

激光光谱技术应用于藻类的研究进展

曲颖桐, 李 颖, 关冉昀

中国海洋大学光学光电子实验室, 山东 青岛 266100

摘要 藻类在多个领域发挥着不可替代的作用。激光拉曼光谱技术、激光诱导击穿光谱(LIBS)技术有着无需对样品进行复杂的预处理、对样品的破坏性小、多成分同时探测等优点,在诸多领域有着广泛的应用。介绍了近年来激光拉曼光谱技术和 LIBS 技术在藻类研究中的应用进展,并对其发展前景进行了展望。

关键词 光谱学; 激光光谱学; 激光拉曼光谱技术; 激光诱导击穿光谱技术; 藻类; 化学计量学

中图分类号 O433.4 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.060004

Research Progress of Algae Based on Laser Spectroscopy Technology

Qu Yingtong, Li Ying, Guan Ranyun

Optics and Optoelectronics Laboratory, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China

Abstract Algae have an irreplaceable role in many fields. Laser Raman spectroscopy technology and laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) technology have been widely used in various fields due to their advantages, such as no need of complicated preparation for the samples, less damaging for the sample, multi-element detections simultaneously, and so on. This paper introduces recent application progress of algae research based on the laser Raman spectroscopy technology and LIBS technology, and the development prospect is discussed.

Key words spectroscopy; laser spectroscopy; laser Raman spectroscopy technology; laser induced breakdown spectroscopy technology; algae; chemometrics

OCIS codes 300.6360; 300.6170; 300.2140; 300.6450; 300.6365

1 引 言

藻类在能源、环境监测、生物修复等方面扮演着重要的角色。藻类通过光合作用存储能量^[1],具有分布范围广、油脂含量高^[2]、环境适应能力强^[3]等特点,作为生物燃料可以节约化石能源^[4-5],因此藻类是未来最重要的可再生能源之一。藻类可以作为环境检测的反应器,例如可以利用藻类获取水体富营养化的程度和污染状况的信息^[6-7]。藻类还有生物修复的功能,可以利用藻类吸收污水重金属的能力来修复重金属污染水体^[8],大型藻类可对养殖环境进行生物修复并能够起到生态调控的作用^[9]。

目前对藻类细胞中的色素、核酸等方面的检测手段有很多,主要有干重法、比浊法、显微计数法^[10]、分光光度法^[11]、荧光法^[12]、电感耦合等离子体光谱法、液相色谱法^[13]等。激光光谱技术不需要对样品进行复杂的预处理,并且具有分析时间短、实时、在线以及对多种成分同时进行分析的优点^[14]。通过激光光谱技术可以分别获取藻类中分子化合物的信息,例如可以获知藻类中的脂质类别、含量以及藻类细胞中元素的组成,可以说激光光谱技术为藻类研究提供了技术支持。本文综述了近年来激光拉曼光谱技术、激光诱导击穿光谱(LIBS)技术在藻类研究中的应用进展,并对其发展方向进行了展望。

收稿日期: 2016-12-13; **收到修改稿日期:** 2017-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(41576104)

作者简介: 曲颖桐(1993—),女,硕士研究生,主要从事激光光谱技术在生物应用方面的研究。

E-mail: quyingtong111@163.com

导师简介: 李 颖(1971—),女,博士,教授,主要从事激光光谱学方面的研究。

E-mail: liying@ouc.edu.cn(通信联系人)

2 激光拉曼光谱技术

单色光的入射光子与物质分子相互作用时可以发生弹性碰撞和非弹性碰撞,在发生弹性碰撞时,入射光的方向发生改变而能量和光频率的大小均不发生变化,这被称为瑞利散射。在发生非弹性碰撞时,不仅入射光的方向发生了改变,而且光子与分子发生了能量的转换,光将一部分能量传递给了分子,其中使光的频率增大的为反斯托克斯散射,使光的频率减小的为斯托克斯散射。拉曼散射是入射光与物质间发生能量转移的非弹性散射,1928年印度科学家拉曼首次发现拉曼散射效应。

拉曼散射通常以入射光和散射光的能量变化即拉曼频移来表征,拉曼频移与散射物质分子的振动和转动能级相关,通过拉曼光谱分析可得到分子振动、转动能级等信息,因此拉曼光谱技术已成为研究物质分子结构的重要手段之一。拉曼光谱技术对样品要求较低,无需对样品进行复杂的预处理即可完成对多种成分的同时探测,并且测试时间短,可实现在线和原位探测。此外,拉曼光谱技术采用光子探针,对稀有或珍贵样品进行无损探测分析^[15-16],甚至可以直接检测活体中的生物物质^[17-18]。激光器的发展给拉曼光散射研究注入了新活力,迅速发展起一门崭新的激光拉曼光谱技术。

近年来,研究人员利用激光拉曼光谱技术在藻细胞脂肪、色素等方面开展了一系列的研究,揭示了藻类的分子组成。2004年Chen等^[19]对 *Acaryochloris marina* 中的叶绿素 d 进行研究,探测了温度为 77 K 时 250~3200 nm^{-1} 波段叶绿素 d 的拉曼信号并与理论分析结果进行对比,结果表明叶绿素 d 分子的转动特性与密度函数理论分析结果一致。2000年Kubo等^[20]采用激光拉曼光谱技术对裸藻和衣藻两种绿藻中类胡萝卜素和叶黄素进行了研究,结果发现这两种藻的眼点中均有较高含量的类胡萝卜素。为了探讨衣藻中叶黄素的各向异性,Kubo等^[20]搭建了偏振拉曼光谱实验装置以测量某一个方向的拉曼散射光。实验结果表明,衣藻中的叶黄素沿着眼点的光轴分布且与细胞所建立的坐标轴平行,沿 x 轴方向含量增加,沿 y 轴方向含量减少,而裸藻不具备该各向异性的特点。

2010年Huang等^[21]研究了不同营养环境中小球藻和新绿藻两种藻的斯托克斯拉曼散射信号。实验发现,在缺氮的条件下两种藻中均可以探测到叶绿素、胡萝卜素、甘油三酸脂的拉曼信号,而正常情况下在两种藻中只有胡萝卜素均可探测到。2006年Heraud等^[22]获得了绿色单细胞真核藻杜氏藻在营养丰富环境与氮匮乏环境下的拉曼光谱并完成对藻环境的识别,发现随着氮营养程度的降低叶绿素 a 拉曼峰强度有所下降,而 β 胡萝卜素的拉曼峰强度有所增加。在对光谱数据进行处理时,采用了多元散射校正(MSC)、标准正态变量(SNV)等6种不同的光谱预处理方法,以消除基线等因素的影响,并采用了软独立分析(SIMCA)和偏最小二乘(PLS)两种识别方法评估了不同光谱预处理方法的效果,结果表明 SIMCA 不适合对所有进行预处理后的光谱进行判别分析。

藻类中的脂质是藻作为燃料的重要参考指标,而描述藻中脂质的重要参数是脂肪酸的非饱和程度。2010年Samek等^[23]利用激光拉曼光谱技术比较藻类中非饱和和脂肪酸的含量来完成对三种不同藻的识别。图1为小粗盘藻的典型拉曼光谱,其对应的拉曼特征峰如表1所示。饱和脂肪酸的特征拉曼峰频移为 1445 cm^{-1} 的 NCH_2 剪切形变,非饱和脂肪酸的特征拉曼峰频移为 1656 cm^{-1} 的 $\text{NC}=\text{C}$ 伸缩振动模式。从图1可以看出,小粗盘藻含有较高的非饱和脂肪酸,可根据非饱和和脂肪酸的含量将该藻从三种藻中成功地识

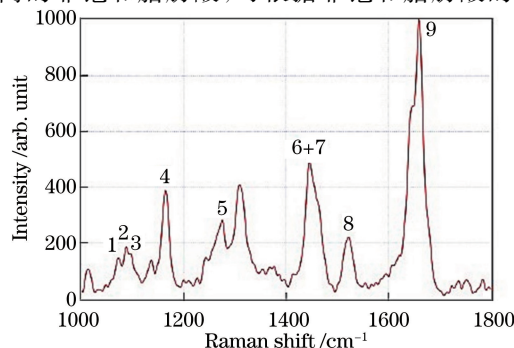


图1 小粗盘藻典型拉曼光谱^[23]

Fig. 1 Typical Raman spectroscopy of *Trachydiscus minutus*^[23]

别出来。非饱和脂肪酸与碘值有着密切的关系,该实验中还利用气相色谱技术分析了藻类中的碘值,所得结果进一步论证了激光拉曼光谱技术在藻种识别方面的可行性。

表1 小粗盘藻典型拉曼特征峰^[23]Table 1 Typical Raman peaks of *Trachydiscus minutus*^[23]

Peak No.	Raman feature /cm ⁻¹	Suggested assignment
1	1060	C-C skeletal stretching vibration, out-of-plane
2	1085	C-C skeletal stretching vibration; gauche chain conformer
3	1125	C-C skeletal stretching vibration; trans chain conformer, in-plane
4	1157	β -carotene
5	1267	cis double bond =C-H bend, in-plane
6	1442	β -carotene
7	1445	CH ₂ bend, scissoring deformation; saturated fat indicator
8	1525	β -carotene
9	1656	cis C=C stretching vibration; unsaturated fat indicator

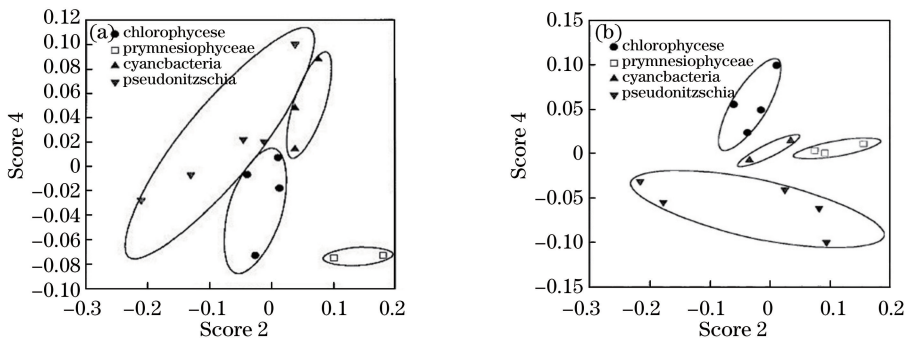
采用激光拉曼光谱技术不仅可获取藻类中的脂质信息,确定脂肪酸的不饱和程度,快速有效地鉴别该藻是否可以作为生物燃料,还可以通过观察叶绿素、胡萝卜素和甘油三酸脂的拉曼信号来反演藻类的营养环境。

传统的拉曼光谱技术获得的信号较弱,探测灵敏度较低,这使其在很多领域的应用受到限制。为了提高拉曼信号的强度及拓展其应用领域,人们开始了更加深入的研究,在原有拉曼技术基础上,提出了一些新的激光拉曼光谱分析及方法,例如共振拉曼光谱技术、显微拉曼光谱技术等。

2.1 共振拉曼光谱技术

拉曼散射过程是一个电子激发态的中间态跃迁过程,但是与激光诱导荧光的能级跃迁有着明显不同,在拉曼散射中,根据测不准关系可以确定在很短时间内,拉曼散射是系统经过了一个“虚”能级跃迁的过程。采用可调谐激光作为激发光源,可以找到拉曼散射的中间态与分子的真实本征态相重合的能级所对应的波长,这时会使拉曼散射截面大大增加,这就是共振拉曼散射。在共振拉曼散射中可以观察到正常拉曼效应中难以出现的、其强度可与基频相比拟的组合振动光谱^[13,24]。与正常拉曼光谱相比,共振拉曼光谱有着灵敏度高、与表面增强技术结合,灵敏度会进一步提高,可达到单分子检测^[25]。研究人员利用该技术对藻类开展了深入的研究。

Brahma 等^[26]使用共振拉曼技术研究了 9 种浮游藻的特性,利用探测到的类胡萝卜素和叶绿素拉曼信号,完成了对藻类的识别。Wu 等^[27]利用类胡萝卜素有强烈的共振增强峰位的特点,采用共振拉曼光谱技术成功地从多种藻中鉴别出伪菱形藻。为了进一步提高分类的效果,还比较了不同激发光的分类情况,图 2 为波长分别为 488 nm 和 457.9 nm 的激发光对应的主成分分析(PCA)分类的主成分(PC)2 和主成分 4 得分散点图,结果发现激发光为 457.9 nm 时的分类效果好,但是该方法只能反映类胡萝卜素的不同,无法反映有毒和无毒的伪菱形藻的区别。

图2 伪菱形藻光谱提取主成分 2 和主成分 4 的得分图^[27]。(a)波长为 488 nm 的激发光;(b)波长为 457.9 nm 的激发光Fig. 2 Scores for PC4 vs scores for PC2 from pseudonitzschia spectra^[27].

(a) Excitation light with the wavelength of 488 nm; (b) excitation light with the wavelength of 457.9 nm

2012年 Li 等^[28]采用单细胞共振拉曼与同位素相结合的探测方式获得聚胞藻巴斯德菌种保藏(PCC) 6803 和细长聚球藻 PCC 7942 中类胡萝卜素的拉曼光谱。以自然状态下¹³C 的拉曼频移为标准,研究了 β 胡萝卜素的三个典型拉曼特征峰的频移,结果表明 β 胡萝卜素拉曼峰的红移与细胞中¹³C 的含量存在一定线性关系,并且获取了在毫秒量级下不同时间下细胞对¹³C 的吸收图片。

2.2 显微拉曼光谱技术

显微拉曼光谱技术是将拉曼光谱分析技术与显微分析技术结合起来的一种应用技术,在常规拉曼实验装置的基础上加上高倍光学显微镜,可实现逐点扫描,并获得高分辨率的三维拉曼图像^[24]。与其他传统技术相比,显微拉曼光谱技术不仅具有常规拉曼光谱的特点,还有微观、原位、多相态、稳定性好、空间分辨率高等优点,可获得微米级的单细胞成像图像,明确色素和脂肪等的分布^[23]。

2007年 Heraud 等^[29]利用显微拉曼技术探测到单细胞真核藻杜氏藻的叶绿素 a 和 β 胡萝卜素的拉曼信号。研究发现当培养环境不同(氮充足和氮匮乏)时,在 1157 cm^{-1} 处的叶绿素 a 与 1325 cm^{-1} β 胡萝卜素强度的比值也会有明显的不同,利用该特性并结合偏最小二乘判别分析(PLS-DA)分类方法,可以将氮充足条件下 90% 的细胞成功识别,分类结果如图 3 所示。

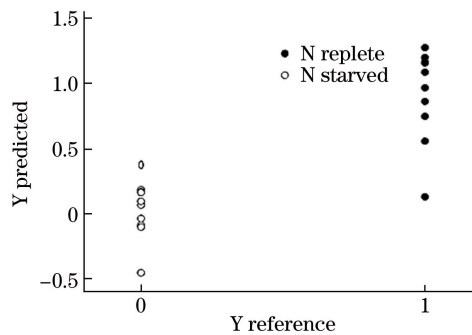


图 3 采用偏最小二乘判别分析分类方法获取验证集预测值与测量值的对比图

Fig. 3 Predicted versus measured values for the validation set obtained using PLS-DA classification^[29]

2012年 Pilát 等^[30]用显微拉曼光谱技术获得小粗盘藻的脂质体中 β 胡萝卜素和脂肪的拉曼光谱,如图 4 所示(Q_p 为光合成有效辐射通量密度, V_{LB} 为脂质体体积),表 2 为对应的胡萝卜素和脂肪典型拉曼峰位。采用 β 胡萝卜素与脂肪拉曼信号强度比建立了定标曲线,可估算在脂质体中 β 胡萝卜素的相对含量。研究表明, β 胡萝卜素的浓度与脂质体的体积、该藻在培养阶段的光照时间成正比。

表 2 β 胡萝卜素和脂肪的典型拉曼峰^[30]

Table 2 Typical Raman peaks of β -carotene and lipids^[30]

Raman peak	Symbol	Raman shift / cm^{-1}
β -carotene C—C stretching	ν_A	1157
β -carotene C=C stretching	ν_B	1525
Lipid CH_2 scissoring	ν_{CH_2}	1445
Lipid C—C stretching	$\nu_{\text{C-C}}$	1656

2015年浙江大学邵咏妮等^[31]采用激光共聚焦拉曼光谱技术快速鉴别普通小球藻和莱茵衣藻,他们采集了不同藻种在不同生长时期的拉曼光谱,通过比较不同藻种色素含量比的差异完成了分类识别。他们对光谱数据采取了不同的预处理方法,采用偏最小二乘全波段建模,并比较了不同预处理方法对识别正确率的影响。他们还采用最大谱峰比值标准化法处理样本,快速有效地鉴别出普通小球藻和莱茵衣藻。当阈值为 ± 0.2 时,两种藻的预测正确率分别为 80% 和 93.3%,具体的预测率如表 3 所示;当阈值为 ± 0.5 时,两种藻的预测正确率均可达到 100%。

表 3 偏最小二乘建模后的预测结果^[31]

Table 3 Prediction result by PLS model^[31]

Pretreatment	Prediction set	Mistake	Accuracy / %
Chlorella sp.	15	3	80
Chlamydomonas sp.	15	1	93.3

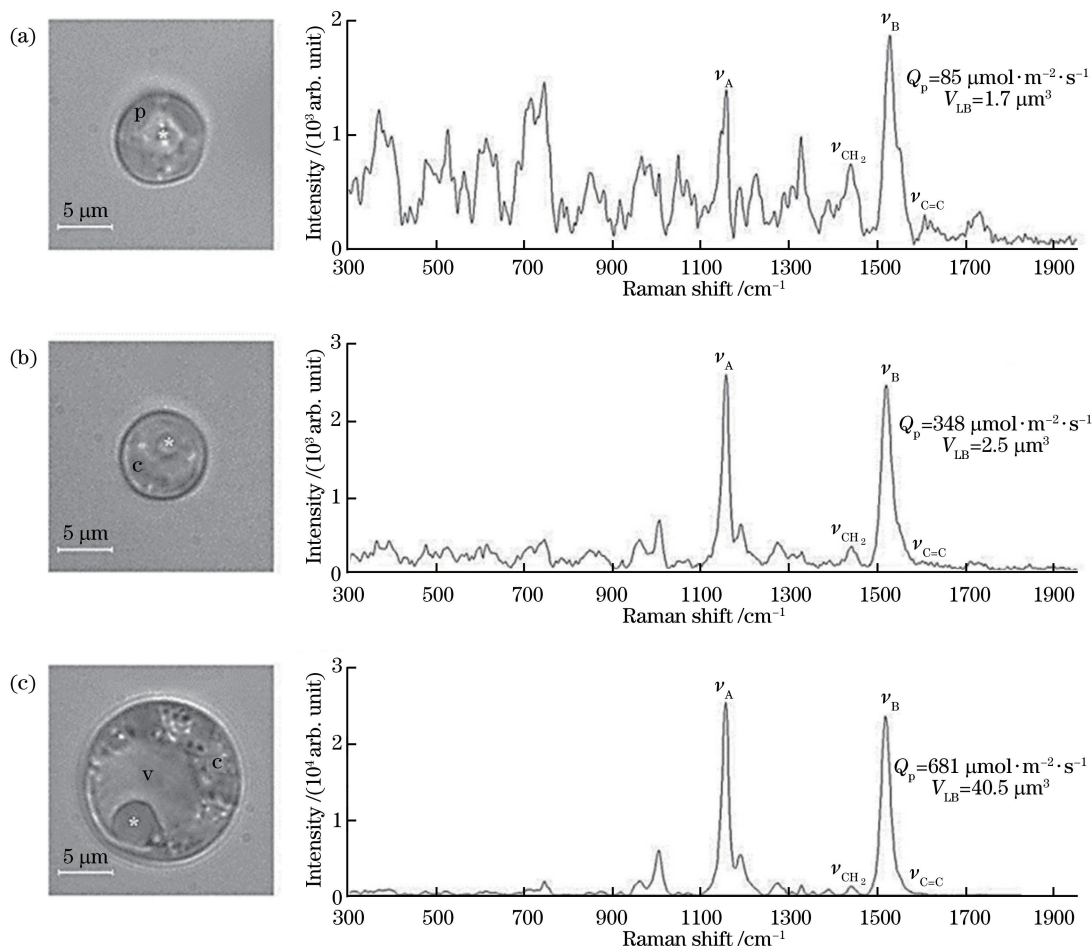


图4 小粗盘藻脂质体的拉曼光谱^[30], 左边图片为谱仪拍摄细胞图。

(a) $L_{AB} = 1.7 \mu\text{m}^3$; (b) $L_{AB} = 2.5 \mu\text{m}^3$; (c) $L_{AB} = 40.5 \mu\text{m}^3$

Fig. 4 Raman spectra of *Trachydiscus minutus* lipid bodies^[30], the left images show the spectrographed cells.

(a) $L_{AB} = 1.7 \mu\text{m}^3$; (b) $L_{AB} = 2.5 \mu\text{m}^3$; (c) $L_{AB} = 40.5 \mu\text{m}^3$

3 LIBS 技术

LIBS 技术是指利用高功率脉冲激光会聚到样品表面, 瞬间产生等离子体, 通过探测等离子体中原子或离子的发射光谱实现对待测样品定性检测和定量分析^[32]的一种新型原子发射光谱技术。LIBS 技术具有原位、实时、远距离探测、对样品的破坏性小、无需对样品进行复杂预处理等优点。随着高功率脉冲激光器和探测器的发展, LIBS 技术的应用领域更加广泛, 不仅在环境污染检测^[33]、考古^[34-35]、医疗^[36]、工业^[37]等方面有着广阔的应用前景, 而且在航天航空^[38]、海洋探测^[39]等领域也得到了快速的发展。由于激光诱导等离子体发射出来的光谱信息包括原子和离子的特征谱线, 因此可利用其完成对待测样品的定性分析。在一定的实验条件下, 所测得谱线强度与金属离子的浓度相关, 利用这一特性可以完成对金属元素浓度的定量分析。

藻类一般以悬浮液形式存在, 在培养液中会成堆聚块繁殖, 导致其在培养液中分布不均。另外在液体的环境中, 受液体压力的影响, 激光诱导等离子体的寿命将大大缩短, 使藻类样品的处理成为一个重大的难题。针对这一问题, 捷克的 Porizka 等^[40]在 2011 年采用三种不同的方式将 LIBS 技术应用到小粗盘藻和莱茵衣藻两种藻类的检测, 具体实验方式如下。

1) 藻液喷流: 藻液放置在自制的玻璃容器中, 使用蠕动泵不断地向容器中注入液体样品, 使液样通过硅胶管从喷嘴流入容器中, 两束脉冲激光以共线的空间位置完成对藻类的探测, 实验装置如图 5 所示。

2) 藻类的生物膜: 生物膜的制备过程是用离心管将藻液分离, 将藻细胞沉淀物放在一个半通风的容器

中自然烘干,这样即可得到生物膜。对藻类的生物膜采用双脉冲方式激发,实验装置如图 6 所示,探测到藻类生物膜的 LIBS 光谱如图 7 所示。

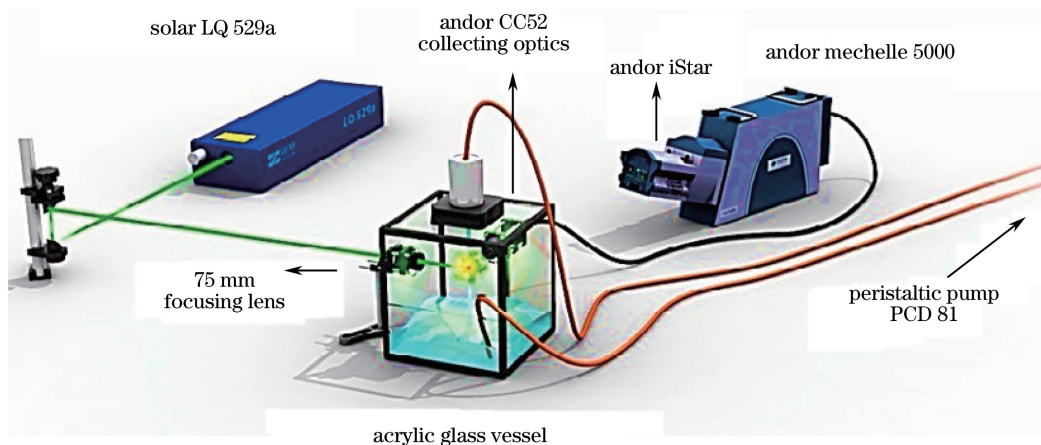


图 5 藻液喷流的 LIBS 实验装置图^[40]

Fig. 5 Schematic diagram of LIBS experimental setup employing laminar water jet setup^[40]

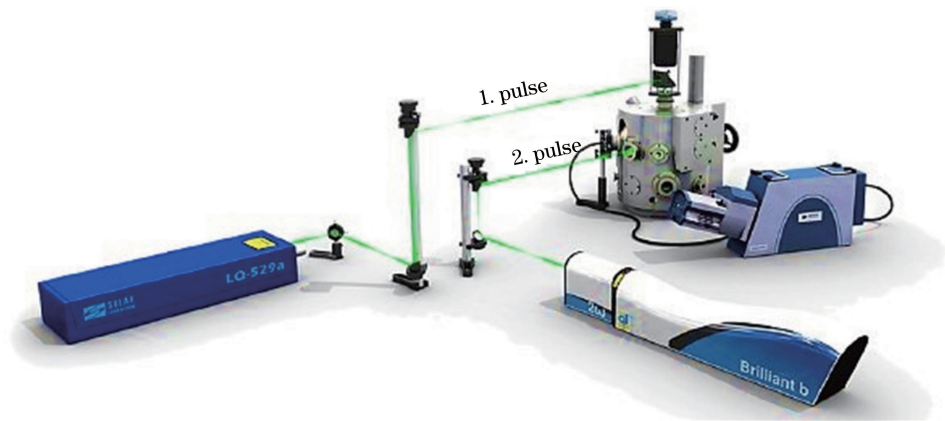


图 6 藻生物膜的 LIBS 实验装置图^[40]

Fig. 6 Schematic diagram of LIBS experimental setup for algae biofilm^[40]

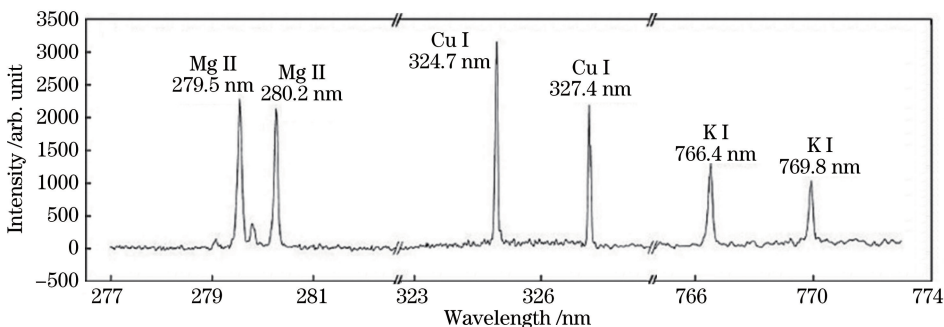


图 7 藻生物膜样品 LIBS 光谱^[40]

Fig. 7 LIBS spectra for the algae biofilm sample^[40]

3) 藻液悬浮液:将藻液放置在一定体积的容器中,同样采用双脉冲方式直接探测,但是两束激光入射的空间位置采用正交方式,波长为 266 nm 的激光从顶部入射,波长为 1064 nm 的激光从侧面入射。

这三种方式均可以探测到藻类中含有金属元素如 Ca、Na、Mg、K 等。同年,该项目组同样采用细胞悬浮液方式,分别采用 LIBS 技术和激光拉曼光谱技术成功探测到了小粗盘藻藻株的金属离子和非饱和脂肪酸^[41]。

由于 LIBS 技术可以探测到样品中的金属离子,因此可利用该性能完成对周围环境的检测。2012 年 Garcimuno 等^[42]应用 LIBS 技术完成对藻类中 Cu 元素的定量分析。在对藻类的制备上,Garcimuno 等采用氢氧化钙 $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ 作为粘合剂将藻类压成固体靶,为了修正基体效应的影响,还制备了 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的空白样品。Cu I 324.75 nm 谱线的定标曲线如图 8 所示(R^2 为线性相关系数),通过比较二者的定标曲线可以推算出藻类中 Cu 的含量。

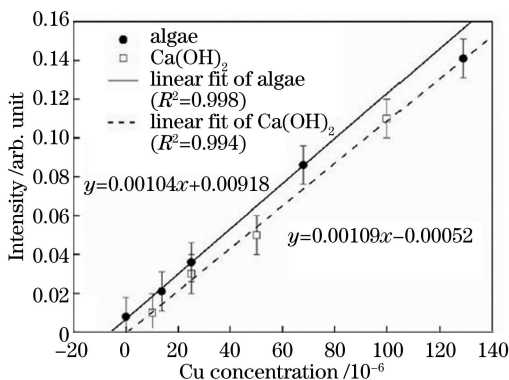


图 8 324.75 nm 处 Cu 元素的定标曲线^[42]

Fig. 8 Calibration curves of Cu at 324.75 nm^[42]

LIBS 技术还可以实现对藻液中痕量元素的探测,2002 年,韩国的 Ni 等^[43]将 LIBS 技术应用到两种不同海洋藻类标样中,实现了对 Sr 元素的低浓度检测。由于 Sr 元素和 Ca 元素有着相似的化学性质,为了排除 Ca 元素的干扰,选择了 Sr II 421.55 nm 处的谱线作为分析谱线,并采用标准加入法对所用 LIBS 系统的定量分析能力进行了评估,线性相关系数 R^2 可以达到 0.99 以上,相对标准偏差 R_{SD} 小于 5%。

利用 LIBS 技术可以实现藻类中的基体元素(Ca、Na、Mg、K)以及微量元素(Cu、Sr、Pb)的探测,因此可以将藻类作为水体污染程度的生物指标,用以确定重金属的存在。另外,不同测量藻菌中这些元素的含量也是不同的,根据这一特点再结合 LIBS 技术可以完成对藻种的识别。LIBS 技术探测的金属元素典型特征谱线参数如表 4 所示。表 4 中, A_{ki} 对应特征谱线跃迁几率, $E_i - E_k$ 为上下能级能量, $g_i - g_k$ 为上下能级简并度。

表 4 LIBS 技术探测的金属元素典型特征谱线参数

Table 4 Parameters of typical spectral lines for metallic element by LIBS

Element	Wavelength /nm	$A_{ki} / (10^7 \text{ s}^{-1})$	$E_i - E_k / \text{eV}$	Terms	$g_i - g_k$
Mg II	279.552	26	0-4.433	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
	280.270	25.7	0-4.422	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2
Cu I	324.754	13.95	0-3.817	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
	327.396	13.76	0-3.786	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2
Ca II	393.366	14.7	0-3.151	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
	396.847	14	0-3.123	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2
Sr I	407.771	14.1	0-3.039	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
	421.552	12.79	0-2.940	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2
Na I	589.592	6.14	0-2.102	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2
	588.995	6.16	0-2.104	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
K I	766.489	3.80	0-1.617	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{3/2}$	2-4
	769.896	3.75	0-1.609	$^2 \text{S}_{1/2} - ^2 \text{P}_{1/2}$	2-2

4 结 论

激光拉曼光谱技术、LIBS 技术有着无需对样品进行复杂预处理、多种成分同时探测、实时在线等优点,因此受到了国内外研究者的高度重视。本文对藻类细胞中的脂肪、色素、金属阳离子等方面展开了研究,发现这些技术已经成为对样品快速分析的有力工具。藻类是多成分的有机生物体,在进行探测时可结合化学计量学方法的优势,为光谱数据的处理及藻种的鉴别提供新思路。但是运用这些技术对藻类进行探测时,发

现基体效应对收集信号的影响是不能忽略的,这给以后的研究提出了新的课题,相信在不久的将来这些问题都可以得到解决,从而使激光光谱技术具有更加广阔的应用前景。

致谢 感谢国家海洋局第一研究所刘晨临研究员的帮助。

参 考 文 献

- [1] Greenbaum E. Simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen by photosynthesis[C]. Gatlinburg: Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, 1979.
- [2] Campbell M N. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel[J]. Guelph Engineering Journal, 2008, 1(1): 2-7.
- [3] Paerl H W, Fulton R S, Moisaner P H, *et al.* Harmful freshwater algal blooms with an emphasis on cyanobacteria [J]. The Scientific World Journal, 2001, 1(1): 76-113.
- [4] Demirbas M F. Biofuels from algae for sustainable development[J]. Applied Energy, 2011, 88(10): 3473-3480.
- [5] Demirbas A. Use of algae as biofuel sources[J]. Energy Convers Manage, 2010, 51(12): 2738-2749.
- [6] Li Meng, Liu Guijian, Wu Lei, *et al.* Eutrophication and water quality characteristics of Western Chaohu Lake in winter via planktonic alga diversity analysis[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2015, 45(2): 150-158.
李 梦, 刘桂建, 吴 蕾, 等. 冬季巢湖西半湖的富营养化及污染状况研究——基于浮游藻类的多样性分析[J]. 中国科学技术大学学报, 2015, 45(2): 150-158.
- [7] Dai Guofei, Liu Huili, Zhang Wei, *et al.* Spatio-temporal variation of algae and eutrophic status of Lake Zhelin, Jiangxi Province[J]. Journal of Lake Sciences, 2015, 27(2): 275-281.
戴国飞, 刘慧丽, 张 伟, 等. 江西柘林湖富营养化现状与藻类时空分布特征[J]. 湖泊科学, 2015, 27(2): 275-281.
- [8] Jiang Yongbin, Ji Hongbing. Bioremediation of heavy metal contaminated water by algae[J]. Progress in Geography, 2007, 26(1): 56-67.
江用彬, 季宏兵. 藻类对重金属污染水体的生物修复[J]. 地理科学进展, 2007, 26(1): 56-67.
- [9] Mao Yuze, Yang Hongsheng, Wang Rucui. Bioremediation capability of large-sized seaweed in integrated mariculture ecosystem: a review[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(2): 225-231.
毛玉泽, 杨红生, 王如才. 大型藻类在综合海水养殖系统中的生物修复作用[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 225-231.
- [10] Zhang Yuxia, Jin Yu, Shi Ze, *et al.* Improvement of method for algae microscope count in eutrophic water body[J]. Fujian Analysis & Testing, 2014, 23(1): 13-16.
张榆霞, 金 玉, 施 择, 等. 富营养化水体藻类显微镜计数方法改进研究[J]. 福建分析测试, 2014, 23(1): 13-16.
- [11] Tu Bo, Cao Min, Huang Qian, *et al.* Methodological comparison between spectrophotometry and microscopic counting in measuring biomass of micro-green algae[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2014, 36(8): 44-50.
涂 波, 曹 敏, 黄 茜, 等. 分光光度法与显微计数法测定微小绿藻生物量的比较研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(8): 44-50.
- [12] Yang Xiaodong. Feasibility of determining the biomass of cyanobacteria by fluorescence method[J]. Environmental Science Survey, 2011, 30(5): 89-91.
杨晓冬. 浅析荧光法测定蓝藻生物量的可行性[J]. 环境科学导刊, 2011, 30(5): 89-91.
- [13] Lu Tongxing, Lu Yiqun. Principle and application of laser spectroscopy [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1999: 275-276.
陆同兴, 路铁群. 激光光谱技术原理及应用[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999: 275-276.
- [14] Corney A, Deslattes R D. Atomic and laser spectroscopy[M]. Oxford: Clarendon Press, 1978.
- [15] Zhang Yanhui, Wu Liangping, Sun Zhenrong. Progress in application of Raman spectroscopy [J]. Education in Chemistry, 2006(4): 32-35.
张延会, 吴良平, 孙真荣. 拉曼光谱技术应用进展[J]. 化学教学, 2006(4): 32-35.
- [16] Han Xiaozhen, Guo Zhengye, Kang Yan, *et al.* Application of Raman spectroscopy in certification of chicken-blood stones[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(1): 0130003.

- 韩孝朕, 郭正也, 康 燕, 等. 拉曼光谱在鸡血石鉴定中的应用[J]. 光学学报, 2015, 35(1): 0130003.
- [17] Chen Rong, Li Yongzeng, Feng Shangyuan, *et al.* Advances in Raman spectroscopy for human tissue[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2008, 45(1): 16-23.
陈 荣, 李永增, 冯尚源, 等. 人体组织拉曼光谱研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2008, 45(1): 16-23.
- [18] Xu Bin, Lin Manman, Yao Huilu, *et al.* Measurement of hemoglobin concentration of single red blood cell using Raman spectroscopy[J]. Chinese J Lasers, 2016, 43(1): 0115003.
徐 斌, 林漫漫, 姚辉璐, 等. 拉曼光谱技术测量单个红细胞的血红蛋白浓度[J]. 中国激光, 2016, 43(1): 0115003.
- [19] Chen M, Zeng H, Larkum A W D, *et al.* Raman properties of chlorophyll d, the major pigment of *Acaryochloris marina*: studies using both Raman spectroscopy and density functional theory[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2004, 60(3): 527-534.
- [20] Kubo Y, Ikeda T, Yang S Y, *et al.* Orientation of carotenoid molecules in the eyespot of alga: in situ polarized resonance Raman spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2000, 54(8): 1114-1119.
- [21] Huang Y Y, Beal C M, Cai W W, *et al.* Micro-Raman spectroscopy of algae: composition analysis and fluorescence background behavior[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 105(5): 889-898.
- [22] Heraud P, Wood B R, Beardall J, *et al.* Effects of pre-processing of Raman spectra on in vivo classification of nutrient status of microalgal cells[J]. Journal of Chemometrics, 2006, 20(5): 193-197.
- [23] Samek O, Jonáš A, Pilát Z, *et al.* Raman microspectroscopy of individual algal cells: sensing unsaturation of storage lipids in vivo[J]. Sensors, 2010, 10(9): 8635-8651.
- [24] Tian Guohui, Chen Yajie, Feng Qingmao. Development and application of Raman technology[J]. Chemical Engineer, 2008, 148(1): 34-36.
田国辉, 陈亚杰, 冯清茂. 拉曼光谱的发展及应用[J]. 化学工程师, 2008, 148(1): 34-36.
- [25] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. Science, 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [26] Brahma S K, Hargraves P E, Howard W F, *et al.* A resonance Raman method for the rapid detection and identification of algae in water[J]. Applied Spectroscopy, 1983, 37(1): 55-58.
- [27] Wu Q, Nelson W H, Hargraves P, *et al.* Differentiation of algae clones on the basis of resonance Raman spectra excited by visible light[J]. Analytical Chemistry, 1998, 70(9): 1782-1787.
- [28] Li M, Canniffe D P, Jackson P J, *et al.* Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities[J]. ISME Journal, 2012, 6(4): 875-885.
- [29] Heraud P, Beardall J, McNaughton D, *et al.* In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 275(1): 24-30.
- [30] Pilát Z, Bernatová S, Ježek J, *et al.* Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification [J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(3): 541-546.
- [31] Shao Yongni, Pan Jian, Jiang Lulu, *et al.* Microalgae species identification study with Raman microspectroscopy technology[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(7): 1908-1911.
邵咏妮, 潘 健, 蒋璐璐, 等. 基于激光共聚焦显微拉曼技术的藻种鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(7): 1908-1911.
- [32] Xu Qinying, Zhang Yongbin, Wang Huaisheng, *et al.* Detection of trace impurities in uranium using laser induced breakdown spectroscopy[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(3): 0315002.
徐钦英, 张永彬, 王怀胜, 等. 激光诱导击穿光谱技术检测铀材料中微量杂质元素 [J]. 中国激光, 2015, 42(3): 0315002.
- [33] Delucia F C, Samuels A C, Harmon R S, *et al.* Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): a promising versatile chemical sensor technology for hazardous material detection[J]. IEEE Sensors Journal, 2005, 5(4): 681-689.
- [34] Tornari V, Zafiropulos V, Bonarou A, *et al.* Modern technology in artwork conservation: a laser-based approach for process control and evaluation[J]. Optics and Lasers in Engineering, 2000, 34(4): 309-326.
- [35] Giakoumaki A, Melessanaki K, Anglos D. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in archaeological science-applications and prospects[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(3): 749-760.
- [36] Kumar A, Sharma P C. Uses of LIBS technology in biological media[C]. SPIE, 2006, 6637: 637701.

- [37] Gruber J, Heitz J, Arnold N, *et al.* In situ analysis of metal melts in metallurgic vacuum devices by laser-induced breakdown spectroscopy[J]. *Applied Spectroscopy*, 2004, 58(4): 457-462.
- [38] Sallé B, Lacour J L, Mauchien P, *et al.* Comparative study of different methodologies for quantitative rock analysis by laser-induced breakdown spectroscopy in a simulated Martian atmosphere[J]. *Spectrochim Acta Part B*, 2006, 61(3): 301-313.
- [39] Guirado S, Fortes F J, Laserna J J. Elemental analysis of materials in an underwater archeological shipwreck using a novel remote laser-induced breakdown spectroscopy system[J]. *Talanta*, 2015, 137: 182-188.
- [40] Porizka P, Prochazka D, Pilát Z, *et al.* Application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of algal biomass for industrial biotechnology[J]. *Spectrochim Acta Part B*, 2012, 74(8): 169-176.
- [41] Porizka P, Prochazka D, Novotný K, *et al.* Utilization of laser-ablation based analytical methods for obtaining complete chemical information of algae[J]. *World Academy of Science Engineering & Technology*, 2012, 72(14): 579-580.
- [42] Garcimuno M, Pace D M D, Bertuccelli G. Laser-induced breakdown spectroscopy for quantitative analysis of copper in algae[J]. *Optics & Laser Technology*, 2013, 47(4): 26-30.
- [43] Niu L, Cho H H, Song K, *et al.* Direct determination of strontium in marine algae samples by laser-induced breakdown spectrometry[J]. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56(11): 1511-1514.