

环境光学监测技术

LED 激发光源的水体浮游植物浓度
活体检测系统研究王志刚^{1,2}, 刘文清², 张玉钧², 司马伟昌², 赵南京², 肖雪², 刘建国²

(1 中国科学技术大学地球和空间科学学院, 安徽 合肥 230026;

2 中国科学院安徽光学精密机械研究所环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031)

摘 要: 采用 5 种不同中心激发波长的超高亮 LED 作为激发光源构建了一套水体浮游植物活体荧光检测系统。利用该系统测量 24 种不同来源水样和同一水样 10 种不同比例稀释样品的浮游植物活体荧光强度, 研究了荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性关系。结果表明: 蓝光 LED (最大发射波长 442.7 nm) 是以测量浮游植物活体荧光的最适合光源, 相应的检测限达到了 0.0278 $\mu\text{g}/\text{l}$ (叶绿素 a); 浮游植物种类、环境造成的荧光量子效率以及水体 DOM 背景荧光均对活体荧光的测量结果产生影响, 尤以浮游植物种类和荧光量子效率的影响更为显著。因此, 蓝光超高亮 LED 将为浮游植物活体荧光测量提供廉价的替代光源, 为利用该光源研发浮游植物浓度原位荧光检测仪提供了潜在的可能。为克服浮游植物种类、荧光量子效率以及 DOM 背景荧光对浮游植物活体荧光测量结果的影响, 需要进一步研究上述因素的具体影响行为, 发展相应方法进行校正。

关键词: LED; 浮游植物; 活体荧光

中图分类号: X122; X83

文献标识码: A

文献编号: 1673-6141(2008)01-0036-06

Research on *In-vivo* Measurement of Phytoplankton Biomass
by LED Excitation SourceWANG Zhi-gang^{1,2}, LIU Wen-qing², ZHANG Yu-jun², SIMA Wei-chang²,
ZHAO Nan-jing², XIAO Xue², LIU Jian-guo²

(1 School of Earth and Space Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2 Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: An experiment system for determining *in vivo* fluorescence of phytoplankton with five LEDs with different maximum emission wavelengths as excitation light sources was established. Based on the system, *in vivo* fluorescence of 10 different dilutions from the same water sample and 24 kinds of water samples

收稿日期: 2007-08-15; 修改日期: 2007-10-15

基金项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目 (KGCX2-SW-111)

E-mail: wangzg@aiofm.ac.cn

from different sources was determined and the linear relationship of fluorescence intensity and chlorophyll-a concentration was also investigated. The results indicate that blue LED (maximum emission wavelength 442.7 nm) is the most proper excitation light source for determining *in vivo* fluorescence of phytoplankton, and limit of determination is 0.0278 $\mu\text{g/l}$ (chlorophyll-a). Background fluorescence of DOM, especially the difference of phytoplankton species and fluorescence quantum efficiency, shows significant influence on the determination of *in vivo* fluorescence. Blue LED has a potential as excitation light source of phytoplankton fluorometry. In order to overcome the influence of phytoplankton species, fluorescence quantum efficient and DOM background fluorescence on *in vivo* fluorescence, further research should be carried out and proper adjustment methods are needed.

Key words: LED; phytoplankton; *in vivo* fluorescence

1 引言

水体富营养化使得浮游植物过量增殖, 耗尽水中溶解氧, 引起鱼类等水生生物的大量死亡, 并导致水体发黑发臭^[1]; 同时某些种类浮游植物(如铜绿微囊藻)向水体释放藻毒素, 引发多种人类疾病的发生^[2]。因此, 水体浮游植物生物量的测量已经成为当前环境监测中非常重要的一项检测指标。传统的浮游植物生物量测量以叶绿素 a 浓度指示, 叶绿素 a 浓度的测量则通常采用取水样, 经有机抽提再结合多波长吸光法或荧光分光光度计法完成。上述方法不仅费时费力, 而且无法针对特定水域进行实时原位在线测量^[3]。浮游植物叶绿素 a 荧光的活体连续测量是解决上述问题的一种重要途径^[4]。尽管如此, 海洋以及环境监测领域现有的浮游植物浓度原位测量装置多是以脉冲氙灯或者激光器等高功率光源为激发光源, 导致了仪器的高成本, 同时妨碍了仪器的便携性。近年来, 超高亮度的发光二极管(LED)技术得到了较大发展, 在许多检测仪器

上得到了越来越多的应用^[5-7]。本文以 5 种不同波长的 LED 为激发光源, 设计了一套水体浮游植物浓度活体荧光检测装置, 利用该装置研究了同一水样不同稀释比例以及不同来源水样浮游植物活体荧光强度与叶绿素 a 浓度的关系, 进一步分析了水体 DOM 背景荧光对浮游植物活体荧光测量的影响, 探讨了超高亮 LED 激发光源在活体测量浮游植物浓度中的潜在应用价值。

2 实验部分

2.1 系统组成

系统装置如图 1 所示, 共分为 7 个部分: (1) LED 阵列, 由蓝、绿、黄、橙、红 5 种不同中心波长的超高亮 LED 组成(深圳佳光电子), 详细参数如表 1 所示。(2) 短波通滤光片, 波长透过范围为 400~620 nm, 透过率大于 90%, 50% 截止波长为 650 nm(上海祥龙光学镀膜定制)。(3) 激发透镜(型号 OLA30-1, 北京卓立汉光)。(4) 玻璃样品池, 尺寸为 30 mm×30 mm×70 mm(宜兴银星分析仪器

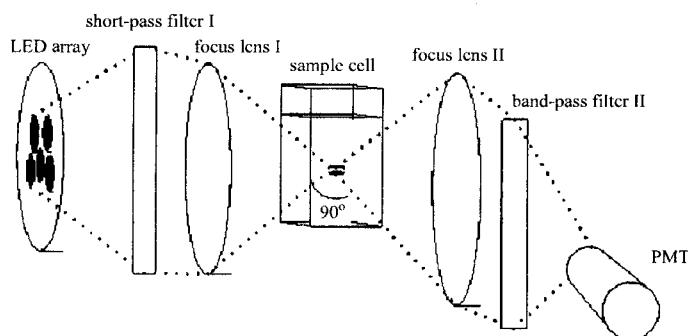


图 1 浮游植物浓度活体荧光检测实验装置图

Fig.1 Experiment setup for phytoplankton *in vivo* fluorescence detecting

厂定制)。(5) 发射透镜(型号 OLA30-5, 北京卓立汉光)。(6) 带通滤光片, 中心波长 (685±10) nm。(7) 光电倍增管(型号 R926, 日本滨松)。系统工作原理如下: LED 激发光通过短波通滤光片, 经激发透镜聚焦汇聚于样品池上激发浮游植物产生荧光, 90° 方向接收的散射荧光经发射透镜和带通滤光片, 最终由光电倍增管检测荧光强度。

系统由计算机软件控制, 应用程序发出指令控制 LED 依次发光, 再控制数据采集卡采集光电倍增管信号, 输出样品的活体荧光强度。

2.2 水样采集及荧光测量

以洗净的塑料采样瓶采集董铺水库及科学岛周边池塘水样共计 24 个。将采集水样带回实验室

置于 20°C 室温下于暗处静止 0.5 h, 分别取各水样置于样品池中, 测量不同波长 LED 激发下浮游植物活体荧光强度。采集一高度富营养化的水样, 以蒸馏水按照一定比例逐步稀释多次, 得到 10 个不同稀释比例的浮游植物水样, 分别测量各稀释水样浮游植物荧光强度。以孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤各水样, 测量各水样过滤后的荧光强度。

2.3 叶绿素 a 浓度测量

测量荧光后, 迅速取各水样 200~500 ml 经 0.45 μm 孔径的微孔滤膜过滤, 将过滤后的滤膜避光保存于 -15°C 的冰箱中, 3 天内按照《水和废水监测分析方法》中的叶绿素 a 浓度标准测量方法以多波长吸光法测量相应叶绿素 a 的浓度。

表 1 5 种 LED 详细参数

Table 1 Detail parameters for five light-emitting diodes

	Blue	Green	Yellow	Orange	Red
Maximum wavelength (nm)	442.7	492.8	571.8	583.5	599.6
FWHM (nm)	20.7	40.6	16.9	17.4	15
View angle(°)	15	15	11	11	10
Luminous intensity (mcd)	4600	25000	4100	11000	9800

3 结果与讨论

3.1 不同比例稀释水样荧光测量

标准方法多次测量平均, 水样叶绿素 a 浓度为 113.2 μg/l, 以蒸馏水稀释得叶绿素 a 浓度范围为 6~56.6 μg/l 的标准稀释水样 10 个, 各 LED 激发下荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性关系如图 2 所示(其中 R 为线性相关系数, SD 为标准偏差, N 为样本数, P 为相关系数为 0 的概率)。5 种 LED 激发下荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性相关系数都达到了 0.997 以上。以叶绿素 a 浓度与荧光强度关系式系数倒数为系统的灵敏度, 以蒸馏水为

空白样品测量 15 次, 测得系统噪声的标准偏差, 按 $LOD = 3\sigma/S$ 计算系统的检测限(见表 2), 其中 LOD 为检测限, σ 为系统噪声标准偏差, S 为系统灵敏度。

蓝光 LED 激发系统具有最低检测限为 0.0278 μg/l, 黄光 LED 激发系统检测限最高 0.7963 μg/l, 由此可见利用中心波长 442.7 nm 的蓝光 LED 作为系统激发光源进行水体浮游植物活体荧光检测是最理想的, 这是由于浮游植物细胞内起吸收光能作用的最主要天线色素是叶绿素 a, 其最大吸收波长位于 435 nm, 与蓝光 LED 的中心激发波长相近。

表 2 不同 LED 激发下实验系统的灵敏度和检测限

Table 2 Sensitivity and detection limit of experiment system under excitation of different LEDs

LED 种类	蓝	绿	黄	橙	红
标准偏差	0.3142	0.3424	0.2973	0.2628	0.2393
灵敏度	33.933	9.025	1.12	5.795	2.876
检测限 (μg/l)	0.0278	0.1138	0.7963	0.1360	0.2496

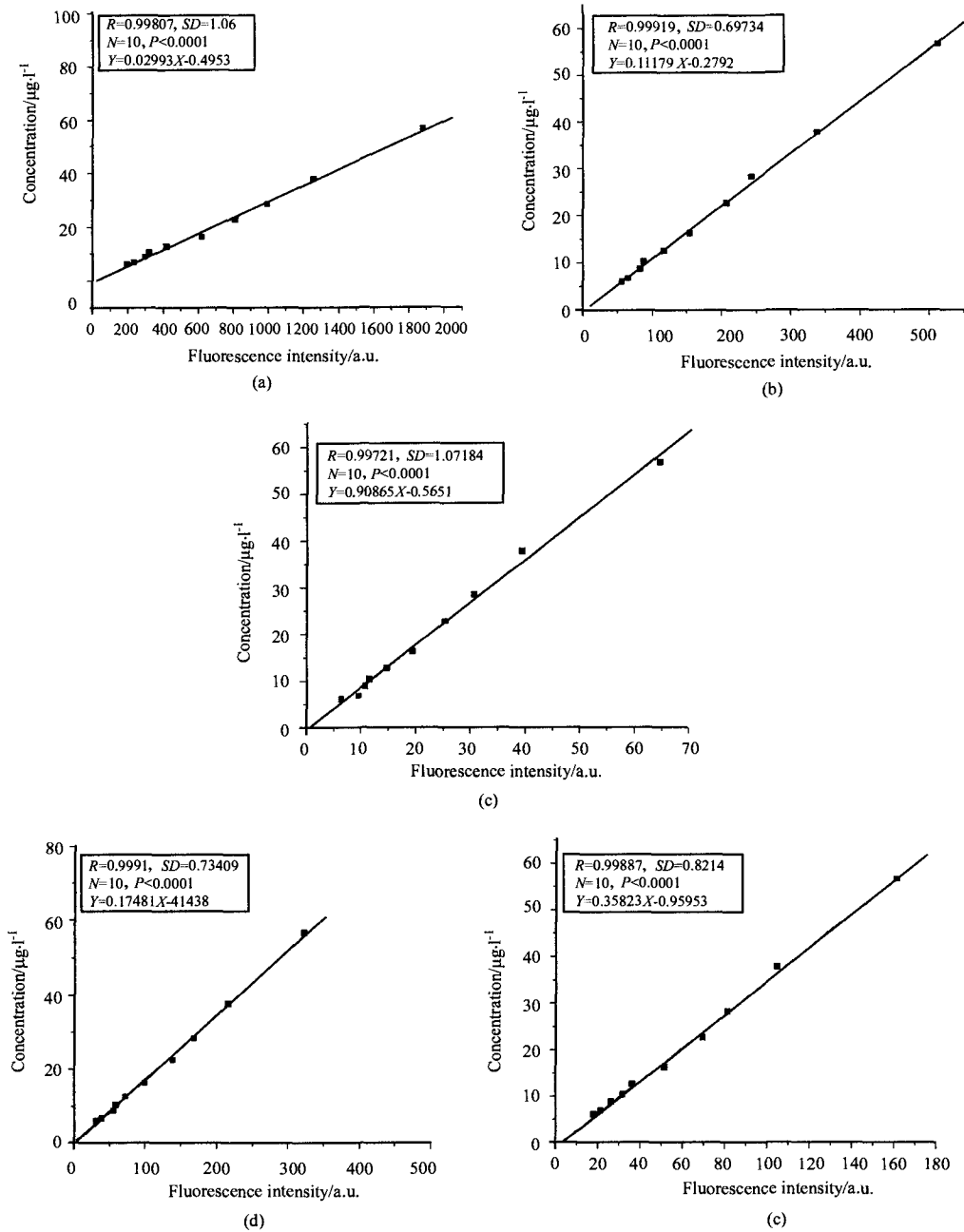


图 2 各 LED 激发下不同比例稀释样品荧光强度与叶绿素 (a) 蓝光 (b) 绿光 (c) 黄光 (d) 桔黄光 (e) 红光

Fig.2 Linear relationship of fluorescence intensity and chlorophyll-a for different dilutions under different LEDs (a) blue (b) green (c) yellow (d) orange (e) red

3.2 不同来源水样荧光测量

选取蓝光 LED 为激发光源, 测量 24 种不同来源水样的浮游植物活体荧光, 图 3 所示为叶绿素 a 浓度与浮游植物荧光强度的线性关系, 二者的线性相关系数为 0.86272, 叶绿素 a 浓度与荧光强度的关系式为 $Y = 0.03551X - 5.76697$, 其中 Y 为叶绿素

a 浓度, X 为荧光强度。测量结果标准偏差 (SD) 为 8.12754。由图 2(a) 可知蓝光 LED 测量同一水样不同稀释比例样品所得叶绿素 a 浓度与荧光强度的关系为 $Y = 0.02993X - 0.4953$, 测量结果标准偏差为 1.06。比较可知当测量同一水样不同稀释比例样品时, 叶绿素 a 浓度与浮游植物荧光强度的线性

关系明显好于不同来源水样的测量结果。分析原因可能有以下几个方面：(1) 不同来源水样浮游植物种类组成不同。(2) 不同外界环境(光照强度等)导致的荧光量子效率差异。(3) 不同水体中溶解有机物(dissolved organic matter, DOM)背景荧光导致的对荧光强度的影响差异^[8-9]。

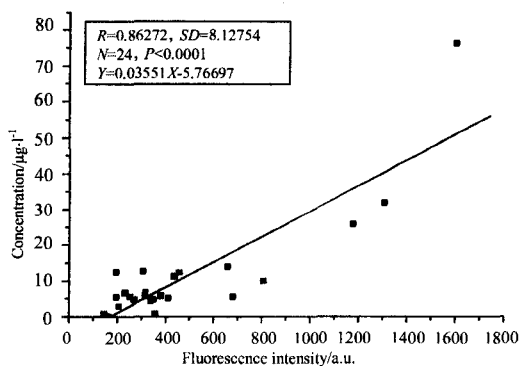


图3 不同来源水样荧光强度与叶绿素 a 浓度线性拟合曲线(含背景)

Fig.3 Linear relationship of fluorescence intensity and chlorophyll-a concentration for waters from different sources (including background fluorescence)

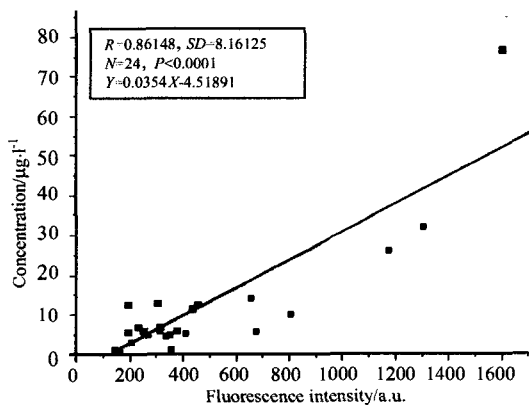


图4 不同来源水样荧光强度与叶绿素 a 浓度线性拟合曲线(去背景)

Fig.4 Linear relationship of fluorescence intensity and chlorophyll-a concentration for waters from different sources (removing background fluorescence)

3.3 DOM 背景荧光对浮游植物活体荧光测量的影响

水体 DOM 主要是由多种高分子量有机酸组

成的复杂混合物,被激发后在 450 nm 波长产生很宽的荧光发射峰,因此其存在会对 685 nm 波长处叶绿素 a 的荧光产生影响。为检验 DOM 对浮游植物活体荧光测量的影响,利用系统测量了水样经微孔滤膜过滤去除浮游植物后溶液的荧光强度,重新比较了去除背景荧光后浮游植物荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性关系。图 4 为不同来源水样去除 DOM 背景后叶绿素 a 浓度与荧光强度的线性关系: $Y = 0.0354X - 4.51891$, 线性相关系数为 0.86148。未去除背景时,叶绿素 a 浓度与荧光强度的线性关系为: $Y = 0.03551X - 5.76697$, 二者的线性相关系数为 0.86272。由此可见,背景荧光未对不同来源水样的荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性关系产生显著影响。可能的原因是 DOM 的荧光强度相对于浮游植物较弱,且不同来源水样浮游植物 DOM 的背景荧光差异较小。图 5 为蓝光 LED 激发下去除 DOM 背景荧光后,稀释样品叶绿素 a 浓度与浮游植物荧光强度的线性关系为 $Y = 0.03297X - 0.53927$, 相关系数为 0.99767。然而未去除背景时线性相关系数为 0.99807, 荧光强度与叶绿素 a 浓度线性关系则为 $Y = 0.02993X - 0.4953$ 。可见对于稀释样品,背景 DOM 荧光对浮游植物叶绿素 a 浓度的测量产生了显著的影响,需要对此影响加以校正。

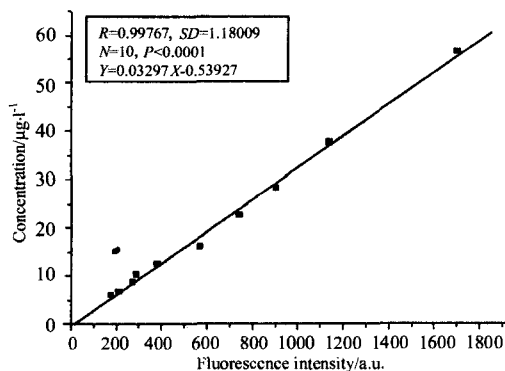


图5 蓝光激发下不同稀释比例样品荧光强度与叶绿素 a 浓度线性关系(去背景)

Fig.5 Linear relationship of chlorophyll-a and fluorescence intensity for different dilutions excited by blue LED (removing background fluorescence)

4 结 论

浮游植物活体荧光测量可以实现浮游植物浓度的原位、快速、实时测量,是发展浮游植物浓度

原位测量相关仪器的基础。本文尝试利用 5 种不同中心激发波长的超高亮 LED 取代传统脉冲氙灯和激光器等大功率激发光源, 建立了一套实验室浮游植物活体荧光测量系统。基于该系统测量了不同来源水样及对同一水样不同比例稀释样品的活体荧光强度, 研究了荧光强度与叶绿素 a 浓度的线性关系, 得出以下结论:

(1) 在 5 种不同中心激发波长的超高亮 LED 中, 蓝光 LED 是最适合的激发光源, 对应的灵敏度和检测限分别为 33.933 和 0.0278 $\mu\text{g}/\text{l}$ (叶绿素 a)。

(2) 不同来源水样的叶绿素 a 浓度与浮游植物荧光强度的线性相关性明显差于同一水样不同稀释比例样品的对应线性相关性, 由此说明浮游植物种类组成、DOM 背景荧光和环境因素造成的荧光量子效率差异严重影响活体荧光测量叶绿素 a 浓度结果的准确性。

(3) DOM 背景荧光对不同稀释比例样品浮游植物活体荧光和叶绿素 a 浓度的线性关系具有一定的影响, 尽管如此 DOM 背景荧光对不同来源水样的相应线性关系影响不明显, 说明 DOM 背景荧光对叶绿素 a 浓度测量结果的影响小于其他因素的影响 (浮游植物种类组成、环境因素造成的荧光量子效率差异等)。

因此, 利用蓝光超高亮 LED 作为激发光源测量浮游植物活体荧光是完全可行的, 这将为利用该光源研发相应的水体浮游植物浓度原位荧光检测仪提供潜在的应用可能性。同时, 浮游植物种类、荧光量子效率差异以及 DOM 背景荧光均会对利用活体荧光测量叶绿素 a 浓度产生影响, 因此需要对上述因素的影响开展进一步的研究, 以便对测量结果进行校正。

参考文献:

[1] Mouchet P, Bonnelye V. Solving algae problems: French expertise and world-wide applications [J]. *J. Water SRT. Aqua.*, 1998, 47(3): 125-141.

- [2] Haider S, Naithani V, Viswanathan P N, et al. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern [J]. *Chemosphere*, 2003, 52: 1-21.
- [3] Lv Honggang, Zhang Xihui, Gong Chunying, et al. Studies on the algorithm and identification of three dimensional fluorescence spectroscopy of algae [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(5):581-584(in Chinese).
吕洪刚, 张锡辉, 龚纯英, 等. 藻类的三维荧光光谱辨别及算法研究 [J]. *中国环境科学*, 2005, 25(5):581-584.
- [4] Pinto A M F, sperling E V, Moreira R M. Chlorophyll-a determination via continuous measurement of plankton fluorescence: methodology development[J]. *Wat. Res.*, 2001, 35(16): 3977-3981.
- [5] Dets S M, Denisov N A. Blue LED's feasibility for tissue fluorescence analysis [C]. *Proc. of SPIE*, 2000, 3917(23-24): 130-138.
- [6] Liew O W, Chen J W, Asundi A K. Development of fiber optic spectroscopy for in-vitro and in-plant detection of fluorescent proteins[C]. *Proc. of SPIE*, 2001, 4596: 208-218.
- [7] He Shurong, Xu Hongfeng. The research on green LED as fluorescence excitation source [J]. *Optical Technique*, 2002, 28(1): 9-10(in Chinese).
何树荣, 徐洪峰. 绿光 LED 激发荧光的研究 [J]. *光学技术*, 2002, 28(1): 9-10.
- [8] Zhang Qianqian, Wang Lei, Lei Shuhe, et al. Characteristics of absorption spectra of phytoplankton [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, 26(9): 1676-1680(in Chinese).
张前前, 王磊, 类淑河, 等. 浮游植物吸收光谱特征分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(9): 1676-1680.
- [9] Beutler M, Wiltshire K H, Meyer B, et al. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ* [J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 72(1):39-53.

作者简介: 王志刚 (1981-), 男, 江苏仪征人, 博士研究生, 主要从事激光诱导荧光在水质监测中的应用研究。