

DOI: 10.3969/j.issn.1673-6141.2011.05.006

# 荧光法藻类光合作用活性测量中激发光强的 选取与控制

钟留勇, 赵南京, 殷高方, 肖雪, 段静波, 张恺, 张玉钧

(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:** 以高亮 LED 为激发光源研究了藻类光合作用活性的快速、原位测量方法。通过对不同藻类的吸收光谱曲线分析, 结合实验测量研究了在藻类光合作用活性测量中采用测量光、饱和脉冲光和光化光三种不同激发光照情况下获得的光诱导荧光曲线; 为了提高激发光源的稳定性, 研究并设计了基于升压式的 LED 恒流驱动电路, 消除了电源电压波动和温度变化等对光源光照度不稳定性的影响, 为藻类光合作用活性测量系统的设计提供了基础参数。

**关键词:** 荧光; 藻类光合作用活性; 激发光源; LED

**中图分类号:** O433

**文献标识码:** A

**文献编号:** 1673-6141(2011)05-0357-07

## Selection and Control of Excitation Light Intensity in Measurement of Algae Photosynthesis Activity Based on Fluorescence Technique

ZHONG Liu-yong, ZHAO Nan-jing, YIN Gao-fang, XIAO Xue, DUAN Jing-bo,  
ZHANG Kai, ZHANG Yu-jun

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

**Abstract:** The rapid and *in situ* measuring methods of algae photosynthesis activity by using highlight LED as the excitation light source was presented. Based on the analysis of the absorption spectrum of different algae, the fluorescence induced curve was obtained by using three kinds of excitation light source of measurement light, saturation pulse light and actinic light in the measurement of algae photosynthesis activity. To improve the stability of the excitation light source, the constant current drive circuit based boost circuit was designed to eliminate the effects of the supply voltage fluctuations and temperature changes on the instability of the

**收稿日期:** 2011-03-15; **修改日期:** 2011-04-06

**基金项目:** 国家 863 计划 (2009AA063005)、国家重大科技专项 (2008ZX07420-008-005)、安徽省自然科学基金 (11040606M26)、所长基金项目 (Y03AG31144) 资助

**E-mail:** njzhao@aiofm.ac.cn

illumination of excitation light source, and to provide basic parameters for the design of the measurement system of algae photosynthesis activity.

Key words: Fluorescence; algae photosynthesis activity; excitation light source; LED

## 1 引言

藻类光合作用活性指示了藻类的生长状态,并直接反映了藻类生长的潜能。关于藻类光合作用活性的测量技术,研究较多的是光诱导荧光光谱<sup>[1]</sup>与光声光谱等。其中光诱导荧光光谱技术被广泛用于定性和定量对水中溶解的有机物、油类污染物以及各种浮游植物生物量的监测,并且具有快速、原位、对样品无损伤等优点,利用光诱导荧光光谱技术在藻类光合作用活性测量研究方面也有较多工作开展。

诱导荧光光谱技术中,激发光源的选取与控制是关键,对比不同激发光源的特点,并结合藻类色素的吸收光谱,选择高亮 LED 作为激发光源并确定了其波长和强度。

由于 LED 工作电流受电源电压波动和温度的影响较大,本文研究并设计了基于升压式的 LED 恒流驱动电路,通过对 LED 进行恒流控制,消除了电源电压波动和温度变化等对光源强度不稳定性影响。

## 2 荧光法藻类光合作用活性测量原理

水体中不同藻类的色素虽然有异,但叶绿素 a 是多数藻类主要的捕光色素,荧光的产生也主要来自叶绿素 a。叶绿素分子在吸收光能后,会在能级间发生跃迁,这一过程伴随着能量的释放,释放的能量有三种去处:光合作用、热耗散和叶绿素荧光,即:光合作用 + 热耗散 + 叶绿素荧光 = 1(总吸收的光能),根据这一关系可以得到荧光所占的比重,即荧光量子效率。通过测量藻类在不同状态(有无光合作用)下的荧光强度,便可计算出藻类光合作用活性的最大荧光量子效率、实际量子效率,用来表征藻类光合作用的潜能。

不同状态下藻类荧光的测量过程<sup>[2]</sup>简述如下:藻类样品经过一段时间的暗适应后打开弱测量光 ML,激发色素的本底荧光,此时不产生光合作用(无光化学猝灭),获得最小荧光  $F_0$ ,几秒钟后打开持续时间很短的饱和脉冲光 SP,获得最大荧光  $F_m$ (荧光饱和),再经过一段时间打开光化光 AL,藻类能够进行正常的光合作用,在这一时间段内,荧光强度随着时间的增加逐渐下降并趋于稳定荧光  $F_s$ ,此时再次加上饱和脉冲光,获得的荧光  $F'_m$ (即在正常光合作用下的最大荧光)。因此,通过对三种激发光源的选取并控制其光强,激发藻类物质获得  $F_m$ 、 $F'_m$  和  $F_0$  三个参数,就可以计算出叶绿素的实际量子效率  $\Phi_{ps} = (F'_m - F_s)/F'_m$ 。

## 3 激发光源的确定与控制

### 3.1 LED 作激发光源

在光诱导荧光光谱技术中,根据不同的需求需要选择合适的激发光源,常用的激发光源主要有脉冲氙灯、汞灯、激光器等,不仅需要高压供电,而且体积大,不适于原位测量应用。随着 LED 技术的快速发展,以 LED 作为激发光源具有体积小、稳定可靠、价格低廉等优点,工作波长范围覆盖了近紫外到近红外光谱波段。因此,在藻类光合作用活性的原位、快速测量中,LED 作为激发光源具有较高的性价比与广阔的应用前景。

### 3.2 藻类吸收光谱与 LED 波长选择

由于不同的藻对光的吸收不同,即使同一种藻,因为有多种色素的存在,也会存在一个或多个吸收峰,因此,需要综合考虑不同藻类的光谱吸收特征<sup>[3]</sup>来选取最佳的激发光源波长。叶绿素和类胡萝卜素是藻类的光合色素,荧光主要是由叶绿素和类胡萝卜素捕获光能产生。其中叶绿素有

两个主要的吸收峰, 分别位于蓝光和红光波段, 类胡萝卜素的吸收波段主要位于蓝光波段 (图 1(a) 所示)。根据文献 [4] 中 5 种不同波长 LED 激发荧光的实验研究结果, 蓝光 LED 有最低的浓度检测

限  $0.0278 \mu\text{g/L}$ , 最高的灵敏度 33.933。因此实验选取 470 nmLED 作为激发光源, 其发射光谱 (图 1(b) 所示) 与叶绿素和类胡萝卜素的主吸收峰相吻合。

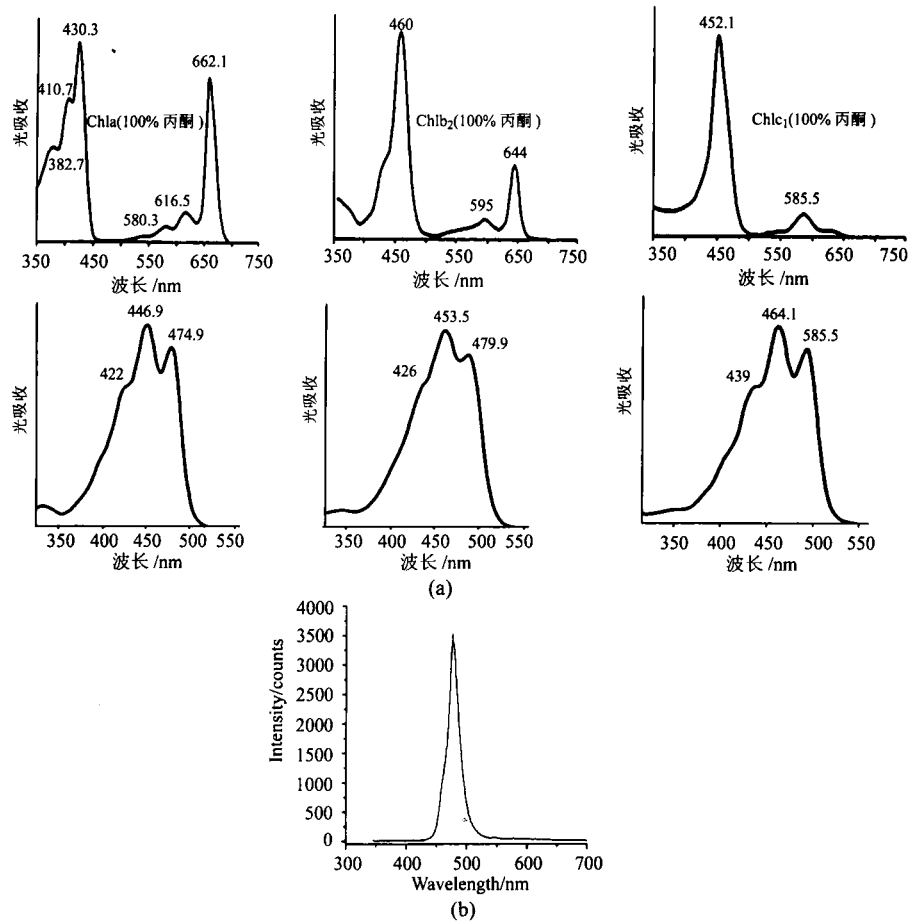


图 1 叶绿素 a、b<sub>2</sub>、c<sub>3</sub>; α、β、γ-类胡萝卜素的吸收光谱 (a) 和蓝色 LED 的发射光谱 (b)

Fig.1 Absorption spectrum of chlorophyll a、b<sub>2</sub>、c<sub>3</sub>; α、β、γ-carotenoid(a) and emitting spectrum of blue LED(b)

### 3.3 激发光源控制

在藻类荧光的原位测量中, 由于荧光信号较弱, 且 LED 光源会随着温度的变化而产生峰值波长的漂移 (波长随温度的升高出现蓝移), 为了提高测量信号的准确性和可靠性, 文章研究并设计了升压式 LED 恒流驱动电路, 通过对 LED 进行恒流控制, 消除了电源电压波动和温度变化等对光源强度不稳定性的影响。

恒流驱动的设计方法 [5] 有多种, 本文实验中

以 MAX1698 为开关电源芯片设计了 LED 恒流驱动电路, 通过控制恒定的电流输出获得了 LED 光强的稳定输出。驱动电路工作原理如图 2 所示。

MAX1698 的使能端 SD 与单片机 [6] 的 IO 口相连接, 控制 LED 按照程序设定的时序工作。其中, AD5243 为数字电位器, 具有 IIC 通信接口, 电阻输出端 A2、W2、B2 分别接 MAX1698 的 REF、ADJ、GND 端, 调节 LED 的工作电流。升压模块由电感、整流管和开关管组成, 电路的

升压主要是通过电感的储能来实现。开关管的占空比决定了电感储能的多少，因此减小开关器件(场效应管)的导通损耗和开关损耗是提高电路效率的关键，为此电路需要选择饱和压降小、工作频

率好的场效应管和肖特基二极管。图 3 分别为电路工作时采集到的开关管漏极电压、电感电流、开关管栅极电压随时间变化的波形图。

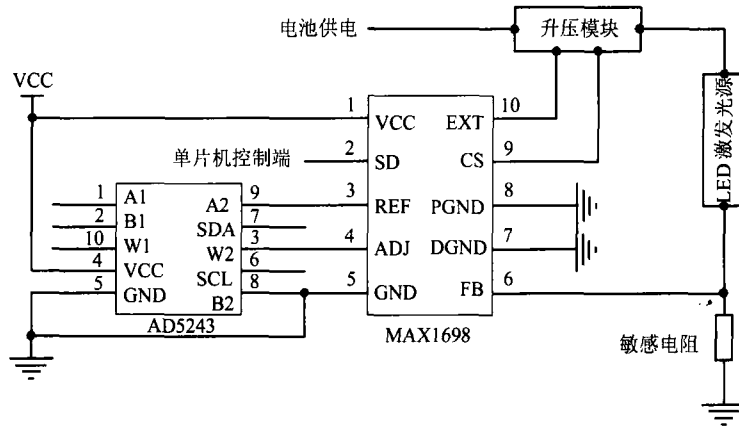


图 2 MAX1698 恒流驱动电路原理图

Fig.2 Theoretic diagram of MAX1698

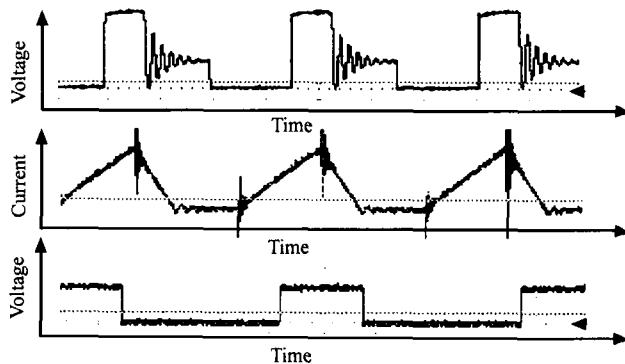


图 3 电路工作波形图

Fig.3 Working wave pattern of the circuit

可以看出，升压电路主要的工作原理是电感的充放电。充电时，开关管打开，电感电流线性增加，开关管漏极电压最低；放电时，开关管关闭，电感电流持续降低，开关管漏极电压最高。电压被升高后作用到 LED 激发光源上，虽然受 LED 的温度特性和其他因素的干扰，电压会不稳定，但流过的电流通过反馈端 (FB) 电压 (300 mV) 和敏感电阻的比值控制，则可以保持恒定。

### 4 实验结果分析

实验，首先进行蓝光 LED(波长 470 nm) 光源强度与电压变化关系的分析，通过改变电压(梯度 0.1 V)，测量对应的工作电流和光照度，其中光照度测量使用光量子计(型号：US-SQS/WB)，表 1 为实验测量结果，图 4 为测量结果的线性拟合。

由图 4 可知，在一定范围内，LED 电压、光照度以及电流之间具有较好的线性变化关系，相

关系数分别为 0.9847 和 0.9661。由藻类光合作用活性测量原理可知, 测量中所需的激发光源主要有测量光、光化光和饱和脉冲光, 其中测量光工作时, 光照度小, 不足以引起光合作用, 也就没有了光化学猝灭现象, 荧光值保持不变; 饱和脉冲光工作时, 藻内电子门全部关闭, 荧光值达到饱和, 持续一段时间后才逐渐下降, 实验测量波形如图 5 所示。实验中初步确定了测量光光照度为 1~600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 饱和脉冲光光照度大于 6000

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 光化光光照度约为 4300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。

为了在实际应用中获得最佳的测量效果, 以光量子计实际测量了户外一天中自然光的光照度变化 (2011 年 01 月 06 日), 如图 6 所示。可以看出, 10:00~15:00 这段时间内, 光照度范围为 1500~3000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 结合图 4 得到对应的 LED 工作电流为 8~16 mA, 因此, 通过调节 LED 的工作电流可以得到不同时刻的光化光强度, 并最终获得不同时刻的藻类光合作用活性。

表 1 LED 电压、电流与光照度变化关系

Table 1 Variation of voltage, current and illuminance of LED

$U(\text{V})$	2.6	2.7	2.8	2.9	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6
$I(\text{mA})$	0.2	1.0	3.1	5.9	9.7	13.6	18.0	22.9	28.2	33.9	39.7
Illuminance( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )	41	207	599	1145	1834	2543	3229	3976	4725	5473	6249

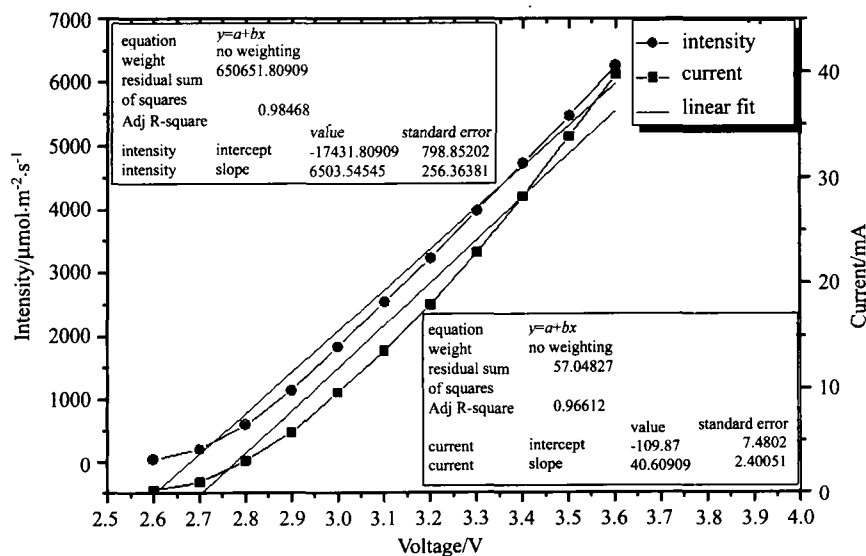


图 4 LED 工作电压、光照度与电流关系

Fig.4 Characteristic of working voltage, illuminance and current

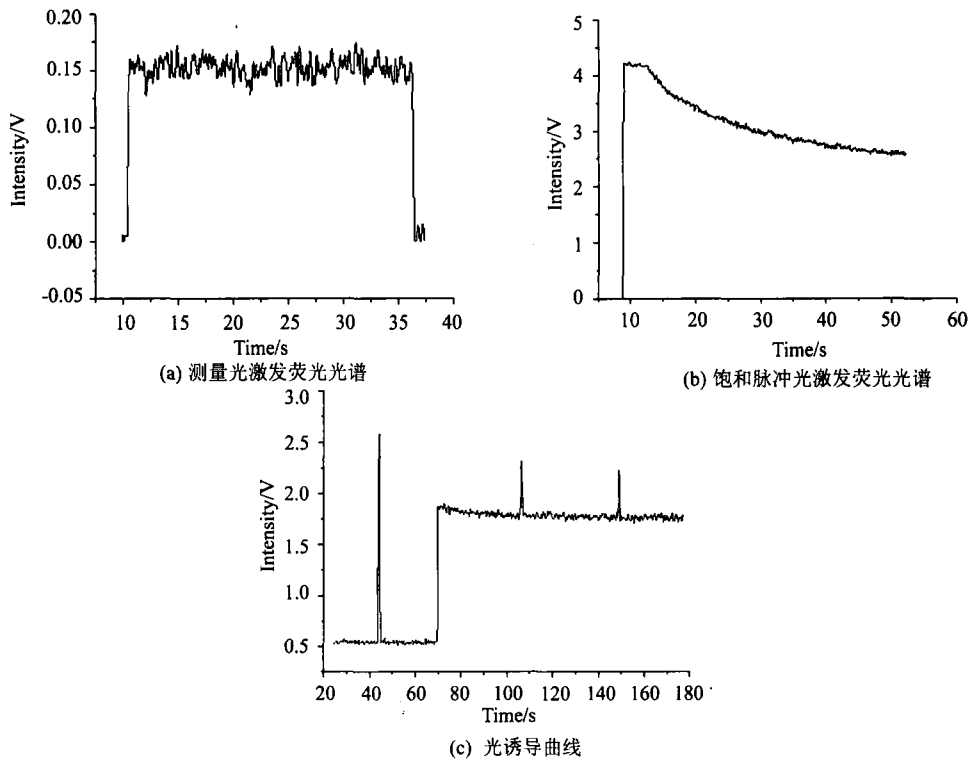


图 5 激发荧光光谱图

Fig.5 Excited fluorescence spectrum

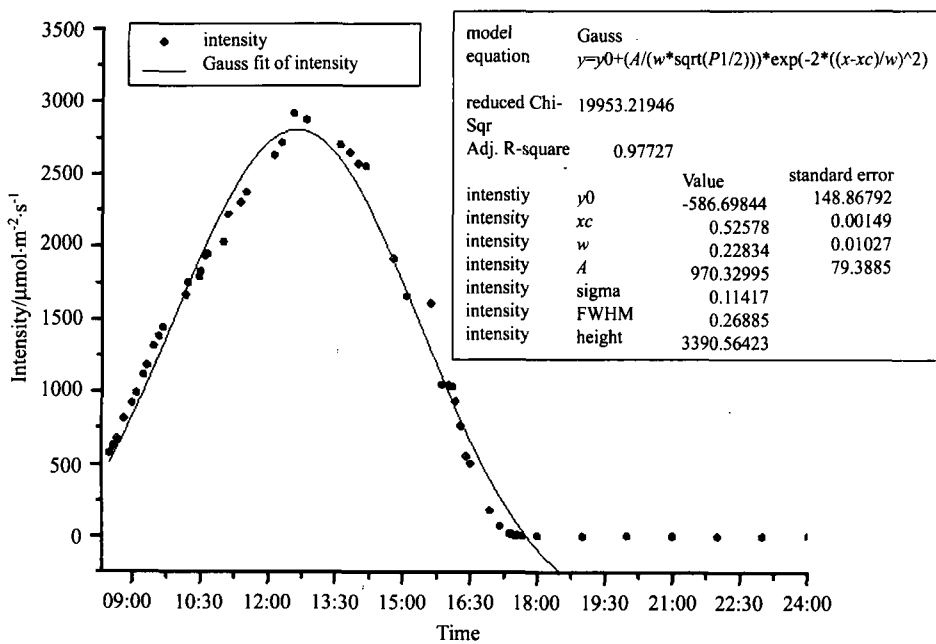


图 6 一天中光照度曲线

Fig.6 Curve of illuminance in a day

## 5 结 论

基于荧光光谱技术的藻类光合作用活性测量提供了一种快速、原位的方法, 可为我国湖泊预警模型的建立提供藻类光合作用活性实时的测量数据。测量电路中的激发光源选择蓝光 LED, 其中心波长接近藻类主要光合色素的吸收波长, 光强大、效率高, 使荧光检测能够具有更高的灵敏度和检测限, 恒流控制电路的设计提高了测量系统的稳定性, 更适于藻类光合作用活性的应用测量。

### 参考文献:

- [1] Sima Weichang, Zhang Yujun, Wang Zhigang, et al. Design and realization of 3D-EEM system based on multi-wavelength LED array as exciting light source [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2007, (6): 75-81(in Chinese).  
司马伟昌, 张玉钧, 王志刚, 等. 基于多波长 LED 阵列激发的三维荧光光谱系统的设计与实现 [J]. *现代科学仪器*, 2007, (6): 75-81.
- [2] Juneau P, Green B R, Harrison P J. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects [J]. *Photosynthetica*, 2005, 43(1): 75-83.
- [3] Han Boping, Han Zhiguo, Fu Xiang. *The Mechanism and Model of Algae Photosynthesis* [M]. Beijing: Science Press, 2001: 6-16(in Chinese).  
韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 6-16.
- [4] Wang Zhigang, Liu Wenqing, Zhang Yujun, et al. Research on *in-vivo* measurement of phytoplankton biomass by LED excitation source [J]. *Journal of Atmospheric and Environmental Optics*, 2008, 3(1): 36-41(in Chinese).  
王志刚, 刘文清, 张玉钧, 等. LED 激发光源的水体浮游植物浓度活体检测系统研究 [J]. *大气与环境光学学报*, 2008, 3(1): 36-41.
- [5] Wei Guangjun, Zhu Yuhong. Design of some kinds of steady current source [J]. *Electronic and Automation*, 2000, (1): 45-46(in Chinese).  
尉广军, 朱宇虹. 几种恒流源电路的设计 [J]. *电子与自动化*, 2000, (1): 45-46.
- [6] Li Gang, Lin Ling, Tian Xiaofang. *The SCM Guide of Learning in Practicing* [M]. Beijing: Beijing University of Aeronautics and Astronautics Press, 2006: 87-93.  
李刚, 林凌, 田晓方. 练中学单片机教程 [M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2006: 87-93.

作者简介: 钟留勇 (1985-), 男, 河南周口人, 研究生, 主要从事微弱荧光信号检测与处理研究。