for different samples and conditions. The table is organized into columns for different parameters, with the first column (C) containing sample numbers and the subsequent columns (D through U) containing numerical values. The data is presented in a clear, structured format, with each row representing a specific measurement or condition.

Slika 7.5 Excel tabele za skladištenje podataka



Slika 7.6 Datoteke gde se čuvaju podaci

Na početnom segmentu blok dijagrama dolazi do inicijalizacije digitalne I/O karticu i multipleksera HP 34970A. Nakon prve 1.5 s merenje počinje tako što multiplekser preko odgovarajućeg modula (34901A) meri šum na listu mernog mesta broj 1. Posle 3 s uključuje se LED dioda na mernom mestu broj 1 tako što I/O kartica šalje 5 V pratećoj elektronici koja to prosledjuje LED diodi na mernom mestu 1. Nakon 3 sekunde od kada je počela da svetli LED dioda 1, kartica I/O prestaje da šalje napon od 5 V i dolazi do gašenja. Vrednost signala se meri za vreme 1.5 s svetljenja LED diode (slika 7.7.). Zatim se prema istom vremenskom intervalu, po istom principu, vrše merenja na mernom mestu broj 2, sve dok se ne završi krug od 10 mernih mesta [55].



7.7 Grafik programskih koraka za jedan ciklus merenja [31]

Merenja su koncipirana tako da se vrednosti beleže u periodima sredine intervala kada LED dioda svetli (merenje signala) i ne svetli (merenje šuma). Ciklusi se vrše istovremeno na grupi biljaka 1 i na grupi biljaka 2 (dva segmenta od po 10 mernih mesta), odnosno kada se pali LED dioda na mernom mestu 1 grupe 1, tada se pali i LED dioda broj 1 na mernom mestu grupe 2 i tako redom do kraja ciklusa.

Preko FOR petlje omogućeno je ciklično paljenje LED dioda i sortiranje podataka u odgovarajuće excel fajlove prema redosledu: vreme (povlači se sa mreže direktno sa časovnika računara po redosledu godina, mesec, dan, sat, sekund, milisekund), vrednost šuma, vrednost signala i njihova razlika za svako merno mesto.

Zbog fluktuacije raznih spoljašnjih parametara (vlaga, CO₂, pozicije na detektoru i sl.) mora se izvršiti oduzimanje šuma. Korekcija se obavlja direktno softverski, tako što se prvo snimi vrednost signala kada dioda ne sija, potom za vreme svetljenja diode i onda se samo izvrši korekcija oduzimanjem vrednosti. Podaci koje se dobiju predstavljaju vrednosti koeficijenata transmisije i refleksije sa list u voltima. Nakon prikupljanja sirovih podataka vrši se proračun vrednosti koeficijenata transmisije i refleksije u procentima, na osnovu vrednosti kalibracije svakog mernog mesta opisanog u odeljku 2 ove teze.

Vremenski interval između dva snimanja, ime datoteka, period snimanja zadaju se na samom početku eksperimenta prikazanom na front panelu na slici 7.4. Na front panelu mogu da se prate grafici vrednosti koeficijenata transmisije i refleksije za obe grupe u realnom vremenu. Svako merno mesto naznačeno je odgovarajućom bojom.

Svaki segment VI je pojedinačno testiran, pre početka merenja vrednosti realnog sistema.

VIII REZULTATI

Snimanje karakteristika lista biljaka nedestruktivnom optičkom metodom, zahteva niz dobro kontrolisanih i sinhronizovanih postupaka da bi se dobili relevantni podaci o stanju biljaka [60, 61].

Tokom poslednjih nekoliko godina, radilo se na usavršavanju eksperimentalne postavke počevši od preliminarne forme metode koja je detaljno opisana u magistarskoj tezi [31]. Ostvareni su potpuno kontrolisani uslovi za merenje parametara koji utiču na stanje biljke: ambijentalna temperatura, ambijentalna vlaga, vlaga zemljišta/koncentracija nutritijenata za hidroponsko gajenje biljaka, koncentracija CO₂, intenzitet i spektralne karakteristike izvora zračenja. Razvijen je novi softver koji je urađen u programskom paketu LabView (opisan u prethodnom poglavlju), koji je omogućio potpunu automatizaciju sistema, lakše prikupljanje i sortiranje podataka. Zadovoljeni su svi metrološki zahtevi u vidu kontrole optičkih segmenata aparature: LED dioda i panela, fotodioda, svetlovoda, interferentnih filtera, sočiva i nosača listova.

Do sada su izvršena merenja uz kompletnu obradu podataka za sledeće biljne vrste: *Ocimum basilicum*, *Phaselolus vulgaris*, *Zea mays*, *Guzmania lingulata*, *Vriesea carinata*, *Tillandsia brachycaulos*, *Ananas comosus*, *Bryophyllum daigremontianum*, *Capsicum annuum*, *Tillandsia xerographica*, *Carya illinoensis*, *Juglans ailantifolia* var. *Cordiformis*, *Variegated geranium* i *Rosa*.

Zbog dovoljnog broja mernih mesta, obezbeđena je bolja statistika, a dobijeni podaci su reprezentativni, reproducibilni, karakteristični za različite biljne vrste i pouzdani za detaljnije biološke analize.

8. 1. Dokaz koncepta rada aparature

Prvi test eksperimenti u svojstvu dokaza koncepta rada aparature izvršeni su snimanjem optičkih karakteristika lista biljke *Phaseolus vulgaris*, kao pripadnika C3 grupe biljaka. Kao što je pomenuto u nekom od prethodnih poglavlja, naziv su dobile zbog činjenice da je prvi proizvod fotosinteze kod njih ugljenikovo jedinjenje koje sadrži 3 ugljenikova atoma. Ove biljke žive u okruženju koje ima umerenu svetlost i temperaturu, a više su fotosintetski aktivne od drugih biljnih vrsta (C4 i CAM).

Najpre su semena *P.voulgaris* postavljena za klijanje u komercijalnom humusu, a 7 dana nakon klijanja, kada su biljke dobile prvi par listova, su postavljene na merna mesta. Na 20 mernih mesta postavljeno je 20 biljaka iste starosti i veličine. Podeljene su u 4 grupe po 5 biljaka. Svaka grupa je rasla pod različito kontrolisanim svetlosnim uslovima.

Svetlosni uslovi za 4 grupe biljaka:

I grupa – biljke su uzgajane u mraku (24 sata).

II grupa – biljke su uzgajane u režimu dnevne svetlosti (snimanje je bilo u martu 2020. godine, u periodu prirodne osvetljenosti od 6 h ujutru do 18 h uveče na poziciji određenoj koordinatama: 44.8246°N 20.4581°E).

III – biljke su uzgajane u LED režimu (24 sata).

IV – biljke su uzgajane u kombinovanom režimu LED (režim III) i dnevne svetlosti (režim II).

Eksperimentalni podaci su prikupljeni dve nedelje i ponovljeni 3 puta u potpuno istim uslovima.

Na kraju eksperimenta prijupljeni su uzorci biljnog materijala. Pigmenti su ekstrahovani iz 100 mg smrznutog biljnog materijala čuvanog u 96 % etanolu a apsorbanca ovog ekstrakta je merena pomoću UV-VIS spektrofotometra na tri talasne dužine: 470 nm, 648 nm i 664 nm.

Koncentracija pigmenata (hlorofili i karotenoidi) kvantitativno je određena preko Lihtentalerove (Lichtenthaler) jednačine [40]:

$$C_{(a+b)} = 5.24 A_{664} + 22.24 A_{648} \quad (8.1)$$

za ukupan sadržaj hlorofila.

Za hlorofil a i hlorofil b date su sledeće jednačine, respektivno:

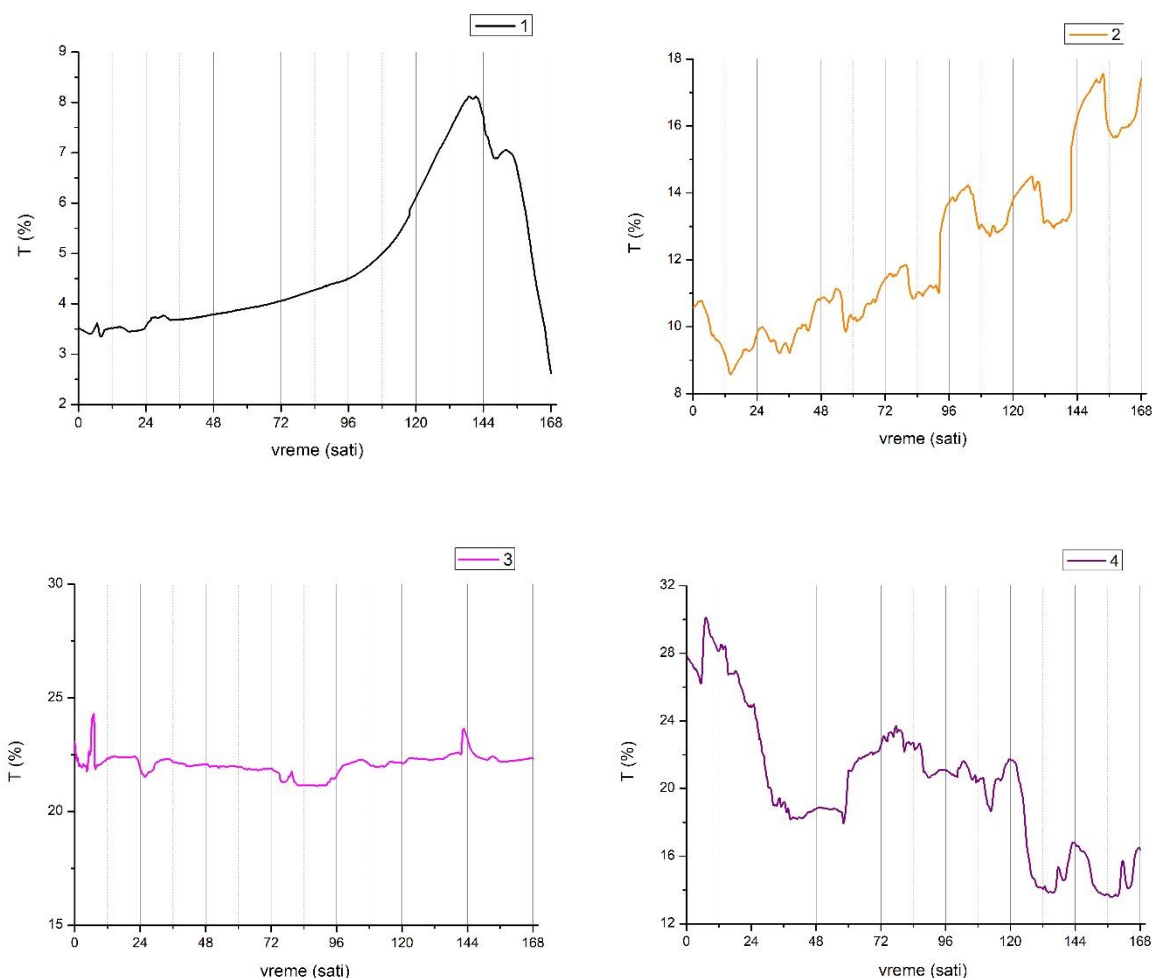
$$C_a = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{648} \quad (8.2)$$

$$C_b = 27.43 A_{648} - 8.12 A_{664} \quad (8.3)$$

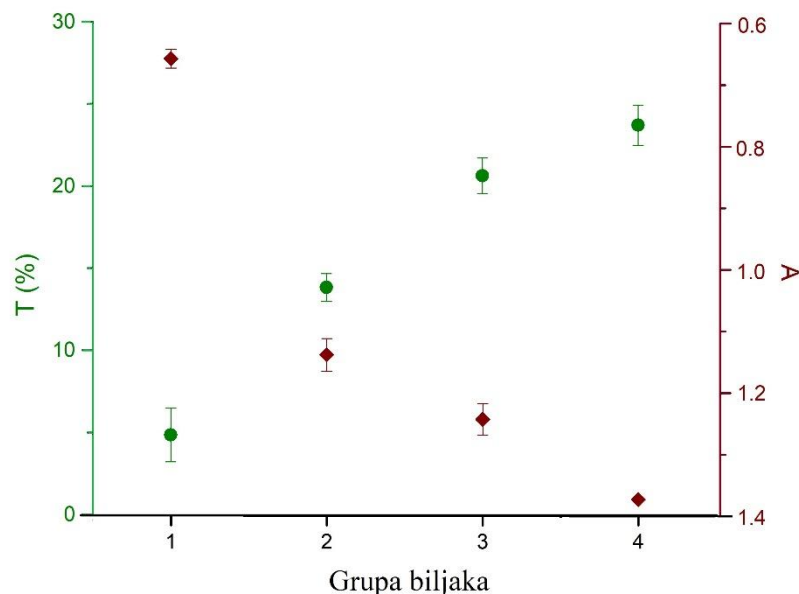
Za ukupni sadržaj karotenoida:

$$C_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 2.13 C_a - 97.64 C_b) / 209 \quad (8.4)$$

Na slici 8.1. su prikazane vrednosti koeficijenta optičke transmisije u funkciji vremena u vremenskom intervalu od 7 dana za sve četiri grupe biljaka.



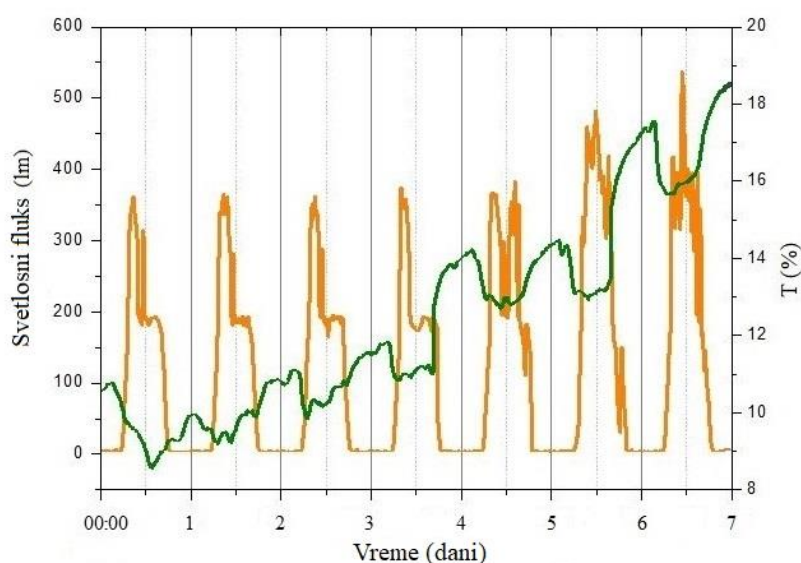
Slika 8.1. Zavisnost optičke transmisije T(%) u funkciji od vremena (počev od ponoći) za grupe 1-4 respektivno [55]



Slika 8.2. Srednje vrednosti koeficijenta apsorbance (crvena skala) i koeficijent transmisije (zelena skala) za sve 4 grupe biljaka [55]

Najveća vrednost apsorbance dobijena je za I grupu biljaka (uzgajanu u mraku). Ista grupa biljaka imala je najnižu vrednost koeficijenta transmisije. Zanimljiva je vrednost porasta transmisije šestog dana, koja ukazuje da je biljka izgubila sposobnost oporavka i da je nastupila ćelijska smrt.

Grupa II pokazuje jasno definisan Cirakadijumski ritam (slika 8.3.), na kom se vidi da je vrednost koeficijenta transmisije najniža u podne, a najviša u ponoć. Ovo može da se objasni aktivnošću fotosintetičkih pigmenata [60]. Nasuprot tome, najveća vrednost apsorbance je dobijena u podne, a tada je fotosintetski proces najintenzivniji. Na slici 8.3. se jasno vidi da je u periodima redukovane osvetljenja (popodne, na primer) transmisija u porastu što ukazuje da, tokom sedmodnevnog snimanja, porast transmisionog koeficijenta indicira starenje lista, odnosno stvaranje manje količine hlorofila.



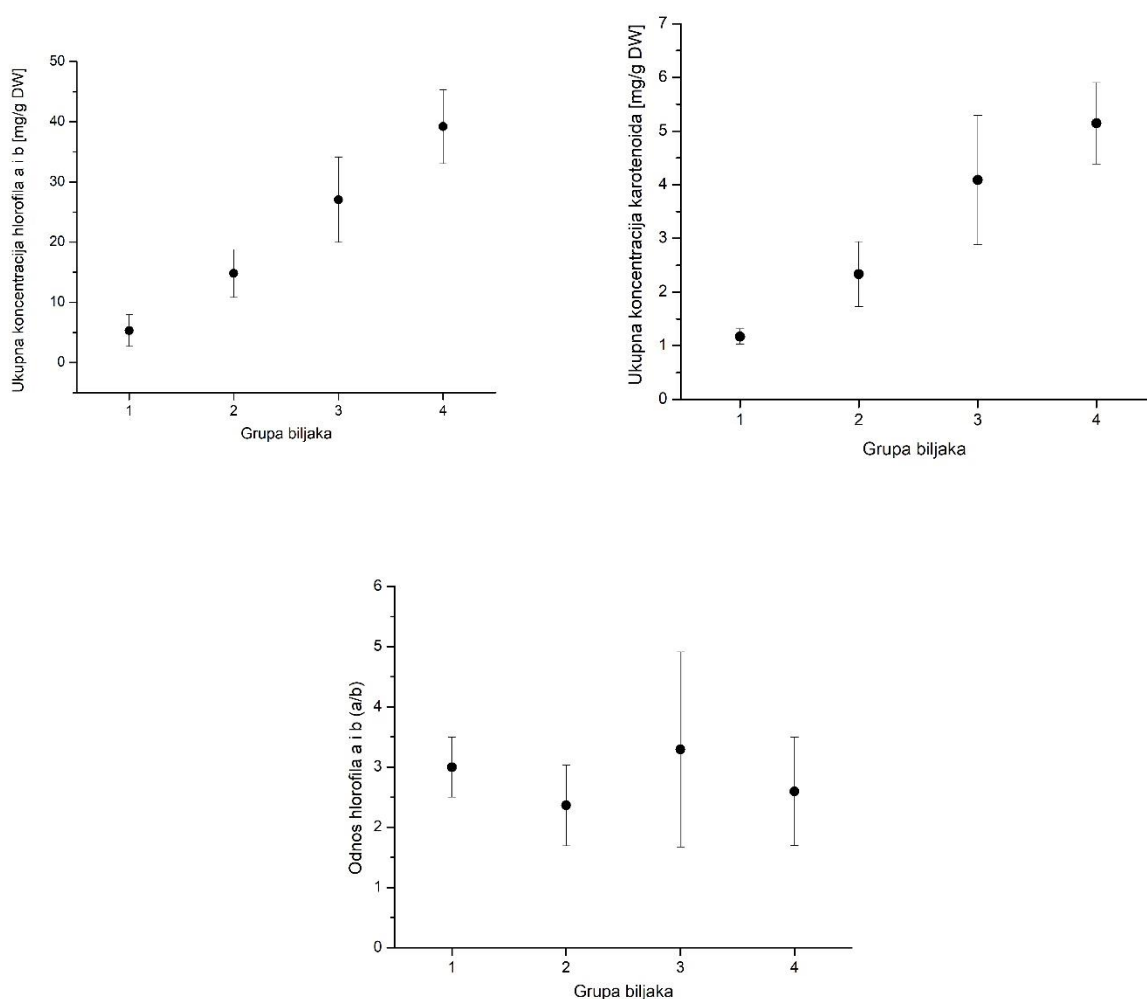
Slika 8.3. Vrednost svetlosnog fluksa (narandžasta linija) i koeficijenta transmisije (zelena linija) u funkciji od vremena za grupu broj II koja je gajena u režimu dnevne svetlosti [55]

Apsorbanca III grupe bila je niža u odnosu na grupu II, a jedan od razloga ovako niske vrednosti može da bude spektralna raspodela LED panela korišćenog za osvetljavanje ove grupe biljaka, koja je sigurno u potpunosti odgovarala apsorpcionim maksimumima fotosintetičkih pigmenata.

Vrednost apsorbance je bila najniža za grupu IV (kombinovana LED i dnevna svetlost). Najrealnije objašnjenje je da su biljke bile previše izložene svetlu, tj. da je fotosintetski sistem bio prezasićen svetlošću [62].

Nasuprot opadanju vrednosti apsorbance od grupe I do grupe IV, vrednosti koeficijenta transmisije rastu po grupama, respektivno (Slika 8.2.). Drugim rečima, grupa IV propustila je najviše svetlosti, odnosno apsorbovala je najmanje svetlost zbog prezasićenosti fotosintetičkog sistema.

Izmerene vrednosti fotosintetičkih pigmenata date su na slici 8.4.



Slika 8.4. Koncentracija ukupnog hlorofila a i b, karotenoida i odnos hlorofila a i b

Najveća vrednost koncentracije hlorofila dobijena je kod biljaka koje su bile izložene LED i dnevnom režimu osvetljenja (IV grupa), dok je za biljke koje su rasle u režimu mraka bila najniža. Vrednosti koncentracije karotenoida, u potpunosti prate vrednosti koncentracije hlorofila, a rezultati se slažu sa

podacima koji su dobijeni u drugim radovima [41, 42, 45]. Ukupna koncentracija hlorofila raste kod biljaka koje su bile izložene dnevnom režimu (II grupa) i režimu LED (III grupa), a vrednosti su višestruko veće nego za grupu I. Odnos hlorofila a/b za IV grupu je najniži, što pokazuje da je ova grupa bila izložena stresnim uslovima (kombinovana LED i dnevna svetlost) [39]. Za grupe II i III ovaj odnos je isti, što je zanimljivo u poređenju sa činjenicom da je ukupni hlorofilni sadržaj za grupu III duplo veći od hlorofilnog sadržaja grupe II. LED osvetljenje je u velikoj meri odgovaralo III grupi.

Biljke *P. Vulgaris* su rasle u pažljivo izabranim eksperimentalnim uslovima. Došlo je do slaganja izmerenih vrednosti koeficijenata optičke transmisije i koncentracija fotosintetičkih parametara. Po prvi put su snimljeni pravilni Cirkadijumske ritmovi koji nikada pre nisu izmereni optičkom metodom.

Na osnovu dobijenih rezultata došlo se do zaključka da predstavljena nedestruktivna optička metoda koja meri koeficijente optičke transmisije na osnovu oblika grafika cirkadijuskog ritma, može da prati stanje i zdravlje biljaka. Ovim dokazom koncepta otvorena su vrata ovoj metodi za merenje širokog spektra bioloških fenomena.

8. 2. Detekcija nutritivnog stresa hidroponski gajenih biljaka

8.2.1. Uvod

Bosiljak je lekovita biljka, bogata antioksidansima i fenolnim jedinjenjima, sa jakim antioksidativnim, antikancerogenim i antibakterijskim svojstvima [63]. Dobro je prilagođen hidroponskom režimu gajenja biljaka i sistemima poljoprivrede sa kontrolisanom okolinom [64]. Optimalno snabdevanje hranljivim materijama, tokom rasta i razvoja biljke u hidroponskom sistemu je od najveće važnosti za karakteristike kvaliteta biljke (hranljiva vrednost, koncentracija bioaktivnih jedinjenja, biomasa, itd.). Makronutrijenti i mikronutrijenti su neophodni za održavanje optimalnog rasta i zdravlja biljke. Na primer tačno određena koncentracija nutrijenta Fe je ključna za antibakterijska svojstva biljke [65].

Hidroponsko gajenje biljaka je tehnika bez zemlje koja je dizajnirana tako da izloži korenje biljaka direktno hranljivom rastvoru. Koncentracija hranljivih materija se održava u okviru određenih granica svih esencijalnih elemenata. Visoke koncentracije ispoljavaju toksičnost, dok malo snabdevanje hranljivim materijama dovodi do simptoma nedostatka. Kada se pojave simptomi (usporen rast i specifični simptomi na listovima, kao što su različiti oblici hloroza i nekroza) obično je prekasno za korekciju koncentracije i pH vrednost i to je razlog zašto je važno održavati odgovarajuću homeostazu (ravnotežu) jona tokom biljne proizvodnje u hidroponskim sistemima [66].

Gvožđe je, na primer, važan deo u respiratornom i sistemu transporta elektrona biljke i učestvuje u biosintezi hlorofila. Dok niska koncentracija gvožđa može ozbiljno uticati na rast biljaka [67]. U višim koncentracijama može biti štetno, stvarajući neravnotežu između oksidanata i antioksidanata putem Fentonove reakcije [68] izazivajući oštećenje ćelija. Kada biljci nedostaje gvožđa, jedna od vidljivih posledica je hloroza. Međutim, mnogo pre početka hloroze, biljka je već doživela značajan nutritivni stres.

Imajući u vidu sve izloženo, za test biljku narednog eksperimenta uzet je *Ocimum Basilicum* [69]. Biljke su podeljene u grupe, tako što je svakoj od grupa isključen jedan od esencijalnih elemenata iz hidroponskog rastvora (Fe, Mg, P, N). Kontrolna grupa je takođe gajena pod istim ambijentalnim

uslovima, osim tim što je rasla u kompletno balansiranom hranljivom rastvoru. Da bi se pokazala efikasnost ove optičko nedestruktivne metode, stanje biljke procenjeno je i drugim uobičajenim metodama, kao što je određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata (destruktivna) i merenje efikasnosti fotosistema (nedestruktivna).

Eksperimentalna postavka obuhvatala je 18 mernih mesta, planiranih za 6 grupa po 3, na preostala dva slobodna mesta, postavljeni su neutralni filtri radi kontrole stabilnosti sistema.

Grupe biljaka:

Grupa I: Biljke su rasle u kompletnom hranljivom rastvoru (C).

Grupa II: Biljke su rasle u rastvoru bez Fe (-Fe).

Grupa III: Biljke su rasle u rastvoru bez Mg (-Mg).

Grupa IV: Biljke su rasle u rastvoru bez P (-P).

Grupa V: Biljke su rasle u rastvoru bez N (-N).

Grupa VI: Biljke su rasle u tretmanu gladovanja (hranljivi) (E)

Radi lakše zamene hranljivog rastvora bez pomeranja biljaka i ograničenja prodiranja svetlosti u području korena, konstruisani su odgovarajuće saksije. Ručno radjene saksije od stirodura presvučene su aluminijumom i svaka od njih sadržala je grupu od 3 biljke. (Slika 8.5.)



Slika 8.5. Šematski prikaz saksije gde je gajen *Ocimum Basilium* [69]

Biljke bosiljka su uzgajane iz komercijalno dobijenog semena. Seme je klijalo na vlažnom filter papiru na 25 °C. Kada su se razvili prvi listovi, prenete su na jači modifikovani hranljivi rastvor. Konačne koncentracije soli u hranljivom rastvoru bile su (izražene u mmolL⁻¹): 0.35 K₂SO₄, 0.05 KCl, 1.00 Ca (NO₃)₂, 0.25 MgSO₄, 0.05 KH₂PO₄; i u μmol L⁻¹: 5.00 H₃BO₃, 0.25 MnSO₄, 0.25 ZnSO₄, 0.1 CuSO₄, 0.005 (NH₄)₆Mo₇O₂₄, i 20.00 Fe^{III}EDTA.

Biljke su rasle u hranljivim rastvorima sa kontinualnom aeracijom. Posle 4 nedelje u kompletnim rastvorima, biljke su prenete u sudove zapremine 1 L (jedna biljka po sudu) i tada su smeštene na merna mesta opisanog mernog sistema (3 merna mesta po grupi biljka).

U ovoj fazi istraživanja počinje praćenje optičkih svojstava listova biljaka. Hranljivi rastvori su menjani na svaka 3 dana. Vrednosti optičke transmisije su beležene u vremenskim intervalima od 15 minuta u trajanju 9 dana. Za svaku biljku odabran je treći list odozgo za snimanje optičkih

karakteristika. U toku merenja na osnovu oblika cirkadijumakog ritma, počinje da se primećuje nedostatak određenih hranljivih materija za svaku grupu ponaosob.



Slika 8.6. Biljka *Ocimum Basilium* [69]

8.2.2. Određivanje efikasnosti fotosistema II

Na kraju eksperimenta, efikasnost fotosistema II procenjena je parametrima fluorescencije hlorofila koja ukazuje na to da li postoji uticaj faktora stresa okoline na fotosintezu. Da bi se utvrdili efekti stresa zbog nedostatka hranljivih materija na fotosintetske elemente, korišćeni su parametri: minimalna (F_0) i maksimalna (F_m) fluorescencija nakon 30 min perioda adaptacije na tamu i fotosintetička efikasnost PSII ($F_0 - F_m$) / F_m (F_v / F_m). Podaci su prikupljeni mernim uređajem FluorPenFP 110. Hlorofil je pobuđivan svetlosnim impulsom (u trajanju od 2 do 5 s), sa gustinom fluksa fotona od $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Merenja su izvršena 4h nakon početka fotoperioda u komori. Osamnaest biljaka je analizirano merenjem parametara u 9 kanala na tri tretirane biljke, na potpuno razvijenom 3. i 2. listu sa vrha.

8.2.3. Određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata

Sadržaj fotosintetičkih pigmenata određen je spektrofotometrijski u ekstraktima acetonskih pigmenata listova (mlađi, potpuno razvijeni listovi, sa vrha). Sveža masa lista (FW) od 1 g je homogenizovana u 10 ml acetona. Da bi se sprečilo zakiseljavanje rastvora, dodata je mala količina MgCO_3 . Posle homogenizacije sadržaj je filtriran kroz stakleni filter. Ekstrakti pigmenata su kvantitativno prebačeni u volumetrijske boce od 25 ml i razblaženi acetonom. Apsorpcije ekstrakata su očitane na spektrofotometru (Thermo, Tipe evaluation 300 UV-Vis Spectrophotometer) na talasnim dužinama od 662 nm, 644 nm i 440 nm. Koncentracija hlorofila a, hlorofila b i ukupnih karotenoida su izračunati prema Wettstein formuli izražene u $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW).

8.2.4. Određivanje težine izdanaka i korena

Posle tretmana, biljke su osušene na 70 °C do konstantne mase. Izmerena je suva masa izdanaka i korena (DW) po biljci (g) i izračunat je odnos koren/izdanak.

8.2.5. Statistička analiza

Podaci su obrađeni analizom varijanse (ANOVA) korišćenjem statističkog softvera Statistica 6 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Određene su srednje i standardne greške (SE) za procenjene parametre. Za poređenje vrednosti aritmetičkih sredina grupa korišćen je Fišerov LSD test.

8.2.6. Rezultati

Na slikama 8.7. (a-e) prikazane su vrednosti koeficijenata transmisije u procentima u funkciji vremena za kontrolnu grupu u poređenju sa ostalih 5 grupa. Vremenski interval koji je obuhvaćen grafikom je 9 dana, počev od prvog dana nakon prve promene hranljivog rastvora. Vrednosti optičke transmisije i refleksije su merene na svakih 15 minuta [55].

Svih šest grupa pokazuju jasno definisane danonoćne cirkadijumske ritmove sa delimičnim promenama u vrednostima koeficijenata transmisije. Radi adekvatnijeg poređenja pojedinačnih signala, analizirane su samo relativne promene vrednosti optičke transmisije. Razlika u procentualnoj vrednosti koeficijenata optičke transmisije zavisi od debljine lista i ugla lista u odnosu na svetlovod.

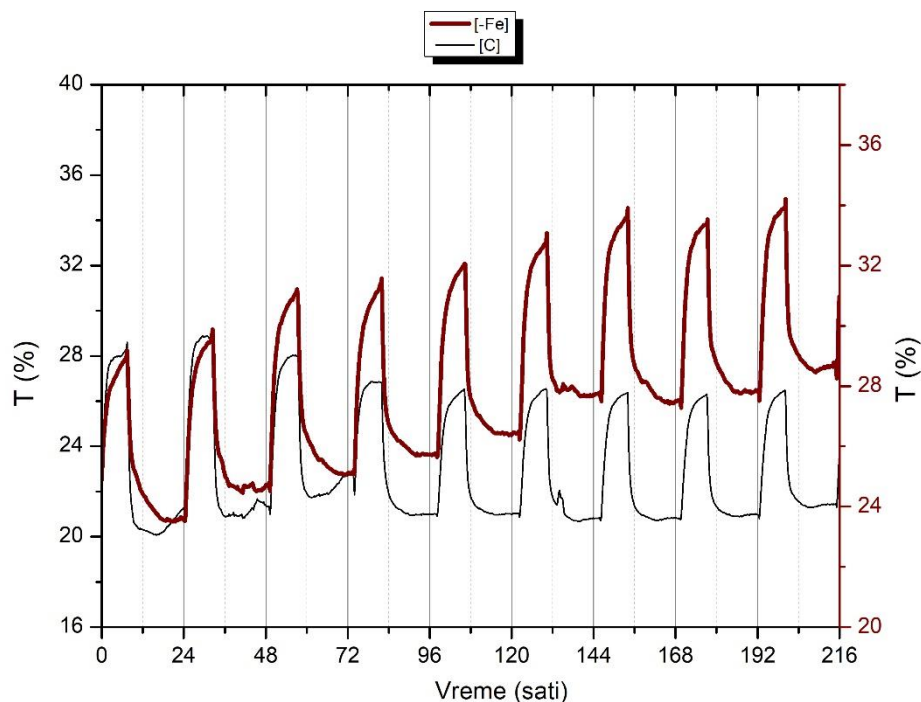
Cirkadijumski ritam svake grupe je periodina funkcija koja može da se opiše dvema funkcijama: dnevni lokalni minimum (linearna) i dnevni lokalni maksimum (trigonometrijska funkcija sa određenom promenom amplitude).

Kontrolna grupa [C] pokazuje spororastuću funkciju sa konstantnim vrednostima dnevnog lokalnog minimuma (bazna linija) i dnevnog lokalnog maksimuma sa konstantnom dnevno-noćnom amplitudom. Vrednost se menjala od 20 % (tokom dana) do 28 % tokom noći. Devet dana nakon tretmana, vrednosti funkcija ostale su konstantne.

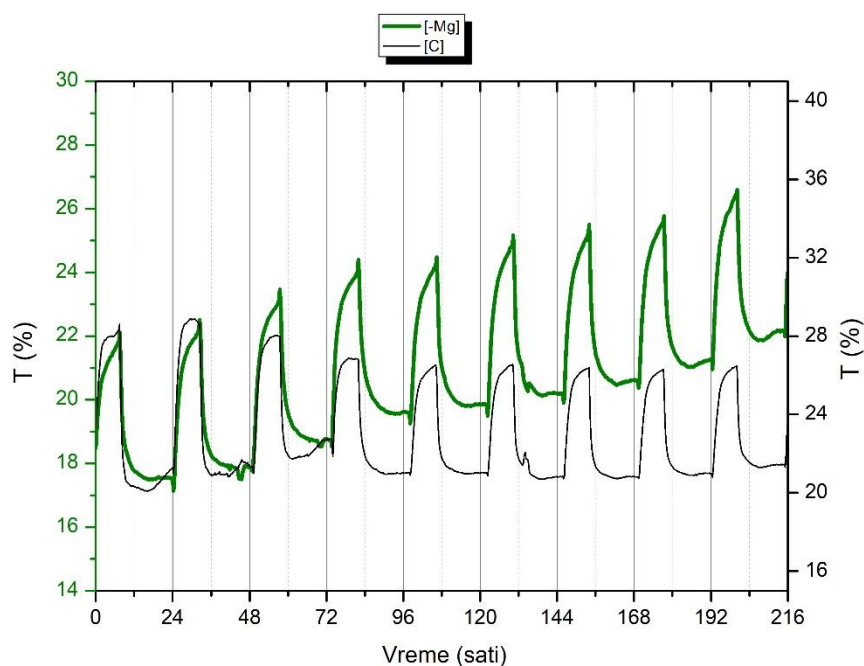
Na slici 8.7.a) prikazane su promene koeficijenata transmisije u funkciji vremena za drugu grupu [-Fe] u poređenju sa kontrolnom grupom [C]. Trećeg dana nakon prve promene hranljivog rastvora,

dnevni lokalni minimum ukazuje na sporo rastuću funkciju sa linearnim porastom. Devet dana nakon tretmana, amplitude dnevnog lokalnog maksimuma ostale su konstantne, ali je vrednost lokalnog minimuma porasla 16% u poređenju sa vrednostima prvog dana.

Treća grupa [-Mg] je upoređena sa [C] (Slika 8.7.b)). Trećeg dana nakon tretmana, dnevni lokalni minimum pokazuje linearni porast u odnosu na baznu funkciju. Devet dana nakon tretmana, amplitude lokalnog maksimuma ostale su konstantne, ali je vrednost lokalnog minimuma porasla za 20 % u poređenju sa vrednostima prvog dana.



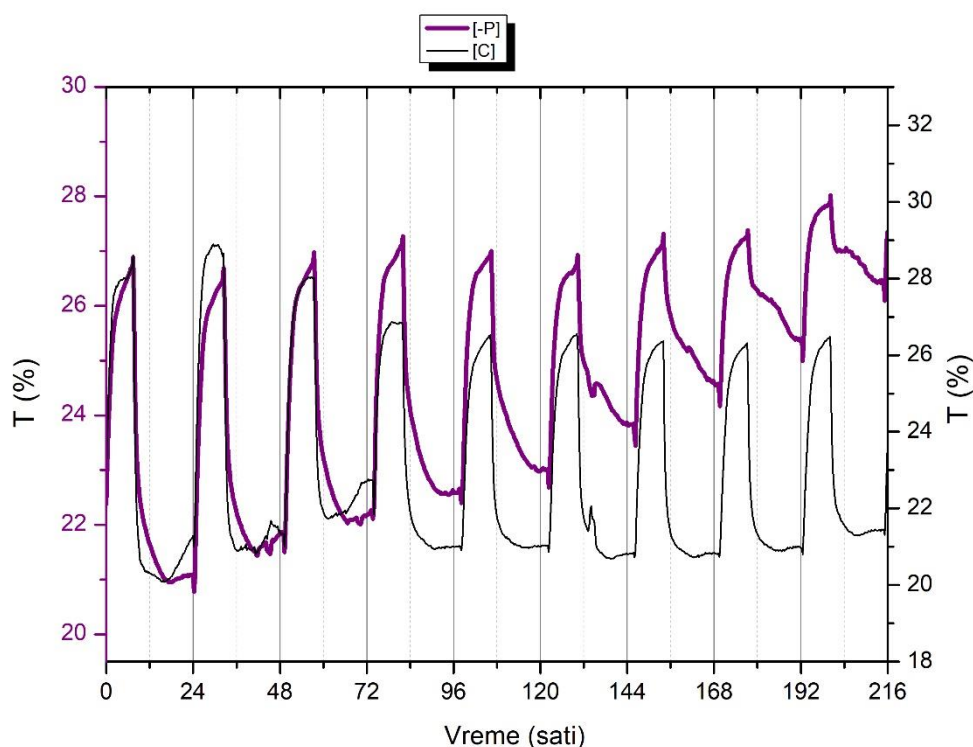
Slika 8.7. a) Varijacija propusnosti T (%) u funkciji vremena u danima (počevši od ponoći) grupa I (kontrolna grupa) - crna, i grupa II nedostatak [-Fe] – bordo boja [69]



Slika 8.7. b) Varijacija propusnosti T (%) u funkciji vremena u danima (počevši od ponoći) grupa I (kontrolna grupa) - crna, i grupa II nedostatak [-Mg] – zelena boja [69]

Na slici 8.7. c) su prikazane vrednosti koeficijenta optičke transmisije u vremenu za grupu [-P] koja je takođe upoređena sa kontrolnom grupom. Četvrti dan nakon tretmana, dnevni lokalni minimum pokazuje linearni porast, s druge strane, amplituda dnevnog lokalnog maksimuma opada 1.5 puta. Devet dana nakon tretmana, amplituda dnevnog lokalnog maksimuma poraste 3 puta, dok se dnevni lokalni minimum promeni za 23% u poređenju sa vrednostima prvog dana.

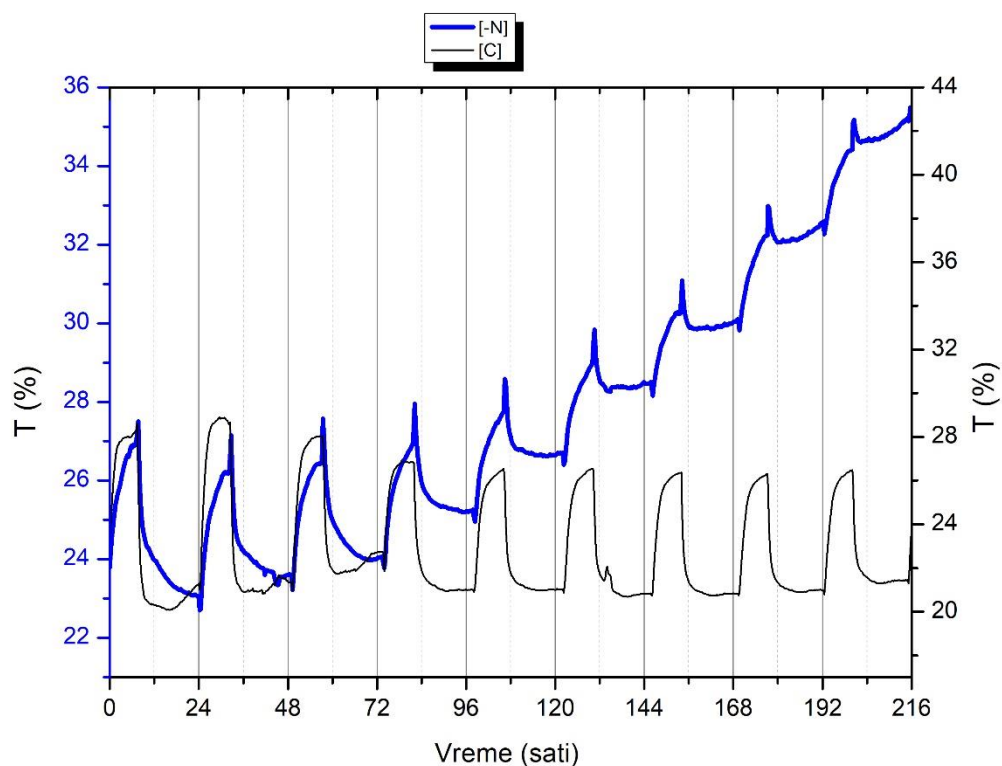
Peta grupa [-N] upoređena sa [C] pokazuje vrednosti prikazane na slici 8.7.d). Drugog dana nakon tretmana dnevni lokalni minimum pokazuje sporo rastuću linearnu funkciju, a već četvrtog dana nakon tretmana dnevni lokalni minimum prelazi u brzorastuću funkciju sa značajnom promenom vrednosti amplitude dnevnog lokalnog maksimuma. Devet dana nakon tretmana, amplituda je opala čak tri puta, dok je vrednost dnevnog lokalnog minimuma porasla za 23% u poređenju sa prvim danom.



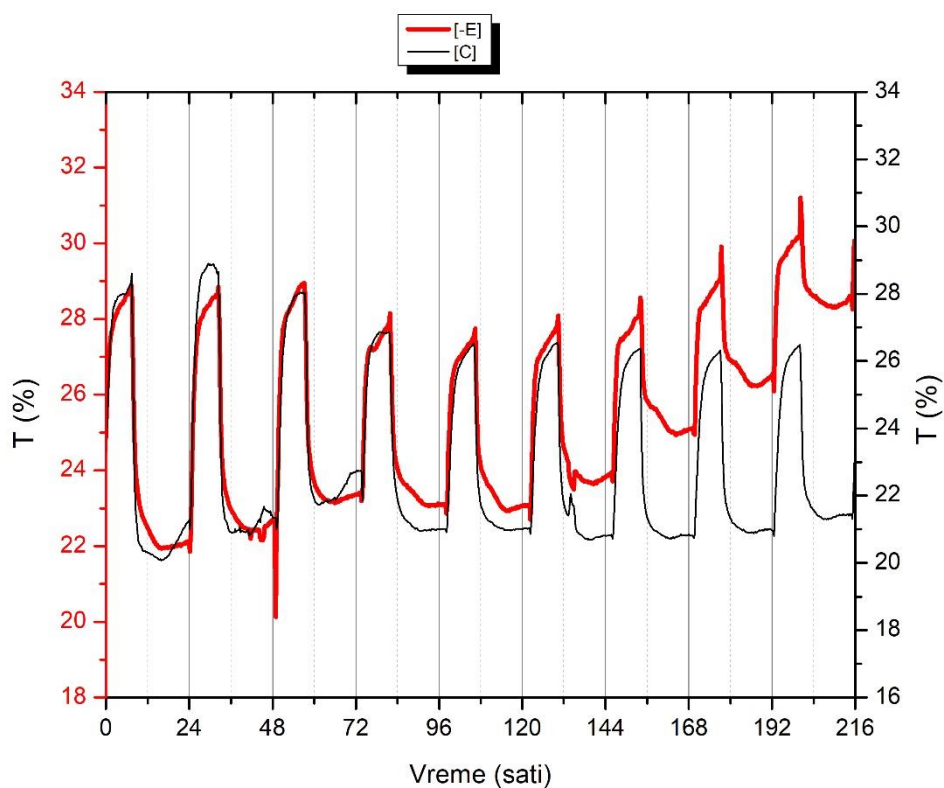
Slika 8.7. c) Varijacija propusnosti T (%) u funkciji vremena u danima (počevši od ponoći) grupa I (kontrolna grupa) - crna, i grupa II nedostatak [-P] - ljubičasta boja [69]

Šesta grupa [-E] (tretman gladovanja nutrijentima) je takođe upoređena sa [-C] a rezultati su prikazani na slici 8.7.e). Trećeg dana nakon početka tretmana funkcija dnevnog lokalnog minimuma pokazuje sporo rastuću linearnu funkciju sa приметnom promenom amplitude dnevnog lokalnog maksimuma. Devet dana nakon tretmana vrednosti koeficijenta transmisije se promeni za 21%, dok se amplituda dnevnog lokalnog maksimuma promeni dva puta, u poređenju sa prvim danom.

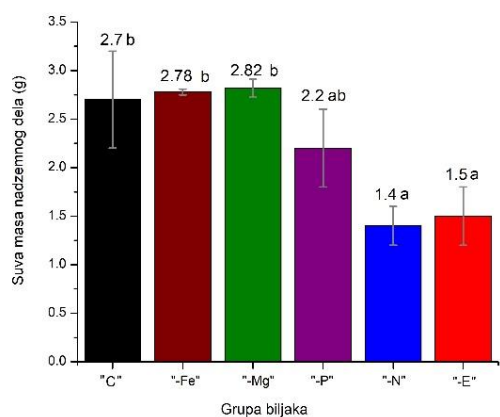
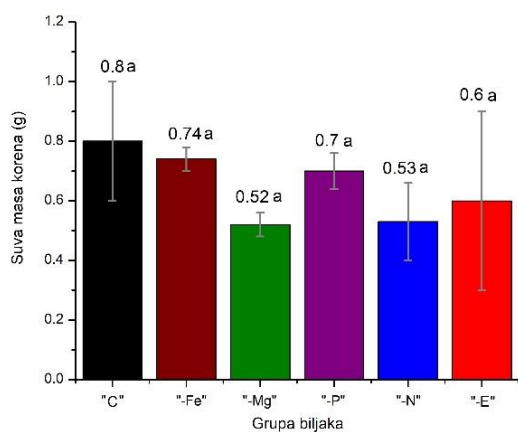
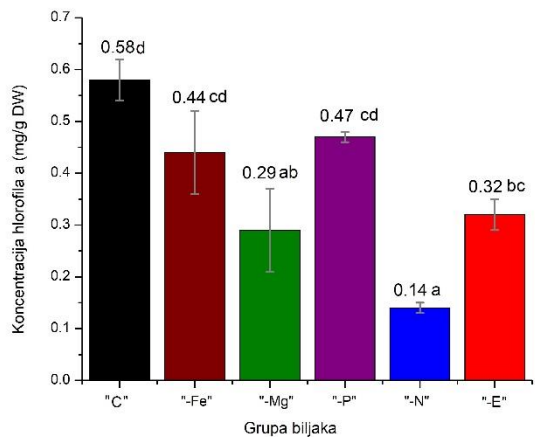
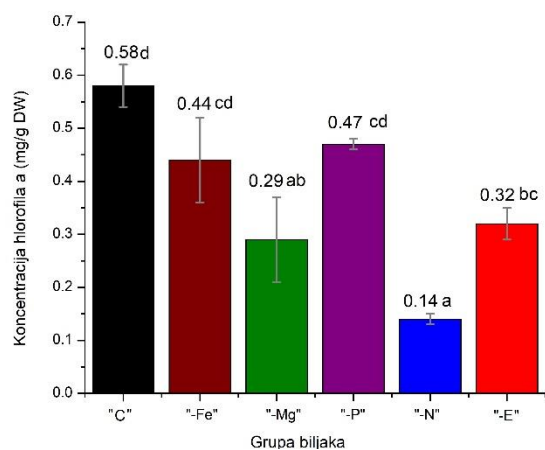
U našem eksperimentu koncentracije hlorofila-**a** i hlorofila-**b** su se posebno smanjile u tretmanima [-N], [-Mg] i [-P], 9 dana nakon izgladnjivanja specifičnim hranljivim materijama. Ovo je jasan pokazatelj uočenog nutritivnog stresa. Tretmani [-E] i [-Fe] nisu pokazali statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolnim biljkama (tabela 1 i slike 8.8. a-d). Koncentracija karotenoida značajno je smanjena samo u listovima iz grupa [-N] i [-Mg] (tabela 8.1 i slika 8.8.d))



Slika 8.7. d) Varijacija propusnosti T (%) u funkciji vremena u danima (počevši od ponoći) grupa I (kontrolna grupa) - crna, i grupa II nedostatak [-N] – plava [69]

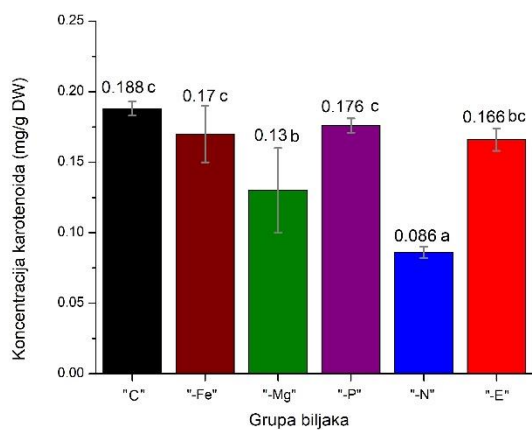
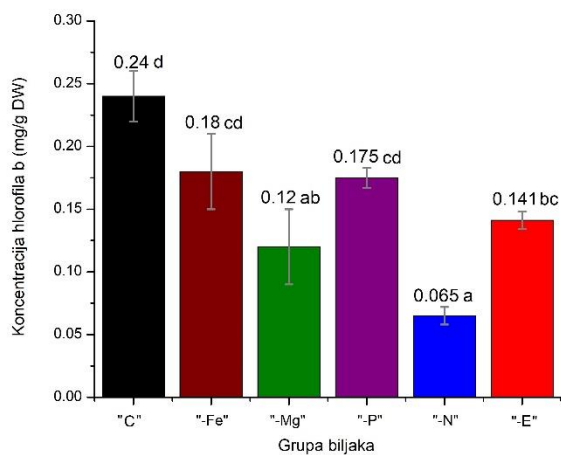


Slika 8.7. e) Varijacija propusnosti T (%) u funkciji vremena u danima (počevši od ponoći) grupa I (kontrolna grupa) - crna, i grupa II nedostatak [-E] - crvena boja [69]



Slika 8.8. Sadržaj fotosintetičkog pigmenta: srednje vrednosti i standardne greške. Sadržaj hlorofila a + b, sadržaj hlorofila a, sadržaj hlorofila b, sadržaj karotenoida.

Slovo u srednjoj vrednosti označava statistički značajnu razliku u koncentraciji pigmenta u poređenju sa kontrolom pri $P < 0,05$. [69]



Slika 8.9. Suva masa korena i izdanaka: srednje vrednosti i standardne greške. [69]

Tabela 8.1. Koncentracija fotosintetičkog pigmenta: srednje vrednosti i standardne greške. [69]

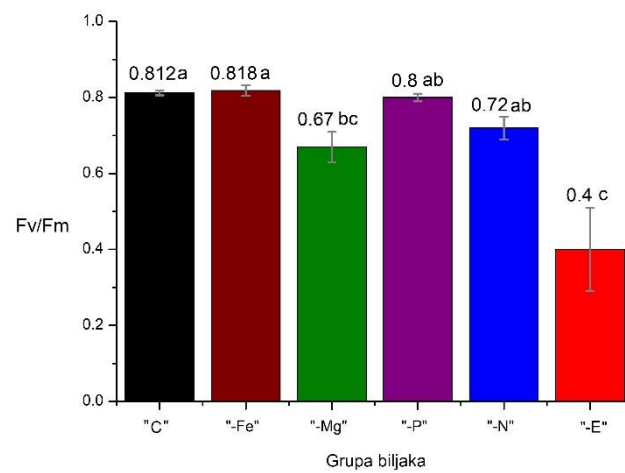
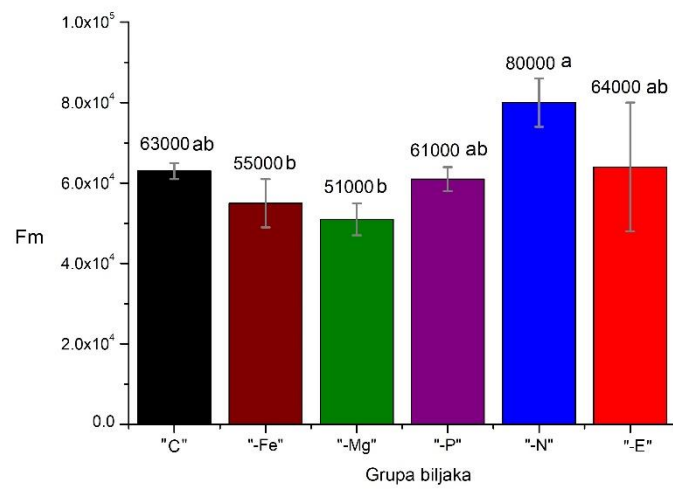
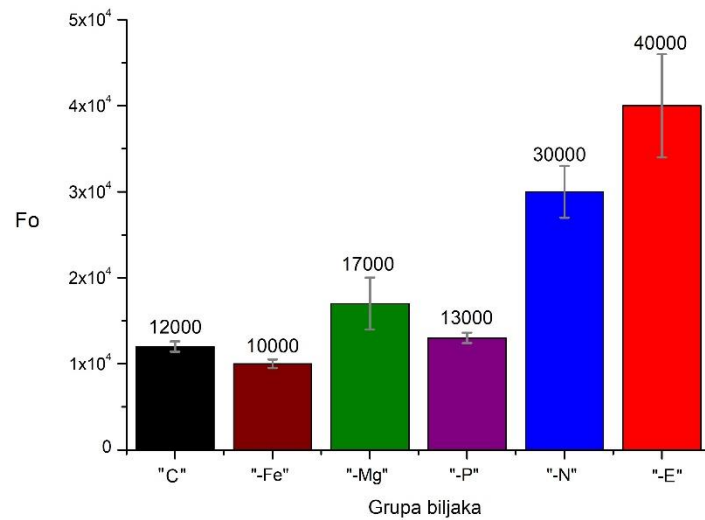
Grupa biljaka	Hlorofil a [mg/g]	Hlorofil b [mg/g]	Hlorofil a+b [mg/g]	Karotenoidi [mg/g]
[C]	(0.58±0.04)d	(0.24±0.02)d	(0.81±0.06)d	(0.188±0.005)d
[-Fe]	(0.44±0.08)cd	(0.18±0.03)cd	(0.62±0.11)cd	(0.17±0.02)c
[-Mg]	(0.29±0.08)ab	(0.12±0.03)ab	(0.40±0.11)ab	(0.13±0.03)b
[-P]	(0.47±0.01)cd	(0.175±0.008)c	(0.644±0.013)cd	(0.176±0.005)c
[-N]	(0.14±0.01)a	(0.065±0.007)a	(0.206±0.014)a	(0.086±0.004)a
[-E]	(0.32±0.03)bc	(0.141±0.007)bc	(0.46±0.04)bc	(0.166±0.008)bc

Suva masa (DW) izdanaka značajno se smanjila u [-N] i [-E] grupama. Suva masa (DW) korena značajno je smanjena u grupama [-N], [-Mg] i [-E]. U svim ostalim tretmanima primećeno je samo blago smanjenje DW (Tabela 8.2, Slika 8.9. a-b).

Tabela 8.2. Suva masa korena i izdanaka: srednje vrednosti i standardne greške [69].

Grupa biljaka	DW±ΔDW	DW±ΔDW
	[g]	[g]
	nadzemni deo	koren
[C] (control)	(2.7±0.5)b	(0.8±0.2)a
[-Fe]	(2.78±0.03)b	(0.74±0.04)a
[-Mg]	(2.82±0.09)b	(0.52±0.04)a
[-P]	(2.2±0.4)ab	(0.70 ± 0.06)a
[-N]	(1.4±0.2)a	(0.53±0.13)a
[-E] (exhausted)	(1.5±0.2)a	(0.6±0.3)a

Smanjenje DW primećeno je samo kod listova sa izraženom horozom. U našem eksperimentu parametri fluorescencije: minimum (*Fo*) i maksimum (*Fm*) i fotosintetička efikasnost (*Fv/Fm*) (tabela 8.3, slike 8.10. a-c) ukazuju na nutritivni stres u [-N], [-Mg] i [-E] tretmani (slika 8.7.b)). U ovim tretmanima vrednost je bila najniža kod „iscrpljenih biljaka“ (0,39) što ukazuje na veoma nisku aktivnost fotosistema II listova prilagođenih tami. Tretmani [-P] i [-Fe] su bili u istoj homogenoj grupi sa kontrolom (*Fv / Fm* od 0,80 do 0,82) što ukazuje da aktivnost fotosistema II nije bila značajno pogođena (Slika 8.10.b)).



Slika 8.10. Parametri F_o , F_m i F_v / F_m : srednje vrednosti i standardne greške. [69]

Tabela 8.3. Parametri Fo, Fm i Fv / Fm: srednje vrednosti i standardne greške.

Grupa biljaka	$(F_o \pm \Delta F_o) \cdot 10^3$	$(F_m \pm \Delta F_m) \cdot 10^4$	$(\frac{F_v}{F_m} \pm \Delta \frac{F_v}{F_m}) \cdot 10^{-1}$
[C]	(12.0±0.6)	(63.0±0.2)ab	(812.0 ± 6.0)a
[-Fe]	(10.0±0.5)	(55.0±0.6)b	(818.0 ± 14.0)a
[-Mg]	(17.0±0.3)	(51.0±0.4)b	(6.7±0.4)bc
[-P]	(13.0±0.6)	(61.0±0.3)ab	(8.0±0.1)ab
[-N]	(300.0±3.0)	(80.0±0.6)a	(7.2±0.3)ab
[-E]	(400.0±6.0)	(64.0±1.6)ab	(4.0±1.1)c

8.2.7. Diskusija dobijenih rezultata

Analiza hranljivih materija u biljkama podrazumeva destruktivnu proceduru potrebnu za procenu statusa nutrijenata. Zasniva se na hemijskim i histohemijskim metodama (analiza koncentracije) ili biohemijskim za procenu aktivnosti enzima. S druge strane, indirektne, nedestruktivne metode, zasnovane na florescenciji hlorofila, često nisu najbolji izbor, jer nedostatak hranljivih materija nije uvek povezan sa smanjenjem aktivnosti fotosistema II. Ovo je dobro dokumentovano za slučajeve nedostatka gvožđa i fosfora. Na primer, u eksperimentu na biljkama ječma sa nedostatkom P (*Hordeum vulgare*) kvantna efikasnost PSII (F_v/F_m) nije bila adekvatna da napravi razliku između tretmana i sve izmerene vrednosti dostigle su vrednosti bliske teorijskom maksimumu od 0,83 [70]. U istraživanju Moralesa [71], listovi sa nedostatkom Fe nisu pokazali smanjenje efikasnosti PSII nakon adaptacije na mrak, što se slaže sa našim rezultatima kvantne efikasnosti, međutim naši modifikovani grafici Cirkadijumskih ritmova ipak ukazuju na stres.

Dobijeni rezultati pokazuju da je efikasnost PSII listova *Ocimum basilicum* prilagođenih mraku dobar pokazatelj nutritivnog stresa za biljke izložene nedostatku azota i magnezijuma. Ovo zapažanje je u skladu sa prethodnim radom na različitim biljnim vrstama [72-75].

8.2.8. Zaključak

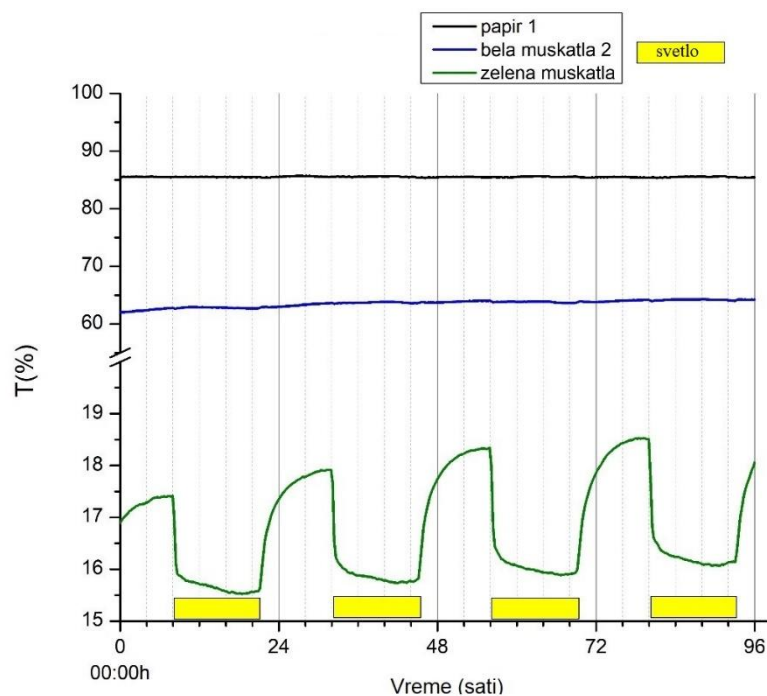
Prikazani rezultati su pokazali značajan potencijal predložene optičke metode za rano otkrivanje stresa biljaka pri hidroponskom gajenju. Razne biološke metode (kako destruktivne, tako i nedestruktivne) su upoređene sa rezultatima dobijenim novom optičkom metodom. U poređenju sa kontrolnom grupom, tretirane biljke su kroz novu metodu ukazale na modifikovane cirkadijalne ritmove, što nedvosmisleno ukazuje na prisutan

nutritivni stres. Štaviše, početak uočenih promena optičkog prenosa dešava se mnogo pre nego što se stres biljaka može uočiti tradicionalnijim metodama. Ovaj podatak omogućava ranu detekciju i prevenciju nedostatka nekog nutritijenta u hidroponski uzgajanim uslovima. Dodatna prednost opisane metode je činjenica da je nedestruktivna.

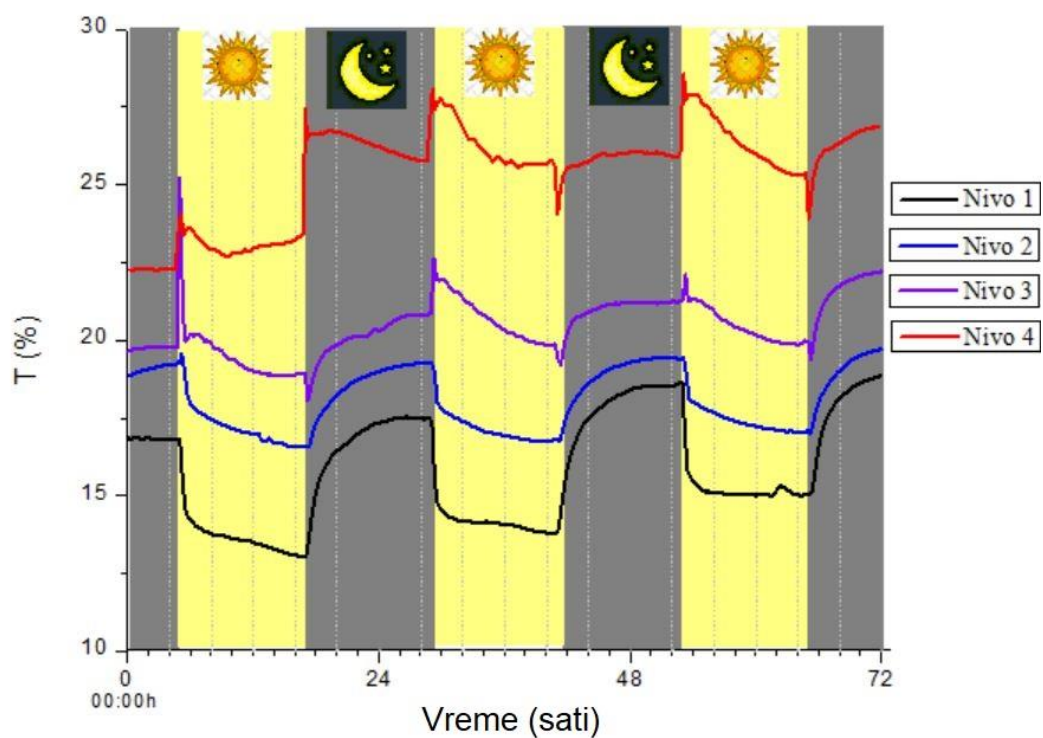
8.3. Reakcija biljaka na različitu jačinu svetla

Različitim biljnim vrstama odgovaraju drugačiji uslovi za najbolji rast i razvoj. Kao test biljka uzeta je Muškatla koja ima belu oblast na obodima zelenih listova. Za kontrolno merno mesto uzet je uzorak teflona, budući da ima konstantnu vrednost optičke transmisije bez obzira na jačinu zadatog osvetljenja. Dobijeni podaci su snimljeni na najmanjoj vrednosti dimovanog osvetljenja korišćenih led panela. Žuta polja na graficima predstavljaju oblasti kada je pajeno svetlo (slika 8.11).

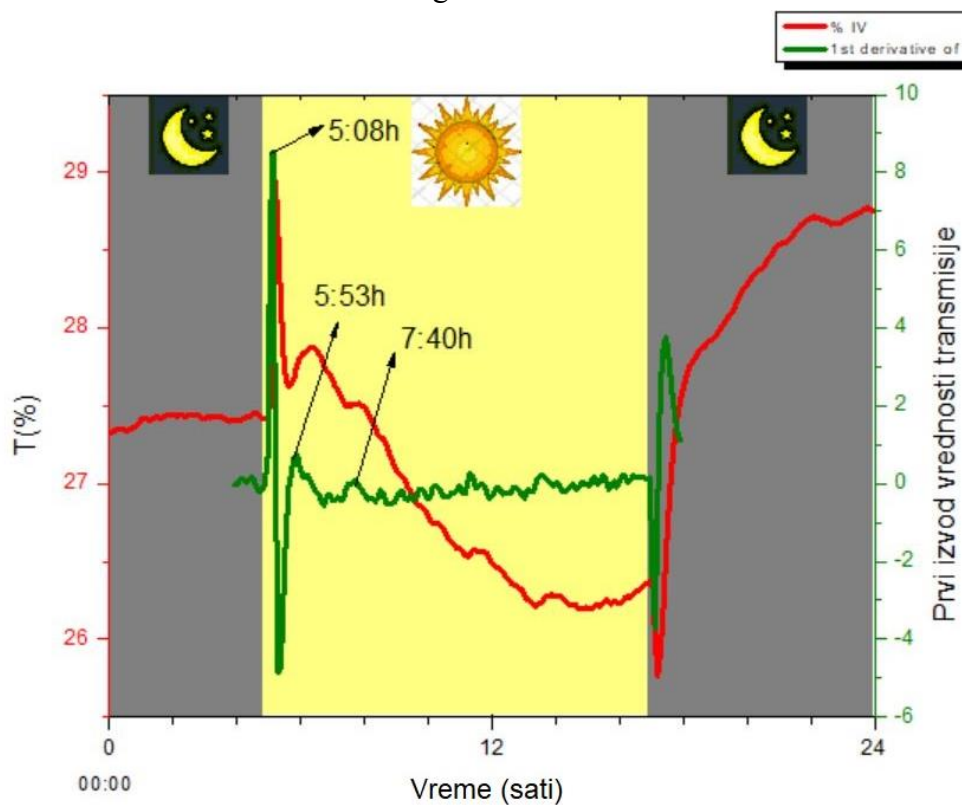
Pokazuje se da postoji neznatna razlika između vrednosti koeficijenata optičke transmisije bele površine zelenog lista muškatle i teflona, dok sa druge strane, zeleni deo lista pokazuje periodične Cirkadijumske ritmove. Zeleni deo lista različito reaguje na različite jačine osvetljenja panela (slika 8.12.). Pri jakom svetlu pojavljuje se „svetlosni šok” (slika 8.13.) koji predstavlja pojavu koja se trenutno ispituje.



Slika 8.11. Grafik zavisnosti vrednosti optičke transmisije teflona, zelenog i belog dela lista

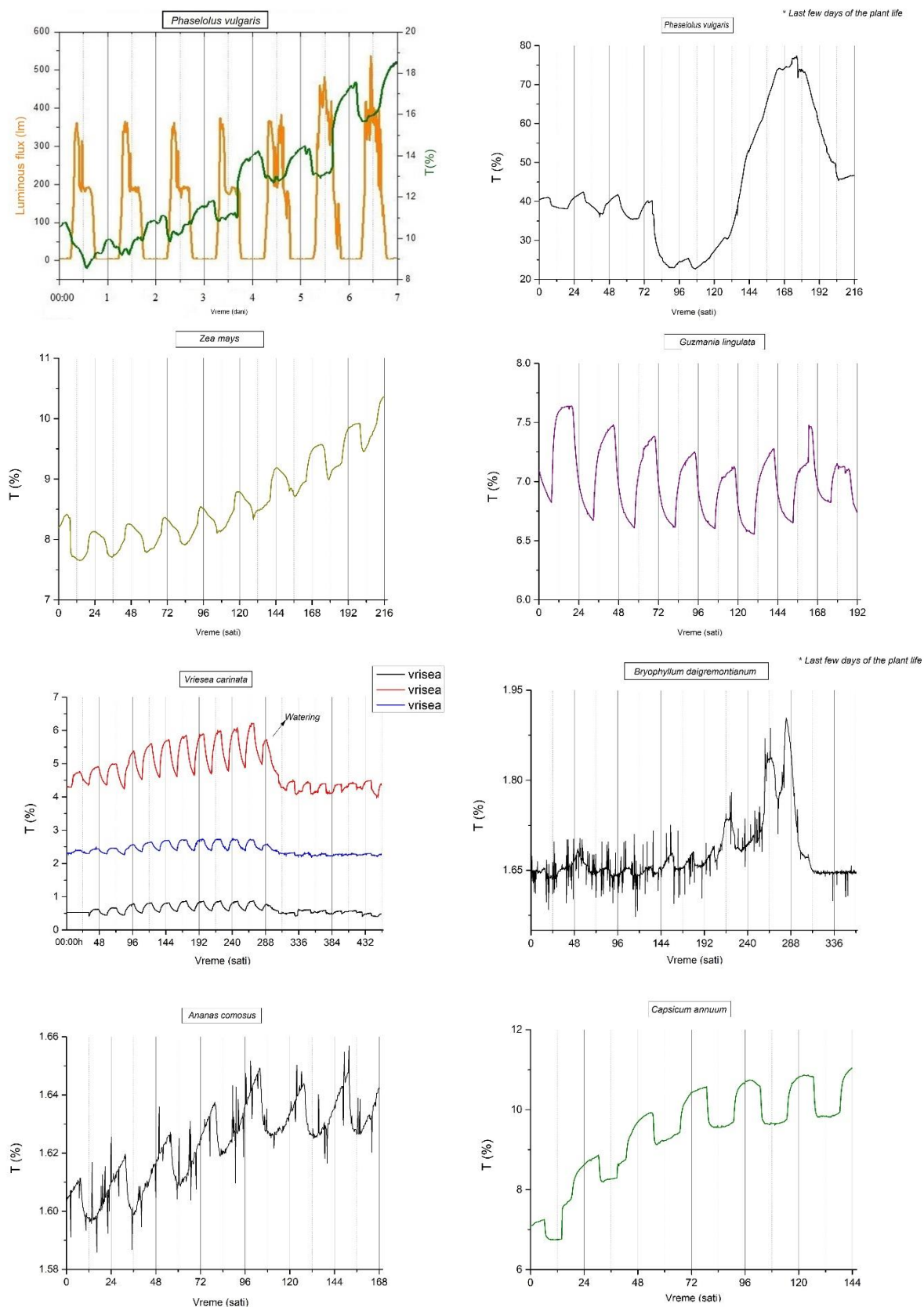


Slika 8.12. Grafik zavisnosti vrednosti optičke transmisije u zavisnosti od različite jačine osvetljenja zelenog lista muškatele



Slika 8.13. Grafik zavisnosti izvoda koeficijenta optičke transmisije u vremenu za najjači intenzitet svetla

8.4. Test merjenja rađena na različitim biljnim vrstama



Slika 8.14. Grafici zavisnosti vrednosti optičke transmsije različitih biljnih vrsta u vremenu

IX ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj tezi predstavljena je eksperimentalna postavka nedestruktivne optičke metode namenjene za praćenje stanja i metabolizma biljaka, koja zadovoljava sve stroge metrološke standarde. U prethodnom poglavlju su predstavljeni i prodiskutovani rezultati dobijeni na osnovu monitoringa optičke transmisije živih biljaka u realnom vremenu. Ovo je ujedno i prvi zapis cirkadijumskih ritmova u vidu grafika zavisnosti optičke transmisije u vremenu merenih u dužem vremenskom intervalu tokom rasta biljaka.

Kao dokaz koncepta, predstavljeni su rezultati prve test biljke uz pažljivo odabrane uslove rasta. Potvrdu metode su pokazala slaganja rezultata cirkadijumskih ritmova sa izvršenim biohemijskim analizama.

Sledeća eksperimentalna postavka primenjena na drugu test biljku gajenu u hidroponskim uslovima, pokazuje ozbiljan potencijal aparature da postane optički detektor za ranu predikciju stresa biljke uzrokovanog nedostatkom nekog od esencijalnih elemenata u njenom rastu i razvoju. Za potvrdu metode urađena su određene biohemijske analize koje se slažu sa modifikovanim grafikom koji je dobijen u odnosu na pravilan grafik cirkadijumskog ritma svojstven kontrolnoj grupi biljaka.

Kao što je već pomenuto na početku, gajenje biljaka pod određenim uslovima podrazumeva i veštačko osvetljenje koje se u datom trenutku isključuje/uključuje. Merenja pokazuju da prilikom uključivanja/isključivanja osvetljenja biljka trpi „svetlosni šok”, koji je testiran promenom intenziteta svetlosti određene test biljke na 4 režima. Kako bismo unapredili svojstva izvora svetlosti, trebalo bi da napravimo svetlosni izvor koji će imati opciju simulacije promene intenziteta svetlosti koji prate smenu dana i noći i time u potpunosti oponašamo prirodni tok zalaska/izlaska sunca.

Na osnovu ovih merenja, postoji mogućnost formiranja velike baze podataka za upisivanje parametara za najefikasniji rast kako aktuelnih hotrikulturnih, tako i drugih biljaka. Takođe, iz dobijenih eksperimentalnih rezultata, u odgovarajućim programima, mogu da se naprave simulacije koje bi mogle da predvide najoptimalnije uslove rasta i kvaliteta biljaka. Postoji još mnogo ideja za dalji rad i unapređenje mernog sistema, koja bi podrazumevala poboljšanje optike i elektronike sistema, adaptaciju sistema koja se bazira na fizici senzora i automatskog upravljanja, pisanje odgovarajućih programa za analize i simulacije signala, kao i neizostavnu saradnju sa drugim naučnim istraživačima koji se bave fiziologijom biljaka.

Opisana metoda posmatra površinu lista od 3 mm², iako struktura lista nije homogena sredina. Jedan vid poboljšanja bio bi skeniranje veće površine lista u formi matrice koji bi uz povećan broj merenja na datoj površini obezbedio bolju statistiku.

Rezultati naših dosadašnjih istraživanja ukazuju da merenja transmisije lista daju pouzdanije podatke za analizu stanja biljke, međutim naša metoda daje i dobru povezanost sa refleksijom lista koja je od posebnog interesa za snimanje stanja biljaka koje se gaje na velikim površinama i prate putem dronova, aviona i satelita.

Ovo je jedan od koraka ka identifikaciji jedinstvenih spektralnih odgovora uz razumevanje fizičkih i mikrobioloških fenomena odgovornih za predviđanje automatizacije proizvodnje osnovnih resursa u lancu ishrane čovečanstva.

Ova metoda može da ima primetnu ulogu u razvoju poljoprivrede: preciznije predviđanje perioda najvećih prinosa biljaka, značajne uštede uloženi sredstava, brža industrijalizacija velikih poljoprivrednih resursa, da olakša stvaranje malih, kućnih, pametnih baštica. Ona ukazuje koji je optimalan odnos nutritijenata potrebnih za rast biljaka, koji omogućava da se potisne ili smanji potreba za hemijskim reagensima u korist zdravijeg krajnjeg proizvoda, i boljeg životnog standarda.

Metod bi mogao da se primeni kako u laboratorijskim kontrolisanim uslovima, tako i napolju na otvorenom. Bio bi efikasan za ispitivanje uslova pod kojim biljka najbolje napreduje, bilo da se radi o hortikulturnoj ili nekoj drugoj biljnoj vrsti.

Naša trenutna optička merenja su zasnovana na relativno direktnom sistemu detekcije svetlosti. U osnovu je direktno pojačavanje signala od svetlosnih senzora koje uključuje ozbiljan proces korekcije varijacije intenziteta LED dioda koje se koriste kao izvori svetlosti. Planiramo da nadogradimo naš optički lanac detekcije na sistem zasnovan na „Lock-in-u“ [50]. Verujemo da će ovo unapređenje značajno poboljšati ukupnu osetljivost sistema kao i efikasnost primeni ove optičke metode na širi dijapazon merenja određenih karakteristika biljaka.

X REFERENCE

- [1] Knapp AK, Carter GA. 1998. Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats. *Am J Bot.* 85(7):940–946. <https://doi.org/10.2307/2446360>.
- [2] Chaerle L, Van der Straeten D. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5:495–501.
- [3] S.M. Fakhrul Islam, Rezaul Karim Talukder, 2017, Projections of food demand and supply in Bangladesh: *International Journal of Sustainable Agricultural Management and Informatics*, Vol. 3, No. 2 125- 153. <http://doi.org/10.1504/IJSAMI.2017.085663> 153.
- [4] M. Tränkner, S. Jamali Jaghdani, Minimum magnesium concentrations for photosynthetic efficiency in wheat and sunflower seedlings, *Plant Physiol. Biochem.*, 144 (2019), pp. 234-243, 10.1016/j.plaphy.2019.09.040
- [5] Shah SH, Houborg R, McCabe MF. 2017. Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*. 7:61. DOI:10.3390/agronomy7030061.
- [6] Havaux, M. (2014), Carotenoid oxidation products as stress signal in plants. *Plant J*, 79: 597-606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>
- [7] Kastori, R. (1995). *Fiziologija biljaka*. Novi Sad: Feljton
- [8] Pavlovic, Danijela & Nikolic, Bogdan & Đurović, Sanja & Waisi, Hadi & Anđelković, Ana & Dragana, Marisavljević. (2014). Chlorophyll as a measure of plant health: Agroecological aspects. *Pesticidi i fitomedicina*. 29. 21-34. 10.2298/PIF1401021P.
- [9] Albert Porcar-Castell, Esa Tyystjärvi, Jon Atherton, Christiaan van der Tol, Jaume Flexa, Erhard E. Pfündel, Jose Moreno, Christian Frankenberg and Joseph A. Berry 2014. Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. *Journal of Experimental Botany* Vol. 65, No. 15, pp. 4065–4095. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru191>
- [10] Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C. et al. Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nat Commun* 11, 4546 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7>
- [11] Dawson, C.J. & Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, Elsevier, vol. 36 (Supplement), pages 14-22, January.
- [12] Syed Haleem Shah, Rasmus Houborg and Matthew F. McCabe. 2017. Response of Chlorophyll, Carotenoid and SPAD-502 Measurement to Salinity and Nutrient Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.) *Agronomy*, 7, 61; doi: 10.3390/agronomy7030061
- [13] Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157: 423-447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- [14] Adams JE, Arkin GF (1977) A light interception method for measuring crop ground cover. *Soil Sci Soc Amer J* 41: 789 –792

- [15] Carter GA, Spiering BA. 2002. Optical properties of intact leaves for estimating chlorophyll concentration. *J Environ Qual*. 31 (5):1424–1432. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1424>.
- [16] Gitelson AA, Zur Y, Chivkunova OB, Merzlyak MN. 2002. Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy. *Photochem Photobiol*. 75(3):272–281. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750272ACCIPL2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750272ACCIPL2.0.CO2).
- [17] Gitelson, Anatoly & Gritz, Yuri & Merzlyak, Mark. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of plant physiology*. 160. 271-82. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>
- [18] Grant L, Daughtry CST, Vanderbilt VC. 1993. Polarized and specular reflectance variation with leaf surface features.
- [19] Grant L. 1987. Diffuse and specular characteristics of leaf reflectance. *Remote Sens Environ*. 22:309–322. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(87\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0034-4257(87)90064-2).
- [20] Combes D, Bousquet L, Jacquemoud S, Sinoquet H, Varlet-Grancher C, Moya I. 2007. A new spectrogoniometer to measure leaf spectral and directional optical properties. *Remote Sens Environ*. 109:107–117. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2006.12.007>.
- [21] Piekarczyk J. 2001. Temporal variation of the winter rape crop spectral characteristics. *Int Agrophys*. 15(2):101–107.
- [22] B. Datt (1999) Visible/near infrared reflectance and chlorophyll content in Eucalyptus leaves, *International Journal of Remote Sensing*, 20:14, 2741-2759, DOI: 10.1080/014311699211778
- [23] Curran PJ, Dungan JL, Gholz HL 1995. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree Physiology* 204 –206. <https://doi.org/10.1093/treephys/15.3.203>
- [24] Fourty T, Baret F, Jacquemoud S, Schmuck G, Verdebout J. 1996. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: direct and inverse problems. *Remote Sens Environ*. 56(2):104–117. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(95\)00234-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(95)00234-0).
- [25] Luís Guilherme Teixeira Crusiol, Marcos Rafael Nanni, Renato Herrig Furlanetto, Rubson Natal Ribeiro Sibaldelli, Everson Cezar, Liang Sun, José Salvador Simonetto Foloni, Liliane Marcia Mertz-Henning, Alexandre Lima Nepomuceno, Norman Neumaier, and José Renato Bouças Farias. Yield Prediction in Soybean Crop Grown under Different Levels of Water Availability Using Reflectance Spectroscopy and Partial Least Squares Regression. *Remote Sens*. 2021, 13(5), 977. <https://doi.org/10.3390/rs13050977>
- [26] Liew O, Chong P, Li B, Asundi A. 2008. Signature optical cues: emerging technologies for Monitoring plant health. *Sensors*. 8(5):3205–3239. <https://doi.org/10.3390/s8053205>.
- [27] Arthur J. Richardson, Craig L. Wiegand Canopy leaf display effects on absorbed, transmitted, and reflected solar radiation 1989. Canopy leaf display effects on absorbed, transmitted, and reflected solar radiation. *Remote Sensing of Environment* Volume 29, Issue 1. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(89\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90075-8)
- [28] E.H. Murchie and T. Lawson. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 13, pp. 3983–3998, doi:10.1093/jxb/ert208
- [29] Photosynthetic Physiology of Blue, Green, and Red Light: Light Intensity Effects and Underlying Mechanisms, *Frontiers in Plant Science*, VOL 12, 2021,

[30] Chaerle L, Leinonen I, Jones HG, Van der Straeten D. 2007. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J Exp Bot.* 58:773–784. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl257>.

[31] Dragan Cekić 2018. Izrada i testiranje aparature za merenje spektralnih karakteristika biljaka u realnom vremenu. Magistarska teza. Fizički fakultet. Beograd.

[32] Stevan Đeniže. 2008. Osnovi atomske, kvantne i molekulske fizike. Nauka. Beograd.

[33] Prof. dr Ivan Dojčinović, Nora Trklja. *Primenjena spektroskopija (praktikum)*. Fizički fakultet. Univerzitet u Beogradu.

[34] A. Antić-Jovanović, *Molekulska spektroskopija*, Fakultet za fizičku hemiju Beograd 2016.

[35] M. Todorović, P. Đurđević, V. Antonijević, *Optičke metode instrumentalne analize*, Hemijski fakultet, Beograd, 1993.

[36] Reece, Jane B. & Meyers, Noel. & Urry, Lisa A. & Cain, Michael L. & Wasserman, Steven A. & Minorsky, Peter V. & Jackson, Robert B. & Cooke, Bernard J. & Campbell, Neil A. (2015). *Campbell biology*. Frenchs Forest, NSW : Pearson

[37] Sarton, G., Mayer, J. R., Joule, J. P., & Carnot, S. (1929). The Discovery of the Law of Conservation of Energy. *Isis*, 13(1), 18–44. <http://www.jstor.org/stable/224595>

[38] Arnon DI (1951) Extracellular photosynthetic reaction. *Nature* 167: 1008–1010

[39] Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res.* 73(1):149– 156. <https://doi.org/10.1023/A:1020470224740>.

[40] Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol.* 148:350–382. *Plant Cell Membranes*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).

[41] Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10:403–413. doi: 10.1096/fasebj.10.4.8647339.

[42] Yasushi K. 1991. Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. *J Photochem Photobiol Ser Biol.* 9:265–280. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80165-E](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80165-E).

[43] Young AJ. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plant.* 83(4):702–708. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x>.

[44] Th.Fourty, F.Baret S. Jacquemoud, G.Schmuck, J.Verdebout 1996. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: Direct and inverse problems, *Remote Sensing of Environment* Volume 56, Issue 2, 104-117. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(95\)00234-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(95)00234-0)

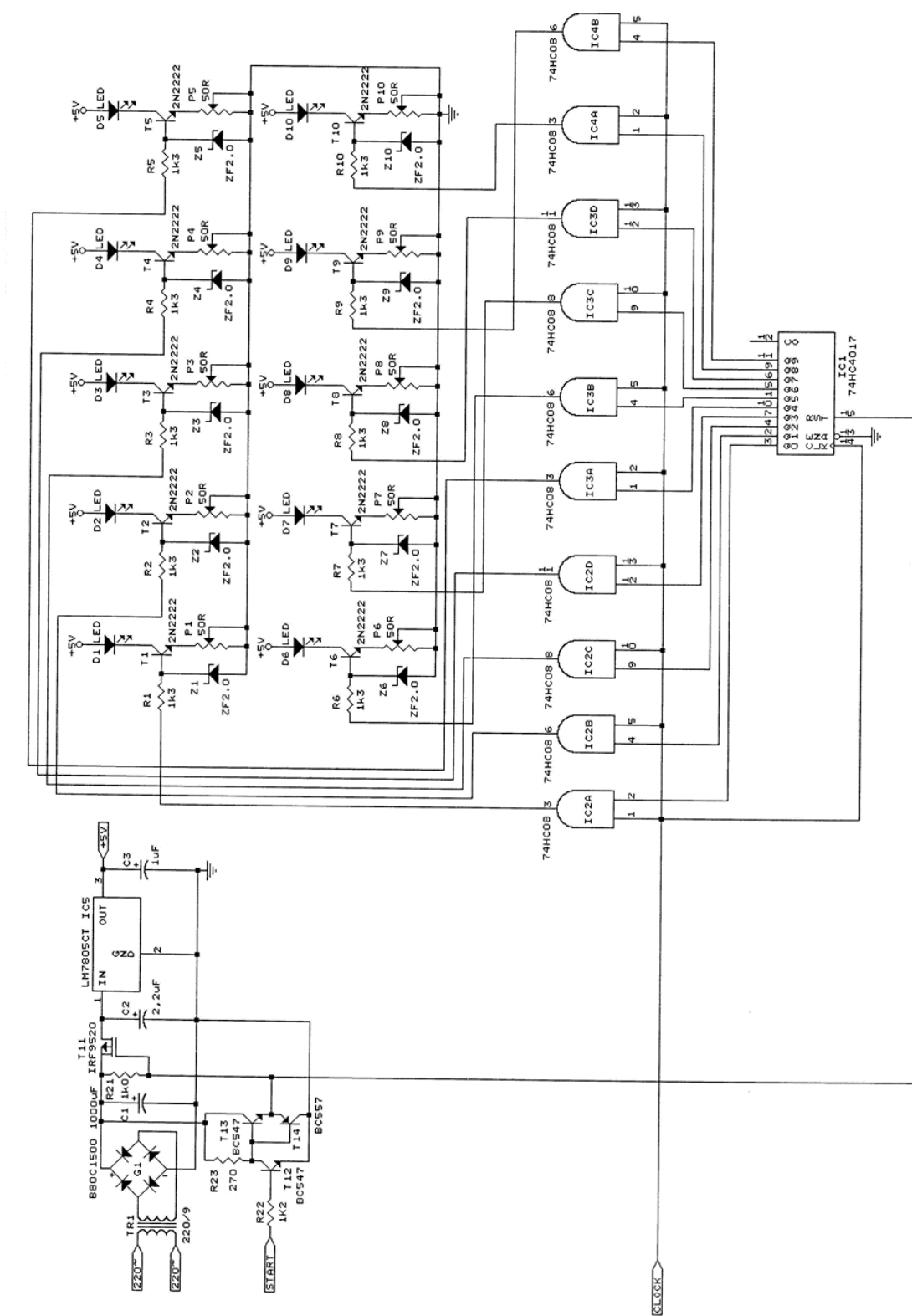
[45] Young AJ, Frank HA. 1996. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 36:3–15. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07397-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07397-6).

[46] Goran Stojanović, Ljiljana Živanov, "Materijali u elektrotehnici", FTN, Izdavaštvo (169), 233 stranica, ISBN: 978-86-7892-073-8, 2007

- [47] Invention, development, and status of the blue light-emitting diode, the enabler of solid-state lighting, *Comptes Rendus Physique*, Volume 19, Issue 3, 2018, Pages 113-133, ISSN 1631-0705, <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2017.12.001>.
- [48] Dr Miodrag Popović, *Osnovi elektronike za studente Odseka za softversko inženjerstvo Elektrotehnički fakultet, Beograd*, 2006.
- [49] *Uvod u elektroniku. Laboratorijske vežbe*. Univerzitet u Novom Sadu, Fakultet tehničkih nauka, Departman za energetiku, elektroniku i telekomunikacije, Katedra za elektroniku
- [50] Paul Horowitz, Winfield Hill. 2015. *The Art of Electronics*. Cambridge University Press.
- [51] Boylestad, Robert L., and Louis Nashelsky. 1978. *Electronic devices and circuit theory*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall.
- [52] Dr Božo Ilić, *Električne instalacije i osvetljenje* Skripta, Visoka tehnička škola strukovnih studija Novi Sad, 2019. god.
- [53] <https://www.termoplast.rs/tehnicka-plastika/termoplast-pmma-pleksiglas-ploce-cevi-sipke/>
- [54] Dr Dejan Gvozdić, *Optička vlakna*, Elektrotehnički fakultet, Beograd, 2018/
- [55] Becko V. Kasalica, Katarina M. Miletic, Aneta D. Sabovljevic, Milorad M. Vujicic, Dejan A. Jeremic, Ivan D. Belca&Marija M. Petkovic-Benazzouz (2021). Nondestructive optical method for plant overall health evaluation, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1928740>
- [56] Svetlana Lukić *Elektronski spektar kompleksa NIN8C36C12H38*, Diplomski rad, Prirodno matematički fakultet, Institut za fiziku, Univerzitet u Novom Sadu, 1980
- [57] National Instruments Corporation (1992–2003). *LabVIEW User manual*.
- [58] Stefanovic M., Cvijetkovic V., Matijevic M., & Simic, V. (2011). A LabVIEW-based remote laboratory experiments for control engineering education. *Computer Applications in Engineering Education*, 19(3), 538-549.
- [59] Đalović M. (2009). Programski paket LabVIEW u računarski podržanom sistemu merenja i upravljanja. Završni rad, katedra za informatiku u inženjerstvu, Mašinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.
- [60] Roessel PG, Monson RK. 1985. Midday depression in net photosynthesis and stomatal conductance in *Yucca Glauca*: relative contributions of leaf temperature and leaf- to-air water vapor concentration difference. *Oecologia*. 67 (3):380–387.
- [61] Vogelmann TC. 1993. Plant tissue optics. *Annu Rev Plant Phys*. 44:231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193>.
- [62] Ruban AV. 2009. Mini review plants in light. *Commun Integr Biol*. 2(1):50–55.
- [63] Yanfei Zhan, XininAn, Shuang Wang, Mengjia Sun, Honglei Zhou (2020). Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 28, Issue 1, 2020, 115179, ISSN 0968-0896, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115179>
- [64] László Sipos, LászlóBalázs, GézaSzékely, András Jung, SzilviaSárosi, PéterRadácsi, LászlóCsambalik, Optimization of basil (*Ocimum basilicum* L.) production in LED light environments – a review, *Scientia Horticulturae*, Volume 289, 2021, 110486, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110486>

- [65] Muazzez Gürkan, Sevinç Adiloğlu, Increasing concentrations of iron fertilizer affect antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.), *Industrial Crops and Products*, Volume 170, 2021, 113768, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113768>
- [66] Natalia Osmolovskaya, Julia Shumilina, Ksenia Bureiko, Veronika Chantseva, Tatiana Bilova, Ludmila Kuchaeva, Nikolai Laman, Ludger A. Wessjohann and Andrej Frolov. 2019. Ion Homeostasis Response to Nutrient-Deficiency Stress in Plants. In: Biba Vikas, Michael Fasullo (Eds.), *Cell Growth* - March 2020 DOI: 10.5772/intechopen.89398
- [67] Dubyak GR. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ.* 2004 Dec; 28(1-4):143-54. doi: 10.1152/advan.00046.2004. PMID: 15545343
- [68] Nikolic, Dragana & Nesic, Sofija & Bosnic, Dragana & Kostic, Ljiljana & Nikolic, Miroslav & Samardzic, Jelena. (2019). Silicon Alleviates Iron Deficiency in Barley by Enhancing Expression of Strategy II Genes and Metal Redistribution. *Frontiers in Plant Science*. 10. 416. 10.3389/fpls.2019.00416.
- [69] Katarina M. Miletic, Danijela M. Djunisijevic-Bojovic, Becko V. Kasalica, Marijana Milutinovic, Marija M. Petkovic-Benazzouz, Slobodan D. Milanovic, Ivan D. Belca, Mirjana Z. Sarvan & Dejan A. Jeremic (2022) Innovative optical method for sensing the nutritional stress in hydroponically cultivated plants, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 72:1, 720-732, DOI: 10.1080/09064710.2022.2071761
- [70] Carstensen A, Herdean A, Schmidt SB, Sharma A, Spetea C, Pribil M, Husted S. The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant Physiol.* 2018 May; 177(1):271-284. doi: 10.1104/pp.17.01624
- [71] Morales, F., Belkhodja, R., Abadía, A. et al. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). *Photosynthesis Research* 63, 9–21 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1006389915424>
- [72] Zhou, R., Yu, X., Ottosen, CO. et al. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biol* 17, 24 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0974-x>
- [73] Harman C.J., Lohse K.A., Troch P.A., Sivapalan M. (2014): Spatial patterns of vegetation, soils and microtopography from terrestrial laser scanning on two semi-arid hillslopes of contrasting lithology. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 119(2): 163-180. DOI: 10.1002/2013JG002507
- [74] Ohnishi M, Furutani R, Sohtome T, Suzuki T, Wada S, Tanaka S, Ifuku K, Ueno D, Miyake C. 2021. Photosynthetic parameters show specific responses to essential mineral deficiencies. *Antioxidants*. 10(7):996. DOI:10.3390/antiox10070996. PMID: 34201487; PMCID: PMC8300717.
- [75] Nenova V. 2008. Growth and mineral concentrations of pea plants under different salinity levels and iron supply. *Gen Appl Plant Physiol*. 34:189–202.

XI PRILOZI



Prilog 1. Šema prateće elektronike



Prilog 2. Tehničke karakteristike korišćenih panela



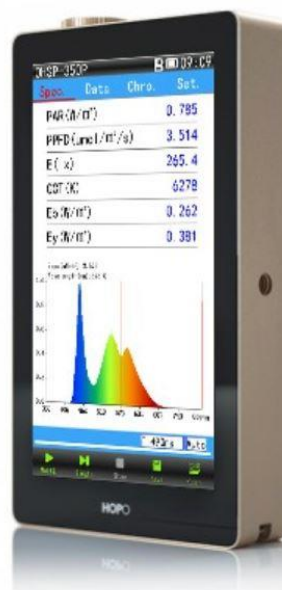
Prilog 3. Uređaj za merenje jačine osvetljenja

OHSP350P

PLANT LIGHTING

ANALYZER

350-800nm



Prilog 4. Spektrofotometar OHSP350P

The image shows a compact, black and silver USB4000 Spectrometer. It has a USB port on the front and a small optical fiber connector on the side. The Ocean Optics logo is visible on the top surface.

USB4000 Spectrometer

The USB4000 is a modular spectrometer that is easily configured for a wide range of absorbance, reflection and emission applications. The compact unit has a 3648-element CCD array detector with response from 200-1100 nm and an optical bench with convenient onboard electronic shutter.

Ocean Optics

www.oceanoptics.com | info@oceanoptics.com | US +1 727-733-2647 EUROPE +31 26-3190900 ASIA +86 21-6295-6600

Prilog 5. Spektrofotometar USB4000 Ocean Optics



Prilog 6. Data logger za merenje temperature, koncentracije CO₂ i vlažnosti vazduha

Temperature Data logger



Prilog 7. Data logger za merenje temperature prateće elektronike

BIOGRAFIJA

Katarina (Milanko) Miletić rođena je 30. maja 1991. godine u Čačku. Osnovnu školu u Guči završava kao đak generacije 2006. godine. Iste godine upisuje Gimnaziju prirodno-matematičkog usmerenja u Čačku, gde maturira 2010. godine i upisuje osnovne studije na Fizičkom Fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru „Primenjena i kompjuterska fizika”. Diplomira 2014. godine na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,52 (devet i 52/100) na katedri za Primenjenu i kompjutersku fiziku, gde na istom fakultetu, 2014. godine upisuje master studije iz uže naučne oblasti „Primenjena i kompjuterska fizika”. Masterira u julu 2015. godine sa prosečnom ocenom 10,00 na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na katedri za Primenjenu i kompjutersku fiziku, odbranivši master rad: Optički spektri aluminijuma dopiranog elementima retkih zemalja u toku plazmene elektrolitičke oksidacije sa ocenom 10,00 – pod mentorstvom prof. dr Bečka Kasalice.

2015. godine upisuje doktorske studije iz uže naučne oblasti „Primenjena fizika”, na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Tokom 2013/14 godine, nosilac je stipendije Fonda za mlade talente – Dositeja.

Od školske 2014/2015. godine angažovana je na Fizičkom fakultetu za izvođenje eksperimentalnih i računskih vežbi.

Od 2015. godine prvi je stipendista na listi dobitnika stipendije doktorskih studija Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Od 1. decembra 2018. godine u zvanju je istraživač-pripravnik na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na projektu Grafite i neorganske nanostrukture niske dimenzionalnosti (ev. br. 1701035) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Od septembra 2020. do decembra 2021. godine rukovodilac je projekta 5780 Nondestructive optical method for plant overall health evaluation Inovacionog fonda Republike Srbije.

Katarina Miletić je od 2014. godine do danas angažovana kao saradnik u izvođenju nastave za studente Fizičkog fakulteta i Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu i to: Laboratorija fizike 1 i 2 (laboratorijske vežbe), Programiranje (računske vežbe), Osnovi računarske tehnike (računske vežbe), Termotehnika (računske vežbe), Akustika (laboratorijske vežbe), Geometrijska optika i optički instrumenti (laboratorijske vežbe) i Fizika 1 (laboratorijske vežbe), za studente prve godine fakulteta za Fizičku hemiju.

Osim publikacije naučnih radova kategorije M22 u vodećim međunarodnim časopisima, kandidat je jedan od pronalazača i dva patenta u Zavodu za intelektualnu svojinu, Beograd.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Катарина Милетић

Број индекса: 8009/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Примена недеструктивних оптичких метода у процени стања и метаболизма биљака”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2022. год.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Катарина Милетић

Број индекса: 8009/2015

Студијски програм примењена физика

Наслов рада: „Примена недеструктивних оптичких метода у

процени стања и метаболизма биљака”

Ментор: проф. Др Бећко Касалица

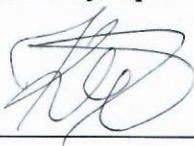
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2022. год.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Примена недеструктивних оптичких метода у процени стања и метаболизма биљака“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

☒ 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2022. год.