

# 浮游植物在不同光质和光强激发下的叶绿素荧光特性

刘 晶<sup>1,2</sup> 刘文清<sup>2</sup> 赵南京<sup>2\*</sup> 张玉钧<sup>2</sup> 马明俊<sup>2</sup> 戴庞达<sup>2</sup> 殷高方<sup>2</sup>  
王春龙<sup>2</sup> 章 炜<sup>2</sup> 段静波<sup>2</sup> 余晓娅<sup>2</sup> 方 丽<sup>2</sup> 甘婷婷<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中国科学技术大学物理学院光学与光学工程系, 安徽 合肥 230026  
<sup>2</sup> 中国科学院安徽光学精密机械研究所环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031

**摘要** 活体浮游植物的叶绿素荧光发射特性与激发光源的波长和强度密切相关, 实验选取普通小球藻和铜绿微囊藻作为测试对象, 获取了中心波长为 450、525、590、620 nm 4 个波段 LED 激发下的叶绿素荧光诱导特性。研究表明, 当对应波段上的激发光强分别低于 2.8、4.6、3.8、4.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时, 荧光诱导曲线始终保持在稳定水平本底荧光( $F_0$ ); 分别记录同一信号增益下上述 4 个波段激发时的  $F_0$  和激发光光合有效辐射(PAR), 通过拟合可以得到一个粗略的四点离散激发光谱, 并结合对应波长处的吸收率数据分析了波长对荧光发射的影响; 对浓度为 0.4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的二氯苯基二甲脲(DCMU)处理并由 90% 的乙醇提取叶绿素后的样品和活体浮游植物样本进行对比分析, 获得了有显著差异的荧光诱导曲线。实验结果为浮游植物光合作用活性原位测量提供了理论基础和数据支持。

**关键词** 光谱学; 浮游植物; 叶绿素 a 荧光; 活体; 脉冲振幅调制; 测量

中图分类号 O433 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201333.0930001

## Phytoplankton Chlorophyll Fluorescence Characteristics Excited by Various Light Qualities and Intensities

Liu Jing<sup>1,2</sup> Liu Wenqing<sup>2</sup> Zhao Nanjing<sup>2</sup> Zhang Yujun<sup>2</sup> Ma Mingjun<sup>2</sup> Dai Pangda<sup>2</sup>  
Yin Gaofang<sup>2</sup> Wang Chunlong<sup>2</sup> Zhang Wei<sup>2</sup> Duan Jingbo<sup>2</sup> Yu Xiaoya<sup>2</sup>  
Fang Li<sup>2</sup> Gan Tingting<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Physical Science, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China  
<sup>2</sup> Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China

**Abstract** Chlorophyll fluorescence emission characteristics of phytoplankton *in vivo* is closely related to the exciting wavelength and intensity. The fluorescence induct curves under 4 wavelengths of LED (450, 525, 590, 620 nm) and various intensities using chlorella vulgaris and microcystis aeruginosa are tested. Research results show that smooth induct curve are obtained when corresponded exciting light intensity are below 2.8, 4.6, 3.8, 4.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Fluorescence intensities of  $F_0$  are recorded at the same gain setting, which represent the pigment level. A discrete spectrum can be obtained when considering exciting light photosynthesis active radiation (PAR). Fluorescence affected by wavelength is analyzed combining absorbance data. Significant different chlorophyll fluorescence induct curves are got between phytoplankton *in vivo*, extracted by 90% ethanol and addition with 0.4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  3-(3,4-

收稿日期: 2013-03-26; 收到修改稿日期: 2013-04-28

基金项目: 国家 863 计划(2009AA063005)、国家科技重大专项(2009ZX07420-008-05)、安徽省杰出青年科学基金(1108085J19)、安徽省自然科学基金(11040606M26)

作者简介: 刘 晶(1988—), 男, 博士研究生, 主要从事荧光技术在水质监测中的应用与设备研制等方面的研究。

E-mail: jliu@aiofm.ac.cn

导师简介: 刘文清(1954—), 男, 博士, 研究员, 主要从事光学与环境科学交叉集成创新方面的研究。

E-mail: wqliu@aiofm.ac.cn

\* 通信联系人。E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn

dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (DCMU). This work can provide theoretical and data support for phytoplankton photosynthesis activity measurement.

**Key words** spectroscopy; phytoplankton; chlorophyll a fluorescence; *vivo*; pulse amplitude modulation; measurement

**OCIS codes** 300.6280; 170.6280

## 1 引 言

叶绿素荧光现象首先是由 Kautsky 以及合作伙伴发现的,他们将暗适应的叶片照光后,发现叶绿素荧光强度随时间变化<sup>[1]</sup>,研究发现叶绿素荧光与常规的分子荧光发射特征明显不同,由于激发光参与了光合作用的能量转化过程,活体叶绿素荧光强度随时间缓慢变化,因此可以通过分析荧光数据来获取光合作用过程中的相关信息<sup>[2-4]</sup>。光合作用活性作为最常被测定的荧光参数,可以反映浮游植物光合作用的能力,其值的大小取决于水体中浮游植物的生理状态<sup>[5]</sup>。对有害藻华(HABs)和赤潮的研究表明,藻华的爆发是特定的环境条件下(富营养、高光、高温)由浮游植物短期快速暴增造成的,这期间浮游植物必须具备极强的光合作用能力才能快速生长。监测光合作用活性可以了解浮游植物的“生长潜能”,结合其他环境条件可以预测未来的增长趋势。基于荧光法的浮游植物光合作用活性原位测量由于具有快速、灵敏、不破坏样品的特点<sup>[6-7]</sup>,在有害藻华的监测和预警中具有广阔的应用前景。

当前叶绿素荧光分析领域主要有两大主流技术:脉冲振幅调制(PAM)技术<sup>[8-9]</sup>和非调制技术<sup>[10]</sup>。非调制技术必须在严格的暗室内进行测量,常用于光合作用机理研究中,而调制技术允许在现场条件下进行测试,可以实现在一定背景干扰下荧光信号的准确提取,调制技术为叶绿素荧光技术和检测仪器走向现场、在线测量提供了可能性。脉冲振幅调制技术测量光合作用参数的核心是提供合适的测量光、光化光、饱和光光源以及荧光信号采集<sup>[11]</sup>,大量研究结果表明通过合理的实验参数设置,利用饱和脉冲方法测量的荧光参数可以得到活体样本的光化学能量转换效率以及光适应状态下非光化学淬灭<sup>[12]</sup>等,通过与光合放氧和 CO<sub>2</sub> 固定测试对比发现叶绿素荧光可以作为研究光合作用的探针<sup>[13]</sup>。Schreiber 在介绍 PAM 测量系统的文献<sup>[7,14]</sup>中提到测量光十分微弱,但是并没有具体介绍测量光的光强范围,文献<sup>[15]</sup>介绍了 Schreiber 团队于 2011 年研发的 Multi-Color-PAM 在光合作用机理中的应用,重点阐述了藻类光合作用中电子传递速率与波长之间的关系,但是 Multi-Color-

PAM 的工作方式为实验室内离线分析,无法应用于现场原位测量。

为了解决浮游植物光合作用活性原位测量中测量光光强选取的关键问题,本文对活体浮游植物的叶绿素荧光诱导特性进行了研究,分别采用 450、525、590、620 nm 4 个波段的 LED 作为激发光源,获取了不同光强下的诱导曲线,分析了各波长激发本底荧光的测量光光强阈值范围,并探讨了激发光强在阈值范围内各波长处的  $F_o/I_{PAR}$  [其中  $F_o$  为本底荧光( $F_o$ )的值,  $I_{PAR}$  为光合作用中常称的光合有效辐射(PAR)的值],根据得到的铜绿微囊藻和普通小球藻的离散激发光谱和吸收率数据进一步分析了光合系统 II(PSII)天线系统色素的特征。最后对比了活体浮游植物和采用二氧苯基二甲脲(DCMU)处理过后失去活性样品的荧光诱导特性,实验结果为浮游植物光合作用活性原位测量提供了理论依据和数据支持。

## 2 光质和光强影响浮游植物光合作用的机理

活体叶绿素荧光是一种特殊的分子荧光,不仅具有分子荧光的特征,由于参与光合作用的能量转换过程(见图 1),其荧光产率包含了光化学反应中的许多有用信息。活体叶绿素荧光主要来源于光合色素叶绿素 a,在活体细胞内叶绿素 a 与其他色素协同完成捕获光能的功能<sup>[16]</sup>。浮游植物活体细胞的色素主要分为用于吸收光能的天线色素和将捕获的光能转化为化学能的反应中心色素<sup>[17]</sup>。反应中心色素是一种特殊的叶绿素 a 分子,天线色素除了均含有叶绿素 a 以外,不同浮游植物体内的其他天线色素有很大差异,如叶绿素 b,叶绿素 c,类胡萝卜素,藻蓝蛋白等,叶绿素 a 与其他天线色素协同蛋白质一起构成捕光色素复合体(LHC)。不同种类浮游植物的光合器官中完成捕获光能的色素有明显差异,如蓝藻主要由藻胆蛋白吸收 400~700 nm 的光,绿藻则由叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和叶黄素完成光能捕获的功能,因此,捕光色素决定了藻类吸收自然光的波长范围。

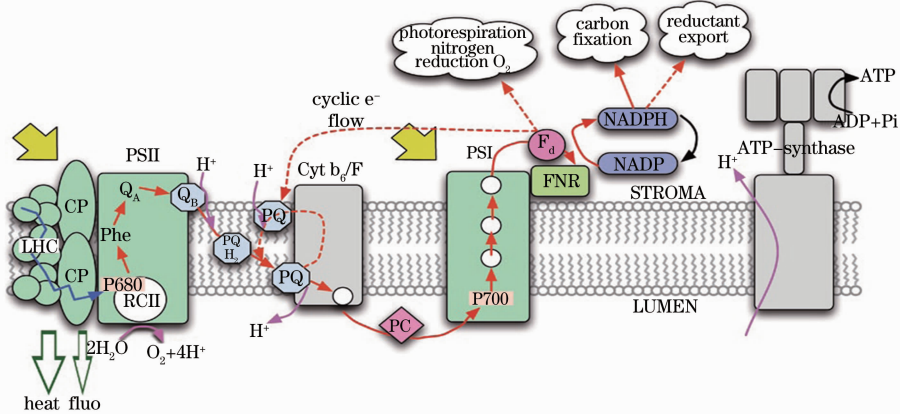


图 1 光合作用中荧光发射与电子和能量传递过程

Fig. 1 Fluorescence emission, electron and energy transfer process in photosynthesis

活体叶绿素荧光不仅可以反映光能吸收、激发能量传递和光化学反应等光合作用的原初反应，还与电子传递、质子梯度建立以及三磷酸腺苷(ATP)合成和 $\text{CO}_2$ 固定密切相关，几乎所有光合作用过程的变化均可通过叶绿素荧光反映出来，因此叶绿素荧光被视作光合作用研究的探针。与活体浮游植物相比，失去活性的浮游植物在光源的照射下同样会产生叶绿素荧光，但由于内部电子传递过程被打断，其激发光不参与 PSII 的光合作用，因此显现出普通分子荧光的特征 DCMU 作为一种非常灵敏的电子传递抑制剂，常用于光合系统的电子传递研究<sup>[18]</sup>。

测量系统简易结构框图，上位机软件界面通过指令操作控制单元，实现光源的通断、各种参数设置和数据采集等功能。

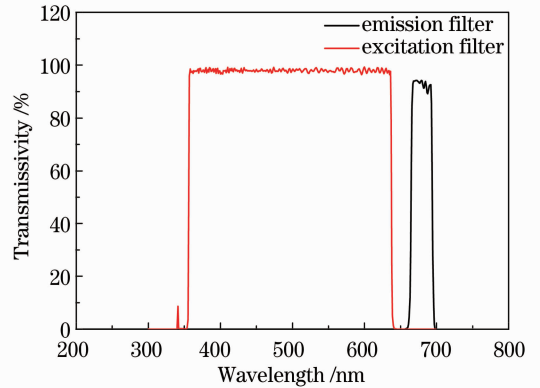


图 2 激发和发射滤光片的透射率曲线

Fig. 2 Transmissivity curve of excitation and emission filter

### 3 实验与方法

#### 3.1 测量系统

测量系统由光源驱动、光电转换及信号处理、控制单元和上位机软件组成。光源驱动系统为 LED 光源提供恒定电流，其中测量光采用 1 kHz 方波调制的方案，光强大小可设置，光化光采用数控数模转换(DAC)驱动方案，可选取 12 种不同的强度，饱和光由超高亮激光二极管产生。为了最大程度地减弱杂散光对测量结果的影响，在光源和样品池之间放置高性能滤光片(FF01-650/SP-25, semrock)，光电探测器与三个光源所在平面的保持垂直，探测器前端放置 680 nm 带通滤光片(FF01-685/25-25, semrock)。图 2 为激发和发射滤光片的光谱透射率曲线，探测器响应的波段为 650~700 nm，低通滤光片使激发光超过 650 nm 的部分透射率低于 0.01%，从而使探测器接收到的容易引起散射的杂散光强度低于其自身强度的 $10^{-8}$ ，最大程度上保证了荧光信号的可靠性。信号处理系统利用锁相放大技术实现与测量光同频率的荧光信号检测。图 3 为

#### 3.2 实验设置

将一定浓度的铜绿微囊藻和普通小球藻放置于样品池暗适应 10 min 后，(所用藻种均取自中国科学院水生生物研究所)。首先采用三维荧光仪获取上述样本的三维荧光光谱，结合常用的光源，分别利用 450、525、590、620 nm LED 作为调制光源，逐次改变光源的强度，利用 US-SQS/WB 光子量子传感器(产自德国 Walz)读取光强，通过自行研制的测量系统结合上位机软件记录各波长和光强激发下的叶绿素荧光诱导曲线。

#### 3.3 活体和失活浮游植物叶绿素荧光特性对比

采用 DCMU 作为电子传递抑制剂，其主要作用是打断 PSII 与质体醌的结合位点，阻断电子受体 $\text{Q}_B$ 与 PQ 之间的电子传递过程(见图 1 光合作用中的电子传递过程)，光合作用过程中电子传递链的打

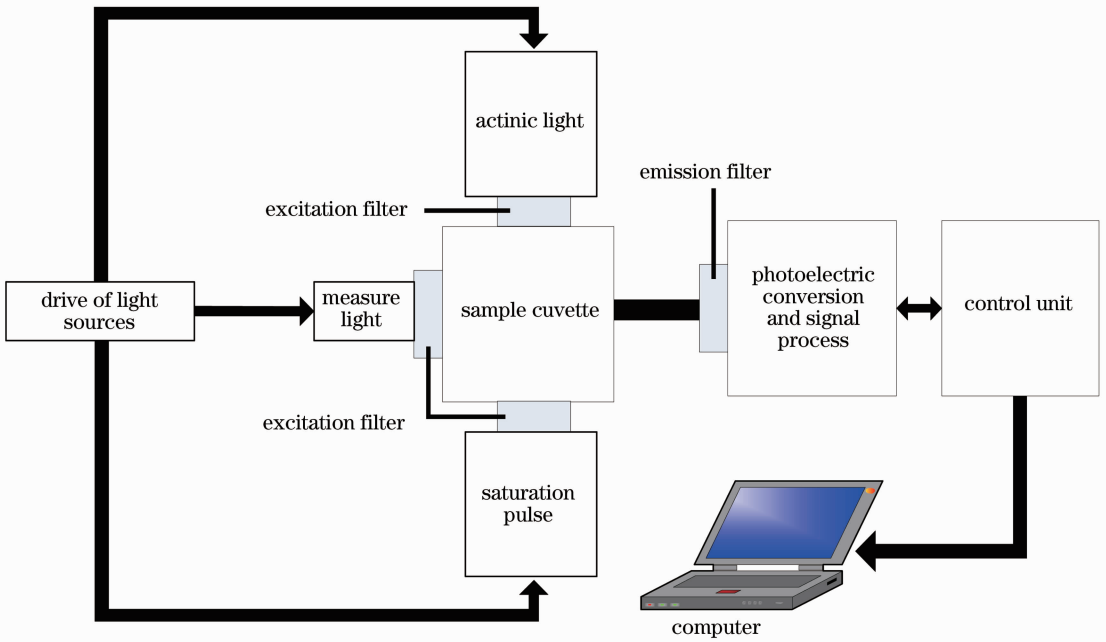


图 3 叶绿素荧光诱导特性测量系统结构示意图

Fig. 3 Block diagram of chlorophyll fluorescence induction measurement system

断会导致光能不能转变成化学能力(ATP 和还原力)并使活体浮游植物失去光合作用能力。DCMU 仅阻止 PSII 的电子传递过程,对光合系统 I(PSI)和其他光合功能诸如光能吸收以及卡尔文循环中的 CO<sub>2</sub> 固定并不产生影响,而且不会改变叶绿素的分子荧光特性。所用试剂选取纯度为 98% 的 DCMU 粉末(乐陈化工,上海),取 0.1 mol 试剂溶于 100 mL 乙醇中,再从中取 0.4 mL 加入质量分数为 1 mg/L 的铜绿微囊藻溶液并加蒸馏水定容至 100 mL。

## 4 结果与讨论

### 4.1 浮游植物三维荧光光谱测量

利用 Fluorescence Spectrophotometer F7000 三维荧光仪(Hitachi,日本)获取铜绿微囊藻和普通小球藻的三维荧光光谱,如图 4 所示,其中激发波长的范围为 400~620 nm,发射波长选取 620~730 nm。铜绿微囊藻的荧光发射峰位于 640~730 nm,利用蓝光、黄光和红光可以实现荧光激发,其中红光激发的效率最高,普通小球藻的荧光发射谱线相对较宽,覆盖的光谱范围为 650~730 nm,可见波段的光都可以

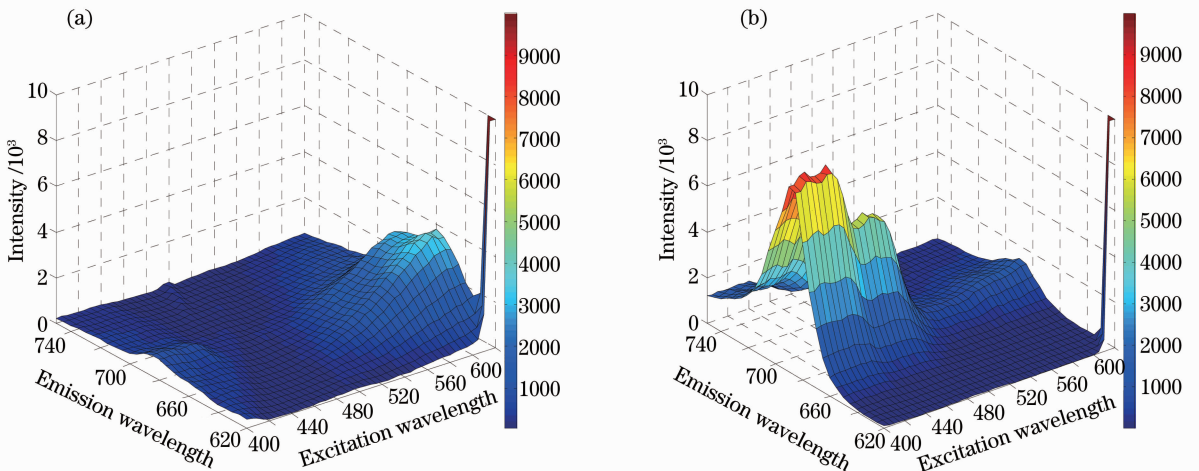


图 4 (a)铜绿微囊藻和(b)普通小球藻三维荧光光谱

Fig. 4 Three-dimensional fluorescence spectra of (a) microcystis aeruginosa and (b) chlorella vulgaris

用于荧光激发,其中蓝紫光的激发效率最高,红光的激发效率次之,绿光最低。由此可见,蓝光、黄光和红光光源均可以应用于浮游植物的荧光测量中。

#### 4.2 光强对活体浮游植物叶绿素荧光的影响

活体浮游植物的叶绿素荧光发射特征与分子荧光有明显的差异,在激发波长和发射波长确定的情况下,活体叶绿素荧光强度的大小不仅由激发光强度和样本浓度决定,还会随着时间而变化。活体叶绿素分子吸收的能量利用的途径有光化学反应( $P$ )、热量耗散( $D$ )和发射荧光( $F$ ),上述三种途径一直处于相互竞争的过程当中,经过一定的适应时间后达到平衡状态。

$$P + D + F = 1. \quad (1)$$

当激发光强度足够低时,内部的电子和能量传递过程并没有被开启,活体叶绿素分子吸收的能量转化成荧光或者以热量耗散的形式向周围环境传递。当激发光的强度超出一定的范围后,活体叶绿素分子内部的光化学反应过程开始启动,(1)式中的三种去激发途径开始相互竞争。

为了更好掌握激发光强对活体浮游植物光化学反应的影响,利用3.1节中介绍的测量系统,获取不同光照强度的620 nm LED激发下荧光强度随时间变化的诱导曲线。如图5所示,分别给出了激发光为1.1、3.4、4.3、8.6、18.4、190.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时的荧光诱导曲线。从图中可以发现当激发光的强度

分别为1.1、3.4  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,诱导曲线的荧光值维持在一个稳定的水平,这与Schreiber<sup>[5,7]</sup>介绍的测量光荧光诱导特性相符。当激发光强大于等于4.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,荧光诱导曲线呈现出现快速上升然后缓慢下降趋势,这个下降过程会持续几分钟时间,并最终达到一个相对稳定的水平。这表明激发光的强度超过一定的阈值后,活体叶绿素分子的光合作用过程被启动,吸收的能量驱动分子内部的电子和能量传递,有一部分能量被转化成化学能并被储存起来,由于(1)式中热量耗散的比例相对稳定,用于光化学反应的比例的上升会导致荧光发射占所吸收能量的比例下降,当三种去激发途径相互竞争并达到平衡状态时荧光强度即维持在一个稳定的水平,这很好地解释了诱导曲线中荧光强度的逐步变弱最后趋于稳定的现象。在光强为4.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的激发光照射下,诱导曲线中由于光合作用导致的部分荧光下降占最大值的2.54%,8.6、18.4、190.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 等三种光强激发下的上述数值分别为5.62%、5.88%和18.15%。继续提高光照强度(不超过使活体叶绿素分子产生),荧光诱导曲线的趋势与上述4种光强激发时一致,只是荧光强度下降的幅度更大,通常情况下将这种能够驱动光合过程的光称之为光化光。另外荧光强度均为相对值,由于模数转换(ADC)位数的缘故,测量系统采用了不同增益设置。

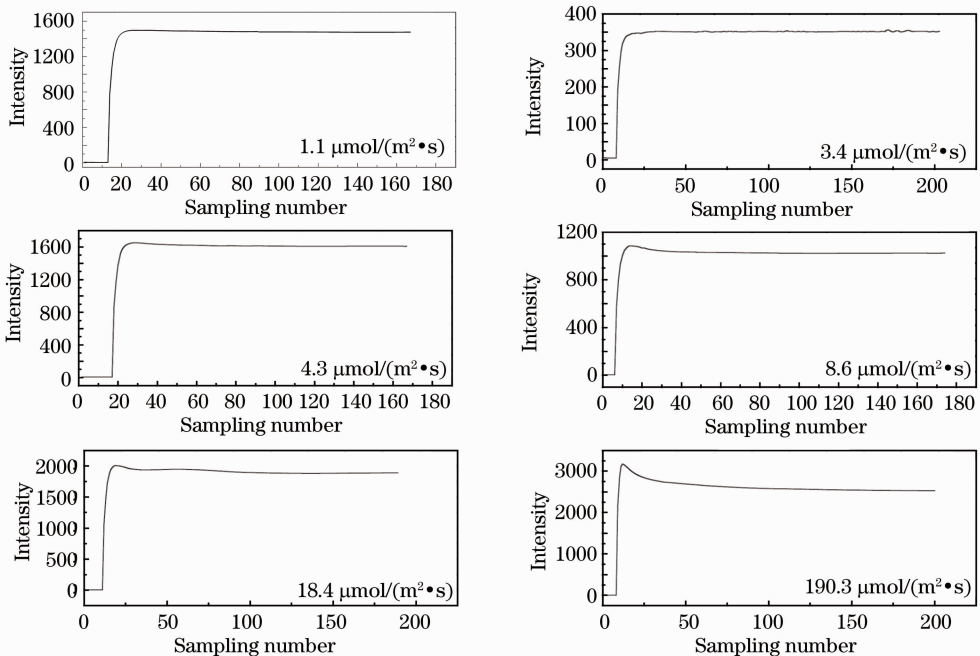


图5 活体浮游植物在620 nm LED不同光照强度下的叶绿素荧光诱导曲线

Fig. 5 Chlorophyll fluorescence induction curves of phytoplankton *in vivo* excited by different light intensities at 620 nm

改变激发波长,分别选取波长为 450、525、590 nm LED 作为激发光源,获得的荧光诱导现象与采用 625 nm LED 激发时很相似。通过实验确定了 450、525、590、620 nm 4 个波长的光源满足测量光特征的强度阈值,如表 1 所示,选取对应波段的 LED 作为激发光源,将光强控制在阈值范围内可以获得与样本本底色素浓度(线性范围内)严格成比例关系的荧光诱导特性。

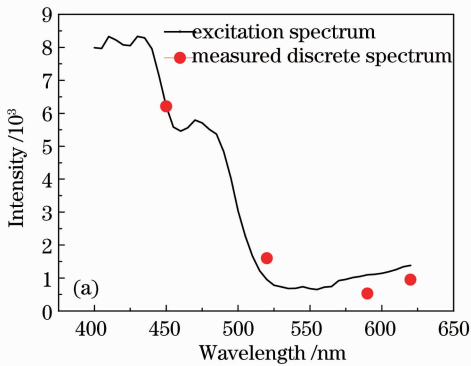
表 1 各波长测量光的光强阈值

Table 1 Intensity threshold values of measure light with different wavelengths

Wavelength /nm	Threshold value / $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$
450	2.8
525	4.6
590	3.8
620	4.3

### 4.3 不同波长激发的荧光诱导特性

为了进一步考察激发光的光质对叶绿素荧光诱导特性,将各波段的激发光强选取在只激发本底色素荧光的光强范围内测量对应的荧光强度。450、525、590、620 nm 激发下的  $F_o$  均是在同一增益设置下测量得到的,实际入射光非常微弱,不足以引起高于  $F_o$  的荧光上升,每一组荧光数据均测量 3 次并取均值。不同波长的测量光与入射光强的比值与样品的激发光谱有关,通过 Origin 软件自带的曲线拟合功能可以得到粗略的四点离散激发光谱如图 6 所



示。通过比较不同激发波长处的  $F_o/I_{PAR}$ ,可以得到更多关于 PSII 吸收光与荧光发射的信息。

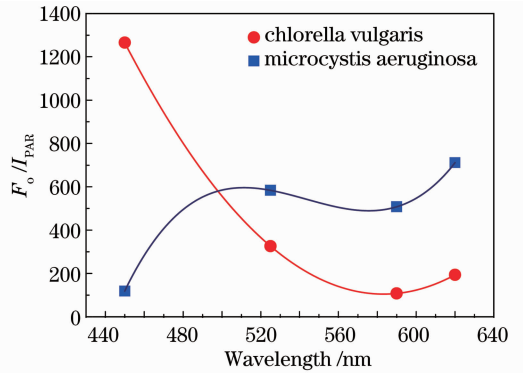


图 6 普通小球藻和铜绿微囊藻的离散激发光谱  
Fig. 6 Discrete excitation spectra of microcystis aeruginosa and chlorella vulgaris

从 4.1 节中得到的普通小球藻三维荧光谱图中提取出 685 nm 处的激发谱线,将测量得到  $F_o/I_{PAR}$  在 450 nm 处的数据调整到三维光谱中同样的大小,其余 3 个波长处的数据依据放大倍数做同样的处理。从图 7(a)中可知测量得到的离散激发光谱与三维荧光仪的结果类似,由于滤光片与三维光谱仪中单色仪透射率性能和探测器在不同波长处响应效率的不同,实验得到的离散激发光谱与三维光谱仪中提取出的激发谱线有一定的偏离,激发光谱的离散化可以为检测仪器的低功耗、快速、小型化提供技术支持。

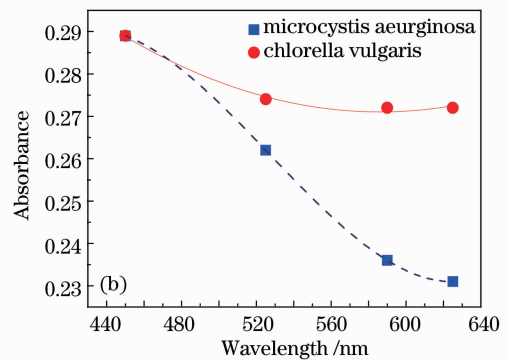


图 7 普通小球藻的激发光谱对比和 4 个波长处的吸收率

Fig. 7 Comparison of discrete and continuous spectrum of chlorella and absorbance measured at 4 wavelengths

为了考察波长对荧光量子效率的影响,利用 UV2550 紫外分光光度计(SHMADZU 日本)测量了普通小球藻和铜绿微囊藻在 450、525、590、620 nm 处的吸收率数据如图 7(b)所示,通过调整样本的浓度使两种藻在 450 nm 处的吸收率处于同一水平。由图 6 可知铜绿微囊藻和普通小球藻荧光  $F_o$  在波长和 PAR 相同时差异非常明显,尽管在 450 nm 下的

吸收率相同,但  $F_{om,450}/F_{oc,450}$  (其中  $F_{om,450}$  和  $F_{oc,450}$  分别代表小球藻和微囊藻在 450 nm 处的本底荧光值)达 1265.833/118.571=10.676 倍,与之相比,同一样品在 620 nm 的激发光下,波长被蓝藻中的藻蓝蛋白强烈吸收,  $F_{oc,620}$  与  $F_{om,620}$  的比值达到 711.163/193.674=3.672。铜绿微囊藻在 525、590、620 nm 处的吸收率数据相差很小,而普通小球

藻的差异相对较大,这与 PSII 和 PSI 的色素构成有密切的关系。叶绿素荧光主要来自 PSII,蓝藻的 PSII 和 PSI 之间色素构成的差异大于绿藻,在蓝藻中,绝大多数叶绿素 a 位于 PSI 的天线系统中,而 PSII 主要由藻胆体构成。通过比较吸收率数据和  $F_o/I_{PAR}$ ,可以发现不同波长激发的荧光数据包含了 PSII 吸收和荧光发射效率方面的信息,而单纯的通过吸收率没办法获取。

#### 4.4 活体浮游植物和失活浮游植物的荧光特性测量

对铜绿微囊藻溶液分别用 90% 提取叶绿素和浓度为  $4 \mu\text{mol/L}$  的 DCMU 进行处理,并设置一个活体对照样本,将 3 个配置完成的样品放入光照培养箱中,24 h 后分别测试叶绿素荧光诱导曲线。其中测量光选取  $450 \text{ nm}$  LED 光源,强度为  $1.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光化光同样选取  $450 \text{ nm}$  LED 作为光源,强度设置为  $276 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,饱和光由  $445 \text{ nm}$  激光二极管提供,光强约为  $6000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,测试过程中每间隔  $10 \text{ s}$  提供一次饱和脉冲光,持续时间约  $1.2 \text{ s}$ 。将样品暗适应  $10 \text{ min}$  后开始进行测试,得到的荧光诱导曲线如图 8 所示,为了更好地比较 3 个样品的荧光诱导特征,3 组测试均在同一信号增益下进行,并将测量光激发下的荧光强度、光化光和饱和脉冲光的作用时间调整到同一水平。

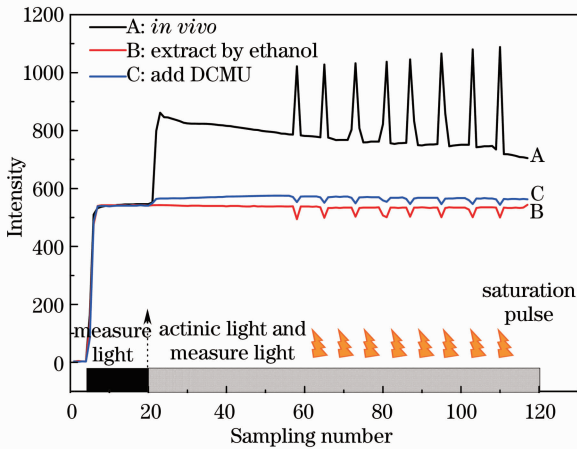


图 8 活体浮游植物、经质量分数为 90% 的乙醇提取和 DCMU 处理后样品的叶绿素荧光诱导曲线

Fig. 8 Chlorophyll fluorescence induction curves of phytoplankton *in vivo*, extracted by 90% mass fraction ethanol and addition with DCMU

3 个样本的在测量光激发下的荧光值一直处于稳定水平,提供  $276 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的非调制光化光后,荧光诱导曲线开始显现出明显的差异。活体样本在光化光的作用下,叶绿素分子内部电子和能量传递过程被触发,荧光强度在很短的时间内迅速上

升至最大值,随着(1)式中三种去激发途径的相互竞争,荧光强度逐渐下降如图 8 中曲线 A 所示,在测量光和光化光同时作用的基础上,提供的饱和脉冲光由于强度足够大作用时间足够短,光合电子传递被短暂地抑制,PSII 中心被完全关闭,荧光强度在短时间内迅速上升至峰值并且随着饱和脉冲光的关闭迅速下降,荧光峰的峰值与光化光的强度和持续时间有关,具体表现为活体叶绿素分子在光适应的过程中,峰值逐渐增加并最终保持稳定,通过峰值处的荧光强度和光适应后的荧光值可以计算得到活体分子的 PSII 原处光能转化效率即光合作用活性。DCMU 作为电子传递抑制剂,打断了图 1 中介绍的 PSII 与 PQ 之间的电子传递过程,在光化光的照射下,PSII 因此积累了大量的电子和能量,导致荧光强度上升。叶绿体分子中的主要光合色素:叶绿素 a、叶绿素 b、叶黄素和胡萝卜素等易溶解于有机溶剂中,因此无水乙醇常用于提取活体浮游植物的叶绿素<sup>[19]</sup>,乙醇对叶绿体结构的破坏导致了浮游植物失去了光合能力,由于信号处理系统只检出与测量光同频率的信号,光化光对检测的荧光没有任何贡献,加入的饱和脉冲光会导致下降表明样本已经完全失去了活性,如图 8 中曲线 B 和 C 所示。

通过对活体和失活样本的荧光诱导测量,在实验条件一致的情况下,获得了不同的荧光诱导曲线,可以说明两个问题:1) 叶绿素荧光可以作为研究活体藻类光合作用的探针,失活样本由于不具备光合作用能力,光化光和饱和脉冲光的照射不会对其荧光量子产率产生影响;2) 验证了测量系统的有效性,采用本测量系统可以获得典型的活体浮游植物的叶绿素荧光诱导曲线,从中可以获取活体样本在光合作用过程中将光能转化为化学能的效率,实现光合作用活性的测量。

## 5 结 论

基于荧光法的叶绿素诱导特性测量可以实现浮游植物光合作用过程的快速和实时监测,不同光质和光强激发下的活体叶绿素荧光诱导特性研究是发展光合作用活性测量仪器的基础。尝试利用 4 种不同中心激发波长的 LED 作为调制测量光的光源,建立了一套实验室浮游植物光合作用活性测量系统。基于不同光强激发下的叶绿素荧光诱导特性,研究了光强对活体浮游植物荧光特性的影响;通过测量各波长处的吸收率和  $F_o/I_{PAR}$ ,获得依赖与波长的有关 PSII 吸收的信息;此外对比测试活体浮游植物、

经 90% 提取和浓度  $0.4 \mu\text{mol/L}$  的 DCMU 处理过的失活样本, 获得了有显著性差异的叶绿素荧光诱导曲线。基于上述研究, 得到如下结论:

1) 给出了中心波长为 450、525、590、620 nm LED 用作测量光光源的光强阈值范围和测试方法, 为浮游植物光合作用活性原位测量系统研制提供数据支持。

2) 结合各波长处的  $F_o/I_{\text{PAR}}$  和吸收率数据, 获得离散的激发光谱并提供不同浮游植物样本 PSII 吸收和荧光发射效率的信息, 明确普通小球藻比铜绿微囊藻更适宜用蓝光波段 LED 进行探测, 铜绿微囊藻在红光波段 LED 激发下荧光发射效率更高, 可以为不同浮游植物的光合作用活性测量中激发光源的波长选取提供参考依据。

3) 比较活体和失活样本的测量结果, 充分揭示了活体浮游植物叶绿素荧光与其他分子荧光的区别, 活体叶绿素荧光量子产率的变化包含了丰富的光合作用信息。

因此, 利用脉冲振幅调制技术结合饱和脉冲方法可以获取活体浮游植物叶绿素荧光诱导特性, 这将为利用廉价的 LED 光源研发相应的水体浮游水体浮游植物光合作用活性原位测量仪器提供可能性。

### 参 考 文 献

- 1 H Kautsky, W Appel, H Amann. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation [J]. *Biochemische Zeitschrift*, 1960, 332: 277—292.
- 2 U Schreiber, H Hormann, C Neubauer, *et al.*. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis [J]. *Functional Plant Biology*, 1995, 22(2): 209—220.
- 3 E Sakshaug, A Bricaud, Y Dandonneau, *et al.*. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results [J]. *J Plankton Res*, 1997, 19(11): 1637—1670.
- 4 L Nedbal, M Trtilek, D Kaftan. Flash fluorescence induction: a novel method to study regulation of photosystem II [J]. *J Photochem Photobiol B; Biol*, 1999, 48(2): 154—157.
- 5 Fu Xiang. Studies on Photosynthesis of Phytoplankton in China Sea: Modeling of Primary Production and in Vivo Chlorophyll Fluorescence Measurement [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2007. 105—109.  
付 翔. 中国近海浮游植物光合作用研究——初级生产力模型计算与活体叶绿素荧光测量[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所,

2007. 105—109.
- 6 U Schreiber, W Bilger, C Neubauer. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis [J]. *Ecological Studies*, 1994, 100: 49—70.
- 7 G Renger, U Schreiber, J Amesz, *et al.*. Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plant research. *Light Emission by Plants and Bacteria*, 1986. 587—619.
- 8 U Schreiber. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: an Overview [M]. Papageorgiou G, Govindjee. *Chlorophylla fluorescence: A signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer, 2004, 279—319.
- 9 G H Krause, E Weis. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology [J]. *Photosynth Res*, 1984, 5(2): 139—157.
- 10 A Stirbet, Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011, 104(1): 236—257.
- 11 W P Quick, P Horton. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. I. Factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 1984, 220(1220): 361—370.
- 12 Bernard Genty, Jean-Marie Briantais, Neil R Baker. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects*, 1989, 990(1): 87—92.
- 13 Neil R Baker, Kevin Oxborough. Chlorophyll Fluorescence as a Probe of Photosynthetic Productivity [M]. Papageorgiou G, Govindjee. *Chlorophyll & Fluorescence: A signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer, 2004. 65—82.
- 14 U Schreiber, U Schliwa, W Bilger. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer [J]. *Photosynthesis Research*, 1986, 10(1-2): 51—62.
- 15 Ulrich Schreiber, Christof Klughammer, Jorg Kolbowski. Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer [J]. *Photosynth Res*, 2012, 113(1-2): 127—144.
- 16 A R Grossman, D Bhaya, K E Apt, *et al.*. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution [J]. *Annu Rev Genet*, 1995, 29(1): 231—288.
- 17 B R Green, D G Durnford. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Biol*, 1996, 47(11): 685—714.
- 18 Pierre Bennis, Yung-sing Li. New results on the mode of action of 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea in spinach chloroplasts [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1973, 292(1): 162—168.
- 19 D P Sartory, J U Grobbelaar. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis [J]. *Hydrobiologia*, 1984, 114(3): 177—187.