

基于激发荧光光谱的浮游植物分类测量方法

王志刚^{1,2}, 刘文清^{2*}, 张玉钧², 司马伟昌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, 中国科学院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031)

摘要: 提出了一种基于激发荧光光谱的浮游植物快速分类测量方法. 根据激发荧光光谱特征将淡水浮游植物分成蓝色组、绿色组和褐色组 3 组. 选用铜绿微囊藻、小球藻和脆杆藻分别作为蓝色组、绿色组和褐色组的代表, 通过对标准纯种培养体和混合培养体的全波长激发荧光光谱进行多元线性回归计算, 得到混合培养体各分组的叶绿素 a 浓度. 结果表明, 计算得到的铜绿微囊藻、小球藻和脆杆藻浓度的误差分别为 1.67%~12.70%, 0.91%~12.70%, 6.11%~40.20%, 平均误差为 5.44%、6.44% 和 20.71%. 使用带宽 20, 10, 4nm 的 4 波段(中心波长为 440, 480, 520, 610nm)代替全波长激发荧光光谱计算表明, 3 种藻类组分误差与全波长激发荧光光谱计算结果误差十分相似. 20, 10nm 波段宽度铜绿微囊藻、小球藻和脆杆藻的平均误差分别为 5.57%、7.16%、20.52% 和 7.13%、7.42%、20.02%; 4nm 波段宽度的平均误差显著增大, 分别为 8.85%、13.07%、30.67%.

关键词: 浮游植物; 激发荧光光谱; 活体荧光; 环境监测

中图分类号: X824 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2008)04-0329-05

The phytoplankton classified measure based on excitation fluorescence spectra technique. WANG Zhi-gang^{1,2}, LIU Wen-qing^{2*}, ZHANG Yu-jun², SIMA Wei-chang², 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). *China Environmental Science*, 2008, 28(4): 329~333

Abstract: A rapid classified measuring method for phytoplankton based on excitation fluorescence spectra was put forward. Based on the excitation fluorescence spectra characteristics, phytoplankton in fresh water was divided into three spectra groups—blue group, green group and brown group. Selecting *Microcystis aemginosa*, *Chlorella vulgaris* and *Fragilaria* sp. as the representative of blue group, green group and brown group, chlorophyll a concentration of each component in mixed phytoplankton cultures had been calculated by multivariate linear regression on the entire wavelength excitation fluorescence spectra of standard pure phytoplankton cultures and mixed phytoplankton cultures. The errors of the concentration of *Microcystis aemginosa*, *Chlorella vulgaris* and *Fragilaria* sp. were 1.67%~12.70%, 0.91%~12.70% and 6.11%~40.20% respectively, average values were 5.44%, 6.44% and 20.71%. Using four wave bands (central wavelength: 440, 480, 520, 610nm) of bandwidth 20, 10, 4nm for multivariate linear regression instead of entire wavelength excitation fluorescence spectra, the calculation showed that the errors of three phytoplankton components were very similar with the entire wavelength excitation fluorescence spectra results. For 20, 10nm bandwidth, average errors of *Microcystis aemginosa*, *Chlorella vulgaris* and *Fragilaria* sp. were 5.57%, 7.16%, 20.52% and 7.13%, 7.42%, 20.02% respectively. Average errors of 4nm bandwidth were obviously large than that of 20, 10nm, which were 8.85%, 13.07% and 30.67% respectively.

Key words: phytoplankton; excitation fluorescence spectra; in vivo fluorescence; environment monitoring

蓝藻或赤潮的大面积暴发是当前我国水体污染面临的最为突出的问题之一. 迫切要求环境监测部门对水体浮游植物浓度的时空演变状况进行实时监测, 及时预警. 当前国内外浮游植物浓度原位检测多采用测量 685nm 的叶绿素 a 荧光

强度, 以总叶绿素 a 浓度指示浮游植物总生物量.

收稿日期: 2007-07-20

基金项目: 国家“863”项目(2007AA061502); 安徽省人才培养及科研带头人专项基金

* 责任作者, 研究员, wqliu@aiofm.ac.cn

然而,由于不同种类浮游植物的叶绿素 a 含量和荧光量子效率不同,种群结构随着水质状况和季节变化而改变,不同种群结构的浮游植物对环境造成的危害存在差异等原因,环境监测越来越强调对不同浮游植物种群进行分类测量.由于不同种群浮游植物光合色素组成存在差异,外观上表现出不同的颜色,如蓝色、绿色、褐色等.而向水体中释放藻毒素的浮游植物通常都是蓝藻,因此国外依据色素组成分类的原理开展了浮游植物分类测量的研究,开发了相应的仪器设备^[1-3].现有的研究和设备通常以激光诱导延时激发荧光法^[4-5]和三维荧光光谱法^[7-8]结合特定的算法实现对浮游植物的分类测量.然而,这 2 种光谱技术要求的设备结构复杂、成本昂贵,分类算法要求强大的计算能力,尚无法适用于快速原位的浮游植物分类测量.本研究采用多元线性回归的算法开发了一种基于激发荧光光谱的浮游植物浓度快速分类测量方法.

1 材料与方法

1.1 混合浮游植物样品配制

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)和脆杆藻(*Fragilaria sp.*)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供.实验室培养浮游植物的纯种培养体,具体培养方法参照文献[8].利用培养 20d 的纯种培养体制配混合浮游植物样品,配制比例见表 1.

表 1 混合浮游植物培养体制配比例(mL)

Table 1 Ratio of three phytoplankton species in mixed phytoplankton cultures(mL)

混合样品	铜绿微囊藻	小球藻	脆杆藻
1	5	10	30
2	10	10	25
3	10	15	20
4	15	15	15
5	15	5	25
6	5	15	25
7	20	10	15
8	5	20	20
9	5	10	30
10	15	15	10

1.2 叶绿素 a 浓度测定

3 种藻的纯种培养体的叶绿素 a 浓度测量参照文献[9],根据各混合样品的实际配制比例计算各混合样品中各组分的叶绿素 a 浓度.

1.3 浮游植物活体激发荧光光谱测量

测量前将 3 种藻纯种培养体以及各混合浮游植物培养体暗适应 30min.利用 Ls55 型荧光分光光度计(PerkinElmer 公司)测量上述各样品激发荧光光谱,发射波长为 684nm,激发波长 400~650nm,波长间隔 0.5nm,狭缝宽度 10nm.每个样品测量 3 次,平均值作为测量结果.

2 结果与讨论

2.1 浮游植物活体荧光产生机理和激发荧光光谱特征

浮游植物体内叶绿素 a 和辅助光合色素吸收的光能一部分由叶绿素 a 通过荧光形式释放,其最大发射荧光波长为 684nm 左右.由于对不同波长的激发光吸收效率不同,即吸收的光能不同,使得不同波长激发下叶绿素 a 的荧光强度不同,形成特征的激发荧光光谱.活体浮游植物的叶绿素荧光主要是由光系统 II(PS II)天线系统中的叶绿素 a 发射^[10].图 1 为 PS II 天线系统光能吸收和荧光发射的一般模式.天线系统由含叶绿素 a 的核心天线和与种类相关的外周天线组成,核心天线吸收的光能可以直接传递给反应中心进行光合作用,而外周天线吸收的光能需要首先传递给核心天线,再由核心天线传递给反应中心^[11-12].不同的外周天线色素具有不同的吸收光谱,因此含有不同组成外周天线色素的浮游植物具有不同的激发荧光光谱^[13].

不同种群的浮游植物通常具有不同组成的外周天线色素,如绿藻门的外周天线色素为叶绿素 a/b,蓝藻门外周天线色素为藻蓝素,硅藻门外周天线色素为叶绿素 a/c 和类胡萝卜素^[14].淡水富营养化优势浮游植物可以按照外周天线色素组成分成 3 组,即绿色组、蓝色组和褐色组.本研究选用铜绿微囊藻、小球藻

和脆杆藻分别作为蓝色组、绿色组和褐色组的代表浮游植物^[8]。实验测得的铜绿微囊藻、小球藻和脆杆藻的归一化激发荧光光谱存在显著的差异(图 1)。

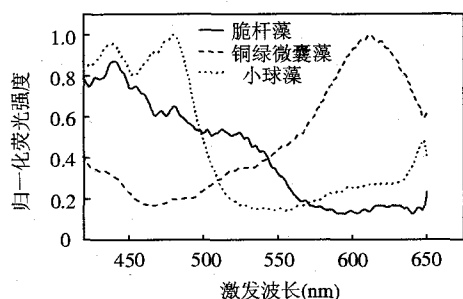


图 1 脆杆藻、铜绿微囊藻和小球藻纯种培养体激发荧光光谱

Fig.1 Excitation fluorescence spectra of three species of Phytoplankton culture (*Fragilaria* sp, *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella vulgaris*)

由图 1 可见,铜绿微囊藻的最大激发荧光峰位于 610nm 处,其次为 435nm 处,分别由活体细胞内藻蓝蛋白和叶绿素 a 吸收产生;小球藻的最大激发荧光峰位于 480nm 处,其次为 435,648nm 处,这 3 处激发荧光峰均由叶绿素 a 吸收产生,同时在 470nm 处存在一小肩峰,是由叶绿素 b 吸收造成的;脆杆藻的最大激发荧光峰位于 440nm 处,同时在 480,650nm 处存在小激发荧光峰,均由叶绿素 a 吸收产生,460nm 处存在的肩峰由细胞内的叶绿素 c 吸收产生,在 490~580nm 处,由于多种类胡萝卜素的吸收产生一个较大的吸收宽峰^[11,14]。由此可见,活体细胞内的外周天线色素组成差异使得不同种群的浮游植物具有显著不同的激发荧光光谱,而同一种群浮游植物则具有相似的激发荧光光谱。

2.2 基于全波长激发荧光光谱的浮游植物分类测量

根据多组分混合物荧光强度相加性原则^[10],混合浮游植物培养体的某一激发波长

处的激发荧光强度为该激发波长处所有浮游植物培养体激发荧光强度之和,用公式表示如下:

$$M = \begin{pmatrix} F_1 \\ F_2 \\ F_3 \\ F_4 \\ F_5 \\ \dots \\ F_i \end{pmatrix} f_{s_{ki}} = \begin{bmatrix} f_{s_{11}} & f_{s_{21}, \dots} & f_{s_{k1}} \\ f_{s_{12}} & f_{s_{22}, \dots} & f_{s_{k2}} \\ f_{s_{13}} & f_{s_{23}, \dots} & f_{s_{k3}} \\ f_{s_{14}} & f_{s_{24}, \dots} & f_{s_{k4}} \\ f_{s_{15}} & f_{s_{25}, \dots} & f_{s_{k5}} \\ \dots & \dots & \dots \\ f_{s_{1i}} & f_{s_{2i}, \dots} & f_{s_{ki}} \end{bmatrix}$$

$$M = F_i = \sum f_{s_{ki}} c_k + r$$

式中: M 为测量得到的混合浮游植物培养体各波长的激发荧光强度; F_i 为激发波长 i 处的激发荧光强度; $f_{s_{ki}}$ 为单位浓度第 k 种纯种浮游植物培养体激发波长 i 处的激发荧光强度; c_k 为第 k 种浮游植物培养体的浓度; r 为测量误差。

由此可见,若单位浓度浮游植物纯种培养体的标准激发荧光光谱已知,根据测量得到的混合浮游植物培养体的激发荧光光谱,利用多元线性回归的方法可以求出混合培养体中各组成浮游植物的浓度。

基于上述原理,本研究利用全波长的激发荧光光谱(400~650nm,0.5nm 波长间隔)对 3 种浮游植物纯培养体和配制的 10 种不同浓度比例的浮游植物混合培养体的激发荧光光谱进行了多元线性回归分析,得到了混合培养体中 3 种浮游植物组分的浓度。

由表 2 可见,铜绿微囊藻和小球藻的计算浓度与实际浓度非常接近,基于全波长激发荧光光谱的多元线性回归准确地计算得到了混合样品中铜绿微囊藻和小球藻的浓度,二者的误差分别为 1.67%~12.70%和 0.91%~12.70%,平均误差为 5.44%和 6.44%;脆杆藻误差较大,为 6.11%~40.20%,平均误差 20.71%,原因可能是混合样品中脆杆藻的荧光强度大大低于铜绿微囊藻和小球藻的荧光强度,计算结果更易受到铜绿微囊藻和小球藻荧光强度变化的影响。

表2 混合浮游植物培养体样品各组分实际浓度与全波段激发荧光光谱多元线性回归计算浓度的比较

Table 2 Comparison of true concentrations and calculated concentrations by multivariate linear regression of entire excitation fluorescence spectra for three phytoplankton components in mixed phytoplankton cultures

样品	铜绿微囊藻			小球藻			脆杆藻		
	实际值 ($\mu\text{g/L}$)	计算值 ($\mu\text{g/L}$)	误差 (%)	实际值 ($\mu\text{g/L}$)	计算值 ($\mu\text{g/L}$)	误差 (%)	实际值 ($\mu\text{g/L}$)	计算值 ($\mu\text{g/L}$)	误差(%)
1	13.81	15.57	12.7	66.01	60.93	7.70	64.21	82.97	29.20
2	27.62	26.32	4.71	66.01	61.77	6.42	53.51	47.26	11.70
3	27.62	26.43	4.31	99.02	98.12	0.91	42.81	50.12	17.10
4	41.43	40.59	2.03	99.02	92.27	6.82	32.10	30.14	6.11
5	41.43	39.52	4.61	33.01	32.03	2.97	53.51	50.04	6.48
6	13.81	14.66	6.16	99.02	95.78	3.27	53.51	44.41	17.00
7	55.24	51.10	7.49	66.01	61.29	7.15	31.10	44.87	44.30
8	13.81	13.58	1.67	132.02	121.7	7.82	42.81	25.60	40.20
9	13.81	13.19	4.49	66.01	57.60	12.70	64.21	51.40	20.00
10	46.61	43.73	6.18	111.40	101.80	8.62	24.08	27.71	15.10

2.3 基于多波段激发荧光光谱的浮游植物分类测量

浮游植物激发荧光光谱的差异主要是外周天线色素组成不同造成的,某一色素通常在某些特定波段有较强吸收,使得相应波段具有较强的激发荧光强度.因此,不同浮游植物的激发荧光光谱主要在某几个波段存在较大的差异.根据多元线性回归的原理,只需合理选择激发荧光差异最为显著的若干波段,即可使用这些波段替代整个激发荧光光谱进行多元线性回归分析.大大节省了测量光谱的时间和多元线性回归的计算量,使得该方法更适用于便携式小型荧光仪.

根据3种浮游植物所含外周天线色素的最大吸收波长,结合其实际激发荧光光谱,以440,480,520,610nm作为波段中心波长,分别选择20,10,4nm波段宽度进行4波段激发荧光光谱多元线性回归分析.

由表3,图2可见,20,10nm波段宽度的多元线性回归与全波长多元线性回归结果的误差范围与平均误差接近,而4nm波段宽度多元线性回归分析结果的误差范围和平均误差明显高于全波

长多元线性回归结果.因此,可以认为20,10nm波段宽度的4个特征波段可以用来替代整个激发荧光光谱进行多元线性回归分析.基于多波段激发荧光光谱的多元线性回归可以准确地对混合浮游植物浓度进行分类测量.

表3 不同波段宽度多元线性回归结果误差分析(%)

Table 3 Error analysis of multivariate linear regression results for different chosen band width(%)

波段	铜绿微囊藻		小球藻		脆杆藻	
	范围	平均值	范围	平均值	范围	平均值
全波长	1.67~12.70	5.44	0.91~12.70	6.44	6.11~40.20	20.71
20nm	1.3~18.30	5.57	2.54~12.40	7.16	3.29~58.60	20.52
10nm	0.87~18.60	7.13	3.44~12.70	7.42	0.87~52.20	20.02
4nm	0.58~21.10	8.85	6.74~40.90	13.07	0.47~65.60	30.67

与其他荧光光谱(如三维荧光光谱)分类算法比较,基于全波长激发荧光光谱和多波段激发荧光光谱的浮游植物分类测量方法具有光谱简单、计算快速等优点,在便携式的浮游植物荧光检测设备中具有很好的应用前景.

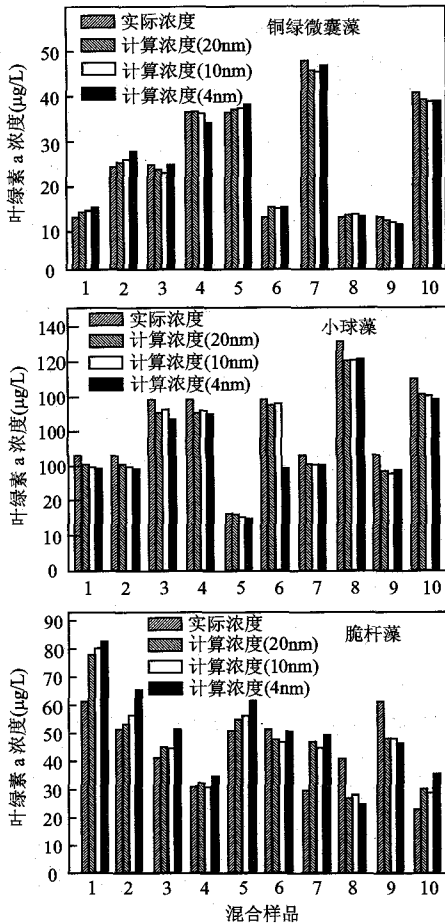


图2 混合浮游植物培养体样品各组分实际浓度与多波段激发荧光光谱多元线性回归计算浓度比较

Fig.2 Comparison of true concentrations and calculated concentrations by multivariate linear regression of multi excitation fluorescence bands for three phytoplankton components in mixed phytoplankton cultures

3 结语

基于全波长激发荧光光谱和不同波段宽度的多波段激发荧光光谱,利用多元线性回归算法计算得到了铜绿微囊藻、小球藻、脆杆藻混合浮游植物培养体中各组分的浓度。其中,全波长激发荧光光谱计算得到的铜绿微囊藻、小球藻、脆杆藻的浓度误差分别为 1.67%~12.70%、0.91%~12.70% 和 6.11%~40.20%, 平均误差分别为 5.44%、6.44%和 20.71%。20,10nm 波段宽度的多波段激发荧光光谱计算结果与上述结果近似,而 4nm 波段宽度的多波长激发荧光光谱计算得到

的 3 种藻类浓度误差则显著增大。

参考文献:

- [1] Yentsch C S, Phinney D A. Spectral fluorescence: an taxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations [J]. *Journal of Plankton Research*, 1985,7(5):617-632.
- [2] Kolbowski J, Schreiber U. Computer-controlled phytoplankton analyzer based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer [A]. *Photosynthesis: from light to biosphere(Vol. V)* [C]. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1995: 825-828.
- [3] Schreiber U. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications [A]. *Photosynthesis: Mechanisms and effects(Vol. V)*[C]. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1998:4253-4258.
- [4] Yacobi Y Z, Gerhardt V, Gonen-zurgil Y, et al. Delayed fluorescence excitation spectroscopy: A rapid method for qualitative and quantitative assessment of natural population of phytoplankton [J]. *Water Research*, 1998,32(9):2577-2582.
- [5] Bodemer U. Variability of phycobiliproteins in cyanobacteria detected by delayed fluorescence excitation spectroscopy and its relevance for determination of phytoplankton composition of natural water samples [J]. *Journal of Plankton Research*, 2004,26(10): 1147-1162.
- [6] 张前前,类淑河,王修林,等.浮游植物活体三维荧光光谱分类判别方法研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2004,24(10):1227-1229.
- [7] 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.
- [8] 王志刚,刘文清,张玉钧,等.三维荧光光谱法分类测量水体浮游植物浓度 [J]. *中国环境科学*, 2008,28(2):136-141.
- [9] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法 [M]. 4 版.北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Kehrberg G, Voigt J, SchrÖtter T, et al. Excitation equilibration in the light-harvesting complex of Photosystem II of higher plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995,1231(2):147-156.
- [13] Moberg L, Karlberg B, Sørensen K, et al. Assessment of phytoplankton class abundance using absorption spectra and chemometrics [J]. *Talanta*, 2002,56(1):153-160.
- [14] Poryvkina L, Babichenko S, Leeben A. Analysis of phytoplankton pigments by excitation spectra of fluorescence [J]. *EARSel eProceedings*, 2000,1(1):224-232.

作者简介: 王志刚(1981-),男,江苏仪征人,中国科学技术大学与中国科学院安徽光学精密机械研究所联合培养博士研究生,主要从事激光诱导荧光在水质监测中的应用研究.发表论文 9 篇。