

文章编号: 0258-7025(2008)01-0115-05

基于光谱相似性指数的赤潮藻荧光识别技术

胡序朋 苏荣国 张传松 王修林

(中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100)

摘要 东海原甲藻(*Prorocentrum dentatum*)、裸甲藻(*Gymnodinium stein*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)是近几年我国东海频繁引发赤潮的藻种。基于这三种赤潮藻的活体叶绿素荧光激发光谱,通过计算光谱相似性指数对其进行识别。结果表明,活体叶绿素荧光激发光谱在平行测量和不同生长期的相对标准偏差(RSD)分别小于3%和5%;光谱混合及混合海藻荧光光谱与标准谱之间的光谱相似性指数与混合比例之间存在线性关系。通过计算混合藻的荧光光谱与标准谱之间的相似性指数能够定性识别引发赤潮的藻种,并半定量地估计赤潮藻种的相对含量。当噪声小于25%时,噪声基本不会对赤潮藻的识别分析产生影响。

关键词 光谱学;识别;相似性指数;荧光激发光谱;赤潮藻

中图分类号 O 433 文献标识码 A

Fluorescence Discrimination Technology for the Red Tide Algae by Spectra Similarity Index

Hu Xupeng Su Rongguo Zhang Chuansong Wang Xiulin

(Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China)

Abstract *Prorocentrum dentatum*, *Gymnodinium stein* and *Skeletonema costatum* are the main algae which frequently cause red tide. In this paper in vivo fluorescence excitation spectra were measured and the discrimination method of the red tide algae was established by the similarity index of spectra. The results show that the in vivo fluorescence excitation spectra were well reproduced ($RSD \leq 5\%$) and the spectra precision was very high ($RSD \leq 3\%$). The similarity index between the standard spectra of one algae species and hypothetical mixed spectra of algae and spectra of mixed algae assemblage was calculated. There is a linear relationship between the similarity index and the relative content of the algae. So the red tide algae can be discriminated by calculating the similarity index between fluorescence spectra of mixed algae and their standard fluorescence spectra, and the relative content of the red tide algae can also be detected semi-quantitatively. There is almost no influence of noise on the discrimination of red tide algae when noise is lower than 25%.

Key words spectroscopy; discrimination; similarity index; fluorescence excitation spectra; red tide algae

1 引言

准确、实时地对发生赤潮的浮游藻进行识别测定^[1~3],对于赤潮机制研究和赤潮灾害防治都具有重要意义。赤潮浮游植物的光学监测技术具有仪器简单、易于实现现场实时测定等优点而受到广泛关注。Kirkpatrick等^[4,5]通过吸收光谱及其四阶导数

的相似性分析能够定性识别出米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)。荧光光谱具有灵敏度高、受干扰小以及对物质具有良好的鉴别性能等优点,近年来在赤潮藻识别中的应用越来越广泛^[6~9]。金海龙等^[10]通过研究活体海藻的荧光发射光谱,确定了叶绿素a,b,c,类胡萝卜素和藻胆色素的特征激发波长;吕洪刚等^[11]采用三维荧光技术分析了栅藻

收稿日期:2007-04-23;收到修改稿日期:2007-07-20

基金项目:国家自然科学基金(40706036)和国家863计划(2006AA09Z178)资助项目。

作者简介:胡序朋(1982—),男,山东人,硕士研究生,主要从事海洋浮游植物荧光光谱识别技术研究。

E-mail:hustudy@163.com

导师简介:王修林(1960—),男,山东人,教授,主要从事海洋浮游生物研究。E-mail:xlwang@ouc.edu.cn

(Scenedesmus)、微囊藻(Microcystis aeruginosa)和小环藻(Cyclotella)的色素组成,建立了这三种藻叶绿素浓度与藻密度的荧光强度矩阵方程。

东海原甲藻(Prorocentrum dentatum)、裸甲藻(Gymnodinium stein)和中肋骨条藻(Skeletonema costatum)是我国东海常见的几种赤潮藻种,近年来引发过大规模的赤潮^[12~14]。本文基于活体叶绿素荧光激发光谱,针对东海原甲藻、裸甲藻及中肋骨条藻,通过计算光谱相似性指数建立识别分析技术,以期各海洋监测基站现有荧光分光光度计提供技术支持。

2 实验与方法

选取东海近年频繁引发赤潮的东海原甲藻、裸甲藻和中肋骨条藻作为研究对象,在光照培养箱内进行一次性无菌培养。藻种以 f/2 营养液为培养基,培养温度为 20 °C,光照强度为 15000 lx,光暗周期为 12 h:12 h,每个藻种平行培养三份。藻生长进入指数生长期后用于光谱测定。

藻液扩大培养 3 天后使用 Hitachi F4500 荧光分光光度计(1 cm 石英比色池)进行光谱测量。由于主要考察活体叶绿素的荧光光谱,因此设定发射波长为 680 nm,激发波长为 400~600 nm,激发步长为 5 nm,激发发射狭缝宽度均为 5 nm,扫描速度为 12000 nm/min。为了避免溶液太浓导致出现光谱自吸收效应,在测定前将浓度较大的藻液进行稀释,使之符合朗伯-比尔定律。

取处于指数生长期的藻液,通过德国 BBE MOLDAENKE 公司的在线藻分析仪测定叶绿素浓度。根据测得的叶绿素浓度结合每种藻的浓度比例进行混合,得到体积分数分别为 20%,40%,60%,80%的混合藻液。

通过赤潮藻光谱相似性指数建立赤潮藻识别分析方法,并就噪声对所建立识别分析技术的影响进行分析。

为了定量确定不同光谱之间的差异,J. O. Lay 等^[15]引入了相似性指数

$$SI = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{i - i_0}{i_0} \times 100 \right)^2}{N}}, \quad (1)$$

式中 i_0 表示低强度值, i 表示高强度值, N 表示信号数目。

(1) 式的一个缺陷是必须确定 i_0 和 i ,因为它们公式中的地位不是对等的,Drahos 等^[16]提出了

改进公式

$$SI = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{i - i_0}{i + i_0} \times 100 \right)^2}{N}}, \quad (2)$$

式中 i_0 和 i 的地位是相同的,克服了(1)式存在的缺陷。在光谱相似性分析中常用的一种方法是向量余弦法^[4,17],也就是将光谱视为 N 维空间中的一个向量,计算两个向量之间的夹角,通过比较夹角的大小来确定两条光谱之间的相似程度。

Katty 等^[18]运用相似性指数和向量余弦法两种方法比较了不同质谱之间的相似性,认为向量余弦法具有一定的优越性。在赤潮藻的光谱识别中将相似性指数定义为

$$SI = 1 - \left[\frac{2 \times \arccos \left(\frac{\mathbf{A}_{std} \cdot \mathbf{A}_{unk}}{|\mathbf{A}_{std}| \cdot |\mathbf{A}_{unk}|} \right)}{\pi} \right], \quad (3)$$

式中 \mathbf{A}_{std} 和 \mathbf{A}_{unk} 分别为标准和未知样品的向量。通过(3)式,相似性指数与混合物中该物质所占的比例之间可以建立函数关系。混合物中该物质所占比例越大,相似性指数就越接近于 1,反之则越接近于 0。

3 结果与讨论

3.1 光谱精密度和重现性

为了消除藻细胞浓度不同所带来的荧光光谱强度上的差异,对每份藻液平行测定三次得到的荧光光谱进行均值归一化,然后计算每种藻的光谱精密程度,如表 1 所示。

表 1 光谱精密程度

Table 1 Precision of the spectra

algae		Relative standard deviation
Code	Name	
Pr	Prorocentrum dentatum	0.0271
Gy	Gymnodinium stein	0.0217
Sk	Skeletonema costatum	0.0113

通过计算可知,这三种藻平行测定的活体叶绿素荧光激发光谱相对标准偏差(RSD)均小于 3%。

每种藻平行培养三份,培养 15 天,每三天取一次样进行光谱测量,对所得到的荧光光谱进行均值归一化,计算每种藻平行培养及不同生长期的光谱重现性,如表 2 所示。

通过计算可知,各藻平行培养及不同生长期的光谱相对标准偏差均小于 5%,表明这三种赤潮藻在不同生长期的光谱形状具有良好的稳定性。

表 2 光谱重现性

Table 2 Reproducibility of the spectra

algae		Relative standard deviation
Code	Name	
Pr	Prorocentrum dentatum	0.0449
Gy	Gymnodinium stein	0.0309
Sk	Skeletonema costatum	0.0274

3.2 赤潮藻的识别

我国近海发生的赤潮多为单相型赤潮,即某一种藻爆发性增殖使其相对含量逐渐达到绝对优势。各种藻的标准荧光光谱如图 1 所示。混合藻中某种藻所占的比例不同,则混合藻的荧光激发光谱与该纯藻种的荧光激发光谱之间的相似性指数也不同。建立相似性指数与赤潮藻相对含量之间的函数关系就可以通过计算相似性指数来估计混合藻中某一赤潮藻种的组成情况。

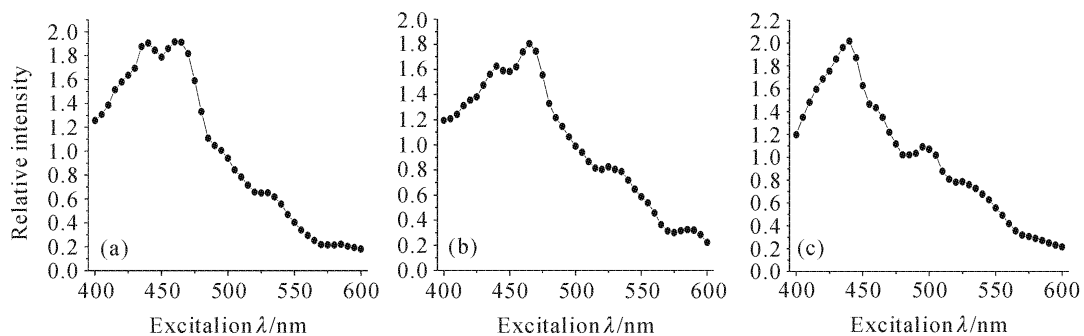


图 1 每种藻的标准荧光光谱。(a) 东海原甲藻;(b) 裸甲藻;(c) 中肋骨条藻

Fig. 1 Standard fluorescence spectra of every alga

(a) Prorocentrum dentatum; (b) Gymnodinium stein; (c) Skeletonema costatum

混合谱与某种藻的标准谱之间的相似性指数与该藻所占比例之间存在良好的线性关系,可以根据相似性指数来评估混合藻的混合情况。

由于相似性指数只是用来表征光谱形状的相似程度,所以无法得到赤潮藻准确的含量。但相似性指数为赤潮藻的识别测定提供了一种有效的手段。

3.3 噪声的影响

噪声对光谱相似性具有一定的影响,噪声的干扰会引起判别错误,而利用多项式平滑法^[19~21]对光谱进行预处理能够有效消除噪声对光谱谱形的影响。对赤潮藻荧光光谱加入一定量噪声,然后利用多项式平滑法处理荧光光谱,以考察噪声的加入对光谱谱形产生的实质性影响,确定本技术在实际应用中的可行性。

对于单种藻的被识别谱,加入不同比例的随机噪声,并利用多项式平滑法去噪,然后计算同种藻自身的相似性指数及不同藻种之间的相似性指数。

Millie 等^[5]通过吸收光谱的线性混合并计算了混合吸收光谱同米氏凯伦藻吸收光谱之间的相似性指数与米氏凯伦藻浓度之间的关系,得到较好的线性关系。选择两种藻的荧光激发光谱进行线性叠加,计算混合光谱与标准谱之间的相似性指数。发现相似性指数与混合光谱中该藻的相对含量之间具有线性相关性(图 2(a),(c),(e))。混合藻液的荧光激发光谱与某种藻荧光光谱之间的相似性指数与藻液浓度之间也具有线性相关性(图 2(b),(d),(f))。但是图 2(b),(d),(f)中 Pr 与 Sk 的混合有几个浓度比例的相似性指数偏离了线性关系,估计是由于配制混合藻液的误差所致。可见通过计算混合光谱与某种藻标准荧光光谱之间的相似性指数就可以定性估测引发赤潮的藻种,并半定量地测定该赤潮藻的相对含量。

首先考察不同噪声水平对不同藻种之间光谱相似性指数的影响。随噪声比例增加,不同藻种之间的光谱相似性指数逐渐减小(图 3(a)),不同藻种间的光谱相似性指数最大值为 0.92。

图 3(b)为不同噪声水平对单种藻自身相似性指数的影响。随噪声比例增加,赤潮藻自身相似性指数逐渐减小。当噪声大于 25%时,赤潮藻的自身相似性指数小于 0.92,不同赤潮藻的识别会出现误判。因此当噪声水平小于 25%时,不会影响对赤潮藻的正确识别。

4 结 论

平行测量东海原甲藻、裸甲藻和中肋骨条藻的活体叶绿素荧光激发光谱的相对标准偏差均小于 3%,不同生长期的相对标准偏差均小于 5%,可知仪器精密度高,光谱重现性好。

通过计算线性叠加的混合荧光激发光谱与某种

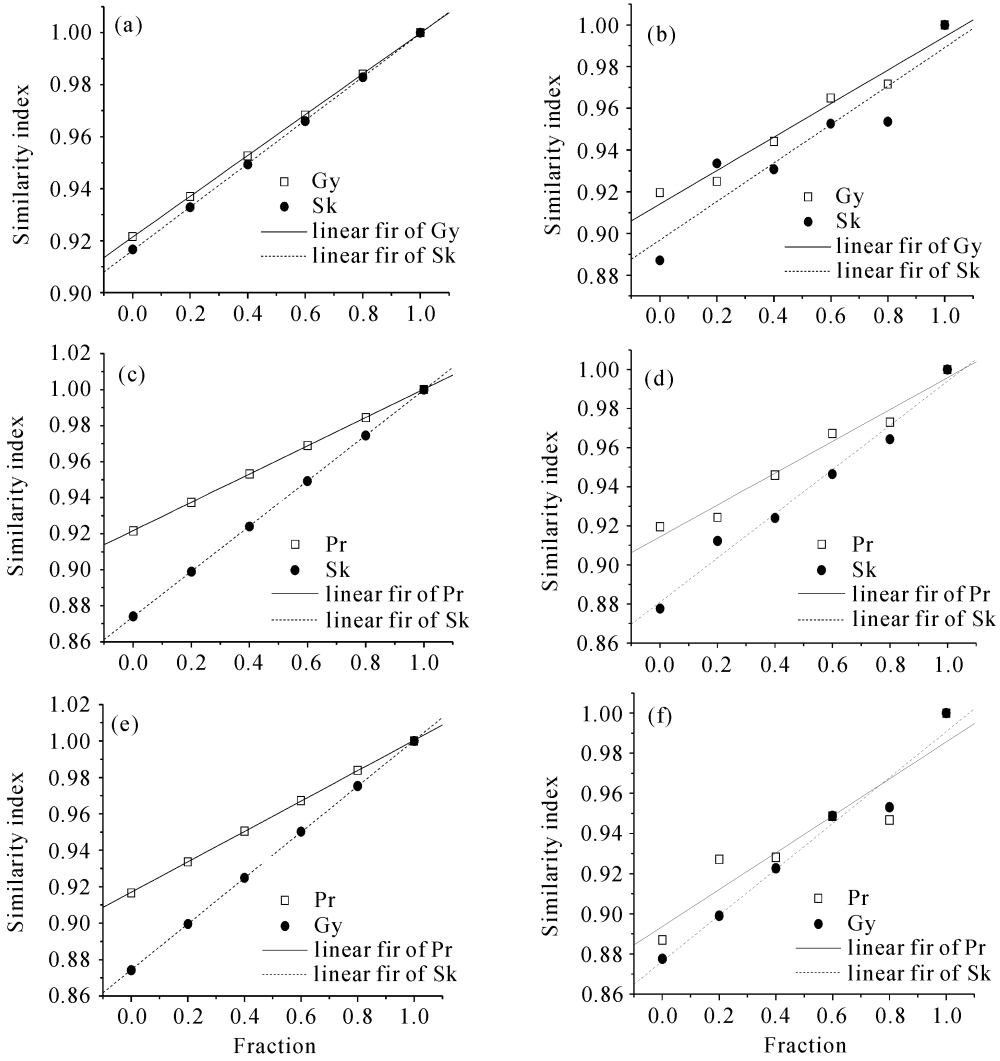


图 2 混合光谱与各藻标准谱相似性指数与比例之间的关系

(a), (b) 东海原甲藻; (c), (d) 裸甲藻; (e), (f) 中肋骨条藻

(a), (c), (e) 荧光光谱的线性叠加; (b), (d), (f) 混合藻液的荧光光谱

Fig. 2 Relationship of the similarity index between hypothetical mixed fluorescence spectra and standard spectra and the fraction

(a), (b) *Prorocentrum dentatum*; (c), (d) *Gymnodinium stein*; (e), (f) *Skeletonema costatum*

(a), (c), (e) hypothetical mixed spectra; (b), (d), (f) spectra of mixed algae

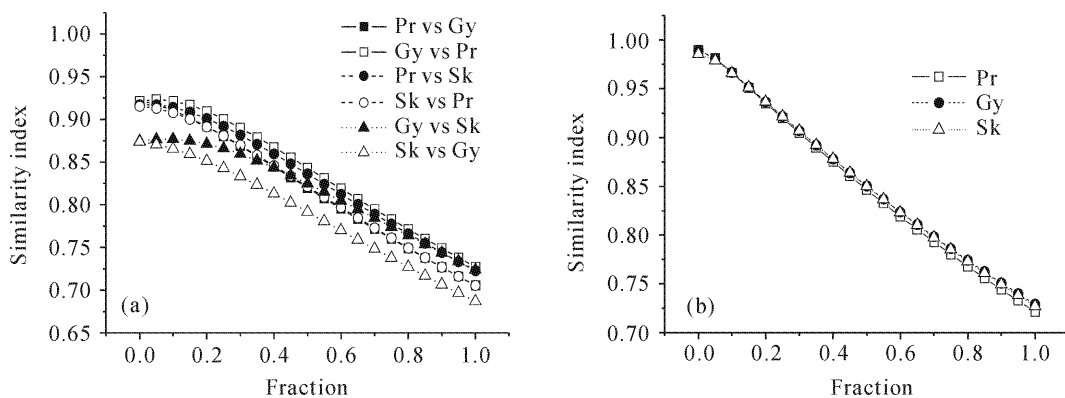


图 3 噪声对不同种藻(a)和同种藻自身(b)光谱相似性指数的影响

Fig. 3 Influence of noise on similarity index of different algae (a) and the same algae (b)

藻的标准谱之间的相似性指数以及混合海藻的荧光光谱与标准谱之间的相似性指数,发现相似性指数与混合比例之间具有线性相关性,这是赤潮藻识别技术的基础。

加入噪声考察对光谱相似性的影响发现,随着噪声比例的增加,同种藻自身及不同藻种之间的光谱相似性指数均逐渐下降,当噪声小于 25% 时,不会影响对赤潮藻的正确识别。

参 考 文 献

- Adriana Zingone, Henrik Oksfeldt Enevoldsen. The diversity of harmful algal blooms; a challenge for science and management [J]. *Ocean & Coastal Management*, 2000, **43**:725~748
- Zhou Mingjiang, Zhu Mingyuan, Zhang Jing. Status of harmful algal blooms and related research activities in China [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2001, **13**(2):54~59
周名江,朱明远,张 经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. *生命科学*, 2001, **13**(2):54~59
- Liang Song, Qian Honglin, Qi Yuzao. Problem on the red tide in coastal China Sea [J]. *Ecologic Science*, 2000, **19**(4):44~50
梁 松,钱宏林,齐雨藻. 中国沿海的赤潮问题[J]. *生态科学*, 2000, **19**(4):44~50
- Gary J. Kirkpatrick, David F. Millie, Mark A. Moline *et al.*. Optical discrimination of a phytoplankton species in natural mixed populations [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 2000, **45**(2):467~471
- David F. Millie, Oscar M. Scofield, Gary J. Kirkpatrick *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
- Jin Hailong, Wang Yutian. Research on recognition method of live alga based on fluorescence inspiring spectrum [J]. *Optical Technique*, 2006, **32**(4):581~583
金海龙,王玉田. 基于荧光法的活体海藻识别方法研究[J]. *光学技术*, 2006, **32**(4):581~583
- Cui Tingwei, Zhang Jie, Ma Yi *et al.*. Study of red tide spectral characteristics and its mechanism [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(5):884~886
崔廷伟,张 杰,马 毅等. 赤潮光谱特征及其形成机制[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(5):884~886
- Zhang Qianqian, Lei Shuhe, Wang Xiulin *et al.*. Research on discrimination of 3D fluorescence spectra of phytoplanktons [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, **24**(10):1227~1229
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
- Zhao Nanjing, Liu Wenqing, Cui Zhicheng *et al.*. Analysis of dissolved organic matter in water using spectral fluorescent signature [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(5):687~690
赵南京,刘文清,崔志成等. 用特征光谱荧光标记技术分析水中溶解有机物特性[J]. *光学学报*, 2005, **25**(5):687~690
- Jin Hailong, Wang Yutian. Research on recognition method of living alga based on stimulating fluorescence spectrum [J]. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2006, **19**(1):91~111
金海龙,王玉田. 基于荧光发射光谱的活体海藻识别方法研究[J]. *传感技术学报*, 2006, **19**(1):91~111
- Lü Honggang, Zhang Xihui, Gong Chunying *et al.*. Studies on the algorithm and identification of three dimensional fluorescence spectroscopy of algal [J]. *China Environmental Science*, 2005, **25**(5):581~584
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
- Chen Hanlin, Lü Songhui, Zhang Chuansong *et al.*. A survey on the red tide of proroentrum donghaiense in East China Sea, 2004 [J]. *Ecologic Science*, 2006, **25**(3):226~230
陈翰林,吕颂辉,张传松等. 2004 年东海原甲藻赤潮爆发的现场调查和分析[J]. *生态科学*, 2006, **25**(3):226~230
- Wang Zhaohui, Chen Jufang, Xu Ning *et al.*. Relationship between seasonal variations in gymnodinium spp. population and environmental factors in Daya Bay, the South China Sea [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(11):1825~1832
王朝辉,陈菊芳,徐 宁等. 大亚湾裸甲藻种群的季节变化与环境条件的关系[J]. *生态学报*, 2001, **21**(11):1825~1832
- Lan Hong, Xu Kuncan, Zhang Shimin *et al.*. The relation between hydrometeorology and formation of a *Skeletonema Costatum* red tide of west sea area of Xiamen [J]. *Marine Forecasts*, 2004, **21**(4):93~99
蓝 虹,许昆灿,张世民等. 厦门西海域一次中肋骨条藻赤潮与水文气象的关系[J]. *海洋预报*, 2004, **21**(4):93~99
- J. O. Lay, M. L. Gross, J. J. Zwinselman *et al.*. A field ionization and collisionally activated dissociation/charge stripping study of some $[C_9H_{10}]^+$ ions [J]. *Org. Mass Spectrom.*, 1983, **18**(1):16~21
- László Drahoš, Károly Vekey. Quantification of isomeric differences in mass spectra [J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, **10**:1309~1315
- P. A. Steaehr, J. J. Cullen. Detection of *Karenia mikimotoi* by spectral absorption signatures [J]. *Journal of Plankton Research*, 2003, **25**(10):1237~1249
- Katty X. Wan, Ilan Vidavsky, Michael L. Gross. Comparing similar spectra; from similarity index to spectral contrast angle [J]. *J. Am. Soc Mass Spectrum*, 2002, (13):85~88
- Ye Haihua, Zhang Luda, Ji Haiyan *et al.*. Achieve the coefficient of smoothing with MATLAB [J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2002, **17**(3):46~50
叶海华,张录达,吉海言等. 利用 MATLAB 实现平滑系数的精确表达[J]. *北京农学院学报*, 2002, **17**(3):46~50
- Abraham Savitzky, Marcel J. E. Golay. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures [J]. *Analytical Chemistry*, 1964, **36**(8):1627~1639
- Phillip Barak. Smoothing and differentiation by an adaptive-degree polynomial filter [J]. *Analytical Chemistry*, 1995, **67**(17):2758~2762