

基于色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量方法

殷高方¹ 赵南京¹ 胡丽^{1,2} 余晓娅¹ 石朝毅¹ 肖雪¹ 方丽¹ 段静波¹
甘婷婷¹ 张玉钧¹ 刘建国¹ 刘文清¹

(¹ 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)
² 合肥学院建筑工程系, 安徽 合肥 230022)

摘要 光合作用色素组成是浮游植物分类的重要依据。通过对蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻和隐藻等 5 个门类浮游植物三维荧光光谱的差异性分析, 提取了与叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 c、类胡萝卜素、藻蓝蛋白和藻红蛋白等光合色素相关的 36 个特征荧光光谱点, 提出了基于色素特征荧光光谱的不同门类浮游植物分类测量方法。对铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形隐藻的实验结果表明: 色素特征荧光光谱法对 5 种藻类纯种样品的测量误差分别为 5.15%、5.63%、7.90%、4.85%、6.55%, 对优势藻类(质量分数高于 50%)的测量误差分别为 7.96%、8.69%、5.44%、10.78%、15.57%, 对劣势藻类(质量分数低于 30%)的测量误差分别为 18.29%、17.52%、20.01%、29.11%、20.14%, 测量结果准确度达到了三维荧光光谱法水平, 但数据量和计算时间仅是三维荧光光谱法的 1.1% 和 2.2%, 是一种快速有效的浮游植物分类测量方法。

关键词 光谱学; 浮游植物; 光合作用色素; 特征荧光; 分类测量

中图分类号 X832 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201434.0930005

Classified Measurement of Phytoplankton Based on Characteristic Fluorescence of Photosynthetic Pigments

Yin Gaofang¹ Zhao Nanjing¹ Hu Li^{1,2} Yu Xiaoya¹ Shi Chaoyi¹ Xiao Xue¹ Fang Li¹
Duan Jingbo¹ Gan Tingting¹ Zhang Yujun¹ Liu Jianguo¹ Liu Wenqing¹

(¹ Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China)
² Department of Architectural Engineering, Hefei University, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract The photosynthetic pigment composition is an important basis of classification of phytoplankton. Three dimensional (3D) fluorescence spectra of five phytoplankton divisions (Cyanophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta, Dinophyta, Cryptophyta) are analyzed and 36 characteristic fluorescence peaks which are related to chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll c, carotenoid, phycocyanin and phycoerythrin are extracted. On this basis, a classified measurement method of phytoplankton based on characteristic fluorescence of photosynthetic pigments is put forward. Pure cultures and mixed cultures of *Microcystis aemginosa*, *Chlorella vulgaris*, *Fragilaria* sp, *Glennodinium gymnodinium* and *Cryptomonas ovate* are tested. For the five pure cultures, the measuring errors are 5.15%, 5.63%, 7.90%, 4.85%, 6.55%. For dominant species (mass fraction higher than 50%), the measuring errors are 7.96%, 8.69%, 5.44%, 10.78%, 15.57%. For subordinate species (mass fraction less than 30%), the measuring errors are 18.29%, 17.52%, 20.01%, 29.11%, 20.14%. The characteristic fluorescence spectrometry is a fast and effective phytoplankton classified measurement method. Its measurement accuracy has reached the level of 3D fluorescence spectrometry, while the data volume and calculation time are only 1.1% and 2.2% of the 3D

收稿日期: 2014-04-03; 收到修改稿日期: 2014-05-14

基金项目: 国家 863 计划(2014AA06A509, 2009AA063005)、国家自然科学基金(61378041)、安徽省杰出青年科学基金(1108085J19)、安徽省自然科学基金(1408085MD72)

作者简介: 殷高方(1979—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事水污染光学监测技术与方法等方面的研究。

E-mail: gfyin@aiofm.cas.cn

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

fluorescence spectrometry.

Key words spectroscopy; phytoplankton; photosynthetic pigments; characteristic fluorescence; classified measurement

OCIS codes 300.6280; 300.2530; 300.6390

1 引 言

随着我国水质富营养化问题日益加剧,浮游植物已经成为内陆湖泊和水库的主要污染物。浮游植物种群结构随着水质状况和季节变化而改变,不同种群结构的浮游植物对环境造成的危害也存在差异,因此,水体环境监测越来越强调浮游植物群落的分类测量。

浮游植物细胞色素组成是浮游植物分类的重要依据和物质基础,荧光光谱探测具有灵敏度高、分析简便、无需样品预处理、无污染和无破坏性等优点,被广泛应用于浮游植物光合色素组成和群落分布测量中。利用荧光光谱研究鉴定浮游植物种类起始于20世纪80年代,1985年,Yentsch等^[1]率先利用荧光光谱鉴定浮游植物色素种类。1993年,Cowles等^[2]通过测量藻红蛋白特征荧光推断了海水中含藻红蛋白的浮游植物种类和丰度变化。1995年,Lee等^[3]根据藻蓝蛋白的特征荧光,建立了蓝藻含量的荧光分析方法。2002年,Beutler等^[4]利用叶绿素a激发荧光光谱实现了蓝藻、绿藻、隐藻三个门类浮游植物的分类测量,但是尚无法区分硅藻和甲藻。随着三维(3D)荧光光谱测量技术的发展,三维荧光光谱在浮游植物研究中的应用逐渐展开,该技术提供的指纹信息更加丰富,能够在更细层次上区分浮游植物^[5-7]。然而,三维荧光光谱的测量设备结构精密而复杂、光谱解析算法计算量大,目前只适合在实验室条件下进行测试分析,难以满足浮游植物现场快速的测量需求。

本文通过研究不同门类浮游植物的三维荧光光谱特征,结合浮游植物色素组成,提出一种基于色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量方法。

2 材料与方法

2.1 浮游植物培养

选择我国淡水常见5个门类浮游植物进行纯种培养,即蓝藻门的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、绿藻门的小球藻(*Chlorella vulgaris*)、硅藻门的桅杆藻(*Fragilaria* sp)、甲藻门的光甲藻(*Glenodinium gymnodinium*)和隐藻门的卵形隐藻(*Cryptomonas ovata*)。选用的浮游植物均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。在光照培养箱

中对纯种的浮游植物进行扩繁、驯化培养和转接,光源使用白色冷荧光灯管,光照强度为6000 lx,固定光暗周期为10 h/14 h,温度为25 ℃/22 ℃,培养周期为15 d。

2.2 叶绿素 a 浓度测定

以叶绿素 a 浓度代表浮游植物浓度,对各浮游植物纯种培养体进行抽滤、提取和离心步骤后得到相应的丙酮萃取液,利用 Shimadzu UV2550 分光光度计测量提取液在 630、645、663、750 nm 的吸光度,根据标准的光分光光度法^[8],计算各浮游植物纯种培养体的叶绿素 a 浓度。根据纯种培养体的叶绿素 a 浓度,按实际体积配制比例计算混合样品中各浮游植物的叶绿素 a 浓度。

2.3 浮游植物三维荧光光谱测量

浮游植物待测样品暗适应 20 min 后,使用 Hitach F7000 荧光分光光度计测量三维荧光光谱。光谱测量参数设置如下:激发光谱范围为 400~700 nm,激发波长间隔为 5 nm,发射光谱范围为 560~750 nm,发射波长间隔为 5 nm。然后,采用 Delaunay 三角形内插值法^[9],去除测量光谱中的瑞利和拉曼散射信号,得到浮游植物的三维荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 浮游植物三维荧光光谱特征

取5种浮游植物纯种培养体,使用蒸馏水稀释,得到叶绿素 a 质量浓度为 100 μg/L 左右的纯种样品,测量得到的三维荧光光谱如图 1 所示。

从图 1 可以看出不同门类浮游植物三维荧光光谱具有明显的特征光谱,而特征光谱占三维光谱的小部分区域,大部分区域是非特征光谱区。这些非特征光谱区是信噪比低的光谱区域和冗余光谱区域,所含信息量少或者与浮游植物门类缺乏相关关系,无益于浮游植物分类测量。因此采用二元凸函数判定和聚类分析方法^[10]对浮游植物三维荧光光谱进行了特征提取。

浮游植物特征荧光激发与发射波长取决于色素对光能的吸收、传递和释放特性。根据提取得到的特征荧光光谱结合不同门类浮游植物的色素组成^[11],能够进一步明确各门类浮游植物色素特征荧光光谱点激发和发射波段,如图 2 所示。1)所有浮

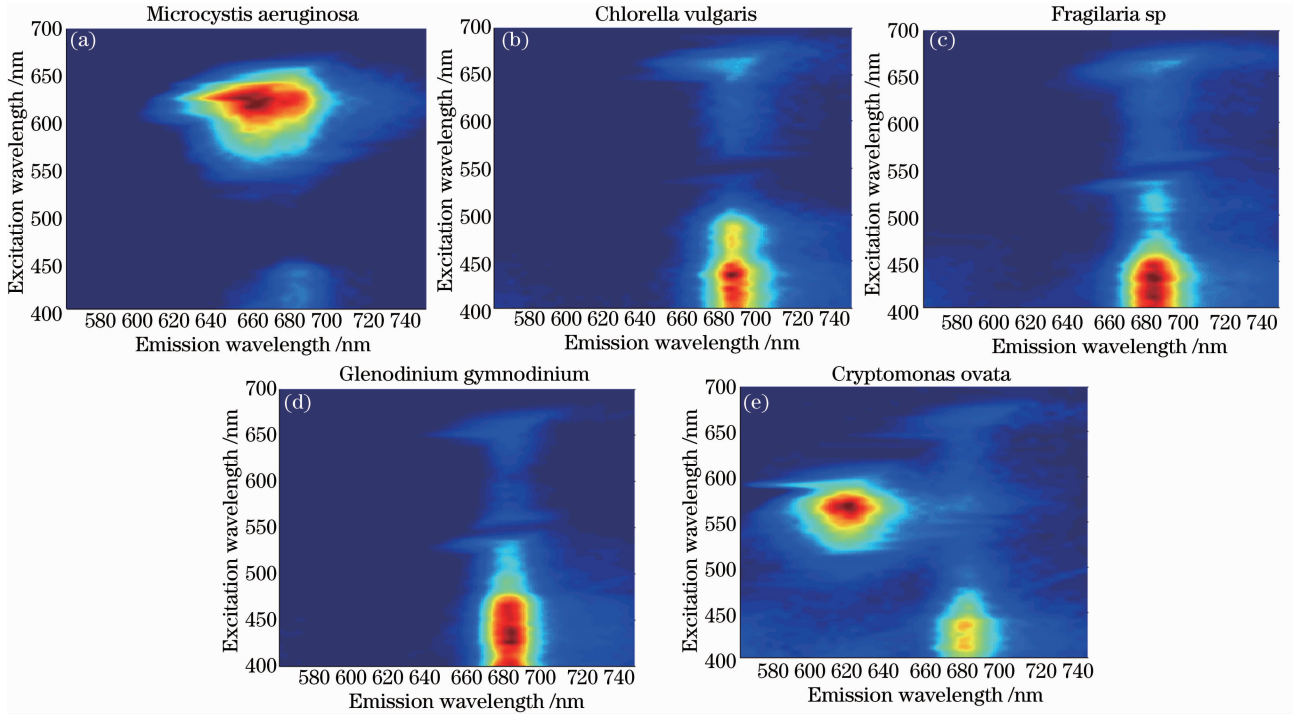


图 1 5 个门类浮游植物的三维荧光光谱

Fig. 1 3D fluorescence spectra of the five phytoplankton divisions

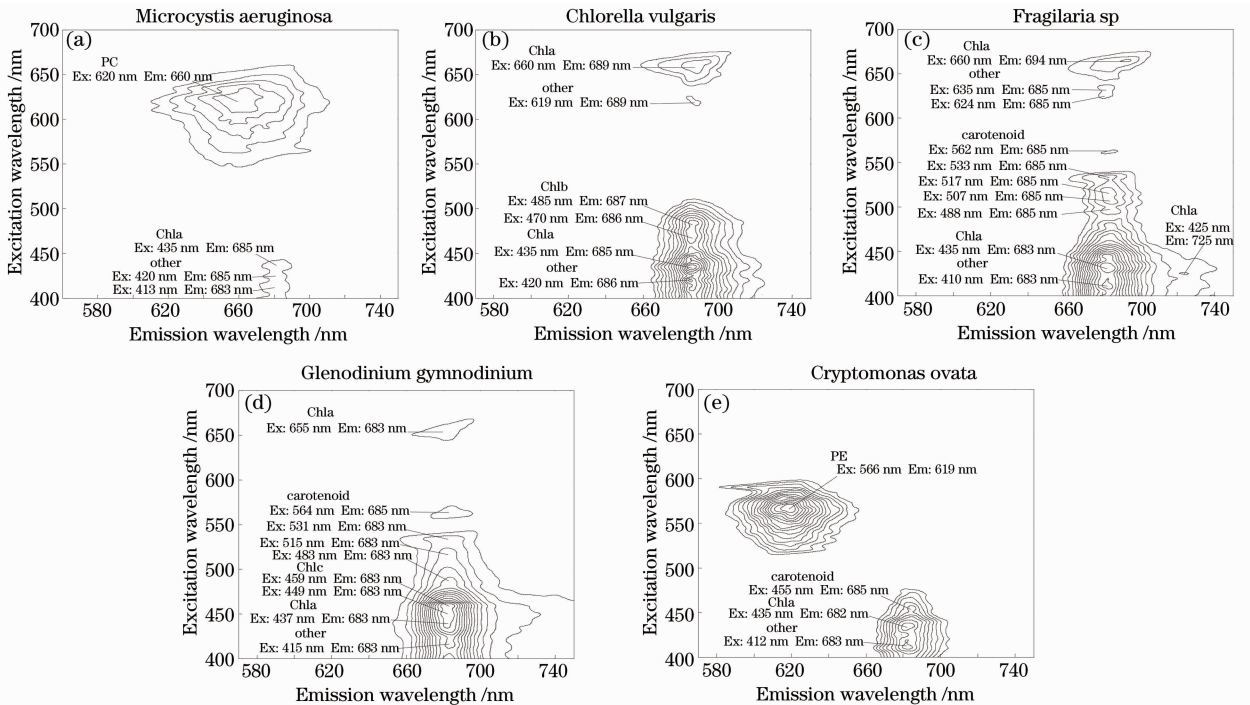


图 2 5 个门类浮游植物色素特征荧光

Fig. 2 Characteristic fluorescence of the five phytoplankton divisions

游植物均含有反应中心色素叶绿素 a(Chla), 吸收峰在 435 nm 处, 并发射 685 nm 主荧光峰和 725 nm 次荧光峰。2) 由于叶绿素 a 分子是反应中心色素, 它还接收其他捕光色素传递的吸收光能, 所以在叶绿素 a 荧光发射波段上还会出现与捕光色素吸收特

性相关的荧光峰。3) 不同门类浮游植物的捕光色素各异, 蓝藻门的主要捕光色素为藻蓝蛋白(PC), 吸收 620 nm 波段红光, 发射 660 nm 波段荧光; 绿藻门捕光色素是叶绿素 b(Chlb), 吸收峰在 480 nm 波段; 硅藻门的捕光色素以类胡萝卜素为主, 在 480~

580 nm 波长范围出现不同的次级吸收峰;甲藻门主要的捕光色素是叶绿素 c(Chlc),吸收峰在 450~470 nm 波段,同时含有岩藻黄质和多甲藻素等类胡萝卜素,吸收峰在 430~560 nm 波段;隐藻门捕光色素含有藻红蛋白(PE),吸收峰在 570 nm 波段,并在 620 nm 波段发射荧光。4)在浮游植物活体细胞中,色素总是与蛋白形成复合体,它们之间相互作用使色素的光能吸收和释放特性发生变化,因此,在实测光谱中色素荧光特征峰会出现少许偏移,还存在一些未能明确归类的荧光峰。

3.2 浮游植物色素特征荧光光谱

根据 5 个门类浮游植物色素特征荧光光谱点的位置,采用无信息变量消除算法(UVE)对三维荧光光谱进行压缩^[12],最大程度地减小非特征区域和特征区域的比例,突显不同门类的浮游植物荧光光谱差异信息,选出 36 个特征光谱点,如图 3 所示。

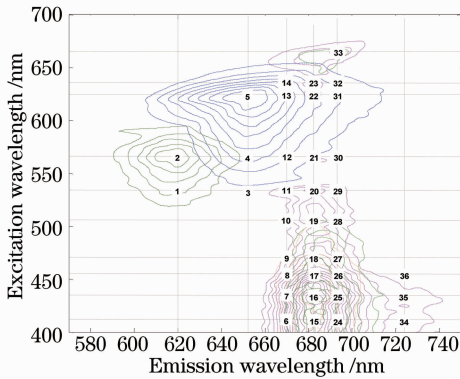


图 3 浮游植物 36 个色素荧光光谱的特征点
Fig. 3 36 characteristic fluorescence peaks of photosynthetic pigments

将 36 个色素荧光特征点按激发-发射波长由小到大顺序连接,转化为二维光谱,并以浮游植物的叶绿素 a 含量为统一标准,将光谱强度转化成单位叶绿素 a 浓度对应的荧光光谱强度,建立 5 个门类浮游植物标准色素特征荧光光谱。

3.3 浮游植物分类测量

基于色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量的基本思想是在浮游植物标准特征荧光光谱库中找到与样品荧光光谱最为相似的特征谱或特征谱组合,可转化为多元线性回归(MLR)问题,即混合浮游植物培养体的某一激发波长处的激发荧光强度为该激发波长处所有浮游植物培养体激发荧光强度之和,用公式表示为

$$M = F_i = \sum_{k=1}^{36} f_{k,i} \cdot a_k + \chi, \quad (1)$$

式中 M 为测得的浮游植物色素特征荧光光谱, F_i 为第 i 个特征点的荧光强度, $f_{k,i}$ 为第 k 种浮游植物在第 i 个特征点的标准值, a_k 为第 k 种浮游植物的叶绿素 a 浓度, χ 为测量误差。

3.4 实验结果

测量上述 5 种浮游植物纯种培养体的叶绿素 a 浓度,将纯种培养体以蒸馏水稀释一定倍数,得到铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形隐藻的母液,母液的叶绿素 a 质量浓度分别为 106、105、95、95、98 $\mu\text{g/L}$ 。再按表 1 所示体积比例配制成 15 个浮游植物纯种样品和 26 种混合样品,其中 0 代表蒸馏水,字母 A、B、C、D、E 分别代表铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形隐藻。样品暗适应 30 min 后,测量三维荧光光谱,并按图 3 提取浮游植物样品的色素特征荧光光谱。

表 1 浮游植物样品的体积配制比例

Table 1 Mixing proportion of phytoplankton samples

No.	Species	Volume ratio	No.	Species	Volume ratio	No.	Species	Volume ratio
1	0A	0:1	16	AB	1:1	31	ADE	1:1:1
2	0A	1:1	17	AC	1:1	32	BCD	1:1:1
3	0A	3:1	18	AD	1:1	33	BCE	1:1:1
4	0B	0:1	19	AE	1:1	34	BDE	1:1:1
5	0B	1:1	20	BC	1:1	35	CDE	1:1:1
6	0B	3:1	21	BD	1:1	36	ABCD	1:1:1:1
7	0C	0:1	22	BE	1:1	37	ABCE	1:1:1:1
8	0C	1:1	23	CD	1:1	38	ABDE	1:1:1:1
9	0C	3:1	24	CE	1:1	39	ACDE	1:1:1:1
10	0D	0:1	25	DE	1:1	40	BCDE	1:1:1:1
11	0D	1:1	26	ABC	1:1:1	41	ABCDE	1:1:1:1:1
12	0D	3:1	27	ABD	1:1:1			
13	0E	0:1	28	ABE	1:1:1			
14	0E	1:1	29	ACD	1:1:1			
15	0E	3:1	30	ACE	1:1:1			

利用 MLR 算法解析色素特征荧光光谱,计算出样品中各门类浮游植物的叶绿素 a 浓度。同时利用平行因子模型算法(PARAFAC)对浮游植物的三

维荧光全谱进行解析^[6],将两种光谱法的计算结果与分光光度法测量结果进行比较,如图 4 所示。

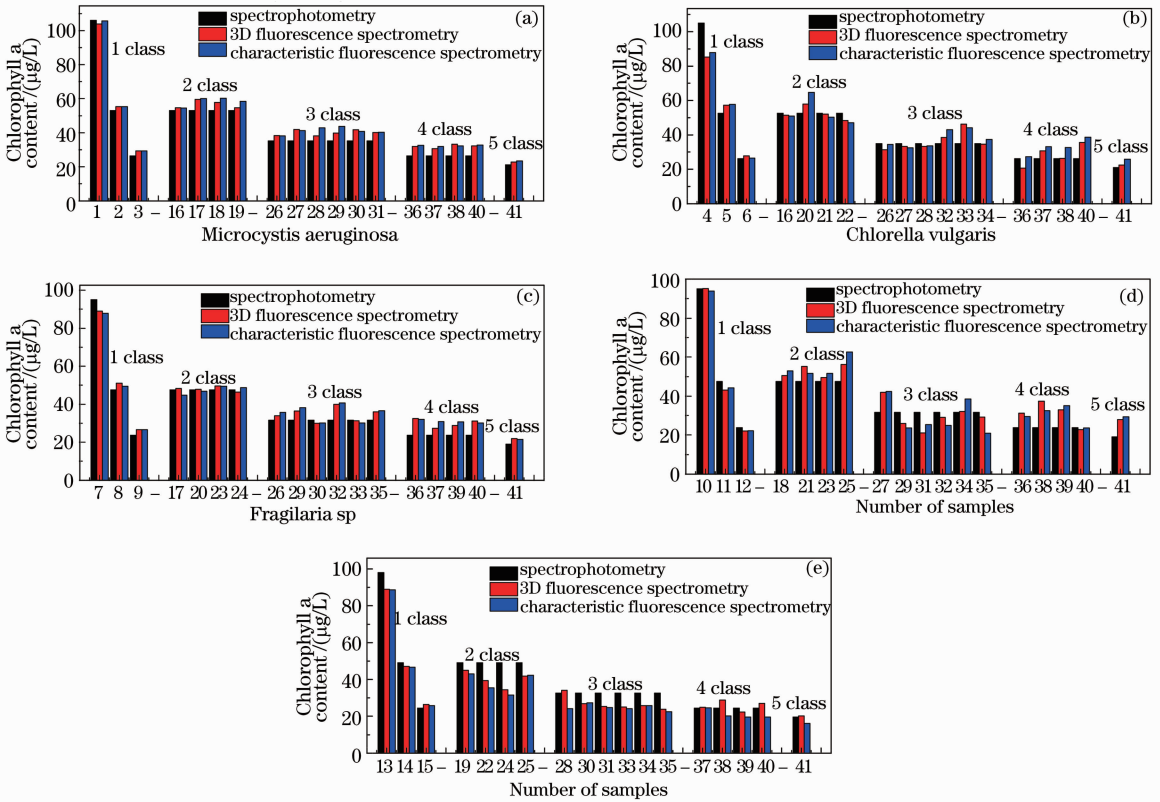


图 4 浮游植物样品荧光光谱法计算结果与分光光度法测量结果比较(质量浓度)

Fig. 4 Comparison of calculated concentrations by fluorescence spectrometry and measured concentrations by spectrophotometry in phytoplankton samples (mass concentration)

色素特征荧光光谱法的浮游植物分类计算结果表明:对于纯种浮游植物样品,该方法计算结果准确度高,与分光光度法测量值非常接近,铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形隐藻浓度分析结果的相对误差分别为 5.15%、5.63%、7.90%、4.85%、6.55%;在混合样品中,对质量分数高于 50% 的优势藻,计算结果与测量值接近,铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形隐藻质量浓度分析结果的相对误差分别为 7.96%、8.69%、5.44%、10.78%、15.57%;当浮游植物在混合样品中比率降低时,计算结果准确性也随之下落,对质量分数低于 30% 的劣势藻,铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻、光甲藻和卵形

隐藻质量浓度分析结果的相对误差为 18.29%、17.52%、20.01%、29.11%、20.14%。

色素特征荧光光谱法与三维荧光光谱法计算结果的对比分析发现:两种光谱法对优势浮游植物的计算都有较高的准确度,且计算准确度都随浮游植物在混合样品中比率的降低而低,对纯种样品,色素特征光谱法计算准确度略高于三维荧光光谱法(见图 4)。采用 ThinkPad X200 计算机和 Matlab R2009a (Version 7.8, Mathworks Inc.) 软件对两种光谱法的结果进行解析,结果表明色素特征荧光光谱法处理的数据量和解析时间仅是三维荧光光谱法的 1.1% 和 2.2%,如表 2 所示。

表 2 特征荧光光谱法与三维荧光光谱法对比

Table 2 Comparison of characteristic fluorescence spectrometry and 3D fluorescence spectrometry

	Data volume	Analytical algorithm	Calculation time /s	Average relative error /%		
				Pure	Dominant	Subordinate
3D fluorescence spectrometry	3159	PARAFAC	5.4	6.84	7.92	17.11
Characteristic fluorescence spectrometry	36	MLR	0.12	6.02	9.69	21.01

4 结 论

色素特征荧光光谱法不同门类浮游植物分类测量的有效方法。对于实验的 5 个门的浮游植物,该方法分类测量能力达到了三维荧光光谱法的测量水平,能够有效区分硅藻和甲藻,对于纯种浮游植物计算准确度还略高于三维荧光光谱法。色素特征荧光光谱测量和分析过程简单快速,可发展成为浮游植物的快速现场分类测量方法。

实验过程中发现荧光光谱法对劣势种类浮游植物的测量能力都比较差,初步分析认为误差主要源于光谱的测量过程。在混合样品中荧光重吸收效应引起光谱形状变化,例如卵形隐藻产生的 620 nm 荧光会再次激发铜绿微囊藻、小球藻、桅杆藻和光甲藻;光谱测量过程中颗粒大的桅杆藻和卵形隐藻出现下沉和不均匀性也会造成三维荧光光谱的测量偏差。这些误差来源分析需要进一步的实验验证。

参 考 文 献

- 1 C S Yentsch, D A Phinney. Spectral fluorescence: An taxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations [J]. *Journal of Plankton Research*, 1985, 7(5): 617-632.
- 2 T J Cowles, R A Desiderio, S Neuer. *In situ* characterization of phytoplankton from vertical profiles of fluorescence emission spectra [J]. *Marine Biology*, 1993, 115(2): 217-222.
- 3 T Lee, M Tsuzuki, T Takeuchi, *et al.*. Quantitative determination of cyanobacteria in mixed phytoplankton assemblages by all *in vivo* fluorimetric method [J]. *Analytical Chimica Acta*, 1995, 302(1): 81-87.
- 4 M Beutler, K H Wiltshire, B Meyer, *et al.*. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ* [J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 72(1): 39-53.
- 5 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.
- 6 Wang Zhigang, Liu Wenqing, Zhang Yujun, *et al.*. The classified measuring of three dimensional excitation-emission fluorescence matrix technique on phytoplankton concentration in water body [J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(2): 136-141.
- 王志刚, 刘文清, 张玉钧, 等. 三维荧光光谱法分类测量水体浮游植物浓度[J]. *中国环境科学*, 2008, 28(2): 136-141.
- 7 Chen Xiaona, Han Xiurong, Su Rongguo, *et al.*. Lake algae chemotaxonomy technology based on fluorescence excitation emission matrix and parallel factor analysis [J]. *Environmental Science*, 2014, 35(3): 924-932.
- 陈小娜, 韩秀荣, 苏荣国, 等. 基于三维荧光光谱和平行因子技术联用的湖泊浮游藻化学分类学研究[J]. *环境科学*, 2014, 35(3): 924-932.
- 8 Water and Wastewater Monitoring Method Editorial Board of the State Environmental Protection Administration. *Water and Wastewater Monitoring Method* [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. 649-671.
- 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. *水和废水监测分析方法*[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 649-671.
- 9 R G Zepp, W M Sheldon, M A Moran. Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices [J]. *Marine Chemistry*, 2004, 89(1-4): 15-36.
- 10 Du Shuxin, Du Yangfeng, Yuan Zhibao. Characteristic region selection methods for three-dimensional fluorescence spectrometry [J]. *Chinese J Luminescence*, 2012, 33(3): 341-345.
- 杜树新, 杜阳锋, 袁之报. 三维荧光光谱的特征区域选择方法[J]. *发光学报*, 2012, 33(3): 341-345.
- 11 Han Boping, Han Zhiguo, Fu Xiang. *Algal Photosynthesis: Mechanisms and Models* [M]. Beijing: Science Press, 2003. 6-17.
- 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, 2003. 6-17.
- 12 C Vitezslav, L M Desire. Elimination of uninformative variables for multivariate calibration [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(21): 3851-3858.

栏目编辑: 史 敏