

# 基于 TPLIF 技术的光合荧光参数快速准确测量的 激发光强自适应方法

王翔<sup>1,2</sup>, 殷高方<sup>1\*</sup>, 赵南京<sup>1</sup>, 甘婷婷<sup>1</sup>, 覃志松<sup>1,3</sup>, 陈敏<sup>1,2</sup>, 华卉<sup>1,2</sup>,  
董鸣<sup>1,2</sup>, 丁志超<sup>1,2</sup>, 亓培龙<sup>1,2</sup>, 王璐<sup>1,2</sup>, 孟德硕<sup>1</sup>, 刘建国<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

<sup>3</sup>桂林电子科技大学计算机与信息安全学院, 广西 桂林 541004

**摘要** 首先采用藻类荧光产率模型, 以荧光饱和参数  $E_s$  作为饱和激发光强的判断标准, 提出了一种激发光强自适应方法, 以准确获取不同藻类的光合荧光参数。结果表明, 7 种藻经自适应调整后, 可快速而稳定地获得饱和激发光强, 调整结果的相对标准偏差均小于 2.5%。然后利用激发光强自适应的可变光脉冲诱导荧光 (TPLIF) 技术测量了 7 种藻的有效光吸收截面  $\sigma_{\text{PSII}}$ , 并分析了不同门类藻的  $\sigma_{\text{PSII}}$  差异。最后采用 TPLIF 技术测量了不同生长时期的小球藻样品, 记录了其荧光参数  $F_v/F_m$  值和变化趋势, 并将其与光合活性分析仪 Fast-Ocean 的测量结果进行对比, 结果发现两者测得的  $F_v/F_m$  值保持一致, 相关系数为 0.9939。本研究为不同生长时期 (生长状态差异明显)、不同种类藻类光合荧光参数的准确测量提供了有效的饱和激发手段。

**关键词** 生物光学; 可变光脉冲诱导荧光技术; 藻类; 光合参数; 激发光强自适应

中图分类号 X832

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202040.2412001

## Adaptive Method of Excitation Light Intensity Based on TPLIF Technology for Fast and Accurate Measurement of Photosynthetic Fluorescence Parameters

Wang Xiang<sup>1,2</sup>, Ying Gaofang<sup>1\*</sup>, Zhao Nanjing<sup>1</sup>, Gan Tingting<sup>1</sup>, Qin Zhisong<sup>1,3</sup>,  
Chen Min<sup>1,2</sup>, Hua Hui<sup>1,2</sup>, Dong Ming<sup>1,2</sup>, Ding Zhichao<sup>1,2</sup>, Qi Peilong<sup>1,2</sup>,  
Wang Lu<sup>1,2</sup>, Meng Deshuo<sup>1</sup>, Liu Jianguo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Environment Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics,  
Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

<sup>2</sup>University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

<sup>3</sup>School of Computer and Information Security, Guilin University of Electronic Technology,  
Guilin, Guangxi 541004, China

**Abstract** Based on the model of algae fluorescence yield and with the fluorescence saturation parameter  $E_s$  as the judgment standard of saturated excitation light intensity, we proposed a self-adaptive method of excitation light intensity to accurately acquire the photosynthetic fluorescence parameters of different species of algae. The results show that with the self-adaptive method, the saturated excitation light intensity could be quickly and stably obtained in the seven species of algae, and the relative standard deviations (RSDs) of the adjustment results were all smaller than 2.5%. Furthermore, the effective light absorption cross-sections  $\sigma_{\text{PSII}}$  of the seven species of algae were measured by the tunable pulse laser induced fluorescence (TPLIF) technique based on the self-adaptive method, and

收稿日期: 2020-07-31; 修回日期: 2020-08-26; 录用日期: 2020-09-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFC1400604)、青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金 (QNL2016ORP0312)、国家自然科学基金 (61875207, 61805254)、安徽省杰出青年科学基金 (1908085J23)、中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目 (Y93H3g1251)

\* E-mail: gfyin@aiofm.ac.cn

the difference in the  $\sigma_{\text{PSII}}$  of different species of algae was analyzed. Finally, we measured the *Chlorella* samples at different growth stages through the TPLIF technique and recorded their fluorescence parameter  $F_v/F_m$  and relevant variation trend. It turns out that the recorded results are consistent with the measurement results of the photosynthetic activity analyzer Fast-Ocean, with the correlation coefficient being 0.9939. In conclusion, this study provides an effective way of saturation excitation for accurately measuring the photosynthetic fluorescence parameters of different species of algae at different growth stages (with obvious differences in growth status).

**Key words** biotechnology; tunable pulse laser induced fluorescence technique; algae; photosynthetic parameters; self-adaptive method of excitation light intensity

**OCIS codes** 260.2510; 260.5130; 260.2160; 350.4600

## 1 引 言

叶绿素荧光的重要应用之一是估算水体藻类的初级生产力<sup>[1-2]</sup>。水体藻类的初级生产力通常通过  $\text{O}_2$  的释放速率或  $\text{CO}_2$  的固定速率来估算,如 $^{18}\text{O}$ 和 $^{14}\text{C}$ 同位素示踪法。示踪法需要对样品进行长时间培育,导致时空分辨率较低,并且测量成本较高。此外,在采用示踪法进行测量时,潜在放射性危害不容忽视<sup>[3-4]</sup>。主动叶绿素荧光法的引入使得水体初级生产力的测量更加快速、便捷,而且该方法的无侵入性测试过程更符合原位检测的需求<sup>[5-6]</sup>。具有代表性的叶绿素荧光方法包括脉冲振幅调制技术(PAM)<sup>[7]</sup>、高速重复脉冲技术(FRR)<sup>[8-9]</sup>和可变光脉冲诱导荧光(TPLIF)技术<sup>[10-11]</sup>等。在利用上述叶绿素荧光技术进行藻类光合作用参数测量时,激发光强的选择至关重要。根据光合电子传递和叶绿素荧光产率理论,藻类捕光色素吸收的光能绝大部分用于光化学反应(P),其余的能量以热能(H)和荧光(F)的形式耗散掉。上述三者属于竞争关系。利用TPLIF技术进行藻类荧光测量时,通常会在光合作用单次周转期间(初级电子受体  $\text{Q}_a$  再氧化周期内)发射一束饱和激发光,使初级电子受体  $\text{Q}_a$  完全被氧化,无法再接收来自水裂解产生的电子,导致电子传递链被完全阻塞,从而使得光系统 II(PSII)反应中心全关闭,叶绿素吸收的过量能量只能以荧光、热能等形式发散。此时可获得最大荧光产率  $F_m$ ,而且此时对应的激发光强是合适的。若激发光强不足,PSII反应中心无法全关闭,叶绿素荧光产率将无法达到最大值<sup>[12]</sup>;若激发光强过大,则会导致PSII反应中心类胡萝卜素三联体的形成和  $\text{P680}^+$  积累等过程,进而引起非光化学荧光猝灭<sup>[13]</sup>。由于不同种类的藻对光能的利用波段和效率不一致,因此,固定强度的激发光无法使各藻种在单次周转期间均达到荧光饱和,从而影响了光合参数的准确反演。目前,关于主动叶绿素荧光法中激发光强自适应调整的研究还鲜有报道,鉴于此,本文提出了一种

激发光强自适应方法。该方法结合了光合作用电子传递模型<sup>[14-15]</sup>,可以实现基于TPLIF技术的不同藻种激发光强的快速准确调控,为获得可靠的光合荧光参数和水体初级生产力的估值提供了参考。

## 2 实验与方法

### 2.1 实验材料

本文选择7种淡水藻种作为研究对象,其中包括三种绿藻、三种蓝藻和一种硅藻。三种绿藻分别为普通小球藻(FACHB-8, *Chlorella vulgaris*)、蛋白核小球藻(FACHB-5, *Chlorella pyrenoidosa*)和斜生栅藻(FACHB-12, *Scenedesmus obliquus*),三种蓝藻分别为鱼腥藻(FACHB-82, *Anabaena* sp.)、铜绿微囊藻(FACHB-315, *Microcystis aeruginosa*)和平裂藻(FACHB-1937, *Merismopedia*),硅藻为小环藻(FACHB-1652, *Cyclotella* sp.)。以上藻种均来自中国科学院淡水藻种库。培养条件如下:设定连续光照强度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光照和黑暗时间比为12:12,培养物置于  $22^\circ\text{C}$  的恒温箱内。

### 2.2 实验装置

基于TPLIF技术的藻类光合荧光参数测量系统主要由控制单元、激发单元、荧光探测单元、样品室以及相关的光学机械结构组成。激发单元包含三个波段的激光二极管(LD)光源,三个LD光源的发射波段分别位于450 nm(蓝光)、520 nm(绿光)和624 nm(橙红光),以满足大多数藻类(包括大型红藻和蓝细菌等)的激发需求。TPLIF测量系统的结构如图1。

TPLIF测量系统的样品室是一个内壁光滑的石英管。在进行藻类荧光探测前,先用移液枪吸取5 mL的待测藻样(藻样的质量浓度约为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),将藻样注入到样品室;此外,还需对待测藻样进行30 min的暗适应处理,使藻类PSII反应中心叶绿素处于开放状态(以接收光能裂解水分子产生的电子并将电子传递给光系统I)。暗适

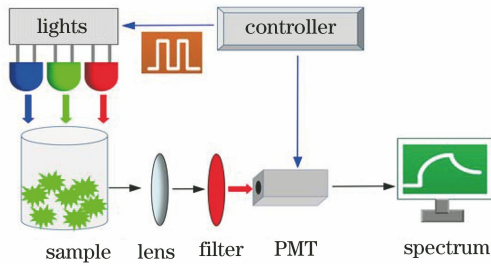


图 1 TPLIF 测量系统结构图

Fig. 1 Structure of TPLIF measurement system

应完成后,打开可调整的脉冲激发光,待测藻样吸收光能释放荧光。荧光通过聚焦透镜和 680 nm 带通滤光片后被光电倍增管(PMT)接收并转化为电信号,电信号经过一系列积分放大电路后得到荧光动力学曲线,然后采用移动窗口斜率判定算法和线性最小二乘算法对荧光动力学曲线进行拟合和运算,就可以获得藻类光合荧光参数。

### 2.3 激发光强自适应方法

根据藻类光合作用电子传递和荧光产率模型,在暗适应状态下, $t$ 时刻的荧光产率  $f(t)$ 可表示为

$$f(t) = F_0 + (F_m - F_0)C(t) = F_0 + F_v C(t), \quad (1)$$

式中: $F_0$ 为暗适应条件下的最小荧光产率(初始荧光产率); $F_m$ 为暗适应下的最大荧光产率; $F_v$ 为最大可变荧光产率; $C(t)$  ( $0 \leq C(t) \leq 1$ )为关闭的PSII反应中心的比例,其由原初光化学反应速率决定,而原初光化学反应速率与激发光强度  $E$ 、PSII光能吸收截面  $\sigma_{\text{PSII}}$  以及  $\text{Qa}^-$ 再氧化时间的乘积成正比。在单周转激发过程中, $\text{Qa}^-$ 的再氧化过程与吸收的能量相比较弱,如果忽略这一部分,则可变荧光产率  $f(t)$ 可以用一个简单的瞬态生理模型表示为累积一次命中的泊松函数<sup>[16]</sup>,即

$$f(t) = F_0 + (F_m - F_0) \left[ 1 - \exp\left(-\sigma_{\text{PSII}} \int_0^t E dt\right) \right], \quad (2)$$

式中: $1 - \exp\left(-\sigma_{\text{PSII}} \int_0^t E dt\right)$ 表示PSII反应中心随时间的关闭比例。

通过(2)式可以得到相应的荧光动力学参数( $F_0$ 、 $F_m$ 、 $\sigma_{\text{PSII}}$ )。荧光饱和参数  $E_s$  定义为单次测量期间总的激发光强  $E$  和功能吸收截面  $\sigma_{\text{PSII}}$  的乘积,则荧光产率模型  $f(t)$ 中关闭的PSII反应中心  $C(t)$  随时间的变化关系可表示为

$$C(t) = 1 - \exp(E_s t). \quad (3)$$

根据(3)式可以得到  $E_s$  值与反应中心叶绿素关闭比例的关系,如图 2 所示。

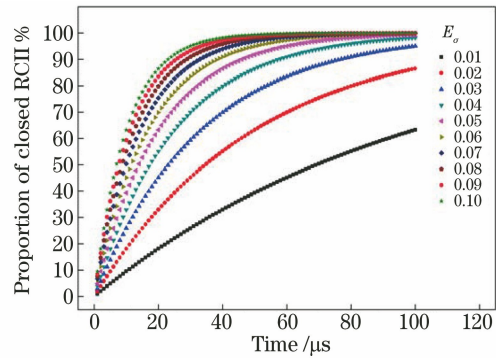


图 2  $E_s$  与反应中心叶绿素关闭比例的关系

Fig. 2 Relationship between  $E_s$  and proportion of closed RCII

在图 2 中,当  $E_s$  的值为 0.01 时(激发光强较弱),PSII 反应中心关闭比例仅为 62%,此时的藻样品未能饱和激发,所得荧光参数是不准确的。随着  $E_s$  增加,PSII 反应中心关闭比例逐渐增大,当  $E_s$  的值为 0.05 时,PSII 反应中心关闭比例超过 99%;随着  $E_s$  的值继续增大,PSII 反应中心关闭所需的时间可从既定的 100  $\mu\text{s}$  缩减至原先的一半,而过量的激发光强则会导致光抑制,引起非光化学猝灭。在本文的激发光强自适应调整研究中,以 99% 的 PSII 反应中心关闭比例来表征 PSII 反应中心在单次周转期间内全关闭,从而可以得出对应的  $E_s$  值约为 0.046。这是一个既定的荧光产率曲线饱和的参考值,也是光强自动调整的一个节点。如果  $E_s$  值小于 0.046,说明 PSII 反应中心全关闭比例不足,即激发光强不够;若  $E_s$  值大于 0.046,说明光强过量。

图 3 为 TPLIF 系统激发光强自适应算法流程。首先给定一个任意的光强  $E_0$ ,进行初步荧光探测,获得初始荧光曲线和荧光饱和参数  $E_s$ 。由于初始光强具有不确定性,因此拟合得到的  $E_s$  与理论适宜值 0.046 会有一定差距。为了实现激发光强的快速自适应,按  $\epsilon = 0.002$  设定置信区间  $[0.044, 0.048]$  对初始光强参数  $E_s$  进行判断。如果  $E_s$  在区间内,则本次激发光强被认定为合适的光强,否则以合适光强的中位值 0.046 进行修正,修正模型为  $E = 0.046 E_0 / E_s$ 。将修正后光强值作为输入进行下一次藻类荧光探测,直到荧光参数  $E_s$  在合适的区间内,且连续三次测量得到的荧光参数  $E_s$  的相对标准偏差  $\text{RSD}(E_s) \leq 5\%$ 。至此,激发光强修正完成。

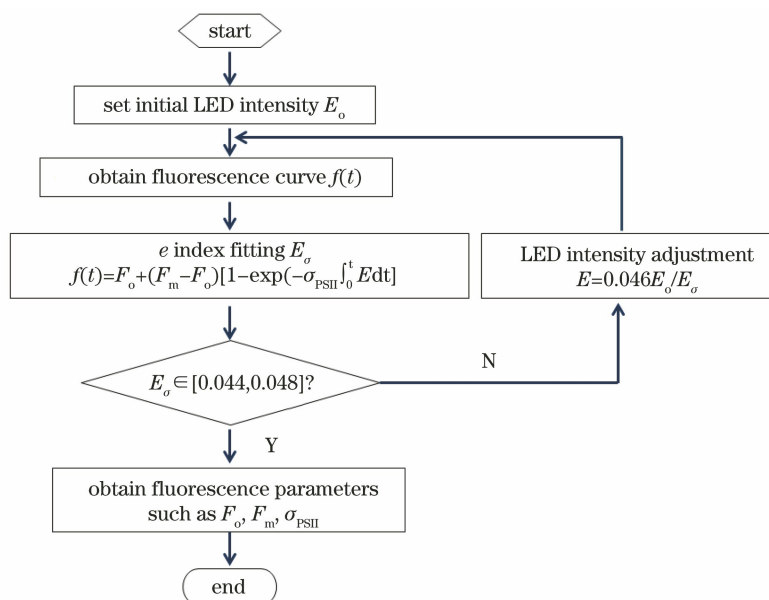


图 3 激发光强自适应算法流程图

Fig. 3 Flowchart of excitation light intensity adaptive algorithm

### 3 分析与讨论

#### 3.1 不同藻的激发自适应结果

利用 TPLIF 测量系统对三种淡水绿藻(蛋白核小球藻、普通小球藻和斜生栅藻)、三种蓝藻(铜绿微囊藻、鱼腥藻和平裂藻)和硅藻(小环藻)进行荧光激发。绿藻和硅藻采用 450 nm LD 光源激发,蓝藻采

用 624 nm LD 光源激发,初始光照强度设定为弱光照 ( 6000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ) 和强光照 ( 32000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 针对绿藻; 22000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 针对蓝藻)。

采用本文提出的激发光强自适应方法,经过 4 次调整,得到了 7 种淡水藻的适宜的激发光强,如表 1 所示。

表 1 7 种藻的激发光强自适应结果

Table 1 Adaptive results of excitation light intensity of seven species of algae

Alga	Initial intensity	First adjustment	Second adjustment	Third adjustment	Fourth adjustment	Average intensity	RSD / %
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	6000	19071	19083	19002	19748	19226	1.80
<i>Chlorella vulgaris</i>	6000	20875	19758	20693	20192	20380	2.50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	32000	21187	21776	21546	22237	21687	2.00
<i>Microcystis aeruginosa</i>	6000	14012	14098	14563	13974	14162	1.90
<i>Anabaena</i> sp.	6000	13142	13187	13422	12880	13158	1.70
<i>Merismopedia</i>	22000	14931	14755	15536	15000	15056	2.20
<i>Cyclotella</i> sp.	6000	27565	27454	28173	26970	27541	1.80

表 1 的激发光强自适应结果显示:在初始低光强和初始高光强条件下,7 种藻在 4 次连续自适应调整后均可获得稳定的激发光强,且调整后光强的 RSD 均小于 2.5%;此外,不同种类藻饱和激发所需的光能差异较为明显,特别是具有不同捕光色素的绿藻和蓝藻。本研究表明,利用激发光强自适应方法可以快速获得合适的激发光强,实现不同种类藻的准确激发。

#### 3.2 不同藻种的有效光吸收截面分析

$\sigma_{\text{PSII}}$  定义为植物的有效光吸收截面,它表征的

是植物对光能的利用效率。在利用主动荧光法进行水体初级生产力的测量时, $\sigma_{\text{PSII}}$  的准确测量有利于提高水体藻类初级生产力的估算结果<sup>[17]</sup>。

$\sigma_{\text{PSII}}$  通常与藻种以及辐射波段有关。真核藻类中的主捕光色素为叶绿素 a 和叶绿素 b,以及其他辅助色素,这类藻种对蓝色波段光的利用吸收明显高于其他波段,但对绿色波段光几乎无吸收。原核类浮游生物(如蓝细菌)的捕光色素以藻胆素为主,包括藻蓝蛋白、藻红蛋白、别藻蓝蛋白等,这类生物主要吸收光合辐射中长波段的橙红光,而对低波段



光的吸收率很低。藻类捕光色素的差异使得  $\sigma_{\text{PSII}}$  随辐射波段的变化而改变。

选择三种淡水绿藻(蛋白核小球藻、普通小球藻和斜生栅藻)、三种蓝藻(铜绿微囊藻、鱼腥藻和平裂

藻)以及硅藻(小环藻)进行荧光探测,对绿藻和硅藻进行荧光探测时选择 450 nm LD 光源,对蓝藻进行荧光探测时选择 624 nm LD 光源。经自适应调整后的激发光强和所得  $\sigma_{\text{PSII}}$  如图 4 所示。

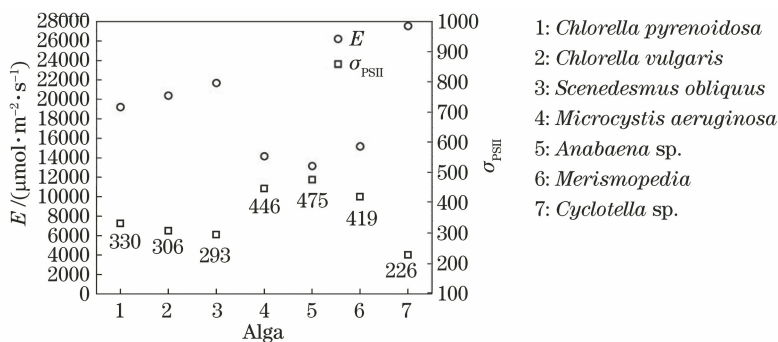


图 4 不同藻类的荧光参数  $\sigma_{\text{PSII}}$

Fig. 4 Fluorescence parameter  $\sigma_{\text{PSII}}$  of different algae

图 4 结果显示:不同藻种达到荧光饱和和所需的激发光强不一致,且  $\sigma_{\text{PSII}}$  的值也存在明显差异,绿藻和蓝藻的  $\sigma_{\text{PSII}}$  差异较大。这与它们的捕光色素组成及结构差异有关,绿藻的捕光色素以叶绿素为主,而蓝藻的主要捕光色素是藻胆蛋白。样品的  $\sigma_{\text{PSII}}$  值大说明该样品对相应激发波段光的吸收利用效率高,达到饱和和激发所需的光能量少;反之,说明该样品对相应激发波段光的吸收利用效率低,样品达到饱和和激发需要更多的光能量。绿藻中的色素分子吸收蓝光导致电子跃迁至第二激发态,然后通过放热回到第一激发态的最低能级,此过程有部分能量损失,且对光合作用无效;而蓝藻中的色素分子吸收红光后导致电子跃迁至第一激发态,光合色素是以第一激发态参与光合作用的,所以在能量利用率上蓝光没有红光高<sup>[18]</sup>。

表 1 中蓝藻对 624 nm 波段光能的利用效率明显高于绿藻对 450 nm 波段光能的利用效率。这与光合色素吸收光能理论及能量转移理论是一致的。在同类型的藻种中,如蛋白核小球藻、普通小球藻、斜生栅藻的  $\sigma_{\text{PSII}}$  同样存在差异,这是由各藻种的叶绿素和辅助色素的组成比例差异引起的,是藻类进化过程中对水体、光照等因素长期适应的结果。利用激发光强自适应方法可以快速获得植物的荧光参数  $\sigma_{\text{PSII}}$ ,为评价植物生理状态以及水体中藻类群落信息提供依据。

### 3.3 荧光参数 $F_v/F_m$ 的准确获取

在众多藻类的光合荧光参数中, $F_v/F_m$  是一个重要的参数,它被定义为 potential photochemical efficiency of open RCII(开放式 RCII 的潜在光化学

效率),其值等于  $(F_m - F_o)/F_m$ 。 $F_v/F_m$  通常被用来表征水体中藻类的活性,是水体环境胁迫程度<sup>[19]</sup>以及藻类初级生产力反演的重要参数<sup>[20]</sup>,因此准确测量  $F_v/F_m$  的值非常重要。

藻类的生长通常包括指数期、稳定期和衰退期,水体中的营养物质含量是决定藻类生长状态的重要因素。通常,藻类的生理活性会随生长周期的更替发生变化,而这些变化可以通过荧光参数  $F_v/F_m$  体现。本文选择小球藻作为研究对象,分别利用基于激发光强自适应方法的 TPLIF 技术和 Fast-Ocean 仪器对 7 个不同生长时期的小球藻样品进行荧光探测。Fast-Ocean 仪器是基于 FRRf 技术的水体藻类荧光参数测量仪器。很多海洋和区域水体的初级生产力测量以及光合荧光参数测量分析都是以该技术为基础开展的。在对比测试过程中,每个样品分别进行 10 次测量,记录两者荧光参数  $F_v/F_m$  的结果,如图 5 所示。

图 5 表明,不同生长时期的小球藻样品的荧光参数  $F_v/F_m$  是动态变化的,这与其自身的生理状态以及培养基的营养程度等息息相关。利用基于激发光强自适应方法的 TPLIF 技术和 Fast-Ocean 仪器测定的小球藻的荧光参数  $F_v/F_m$  的变化趋势一致,两者的相关系数达 0.9939。通过拟合方程  $y = 1.03043x - 0.0131$  可知,两者斜率接近 1,截距接近 0,这说明两者测定的  $F_v/F_m$  值趋于一致。

综上所述,基于激发光强自适应方法的 TPLIF 技术可以准确获得藻类荧光参数  $F_v/F_m$ ,可为水体中藻类活性、水体环境胁迫程度以及水体初级生产力的评价提供参考。

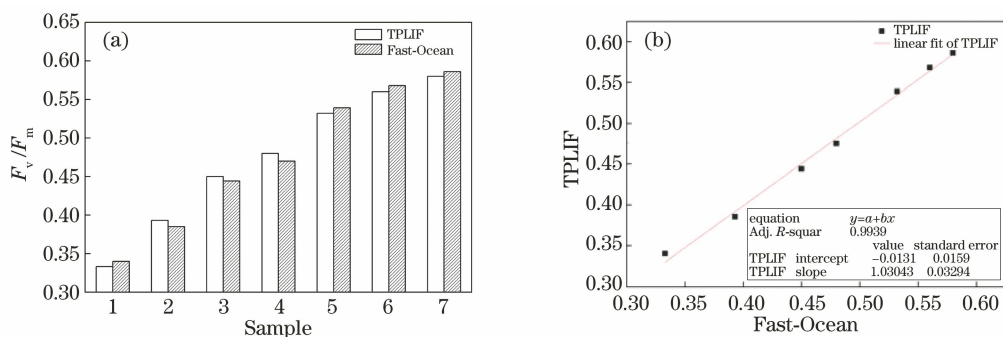


图 5 TPLIF 技术和 Fast-Ocean 测得的  $F_v/F_m$ 。(a)  $F_v/F_m$  的测量值;(b)  $F_v/F_m$  的对应关系

Fig. 5 Measured  $F_v/F_m$  by TPLIF technology and Fast-Ocean. (a) Measured  $F_v/F_m$ ;

(b) corresponding relationship of  $F_v/F_m$

## 4 结 论

利用 TPLIF 测量系统可以快速获得藻类荧光参数。  $E_s$  与激发光强的线性度良好,同时  $E_s$  又是藻类 PSII 反应中心关闭比例的标签,因此提出了一种以  $E_s$  作为参考标准的激发光强自适应方法。研究表明,经自适应算法调整后,不同种类的藻均可快速获得适合的激发光强。此外,本文测量并分析了不同种类藻的有效光吸收截面  $\sigma_{PSII}$ 。结果显示,  $\sigma_{PSII}$  具明显的藻种差异。最后,本文测量了不同生长时期的普通小球藻的光化学效率参数  $F_v/F_m$ , 测量结果与 Fast-Ocean 仪器测定结果一致。

本文提出的这种快速有效的激发光强自适应方法,为水体藻类的精确激发以及光合作用参数的准确获得提供了一种有效手段。

## 参 考 文 献

- [1] Robinson C, Suggett D J, Cherukuru N, et al. Performance of fast repetition rate fluorometry based estimates of primary productivity in coastal waters [J]. Journal of Marine Systems, 2014, 139: 299-310.
- [2] Schuback N, Hoppe C J M, Tremblay J, et al. Primary productivity and the coupling of photosynthetic electron transport and carbon fixation in the Arctic Ocean [J]. Limnology and Oceanography, 2017, 62(3): 898-921.
- [3] Pei S F, Laws E A. Does the  $^{14}C$  method estimate net photosynthesis? Implications from batch and continuous culture studies of marine phytoplankton [J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2013, 82: 1-9.
- [4] Kolber Z, Falkowski P G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ* [J]. Limnology and Oceanography, 1993, 38(8): 1646-1665.
- [5] Gilbert M, Domin A, Becker A, et al. Estimation of primary productivity by chlorophyll a *in vivo* fluorescence in freshwater phytoplankton [J]. Photosynthetica, 2000, 38(1): 111-126.
- [6] Kheireddine M, Ouhssain M, Claustre H, et al. Assessing pigment-based phytoplankton community distributions in the Red Sea [J]. Frontiers in Marine Science, 2017, 4: 191.
- [7] Brooks M D, Niyogi K K. Use of a pulse-amplitude modulated chlorophyll fluorometer to study the efficiency of photosynthesis in *Arabidopsis* plants [J]. Chloroplast Research in Arabidopsis, 2011, 775: 299-310.
- [8] Fujiki T, Takagi H, Kimoto K, et al. Assessment of algal photosynthesis in planktic foraminifers by fast repetition rate fluorometry [J]. Journal of Plankton Research, 2014, 36(6): 1403-1407.
- [9] Suggett D J, Moore C M, Hickman A E, et al. Interpretation of fast repetition rate (FRR) fluorescence: signatures of phytoplankton community structure versus physiological state [J]. Marine Ecology Progress Series, 2009, 376: 1-19.
- [10] Shi C Y, Zhang Y J, Yin G F, et al. Determining the optimal excitation condition of high-frequency flash method for algae photosynthetic parameters measurement [J]. Acta Photonica Sinica, 2015, 44(2): 0217002.
- [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] Osmond B, Chow W S, Pogson B J, et al. Probing functional and optical cross-sections of PSII in leaves during state transitions using fast repetition rate light induced fluorescence transients [J]. *Functional Plant Biology*, 2019, 46(6): 567-583.
- [13] Sonneveld A, Rademaker H, Duysens L N M. Transfer and trapping of excitation energy in photosystem II as studied by chlorophyll a2 fluorescence quenching by dinitrobenzene and carotenoid triplet. The matrix model [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1980, 593(2): 272-289.
- [14] Chen S, Yin G F, Zhao N J, et al. Analysis of phytoplankton concentration of functional reaction centers based on fluorescence dynamics parameters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(6): 0630004.  
陈双, 殷高方, 赵南京, 等. 基于荧光动力学参数的浮游植物有效光合反应中心浓度分析 [J]. *光学学报*, 2018, 38(6): 0630004.
- [15] Boisvert S, Joly D, Carpentier R. Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics [J]. *The FEBS Journal*, 2006, 273(20): 4770-4777.
- [16] Laney S R. *In situ* measurement of variable fluorescence transients [J]. *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*, 2010: 19-30.
- [17] Suggestt D J, Oxborough K, Baker N R, et al. Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll a fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton [J]. *European Journal of Phycology*, 2003, 38(4): 371-384.
- [18] Han B P, Han Z G, Fu X. *Algal photosynthesis: mechanisms and models* [M]. Beijing: Science Press, 2003.  
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.
- [19] Chen M, Yin G F, Zhao N J, et al. Response of photosynthetic activity parameters of algae under phenol stress [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(12): 1217002.  
陈敏, 殷高方, 赵南京, 等. 苯酚胁迫下藻类光合活性参数的响应规律 [J]. *光学学报*, 2019, 39(12): 1217002.
- [20] Chen S, Yin G F, Zhao N J, et al. Measurement of primary productivity of phytoplankton based on photosynthetic electron transport rate [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(11): 1126001.  
陈双, 殷高方, 赵南京, 等. 基于光合电子传递速率的浮游植物初级生产力测量 [J]. *光学学报*, 2018, 38(11): 1126001.