

文章编号: 0258-7025(2007)08-1115-05

高斯分解法研究浮游植物荧光激发光谱

卢璐¹, 苏荣国^{1,2}, 胡序朋¹, 王卫国³, 王修林^{1,2}, 祝陈坚^{1,2}

(中国海洋大学¹ 海洋污染生态化学实验室,
² 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, ³ 数学系, 山东 青岛 266100)

摘要 研究了甲藻和硅藻两个门类的六种浮游植物在发射波长为 675 nm 处的活体叶绿素荧光激发光谱。对其作四阶导数分析的基础上, 根据导数光谱中出现的极大值位置和数量, 对甲藻门和硅藻门的激发光谱分别设定统一的初始中心波长。以初始波长为中心对激发光谱做高斯分解及多峰拟合, 建立门类水平上统一的高斯基库。研究发现, 在波长为 350~550 nm 内, 甲藻和硅藻的高斯基库特征差异显著, 而同门类的高斯基库特征相似, 表明高斯分解法为甲藻和硅藻的分类识别提供有效的技术手段。利用高斯基库的参数拟合原光谱, 拟合曲线与原光谱能较好地吻合, 误差小。高斯分解法可再现活体激发光谱中重叠的色素荧光峰, 也为光合色素的活体测定提供了新的方法。

关键词 光谱学; 高斯基库; 四阶导数; 高斯分解; 浮游植物; 叶绿素荧光激发光谱

中图分类号 O 657.3 文献标识码 A

Research on Phytoplankton Chlorophyll Fluorescence Excitation Spectra by Gaussian Decomposition

LU Lu¹, SU Rong-guo^{1,2}, HU Xu-peng¹,
WANG Wei-guo³, WANG Xiu-lin^{1,2}, ZHU Chen-jian^{1,2}

(¹Laboratory of Marine Polluted Ecological Chemistry,
²Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education,
³Department of Mathematics, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China)

Abstract *In vivo* chlorophyll fluorescence excitation spectra at 675 nm emission wavelength of six phytoplankton species belonging to dinophyta and bacillariophyta were studied. The fourth-derivative analysis was performed on the spectra to set up the uniform initial central wavelengths for excitation spectra of dinophyta and bacillariophyta, respectively, according to the position and number of maxima on the derivative spectra. With these determined wavelengths as centre, Gaussian decomposition and multi-peak fitting were done to the spectra to establish Gaussian database on the level of divisions. The results suggested that at the excitation wavelength from 350 to 550 nm, significant differences of Gaussian database presented between dinophyta and bacillariophyta while similar characteristics were found in the same division. The fitting curve reconstructed from Gaussian parameters was in coincident with the *in vivo* excitation spectra. Gaussian decomposition could reproduce overlapping pigment fluorescence peaks. This method provides not only a useful tool to differentiate dinophyta and bacillariophyta, but also a new technique for determination of *in vivo* photosynthetic pigments.

Key words spectroscopy; Gaussian database; fourth-derivative; Gaussian decomposition; phytoplankton; chlorophyll fluorescence excitation spectra

收稿日期: 2006-12-05; 收到修改稿日期: 2007-03-09

基金项目: 863 计划(2006AA09Z178)和 973 计划(2001CB409703)资助项目。

作者简介: 卢璐(1982—), 女, 浙江人, 硕士研究生, 主要从事赤潮浮游植物荧光检测技术研究。

E-mail: lululu029000@sina.com

导师简介: 王修林(1960—), 男, 山东人, 教授, 博士生导师, 长期从事海洋化学、海洋环境科学教学和研究工作。

E-mail: xlwang@ouc.edu.cn (通信作者)

1 引 言

天线色素对能量的吸收和传递方式决定了浮游植物活体荧光光谱的形状^[1],它们在特征波长附近的荧光峰具有高斯线型分布^[2,3],荧光强度在重叠区域具有可加性。对于多种色素成分共存的活体浮游植物,其叶绿素荧光激发光谱可用这些色素的高斯函数线性加和而成^[2,4],由于胞内色素比率不同,高斯函数的线性组合也不同,以此可以作为识别浮游植物群落的依据。

甲藻和硅藻是我国近海浮游植物群落的主要组成者,也是主要的赤潮浮游植物。本文以分属这两个门类的六种常见赤潮藻为对象,利用导数分析^[4~6]和高斯分解法^[2,3]建立不同门类浮游植物叶绿素荧光激发光谱的高斯基库,以期建立浮游植物的快速识别和定量测定的现场荧光分析技术。

2 实验与方法

2.1 藻种培养

实验藻种由中国海洋大学海洋污染生态化学实验室提供,分别为甲藻门(Dinophyta)的裸甲藻(GY)、东海原甲藻(PR)和锥状斯克里普藻(SC),硅藻门(Bacillariophyta)的中肋骨条藻(SK)、尖刺拟菱形藻(PS)和柔弱角毛藻(DE)。

藻种培养温度 20 ℃,光照强度 15000 lx,光照

培养箱的光暗周期 12 h:12 h,用于接种的藻液为已适应上述生长条件的藻液,藻生长进入指数生长期后收获。

2.2 浮游植物荧光光谱测定

用 Hitachi F4500 荧光分光光度计扫描活体三维荧光光谱。设定激发波长的范围为 300 ~ 600 nm,激发步长 5 nm,激发狭缝 5 nm,发射波长的范围为 500 ~ 800 nm,发射步长 5 nm,发射狭缝 5 nm,扫描速度 12000 nm/min。

3 结果与讨论

3.1 中心波长

通过自编的 Matlab 程序分析三维荧光光谱,得到这几种浮游植物在 675 nm 处有最大叶绿素荧光发射强度。取特征发射波长为 675 nm 处的荧光激发光谱,对其进行四阶导数分析^[7]。原始荧光激发光谱细小杂峰众多,形状粗糙,为了便于更好地识别谱图,采用多项式平滑法对光谱进行预处理,结果如图 1 所示。经过平滑处理不仅有效消除了噪声,同时也保留了有用的信息。为了消除因藻密度的不同引起的荧光强度差别,分别对平滑后的光谱进行了归一化处理,然后对 350 ~ 550 nm 波长范围内的光谱进行了导数分析。六个藻种各自典型的叶绿素荧光激发光谱和四阶导数光谱分别如图 2 所示。

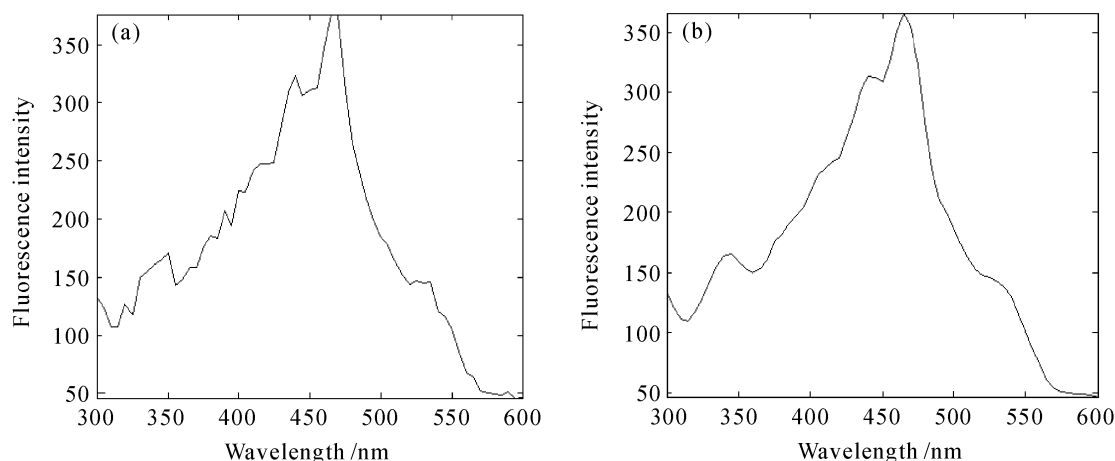


图 1 裸甲藻平滑处理前(a)后(b)的荧光激发光谱

Fig. 1 Original (a) and smoothed (b) fluorescence excitation spectra of GY

对叶绿素荧光激发光谱取四阶导数后,导数光谱与原始光谱相比谱带变窄,减少了与其他谱带之间的重叠,同时光谱被分为若干个荧光峰(对应于四阶导数光谱的极大值)。根据导数光谱理论,它们应分别相应于不同荧光物质的最大吸收位置。如图 2

所示,在 350 ~ 550 nm 波长范围内,甲藻和硅藻的四阶导数光谱均出现了 6 个极大值,各自位于 380 ~ 385 nm, 400 ~ 410 nm, 430 ~ 440 nm, 460 ~ 470 nm, 500 ~ 510 nm, 530 ~ 540 nm 之间。其中位于可见光区的第 2, 3 个极大值主要由叶绿素 a^[2,8]

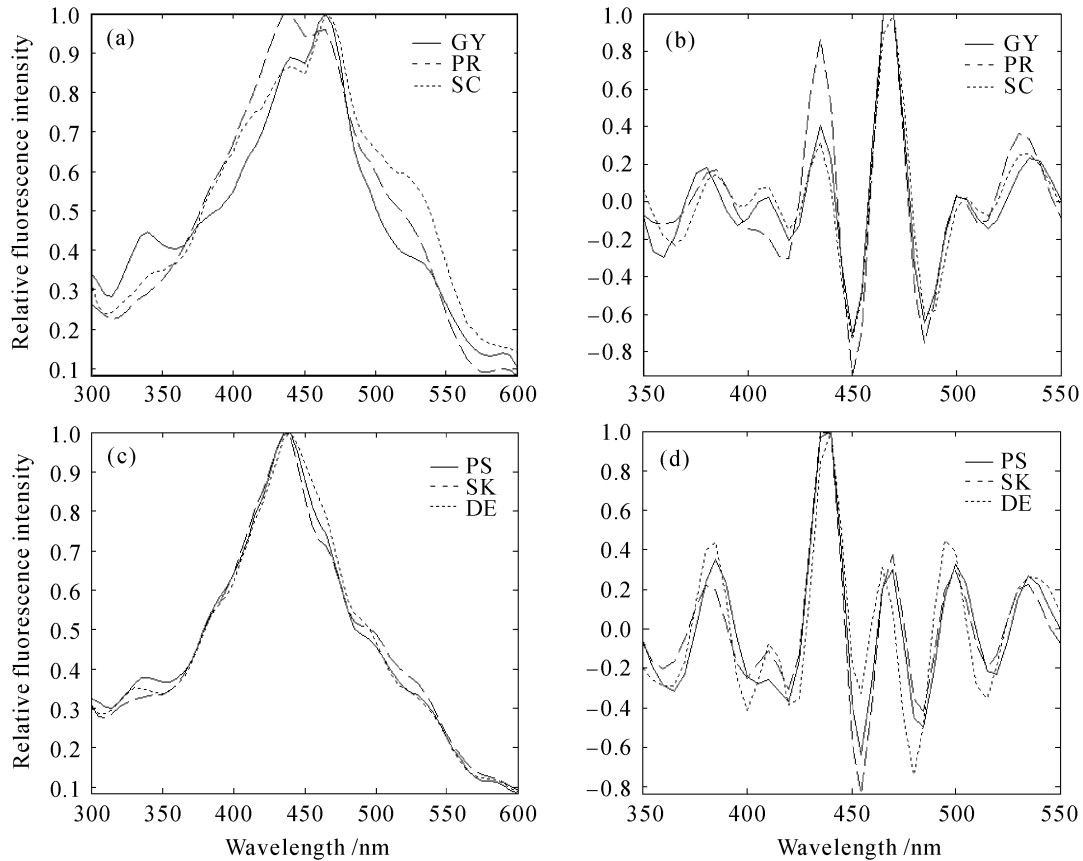


图 2 活体叶绿素荧光激发光谱(a,c)及对应的四阶导数光谱(b,d)

Fig. 2 *In vivo* chlorophyll fluorescence excitation spectra (a,c) and their fourth-derivative spectra (b,d)

的吸收所致,第 4 个极大值相应于叶绿素 c 及其衍生物,而波长位置最大的两个极大值均为类胡萝卜素^[3,9]所在的位置。

由此可见,四阶导数法为设定中心波长提供了基本的依据,通过导数光谱中出现的极大值位置和数量可分别对甲藻和硅藻两个门类的浮游植物设定统一的初始中心波长(见表 1)。在门类水平上建立统一的高斯基库,凸现两个门类光谱之间的差异,以达到区分的目的。为了保证高斯拟合的准确性,将第一个中心波长设为 345 nm。在 350~550 nm 范围内甲藻门和硅藻门分别得到 7 个初始中心波长,列于表 1 中,以这些波长为中心对不同门类藻种的荧光激发光谱进行高斯分解及多峰拟合。

表 1 高斯峰的初始中心波长

Table 1 Initial central wavelengths of Gaussian peaks

Division	Wavelength /nm						
	1	2	3	4	5	6	7
Dinophyta	345	380	410	436	468	500	530
Bacillariophyta	345	385	410	438	468	500	535

3.2 荧光激发光谱高斯基库的建立

调用自编的 Matlab 高斯分解程序,以初始波长

为中心,对平滑及归一后的叶绿素荧光激发光谱做高斯分解,建立不同门类藻种的高斯基库,并对原光谱做多峰拟合,其拟合结果及误差曲线如图 3 所示。

经过高斯分解,叶绿素荧光激发光谱(实线)被分解为 7 个呈正态分布的高斯函数。对甲藻和硅藻的平行样光谱处理后,得到各高斯函数参数,即中心波长 U ,半峰宽 S 和相对荧光强度 C 的平均值(μ)与平行样光谱的 3 倍标准偏差(3σ),列于表 2 和表 3 中,同时利用这些参数对原始荧光激发光谱进行拟合,能获得相对误差较小的拟合曲线(点线)。

高斯分解法可有效提取甲藻不同种类之间的共同特征,使同一门类藻种的色素高斯峰特征基本相似,而不同门类的藻种之间则差异显著。分解后高斯峰所在的中心波长与初始值相差无几,调整幅度最大不超过 5 nm;在一定的误差范围内,拟合曲线与原始光谱几乎完全重合,拟合误差最大的位置主要位于 450~550 nm 的波长范围内,这与 1991 年 Nicolas Hoepffner 等^[2]的研究结果相一致。比较两个门类的高斯基库特征可知,甲藻门和硅藻门各自以 5 号高斯峰(468 nm 左右)和 4 号高斯峰(440 nm 左右)为最高峰;且硅藻的 2 号高斯峰在高

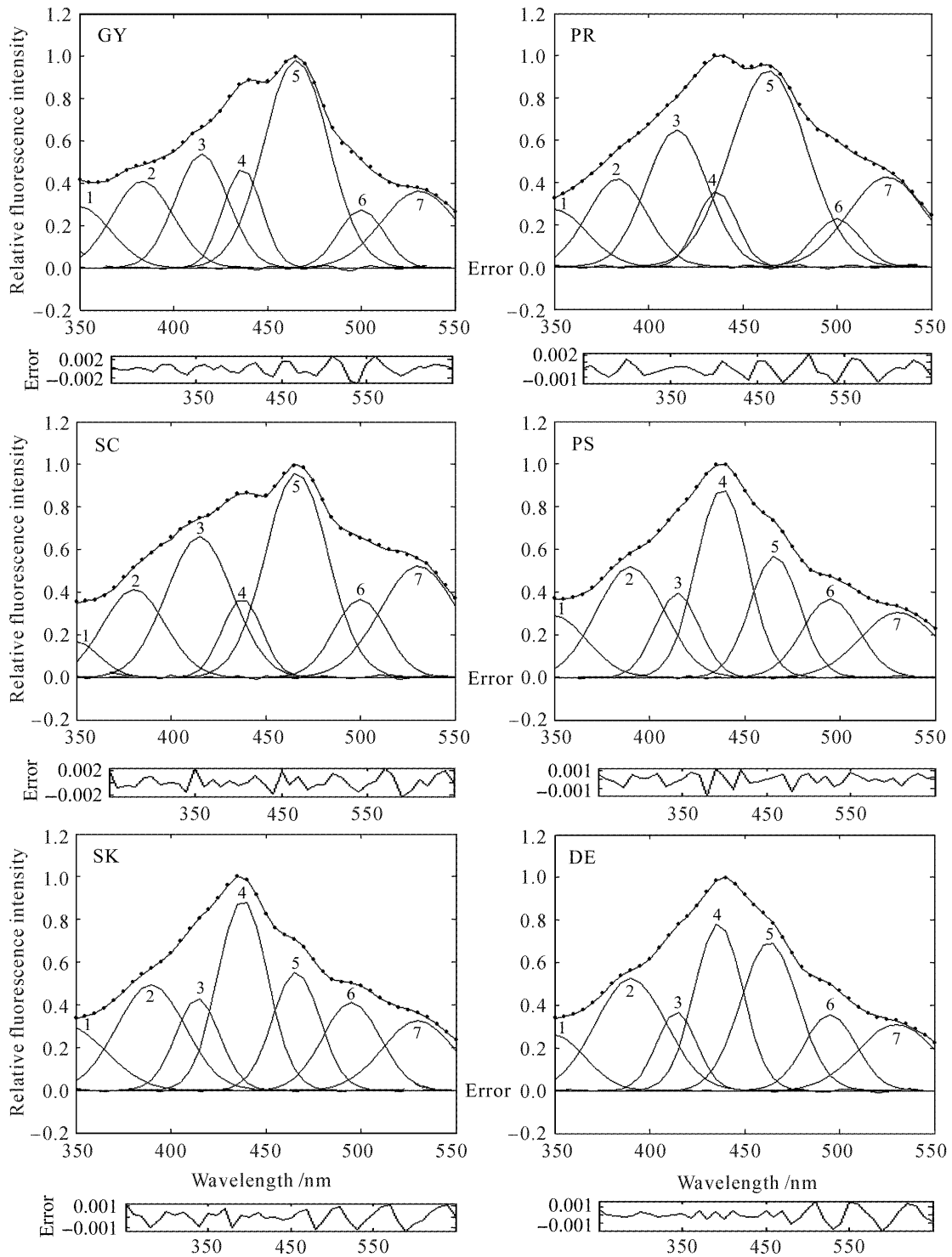


图3 叶绿素荧光激发光谱的各高斯峰(实线)、拟合曲线(点线)及其拟合误差曲线

Fig. 3 Chlorophyll fluorescence excitation spectra expressed as Gaussian peaks (solid line), the corresponding fitted spectra (dotted lines) and fitting error curves

度和宽度上均大于其3号峰,而甲藻特征则与其明显不同。第6,7个高斯峰的高度和峰形在两个门类的谱图中也存在明显的差异,由此可见,通过高斯峰的差异可对形状相似的甲藻和硅藻激发光谱进行区分。不同门类的浮游植物可得到特征不同的高斯基库,主要是由于他们之间的色素成分和含量存在一定的差异。

4 结 论

以分属甲藻门、硅藻门的六种活体叶绿素荧光激发光谱为研究对象,采用自编的Matlab程序,对激发光谱进行四阶导数处理。在波长350~550 nm范围内,以导数光谱出现的极大值位置和数量为依据,在门类的水平上设定统一的初始中心波长。以这些波长为中心对激发光谱做高斯分解及多

表 2 甲藻高斯拟合参数平均值及标准偏差 ($\mu \pm 3\sigma$)

Table 2 Dinophyta's average values and standard deviation of Gaussian fitting parameters

Parameter		Band						
		1	2	3	4	5	6	7
U/nm	GY	350±0.02	384.6±1.92	415.0±0.05	437.5±1.59	466.1±1.54	500.0	532.3±0.71
	PR	350.0	382.8±5.7	415.0	436.22±1.44	463.5±1.5	500.0	526.2±1.20
	SC	350.0	382.5±5.2	414.8±1.3	438.2±2.1	466.2±7.4	500±0.02	530.8±2.7
C	GY	0.36±0.09	0.29±0.09	0.54±0.01	0.42±0.09	0.96±0.04	0.30±0.03	0.36±0.01
	PR	0.24±0.007	0.38±0.007	0.66±0.04	0.33±0.03	0.90±0.005	0.22±0.08	0.42±0.04
	SC	0.32±0.15	0.30±0.10	0.60±0.07	0.40±0.04	0.93±0.05	0.36±0.04	0.53±0.06
S/nm	GY	46.8±2.3	32.9±5.6	41.0±5.8	26.1±5.4	37.7±5.1	31.1±1.5	46.8±1.3
	PR	39.3±16.4	38.1±5.8	38.5±13.7	23.9±2.1	47.2±3.4	26.8±2.0	47.1±2.2
	SC	45.3±2.8	33.2±7.2	40.1±1.5	24.8±5.4	41.7±4.5	42.8±14.8	48.4±0.8

U; central wavelength; S; halfwidth; C; relative fluorescence intensity

表 3 硅藻高斯拟合参数平均值及标准偏差 ($\mu \pm 3\sigma$)

Table 3 Bacillariophyta's average values and standard deviation of Gaussian fitting parameters

Parameter		Band						
		1	2	3	4	5	6	7
U/nm	PS	349.1±4.6	389.6±2.2	415.0	439.0±0.9	466.1±2.9	495.1±0.5	532.1±11.0
	SK	346.7±17.3	389.6±1.9	414.5±1.8	436.2±0.2	463.0±0.1	495.0	530.1±0.7
	DE	348.0±4.7	389.0±4.1	414.2±2.2	436.7±1.0	463.3±1.6	495.0	530.0±0.3
C	PS	0.28±0.08	0.50±0.07	0.44±0.1	0.90±0.06	0.53±0.12	0.37±0.09	0.28±0.08
	SK	0.53±0.03	0.53±0.03	0.42±0.05	0.80±0.04	0.58±0.02	0.38±0.04	0.31±0.03
	DE	0.28±0.08	0.49±0.03	0.48±0.12	0.80±0.13	0.59±0.08	0.38±0.03	0.31±0.04
S/nm	PS	44.6±4.9	43.2±14.2	27.4±4.4	30.6±2.4	28.5±1.5	37.1±9.6	46.4±5.4
	SK	43.0±2.5	42.5±6.7	27.2±3.7	28.9±2.3	34.3±1.7	35.7±2.9	46.5±6.9
	DE	46.6±10.7	41.9±6.7	28.1±2.4	28.6±5.3	34.3±3.5	35.7±3.8	46.8±2.9

U; central wavelength; S; halfwidth; C; relative fluorescence intensity

峰拟合, 分别建立甲藻门和硅藻门统一的高斯基库。研究发现高斯分解法能再现重叠的色素荧光峰, 凸显两个门类的光谱差异, 利用高斯基库的高斯峰形及高度等特征的差异, 可有效区分甲藻门和硅藻门。高斯分解法也能为色素活体测定提供新的方法。

参 考 文 献

- Vivian Alicia Lutz, Shubha Sathyendranath, Erica J. H. Head *et al.*. Changes in the in vivo absorption and fluorescence excitation spectra with growth irradiance in three species of phytoplankton [J]. *J. Plankton Res.*, 2001, **23**(6):555~569
- Nicolas Hoepffner, Shubha Sathyendranath. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, **73**:11~23
- R. Aguirre-Gómez, A. R. Weeks, S. R. Boxall. The identification of phytoplankton pigments from absorption spectra [J]. *Int. J. Remote Sensing*, 2001, **22**(2&3):315~338
- Yu Changqing, Liu Fanguang, Gu Ying. Laser induced fluorescence spectra of human skin and blood [J]. *Chin. J. Laser Med. Surg.*, 2004, **13**(1):41~44
于常青, 刘凡光, 顾瑛. 人体皮肤及血液的荧光光谱分析[J]. *中国激光医学杂志*, 2004, **13**(1):41~44
- Wang Zhongdong, Wu Jinling, Li Dongming *et al.*. Fiber-optical measurement system for pesticides residual based on fluorescence mechanism [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(7):1003~1008
王忠东, 武金玲, 李东明等. 基于荧光机制的光纤式农药残留测量系统[J]. *中国激光*, 2006, **33**(7):1003~1008
- Ding Jianhua, Li Jiandong, Wu Min. Study on the second derivative spectra of rats' serum fluorescence spectrum of liver fibrosis [J]. *J. Optoelectronics · Laser*, 2004, **15**(8):1007~1010
丁建华, 李建东, 吴敏. 肝病变白鼠血清荧光光谱的二阶导数光谱研究[J]. *光电子·激光*, 2004, **15**(8):1007~1010
- F. M. David, M. S. Oscar, J. K. Gary *et al.*. Detection of harmful algal blooms using photopigments and absorption signatures; a case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve* [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1997, **42**(5):1240~1251
- Geir Johnsen, Norman B. Nelson, Raffael V. M. Jovine *et al.*. Chromoprotein- and pigment-dependent modeling of spectral light absorption in two dinoflagellates, *prorocentrum minimum* and *Heterocapsa pygmaea* [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1994, **114**:245~258
- L. Poryvkina, S. Babichenko. Analysis of phytoplankton pigments by excitation spectra of fluorescence [J]. *Proceeding of EARSel-SIG-Workshop LIDAR, Dresden/FRG*, 2000, **1**:224~232