

基于加权平均法的活体藻类三维荧光标准光谱构建

张小玲^{1,2,3}, 殷高方^{1,3}, 赵南京^{1,3}, 杨瑞芳^{1,3}, 覃志松^{1,3,4}, 陈双^{1,2,3},
甘婷婷^{1,3}, 肖雪^{1,3}, 段静波^{1,3}, 刘建国^{1,3}, 刘文清^{1,3}

¹中国科学院安徽光学精密机械研究所中国科学院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

²中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

⁴桂林电子科技大学, 广西 桂林 541004

摘要 针对活体荧光光谱不稳定引起的蓝藻门活体藻类定量误差问题,以实验室培养的 4 种类 6 个生长期的 48 个蓝藻样品为研究对象,通过测量样品叶绿素 a 和藻蓝蛋白的含量,结合藻类活体三维荧光光谱,研究了不同藻种种类、生长期和生长环境下蓝藻细胞色素组成和色素荧光效率的差异;定量分析不同条件对藻类活体荧光光谱不稳定性的影响,获得了不同条件下的光谱不稳定性权重谱;在此基础上,构建基于加权平均方法的蓝藻门活体藻类加权荧光光谱;比较了加权荧光光谱与不同条件下归一化荧光光谱对样品集的结果。结果表明:加权荧光光谱能有效降低荧光测量法对藻种种类、生长期、生长环境的依赖性,提高蓝藻门叶绿素浓度的测量准确性;测量结果的相对误差为 0.1%~30.4%,平均相对误差为 12.8%,相对误差最大可降低 104.1%。

关键词 光谱学; 三维荧光光谱; 活体荧光; 加权平均法; 蓝藻; 叶绿素 a

中图分类号 O433

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.0730001

Construction of Three-Dimensional Fluorescence Standard Spectra of Algae *in vivo* Based on Weighted Average Method

Zhang Xiaoling^{1,2,3}, Yin Gaofang^{1,3}, Zhao Nanjing^{1,3}, Yang Ruifang^{1,3},
Qin Zhisong^{1,3,4}, Chen Shuang^{1,2,3}, Gan Tingting^{1,3}, Xiao Xue^{1,3}, Duan Jingbo^{1,3},
Liu Jianguo^{1,3}, Liu Wenqing^{1,3}

¹Key Laboratory of Environmental Optics & Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

²University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

³Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Anhui Province, Hefei, Anhui 230031, China;

⁴Institute of Computer and Information Security, Guilin University of Electronic Technology, Guilin, Guangxi 541004, China

Abstract Forty-eight samples belonging to four common species of Cyanophyta are studied in order to reduce the chlorophyll a concentration measurement errors caused by unstable fluorescence spectra *in vivo*. We analyze the effects of algae species, growing period, and growing environment on the photosynthetic pigment composition and fluorescence efficiency by measuring the content of chlorophyll a and phycocyanin, as well as the three-dimensional fluorescence spectra of Cyanophyta *in vivo*. And we obtain the weight spectra by analyzing the spectral instability under different habitat conditions. The weight fluorescence spectrum of Cyanophyta *in vivo* is established based on

收稿日期: 2018-01-19; 收到修改稿日期: 2018-02-25

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1400600)、青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金(QNLM2016ORP0312)、国家自然科学基金(31400317)、中国科学院 STS 计划(KFJ-SW-STS-170)、国家 863 计划(2014AA06A509)、安徽省科技重大专项(17030801033)

作者简介: 张小玲(1989—),女,博士研究生,主要从事浮游植物光学监测方法方面的研究。

E-mail: xlzhang@aiofm.ac.cn

导师简介: 赵南京(1976—),男,博士,研究员,主要从事环境污染光学与光谱学监测新技术与方法方面的研究。

E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn(通信联系人)

the weighted average method. The measurement results that respectively obtained by the weight spectrum and different normalized spectra are compared, and the comparisons indicate that the weight spectrum can significantly reduce the dependence of fluorescence method on algae species, growing period, and growing environment, and thus increase the accuracy of chlorophyll a concentration of Cyanophyta. The relative error of the weight spectrum is 0.1%-30.4%, with a mean relative error of 12.8%. The maximum relative error of anabaena can be reduced by 104.1% in the weight spectrum.

Key words spectroscopy; three-dimensional fluorescence spectra; *in vivo* fluorescence; weighted average method; Cyanophyta; chlorophyll a

OCIS codes 300.6170; 300.6280; 000.3860

1 引 言

藻类快速监测是水华预警的前提与基础,而荧光检测方法无需对样品进行预处理,具有灵敏度高、速度快、操作简便等优点,可广泛应用于浮游藻类监测等方面。

活体荧光法是通过测量藻类活体细胞中心色素叶绿素 a(Chl a)分子受激辐射的荧光强度来反演叶绿素 a 的浓度,以实现藻类叶绿素 a 浓度测量的定量分析方法。基于这个理论,HydroLab 多参数水质分析仪^[1-2]通过单点激发荧光光谱法来实现蓝绿藻的监测;FluoroProbe 藻类测量仪采用多点激发光谱法实时判定每个藻类光谱组的叶绿素 a 的浓度^[3-4]。然而,以上两种方法由于携带的藻类荧光信息较少,在实际测量中存在很大的测量误差。随着三维荧光技术的发展,三维荧光光谱技术在浮游藻类测量中逐渐发挥着重要作用。三维荧光光谱法能够提供更加丰富的指纹光谱信息,因此可以实现更准确的深层次识别分析。如:苏荣国等^[5]利用三维荧光光谱结合识别算法实现了海洋硅甲藻的分类识别;王志刚等^[6]通过光谱相似性将浮游植物分成 3 种光谱组,并实现了淡水藻类的光谱组分类测量。然而 Lawrenz 等^[7]和 Loftus 等^[8]的研究表明三维荧光光谱法在活体藻类测量中仍然存在一定的局限性。活体荧光作为浮游植物光合

作用过程的副产物,容易受到环境条件的影响。Jakob 等^[9]发现当采用实验室校准的 Phyto-PAM 荧光仪测量自然河流浮游藻类时,叶绿素 a 浓度的测量误差高达 46%;覃志松等^[10-12]的研究结果表明浮游植物的生理状态随环境条件不同而变化。以上研究表明,活体荧光光谱不稳定是藻类荧光检测方法面临的挑战之一,构建具有普适性与代表性的标准荧光光谱是活体藻类荧光检测方法的重要一环。

鉴于此,本文以实验室培养的 48 个蓝藻样品为研究对象,利用三维荧光光谱技术,研究了藻种种类、生长期和生长环境对蓝藻活体荧光光谱稳定性的影响,并研究了基于加权平均法的蓝藻活体藻类标准三维荧光光谱构建方法,旨在构建一种具有普适性与代表性的活体藻类标准荧光光谱,提高活体藻类荧光测量方法测量的准确性。

2 材料与方 法

2.1 藻种培养

选择我国淡水湖库常见的 4 种典型水华蓝藻(表 1)进行实验,采用 BG11 培养基接种培养,并静置于培养箱中。光暗周期为 12/12 h,光照强度为 6000 lx,培养温度为(25±1) °C,实验设置 2 个平行试样。实验藻种来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。

表 1 实验选用的 4 种蓝藻

Table 1 Four species of Cyanophyta used in the experiment

Category	Genus	Species	No.	Abbreviation
Cyanophyta	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	FACHB-524	Ama
	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena flosaquae</i>	FACHB-82	Aaf
	<i>Merismopedia</i>	<i>Merismopedia tenuissima</i>	FACHB-1937	Amp
	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria utea</i>	FACHB-406	Aol

2.2 色素浓度与荧光光谱的测量

蓝藻门的光合色素主要为叶绿素 a 与藻蓝蛋白(PC),其中叶绿素 a 为浮游藻类常见色素,藻蓝蛋白是蓝藻门特征色素。以分光光度法为标准测量方

法,将其测量结果与活体三维荧光光谱法的测量结果进行比较,并最终用叶绿素 a 的浓度表征样品的生物量。叶绿素 a 浓度的测量参考国家标准^[13],采用反复冻融法提取藻蓝蛋白浓度后,对其进行分光

光度法测量^[14]。

采用 F7000 荧光光谱分析仪(Hitach,日本)扫描样品的活体三维荧光光谱。激发波长为 380~650 nm,发射波长为 580~720 nm,波长间隔为 5 nm/5 nm。

3 结果分析

3.1 蓝藻门类光谱的稳定性

3.1.1 不同种类蓝藻荧光光谱的稳定性

选择生长期为 21 d 的 4 种蓝藻样品,以超纯水分别稀释为 7 个浓度梯度。以样品的标准色素浓度为横坐标,色素荧光峰强度为纵坐标,建立浓度-荧光强度工作曲线。为了降低实验仪器及扫描模式造成的测量误差,选择色素荧光峰对应的特征荧光区域积分强度表征色素的荧光强度。实验选定的藻蓝蛋白特征荧光峰的激发波长为 570~650 nm,发射

波长为 600~700 nm,叶绿素 a 特征荧光峰的激发波长为 380~460 nm,发射波长为 650~750 nm。

图 1 和图 2 所示分别为 4 种蓝藻的三维荧光光谱与色素荧光工作曲线。由图 2 可知:4 种蓝藻的叶绿素 a 和藻蓝蛋白的回归系数 k 的范围分别为 9.94~32.74 和 11.96~68.36,表明不同种类蓝藻细胞的色素荧光效率差异很大,且具有明显的藻种依赖性;藻蓝蛋白与叶绿素 a 对应的横坐标比值表示不同蓝藻样品中两种光合色素标准浓度的比值,其变化范围为 5.22~9.26,表明不同蓝藻细胞内的光合色素组成比例也有明显的种类依赖性。两种光合色素工作曲线的相关性系数 r^2 均大于 0.99,表明荧光区域积分强度与色素浓度具有良好的一致性关系。因此,在接下来的研究中以荧光峰区域积分强度表征色素浓度。

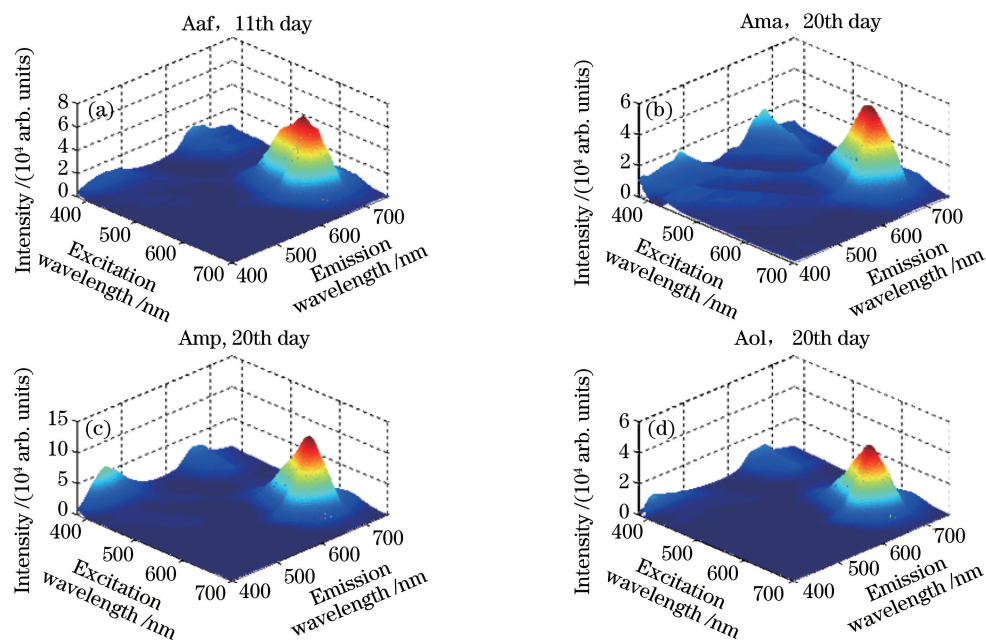


图 1 4 种蓝藻的三维荧光光谱

Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectra of four species of Cyanophyta

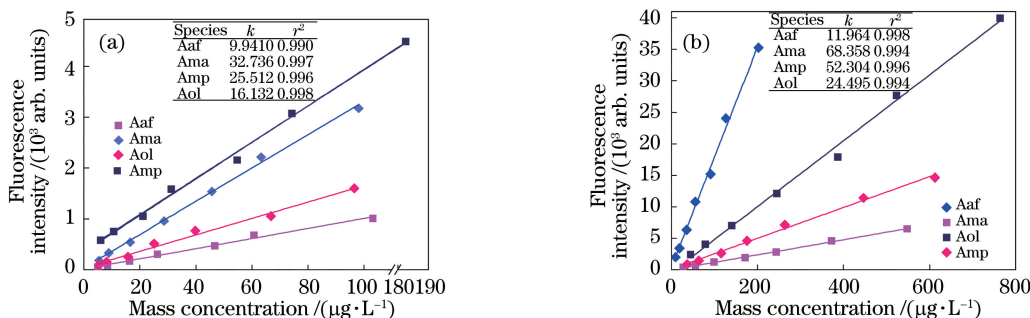


图 2 4 种蓝藻的色素荧光工作曲线。(a)叶绿素 a;(b)藻蓝蛋白

Fig. 2 Fluorescence working curves of four species of Cyanophyta. (a) Chl a; (b) PC

3.1.2 不同生长期蓝藻荧光光谱的稳定性

在培养的第 4、7、11、14、17、21 天扫描实验样品的三维荧光光谱。采用激发光谱包络线法^[9]对藻类的三维荧光光谱进行二维化处理,以激发谱包络线的演变来直观地表征不同生长期蓝藻荧光光谱的稳定性。所有荧光光谱均根据叶绿素 a 的浓度进行归一化处理。

由图 3 可知:随着生长期增加,每种蓝藻的色素荧光逐渐降低,一般在生长末期藻类色素荧光效率达到最低;在培养周期内,Amp 的荧光效率差异最大,变化范围为 0.872~0.438,相对偏差可达 66.3%;Aaf 的荧光效率差异最小,变化范围为 0.524~0.438,相对偏差为 17.9%。

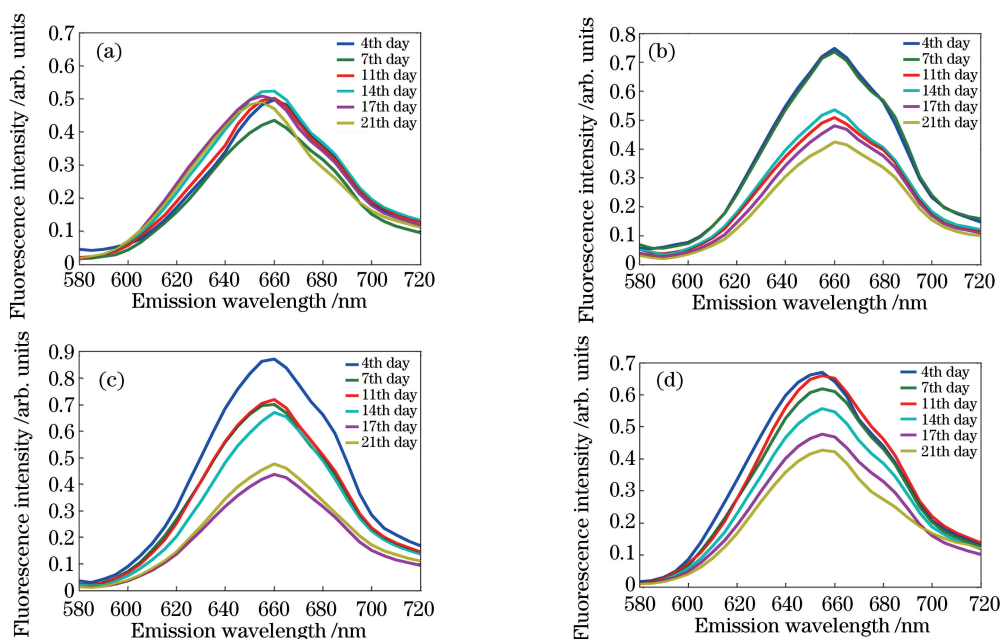


图 3 不同生长期蓝藻的激发光谱包络线演变。(a) Aaf;(b) Ama;(c) Amp;(d) Aol

Fig. 3 Excitation spectrum envelope evolution of four species of Cyanophyta at different growth stages.

(a) Aaf; (b) Ama; (c) Amp; (d) Aol

图 4 所示为 4 种蓝藻在不同生长期的光合色素浓度比值的变化趋势,sample 1 和 sample 2 代表两个平行样品。结果表明,在 4 种蓝藻样品中,藻蓝蛋白与叶绿素 a 的色素浓度之比(以下简称“色素比”)基本随着生长期的增加而增大,变化范围为 3.3~8.1,但变化范

围、趋势与藻种种类密切相关,如 Amp 色素比的最小值为 5.39,大于 Ama 色素比的最大值 5.32。图 4 还表明,物理形态比较均匀的 Ama 和 Amp 的两个平行样品间的一致性较好,而在生长过程中容易团簇结块的 Aaf 和 Aol,其平行样品的一致性较差。

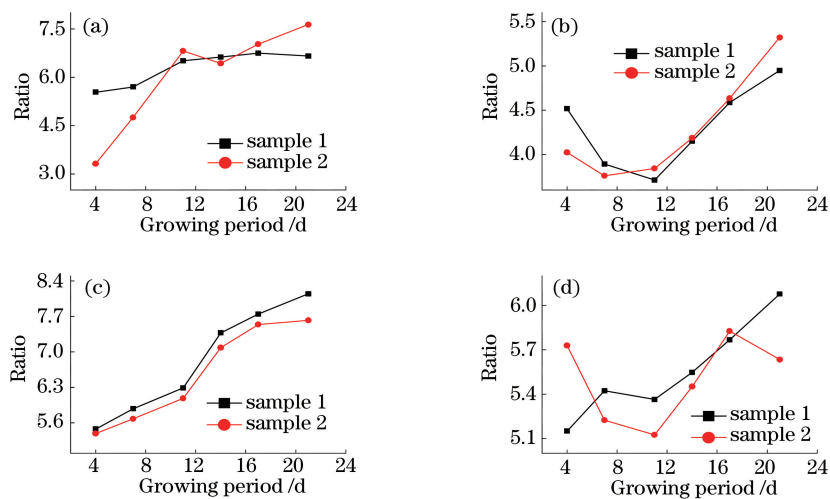


图 4 4 种蓝藻在不同生长期的色素比。(a) Aaf;(b) Ama;(c) Amp;(d) Aol

Fig. 4 Pigment ratios of four species of Cyanophyta at different growing periods. (a) Aaf; (b) Ama; (c) Amp; (d) Aol

通过藻类活体的三维荧光光谱研究了藻种种类、生长期对蓝藻门三维荧光光谱稳定性的影响。结果表明,蓝藻活体细胞内的光合色素组成和荧光效率差异与藻种种类、生长期和生长环境密切相关。

3.2 蓝藻门的标准荧光光谱

上述研究结果表明,藻种种类、生长期以及生长环境都是藻类荧光光谱稳定性的影响因素,制约了荧光测量方法的准确性。

图5虚线包含的区域表示4种蓝藻144个三维荧光光谱的激发谱包络线光谱的变异区间,上、下虚线分别代表包络线的极大和极小值;柱形表示发射波长处的标准偏差。图5(a)~(c)分别表示藻种种类、生长期以及生长环境引起的光谱不稳定性,图5(d)表示综合条件叠加引起的蓝藻门荧光光谱的不稳定性。为了定量表征不同条件对光谱不稳定性的影响,

引入光谱标准偏差作为权重来衡量生长环境的影响。光谱标准偏差是指浓度归一化光谱强度在各对应波长点的标准偏差。以浓度归一化光谱作为标准光谱矩阵,以标准偏差作为权重系数矩阵,用表达式 $\bar{X} =$

$$\sum_{k=1}^l \left[\frac{\sum_{j=1}^m (\sum_{i=1}^m p_i \times x_i / \sum_{i=1}^m p_i) \times p_j / \sum_{j=1}^m p_j \right] \times p_l / \sum_{k=1}^l p_l$$

得到蓝藻门加权光谱。其中: p_i 、 p_j 、 p_l 分别为生长环境、生长期、藻种种类对应条件下的光谱权重; x_i 为浓度归一化荧光光谱。图5(a)~(c)中实线部分代表各对应条件下的加权平均光谱包络线,图5(d)中实线代表以加权平均方法得到蓝藻门加权荧光光谱包络线。加权平均光谱方法既考虑了不同种类、不同生长期的藻种光合色素组成和荧光效率差异,又兼顾了环境条件变化和仪器测量波动导致的光谱不稳定性。

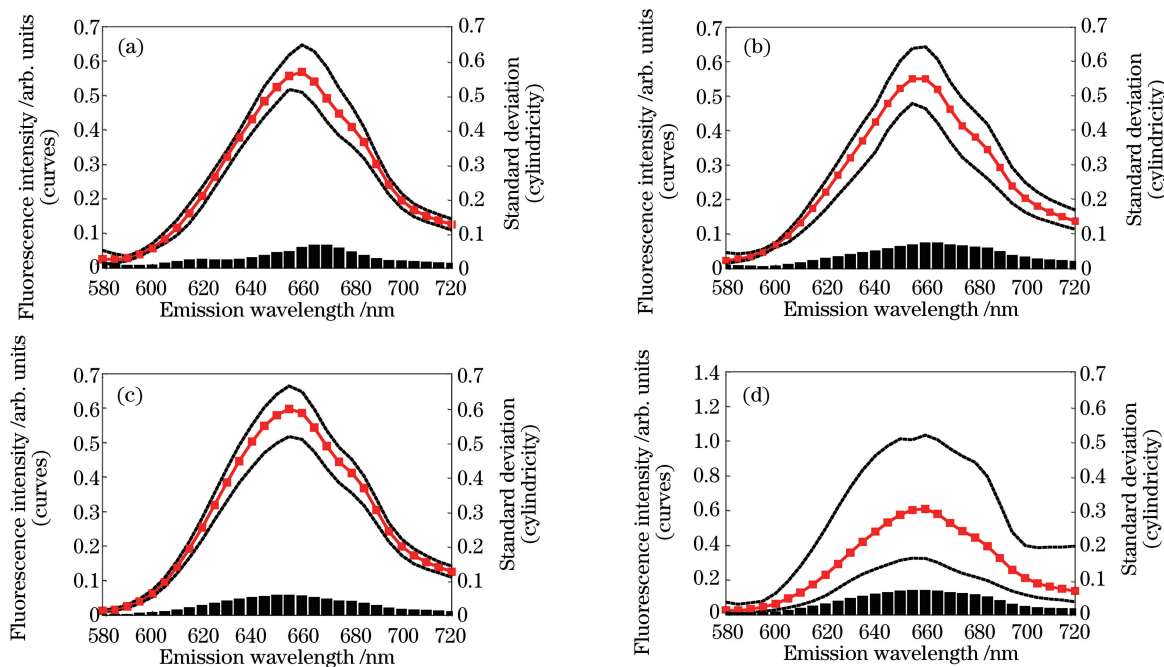


图5 不同因素引起的蓝藻门荧光光谱的不稳定性。(a)藻种种类;(b)生长期;(c)平行样品;(d)综合条件
Fig. 5 Instability of fluorescence spectra of Cynophyta caused by different factors. (a) Species; (b) growing period; (c) parallel samples; (d) comprehensive condition

3.3 对比分析

为了衡量加权平均法构建蓝藻门加权荧光光谱 (weight组) 的普适性与准确性,以4种蓝藻在生长期早期(第7天)、中期(第14天)、晚期(第21天)的归一化光谱作为对比光谱,以48个蓝藻样品(4种蓝藻、6个生长期、2组平行样品)构成待测样品集(Aaf:1#~12#, Ama:13#~24#, Amp:25#~36#, Aol:37#~48#),以各光谱对样品集的测量结果与标准浓度之间的相对误差表征测量结果的准确性。

图6所示为不同条件下的归一化光谱与加权光谱组对待测样品集的回归分析。可以发现:其他归一化光谱对样品集的测量结果的相对误差为0%~104.2%,加权荧光光谱对样品集测试结果的相对误差为0.1%~30.4%,平均相对误差为12.8%;归一化光谱对待测样品集的测量误差大于加权平均法测量误差的次数为403,占总测量次数的69.9%,这表明2/3以上的加权法的测量结果优于其他归一化光谱的测量结果;除加权平均法外,生长中期归一化光

谱的测量误差最小,生长末期归一化光谱的测量误差最大,尤其是采用生长末期归一化光谱测试生长早期样品时,相对误差大多在 60%~80%之间。采用 Amp 第 21 天的归一化荧光光谱测量第 4 天的 Aaf 样品时,测量误差达到最大值 104.2%,此时加

权法的测量误差为 0.1%。以上结果表明,加权平均光谱方法能降低实验结果对藻种种类、生长期、生长环境的依赖性,显著提高荧光法测量藻类叶绿素 a 浓度的准确性与稳定性,能更准确反映实际水体中藻类叶绿素 a 的浓度。

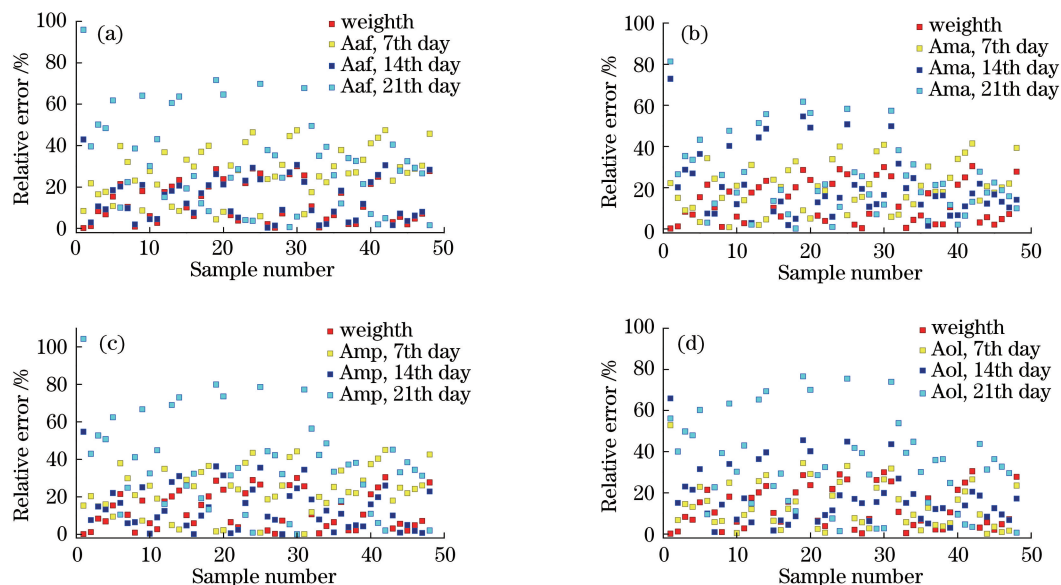


图 6 不同参考光谱对样品集的测量结果。(a) Aaf;(b) Ama;(c) Amp;(d) Aol

Fig. 6 Measurement results of sample sets with different reference spectra. (a) Aaf; (b) Ama; (c) Amp; (d) Aol

4 结 论

利用三维荧光光谱技术测量了蓝藻门 4 种类 6 个生长期 48 个蓝藻样品的活体荧光光谱;研究了不同藻种、生长期和生长环境下蓝藻细胞色素组成和色素荧光效率的差异,证明了藻类细胞色素组成与光合系统色素荧光效率具有藻种依赖性,且与藻类生长期密切相关;定量分析了不同条件对藻类活体荧光光谱不稳定性的影响,获得了不同条件下的光谱不稳定性权重谱。在此基础上,构建了基于加权平均方法的蓝藻门活体藻类加权荧光光谱;比较了加权荧光光谱与不同条件下归一化荧光光谱对样品集的测量结果。结果表明,加权平均光谱方法能够降低荧光法对藻种种类、生长期和生长环境的依赖性,提高蓝藻门叶绿素浓度平均测量准确性。

参 考 文 献

- [1] Hilton J, Rigg E, Jaworski G. Algal identification using *in vivo* fluorescence spectra [J]. Journal of Plankton Research, 1989, 11(1): 65-74.
- [2] Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga [J]. Journal of Cell Biology, 1973, 58(2): 419-435.

- [3] Proctor C W, Roesler C S. New insights on obtaining phytoplankton concentration and composition from *in situ* multispectral chlorophyll fluorescence [J]. Limnology and Oceanography, 2010, 8(12): 695-708.
- [4] Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, *et al.* Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits [J]. Photosynthesis Research, 2005, 83(3): 343-361.
- [5] Su R G, Hu X P, Zhang C S, *et al.* Discrimination of red tide algae by fluorescence spectra and principle component analysis [J]. Environmental Science, 2007, 28(7): 1529-1533.
苏荣国, 胡序朋, 张传松, 等. 荧光光谱结合主成分分析对赤潮藻的识别测定 [J]. 环境科学, 2007, 28(7): 1529-1533.
- [6] Wang Z G, Liu W Q, Liu J G, *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] Lawrenz E, Richardson T L. How does the species used for calibration affect chlorophyll a measurements by *in situ* fluorometry? [J]. *Estuaries and Coasts*, 2011, 34(4): 872-883.
- [8] Loftus M E, Seliger H H. Some limitations of the *in vivo* fluorescence technique [J]. *Chesapeake Science*, 1975, 16(2): 79-92.
- [9] Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, *et al.* Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits [J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 83(3): 343-361.
- [10] Qin Z S, Yin G F, Zhao N J, *et al.* Photosynthesis parameters measurement technology based on fast phase and relaxation fluorescence induced by optical pulses [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2017, 46(9): 0930003.
覃志松, 殷高方, 赵南京, 等. 基于光脉冲诱导快相与弛豫荧光的光合作用参数测量技术 [J]. *光子学报*, 2017, 46(9): 0930003.
- [11] Shi C Y, Gao X H, Yin G F, *et al.* Design of phytoplankton photosynthetic parameter measurement system based on variable pulse induced fluorescence [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(7): 072301.
石朝毅, 高先和, 殷高方, 等. 基于可变光脉冲诱导荧光的浮游植物光合作用参数测量系统设计 [J]. *激光与光电子学进展*, 2016, 53(7): 072301.
- [12] Zhang X L, Yin G F, Zhao N J, *et al.* Research on fluorescence spectral characteristics of phycocyanin under different habitat conditions [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, 37(4): 1145-1151.
张小玲, 殷高方, 赵南京, 等. 不同生境条件下藻蓝蛋白活体荧光光谱特性研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(4): 1145-1151.
- [13] National Environmental Protection Bureau, *Monitoring analysis methods for water and wastewater* [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
国家环境保护总局, *水和废水监测分析方法* [M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] McQuaid N, Zamyadi A, Prévost M, *et al.* Use of *in vivo* phycocyanin fluorescence to monitor potential microcystin-producing cyanobacterial biovolume in a drinking water source [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(2): 455-463.