

## 基于离散三维活体荧光光谱法的湖泊水体叶绿素 a 浓度原位测量\*

袁 静<sup>1</sup>, 戴 源<sup>1</sup>, 沈 薇<sup>1</sup>, 孙小平<sup>1</sup>, 王志刚<sup>2</sup>, 覃志松<sup>3</sup>, 殷高方<sup>3</sup>

(1: 江苏省扬州市环境监测中心站, 扬州 225007)

(2: 扬州大学环境科学与工程学院, 扬州 225127)

(3: 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, 合肥 230031)

**摘 要:** 荧光光谱分析技术具有灵敏度高、检测快速等优点, 三维荧光光谱提供的指纹荧光信息比普通荧光光谱更丰富, 选择性更好, 在多组分分离上更具优势. 离散三维活体荧光光谱法通过提取水体蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻和隐藻 5 个门类藻类荧光光谱的指纹特征, 分类测量藻类叶绿素 a 浓度, 经过加和得到总的水体叶绿素 a 浓度. 将基于该方法研制的三维荧光光谱水体藻类原位测量仪用于太湖水体叶绿素 a 浓度的测定, 并与 YSI 多参数水质检测仪、BBE 藻类现场分析仪、分光光度法等测定结果对比, 结果表明: 该方法与分光光度法间无显著性差异, 与分光光度法、BBE 法间的相关性好, 相关系数达 0.96 以上, 精密度、准确率优于基于普通荧光法的原位测量仪, 是一种快速有效的原位测量方法.

**关键词:** 离散三维荧光光谱法; 活体; 叶绿素 a; 原位测量

### *In-situ* measurement of chlorophyll-a concentration in the lake based on discrete three-dimensional fluorescent spectroscopy *in vivo*

YUAN Jing<sup>1</sup>, DAI Yuan<sup>1</sup>, SHEN Wei<sup>1</sup>, SUN Xiaoping<sup>1</sup>, WANG Zhigang<sup>2</sup>, QIN Zhisong<sup>3</sup> & YIN Gaofang<sup>3</sup>

(1: Yangzhou Environmental Monitoring Center Station of Jiangsu Province, Yangzhou 225007, P.R.China)

(2: College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, P.R.China)

(3: Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, P.R.China)

**Abstract:** Fluorescence spectroscopy had the advantages of high sensitivity and fast detecting. The three-dimensional(3D) fluorescence spectrometry was more informative, better selectivity, more advantage than the general fluorescence spectroscopy on the multicomponent separation. The determination method of chlorophyll-a in water based on the discrete three-dimensional fluorescence spectrometry *in vivo* was studied. It extracted different fluorescence fingerprint properties of five divisions of algae (Cyanophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta, Dinophyta and Cryptophyta), measured chlorophyll-a concentration of every algae and got the total chlorophyll-a concentration by plus. The three-dimensional fluorescence algae *in-situ* analyzer (AFA) was manufactured based on it. The chlorophyll-a concentration in Lake Taihu was measured by AFA. The measured values were compared with YSI, BBE and the spectrophotometry. It showed no significant difference between AFA and the spectrophotometry. There were good correlation among AFA, spectrophotometry and BBE. The correlation coefficient was above of 0.96. AFA was better precision and accuracy than the general fluorescence spectroscopy. It was a fast and effective *in-situ* method.

**Keywords:** Discrete three-dimensional fluorescent spectroscopy; *in vivo*; chlorophyll-a; *in-situ* measurement

叶绿素 a 是水体浮游植物光合作用的重要载体, 也是地表水水质生物监测的重要指标. 通过测定水体叶绿素 a 浓度, 可掌握水体的初级生产力情况. 叶绿素 a 常用来评价水体的富营养化程度. 水体叶绿素 a 浓度的测定方法主要有分光光度法、高效液相色谱法 (HPLC)、荧光光度法等. 分光光度法作为公认的常规分析法, 仪器设备简单、灵敏度高、应用广泛, 但操作繁琐、分析耗时长<sup>[1]</sup>. HPLC 法适用于色素粗提物中叶绿素

\* 国家自然科学基金项目 (31400317, 21507018) 和扬州市科技计划项目 (YZ2014218) 联合资助. 2017-10-09 收稿; 2017-12-04 收修改稿. 袁静 (1971~), 女, 高级工程师; E-mail: bqjyj@sohu.com.

单体及其衍生物和其他色素的分离测定<sup>[2-3]</sup>,但仪器昂贵、分析耗时长、专业技术性强,难以作为常规的监测方法.此外,分光光度法和 HPLC 法均需要对样品进行复杂的前处理,难以实现现场快速、实时测量.荧光光谱法具有灵敏度高、分析简便、样品无需预处理、无污染、无破坏性等优点,易于实现原位测量,因此被广泛应用于浮游植物光合色素组成和群落分布测量<sup>[4-8]</sup>.其中活体荧光直接测定法是目前原位测量水体中叶绿素 a 浓度的首选方法,该方法通过测定一定波长激发下叶绿素 a 的活体荧光强度进行定性定量分析.常用的商品化仪器主要有基于单点荧光光谱法的 YSI 多参数水质检测仪<sup>[9-11]</sup>、Hydrolab DS5 水质多功能监测仪<sup>[12]</sup>、基于激发荧光光谱法的 PHYTO-PAM 叶绿素荧光仪<sup>[13]</sup>和 BBE 藻类现场分析仪<sup>[14-15]</sup>等.

三维荧光分析法能够获得激发波长与发射波长或其他变量同时变化的荧光强度信息,通过一次扫描便有可能监测体系中的全部组分,较单点荧光光谱、激发荧光光谱等普通荧光光谱法提取的指纹信息更丰富,有利于更细地区分目标物<sup>[4]</sup>.中国科学院安徽光学精密机械研究所依据不同门类藻类荧光光谱的差异性,提取蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻和隐藻等 5 个门类藻类荧光光谱的指纹特征,提出基于色素特征荧光光谱的藻类叶绿素 a 分类测量方法,采用 10 波段 LED 激发光源、6 波段荧光探测通道,结合调制解调式微弱荧光信号检测技术,配套活塞式自清洁型的水体自动进样模块开发了基于离散三维活体荧光光谱法的水体藻类原位测量仪,用于水体叶绿素 a 的测定及 5 个门类藻的分类.本文首次将该仪器用于太湖水体叶绿素 a 的原位测量,对其准确性、适用性进行验证,并将测定结果与 YSI 多参数水质检测仪、BBE 藻类现场分析仪和分光光度法测定结果进行对比,以期客观评价几种湖泊水体藻类的原位测量方法,以便在实际应用中扬长避短.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

三维荧光光谱水体藻类原位测量仪(AFA)(中国科学院安徽光学精密机械研究所);YSI6600V2(多参数水质检测仪)(美国 YSI);BBE 藻类现场分析仪(德国 BBE);T6(新锐)分光光度计(北京普析通用);90%丙酮;石英滤膜(美国 Whatman).

### 1.2 样品来源

蓝藻是太湖水体浮游植物中的优势门类,由于污染程度差异,太湖湖体不同区域藻类密度及叶绿素 a 浓度差异较大,有利于得到不同浓度梯度的样品.本实验中的样品来自太湖不同区域的例行监测点位及太湖东岸渔洋山的江苏省环境监测中心太湖野外观测站.其中,2015 年 11 月 2—5 日和 2016 年 5 月 24—25 日在太湖例行监测点位(图 1)先后采集了 39 组样品;2015 年 12 月 25 日—2016 年 5 月 23 日在太湖东岸渔洋山的江苏省环境监测中心太湖野外观测站采集了 38 组样品.

### 1.3 实验方法

采集样品的同时分别用 AFA 和 YSI 现场测定叶绿素 a 浓度,同时采集两份 500 ml 样品,其中 1 份立即加入 1%的碳酸镁试液固定,用作实验室分光光度法测定叶绿素 a 浓度,另 1 份带回实验室用 BBE 藻类现场分析仪测定叶绿素 a 浓度.用 AFA 和 BBE 测定叶绿素 a 的同时,对蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻、隐藻进行分类测量.分析比较 3 种现场分析仪与分光光度法测定的叶绿素 a 浓度,并比较现场分析仪对不同藻类的分类测量情况.

1.3.1 现场分析仪测定方法及测定范围 样品混合均匀后分别使用 AFA 和 BBE 一键进样测定,YSI 置于样品桶中直接测定. AFA 测定范围为 0.1~200  $\mu\text{g/L}$ ,测定时间为 3 min;BBE 测定范围为 0.1~200  $\mu\text{g/L}$ ,测定时间为 10 min;YSI 测定范围为 0.1~400  $\mu\text{g/L}$ ,测定时间为 1 min.此 3 种方法以下统称为非标法.

1.3.2 分光光度法 目前我国环境监测领域水质叶绿素 a 浓度的测定尚没有标准方法,主要依据《湖泊富营养化调查规范》<sup>[16]</sup>及文献[1]中的乙酸纤维滤膜抽滤—丙酮研磨—分光光度法进行测定.但乙酸纤维滤膜溶于丙酮会影响样品溶液吸光度的测定<sup>[17]</sup>,而且研磨萃取易造成叶绿素的降解和损失<sup>[18-19]</sup>.为使测定值具有良好的精密度,参考文献[17-19]将样品前处理方法加以改进:样品经石英滤膜抽滤,滤膜在冰箱内低温干燥 6~8 h 后,剪碎于 6 ml 90%丙酮暗处密闭浸提 16 h,离心后上清液转移至 10 ml 试管,滤渣用 2~3 ml 90%丙酮清洗、离心后滤液并入上清液,重复 1~2 次,所有上清液定容至 10 ml 混匀,经 0.45  $\mu\text{m}$  聚四氟乙烯针式滤头过滤后,依据文献[1]中方法测定.以下称该方法为标准法.

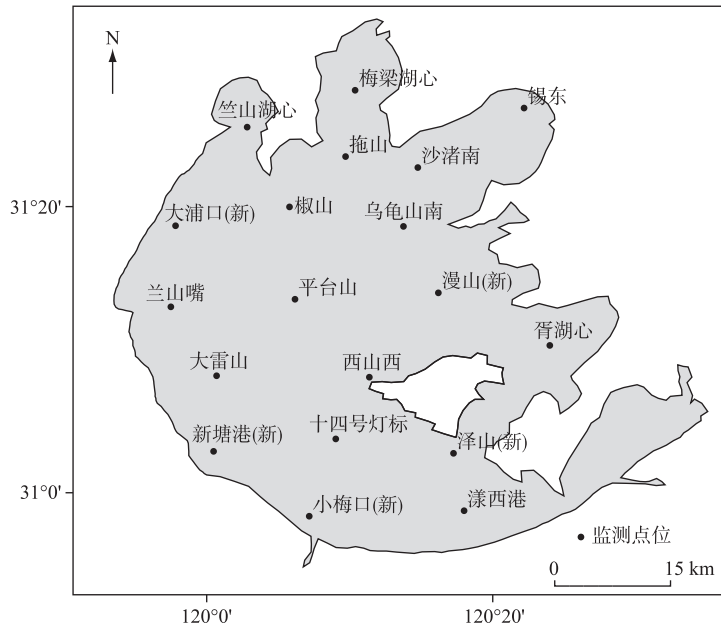


图 1 太湖例行监测点位

Fig.1 The routine monitoring sites of Lake Taihu

## 2 结果与讨论

### 2.1 叶绿素 a 浓度测定结果分析

实验共获得 68 组叶绿素 a 浓度有效数据(表 1), 统计结果表明: 3 种非标法中 AFA 测定值均值与标准法最接近, 但较标准法偏高 10%; YSI 测定值多数偏低, 均值较标准法偏低 48%; BBE 测定值中有 96.9% 的测定值较标准法偏高, 均值较标准法偏高 107%. 将 3 种非标法测得的所有叶绿素 a 浓度分别与标准法测定值作置信度为 95% 的双侧  $t$  检验, 检验结果表明: AFA 法与标准法之间无显著性差异, BBE 法、YSI 法与标准法之间有显著性差异.

表 1 叶绿素 a 浓度测定结果统计\*

Tab.1 Statistics of chlorophyll-a concentration measurement

统计项目	AFA	YSI	BBE	标准法
样本总数	68	68	68	68
最小值/( $\mu\text{g/L}$ )	3.07	1.3	10.9	3.56
最大值/( $\mu\text{g/L}$ )	233.0	39.9	251.0	285.0
平均值/( $\mu\text{g/L}$ )	25.6	11.98	48.0	23.2
低浓度样本数	40	40	40	40
中浓度样本数	15	15	15	15
高浓度样本数	13	13	13	13

\* 低浓度: 叶绿素 a 浓度  $\leq 10 \mu\text{g/L}$ ; 中浓度: 叶绿素 a 浓度在  $10 \sim 30 \mu\text{g/L}$  之间; 高浓度: 叶绿素 a 浓度  $\geq 30 \mu\text{g/L}$ .

为更详细地了解 3 种非标法在不同浓度区间的测定情况, 根据标准法测得的叶绿素 a 浓度将测定值按低 ( $\leq 10 \mu\text{g/L}$ )、中 ( $10 \sim 30 \mu\text{g/L}$ )、高 ( $\geq 30 \mu\text{g/L}$ ) 浓度分组, 3 种非标法分别与标准法的测定结果相对误差的平均偏差(精密性)及与标准法测定值相对误差绝对值  $\leq 30\%$  的样品百分率(准确率)统计结果显示(图

2):(1)低浓度组 3 种非标法定值均较标准法高,其中 BBE 法的测定值最高,YSI 法的测定值波动较大. 精密度最好的是 AFA 法,最差的是 BBE 法;准确率最高的是 YSI 法,为 20%,最低的是 BBE 法,为 6.7%. 将 3 种非标法的低浓度组测定值分别与标准法的测定值作置信度为 95% 的双侧  $t$  检验,结果表明:当叶绿素 a 浓度低于  $10 \mu\text{g/L}$  时,3 种非标法与标准法测定值之间均有显著性差异, $t$  值由小至大的顺序是 YSI 法、AFA 法、BBE 法. (2)中浓度组中,精密度及准确率最好的是 AFA 法,准确率为 73.7%,其次是 BBE 法,准确率为 66.7%. YSI 法有 82.3% 的测定值较标准法低,准确率为 43.8%. AFA 法和 BBE 法测定值较标准法普遍偏高,BBE 法的测定值普遍较 AFA 法高. 将中浓度组 3 种非标法的测定值分别与标准法的测定值作置信度为 95% 的双侧  $t$  检验,结果表明:当叶绿素 a 浓度在  $10 \sim 30 \mu\text{g/L}$  时,AFA 法与标准法之间无显著性差异,YSI 法、BBE 法与标准法均有显著性差异. (3)在高浓度组中,AFA 法精密度和准确度依然是最好的,其次是 BBE 法,YSI 法最差. AFA 法、BBE 法和 YSI 法准确率分别为 88.9%、50.0% 和 0;BBE 法有 87.5% 的测定值较标准法偏高,YSI 法的所有测定值均偏低. 将高浓度组 3 种非标法的测定值分别与标准法的测定值作置信度为 95% 的双侧  $t$  检验,结果表明:当叶绿素 a 浓度  $\geq 30 \mu\text{g/L}$  时,AFA 法、BBE 法与标准法之间无显著性差异,YSI 法与标准法之间有显著性差异. (4)随着叶绿素 a 浓度的升高,AFA 法的精密度、准确率逐渐提高,YSI 法的精密度、准确率则大幅度下降,尤其是在高浓度时可靠性为 0.

### 2.2 几种测定方法分类测量的结果分析

在测定样品叶绿素 a 浓度的同时,BBE 法和 AFA 法会同时给出蓝藻门、绿藻门、硅藻门、甲藻门和隐藻门的分类叶绿素 a 浓度测量结果,样品标准法的分类测量采用实验室显微镜下人工计数法,测得的结果为细胞单体个数,作为荧光法分类测量的参考. YSI 法给出的是蓝藻叶绿素 a 浓度结果,不能对其他门藻类进行分类测量;BBE 不能对硅藻、甲藻进行分类,给出的是硅、甲藻叶绿素 a 浓度之和. 为了进一步比较 BBE 和 AFA 对 5 大门类藻的分类情况,还分别测量了实验室培养的 5 大门类纯藻溶液. 5 大门类纯藻选择我国淡水水体 5 个常见的浮游植物门类进行纯种培养,即蓝藻门的铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、绿藻门的小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、硅藻门的脆杆藻 (*Fragilaria* sp.)、甲藻门的光甲藻 (*Glenodinium gumnodinium*) 和隐藻门的卵形隐藻 (*Cryptomonas ovata*). 选用的纯藻种均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库. 按照不同藻种接种要求配制培养基,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  $6000 \text{ lx}$ ,固定光暗周期为  $10 \text{ h}/14 \text{ h}$ ,温度为  $25^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$ ,培养周期为 15 d,测量前通过人工镜检鉴定其纯度. 部分样品测量结果见表 2.

由表 2 可见,AFA 和 BBE 对太湖样品的浮游植物分类结果趋势与人工计数法趋势大体相同,能够识别出水体中的优势藻种;YSI 不能对浮游植物进行分类,测得的叶绿素 a 均归为蓝藻叶绿素 a 浓度. 对纯种藻类的测定表明:BBE 能够正确地区分蓝藻、绿藻,不能将硅甲藻分开,但会将部分硅甲藻误判为绿藻,将部分隐藻误判为蓝藻、绿藻、硅甲藻,蓝藻、绿藻的荧光效率远高于硅甲藻、隐藻,尤其是绿藻的荧光效率较蓝藻高 10 倍以上,这可能也是 BBE 测定值偏高的原因之一;AFA 对 5 大门类藻的分类优于 BBE.

### 2.3 几种测定方法间叶绿素 a 浓度的相关性分析

几种方法测得的叶绿素 a 浓度相关性分析结果表明 AFA、BBE、标准法测定值间的线性回归相关性较好,相关系数  $r$  均在 0.96 以上,其中,AFA 与 BBE 间的相关性最好, $r$  达到 0.98,表明叶绿素 a 的仪器法测定

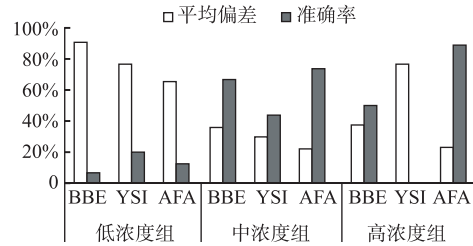


图 2 不同浓度组 3 种非标法的精密度与准确率 (平均偏差:非标法定值与标准法测定值相对误差的平均偏差;准确率:非标法与标准法测定值相对误差绝对值  $\leq 30\%$  的样品百分率)

Fig.2 Precision and accuracy statistics of different concentration groups among three non-standard methods (the mean deviation: the mean deviation of relative error among the non-standard methods and the standard method measured values; the precision rate: sample percentage of absolute relative error  $\leq 30\%$  among the non-standard methods and the standard method measured values)

表2 几种测定方法的分类测量结果\*

Tab.2 Result of classified measurement

样品类别	样品编号	测定方法	总叶绿素 a/ ( $\mu\text{g/L}$ )	蓝藻/ ( $\mu\text{g/L}$ )	绿藻/ ( $\mu\text{g/L}$ )	硅藻/ ( $\mu\text{g/L}$ )	甲藻/ ( $\mu\text{g/L}$ )	隐藻/ ( $\mu\text{g/L}$ )
太湖样品	3	BBE	16.11	4.84	6.39	4.89	0	0
		YSI	10.6	10.6	—	—	—	—
		AFA	12.71	5.24	1.23	6.24	0	0
	9	标准法	8.43	$1.4 \times 10^6$	$9.3 \times 10^4$	$6.4 \times 10^4$	0	0
		BBE	13.41	4.26	5.70	3.45	0	0
		YSI	12.3	12.3	—	—	—	—
	41	AFA	10.22	3.23	2.33	4.66	0	0
		标准法	6.57	$9.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$6.4 \times 10^4$	0	0
		BBE	18.56	10.50	4.40	2.53	1.12	1.12
	44	YSI	9.6	9.6	—	—	—	—
		AFA	11.92	8.06	1.32	1.04	0	1.49
		标准法	14.62	$1.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	0	0
	60	BBE	20.69	7.31	6.61	4.42	2.35	2.35
		YSI	9.6	9.6	—	—	—	—
		AFA	14.76	8.94	1.01	4.81	0	0
	63	标准法	17.71	$9.8 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	0	$8.8 \times 10^3$
		BBE	74.04	57.99	7.19	2.97	5.90	5.90
		YSI	14.8	14.8	—	—	—	—
	64	AFA	41.59	31.95	3.21	6.43	0	0
		标准法	49.18	$4.2 \times 10^7$	$2.7 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	0	$1.9 \times 10^4$
		BBE	107.59	104.26	0	0	3.33	3.33
	纯绿藻	YSI	15.6	15.6	—	—	—	—
		AFA	69.37	63.08	0	6.29	0	0
		标准法	76	$2.0 \times 10^8$	$6.4 \times 10^4$	0	0	$3.2 \times 10^4$
纯蓝藻	BBE	131.66	130.59	0	0	1.07	1.07	
	YSI	39	39	—	—	—	—	
	AFA	89.62	78.80	0	10.82	0	0	
纯硅藻	标准法	96.84	$1.6 \times 10^8$	$3.2 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	0	0	
	BBE	121.88	0	118.60	2.81	0	0	
	AFA	112.44	0	112.44	0	0	0	
纯甲藻	标准法	110.12	0	110.12	0	0	0	
	BBE	73.83	72.88	0	0	0.95	0.95	
	AFA	53.99	53.99	0	0	0	0	
纯隐藻	标准法	56.4	56.4	0	0	0	0	
	BBE	33.36	0	6.44	26.92	0	0	
	AFA	35.40	0	0	35.41	0	0	
纯硅藻+纯隐藻	标准法	36.6	0	0	36.6	0	0	
	BBE	71.33	0	20	51.33	0	0	
	AFA	49.86	0	0	0	49.86	0	
纯绿藻+纯蓝藻	标准法	44.90	0	0	0	44.90	0	
	BBE	91.49	4.84	0.68	9.42	76.55	76.55	
	AFA	77.17	0	0	0	0	77.17	
纯绿藻+纯硅藻	标准法	84.20	0	0	0	0	84.20	
	BBE	31.79	2.11	3.78	10.52	15.38	15.38	
	AFA	49.85	0	0	10.34	0	39.50	
纯绿藻+纯甲藻	标准法	54.15	0	0	12.03	0	42.12	
	YSI	39	39	—	—	—	—	

\* 标准法对太湖样品藻类的分类测量结果单位为 cells/L,对纯藻的分类测量结果单位为  $\mu\text{g/L}$ ;“—”表示无测量值。

结果稳定性优于标准法;AFA 法与标准法间的相关性优于 BBE 法与标准法间的相关性;YSI 法与标准法测定值间相关性较差, $r$  仅为 0.36(图 3).

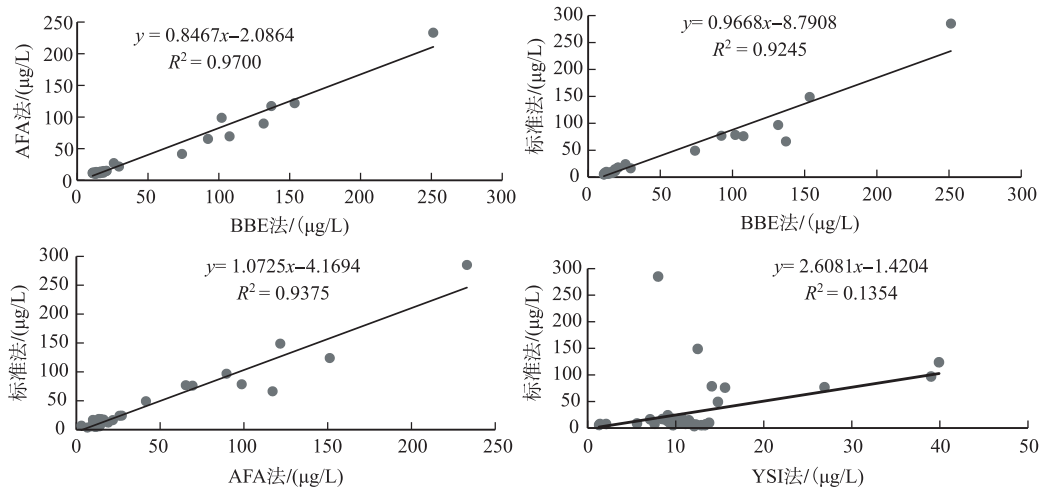


图 3 几种方法测定值间的线性回归

Fig.3 Correlation of measured values among several methods

## 2.4 讨论

**2.4.1 YSI 的适用性** YSI 多参数测定仪测定的叶绿素 a 浓度总体偏低,与标准法具有显著性差异. 对于叶绿素 a 浓度  $\leq 10 \mu\text{g/L}$  的样品,测定值具有参考意义;YSI 不适用于测定叶绿素 a 浓度高于  $10 \mu\text{g/L}$  的样品,主要是由其结构和原理造成的. YSI 的设计原理是基于藻蓝蛋白特征荧光的单点荧光光谱法,采用峰波长为  $470 \text{ nm}$  左右的蓝光作为激发光源,照射完整细胞中的叶绿素 a 发射出光谱在  $650 \sim 700 \text{ nm}$  范围内的荧光. 但是,不同藻类种群在不同波长的激发光下产生的荧光强度不同. 在日常的水质监测中,YSI 的叶绿素 a 探头在通常情况下使用罗丹明 WT 标准溶液进行统一校正,在使用同一激发光测定水体叶绿素 a 浓度的情况下,其他藻种与蓝藻被激发的荧光强度存在较大的差异性,在使用统一校正标准的情况下,叶绿素 a 浓度测定结果必然不准确,这也是造成 YSI 与标准法测定叶绿素 a 浓度结果差异大的主要原因<sup>[10-11]</sup>.

**2.4.2 BBE 藻类在线测定仪** 与文献[14]和文献[15]BBE 藻类在线测定仪测定的叶绿素 a 浓度较标准法偏低不同的是,本文中 BBE 测定的叶绿素 a 浓度总体偏高,可能是本文中的标准法与 BBE 定量方法不同有关. 本文中 BBE 法与标准法具有显著性差异,尤其是测定低浓度样品时差异明显,但与标准法的相关性较好,说明 BBE 法与标准法之间存在方法间的误差. 测定叶绿素 a 浓度  $\geq 30 \mu\text{g/L}$  的样品时,BBE 测定结果与标准法之间无显著性差异,测定结果可部分采用. BBE 采用的是激发波长为变量的二维荧光技术,根据浮游植物活体荧光光谱特征分为蓝藻组、绿藻组、硅甲藻组和隐藻组. 仪器采用  $470, 525, 570, 590, 610$  和  $375 \text{ nm}$  6 个波长作为激发光, $680 \text{ nm}$  作为固定发射波长. 因  $375 \text{ nm}$  激发波长的光只能被普通有机物吸收,藻类对该波长无反应,因而被用来测定有机物干扰,并对藻类检测结果进行补偿. 根据不同类别藻的特征荧光光谱,此外 5 个波长的激发光被用来区分不同类别的藻,得到样品的激发荧光光谱及不同类别藻的荧光强度,再根据已知的纯种培养体标准激发荧光光谱及相应浓度的荧光强度,利用多元线性回归的方法求出样品中各组成浮游植物的浓度. BBE 能够按照不同门类的藻分类测定叶绿素 a 浓度,其准确性及测量范围较 YSI 大大提高,但由于二维荧光光谱提取的信息量有限,除蓝藻和绿藻外,会将部分硅藻、甲藻和隐藻误判为其他藻类,是导致测量结果误差的一个重要原因.

**2.4.3 三维荧光光谱水体藻类原位测量仪(AFA)** AFA 测量的叶绿素 a 浓度较标准法普遍偏高,但与标准法之间无显著性差异,与标准法、BBE 法之间存在很好的相关性,精密度、准确率优于 YSI 法和 BBE 法;测定低浓度样品时,测定值与标准法有显著性差异,精密度优于 YSI 法和 BBE 法,准确率略低于 YSI 法. AFA 法

能够获得激发波长与发射波长同时变化的荧光强度信息,测量原理是基于光合色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量方法<sup>[20]</sup>,即根据不同浮游植物光合色素组分和含量的差异,选择各色素的特征吸收和荧光发射波长,扫描获得波长不连续的藻类活体三维荧光光谱,称之为“离散三维荧光光谱”,最大程度地保留了浮游植物的色素组成信息;将培养的纯种浮游植物“离散三维荧光光谱”以叶绿素 a 浓度归一化,获得“标准离散三维荧光光谱”,形成光谱数据库;以各浮游植物“标准离散三维荧光光谱”对样品光谱进行去卷积运算,反演得到浮游植物种类及其叶绿素 a 浓度. AFA 法以多波段 LED 阵列作为激发光源,以多波段滤光片组作为接收荧光的波段选择器,根据 5 个门类浮游植物色素特征荧光光谱点激发和发射波段,选择 412、435、455、470、507、535、567、624、635 和 665 nm 等 10 个激发波段,620、654、670、683、692 和 725 nm 等 6 个发射波段,采用无信息变量消除算法(UVE)对三维荧光光谱进行压缩,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 个色素荧光光谱的特征点,组合得到“离散三维荧光光谱”. AFA 法激发波段、发射波段都大大多于 BBE 法,提取的指纹信息较 BBE 法更丰富,更好地消除了不同门类藻类光合色素组成导致的叶绿素 a 荧光量子效率上的巨大差异,对藻类种群的分类更准确,大大提高了活体荧光法测量水体叶绿素 a 浓度的可靠性.

2.4.4 影响活体藻类现场测定仪测量的因素 活体藻类现场测定仪测量叶绿素 a 浓度的原理均是基于活体藻类叶绿素 a 的强荧光光谱特性. 水体的温度、浊度对活体藻类叶绿素 a 的荧光强度均有着显著影响,随着温度的降低荧光量子产率和荧光强度将增大;随着水体浊度增高,散射越强,荧光强度越高<sup>[4,21-22]</sup>. 测量低浓度样品时,环境因素的干扰作用会更明显,YSI 主要用于海水中低浓度叶绿素 a 的测量,其在低浓度测量时的校正方法做得较 BBE 和 AFA 更详细,因而准确度略高. 环境因素对活体藻类现场测定仪测定值的影响及校正可能还需要进一步研究. 水体中藻类的组成差异与含量的不均匀性对结果也有一定的影响. 另外,标准法测定低浓度样品时萃取、转移等损失比例的增大会造成标准法测定值偏低,也是藻类现场测定仪测定低浓度样品普遍偏高的原因之一.

### 3 结论

太湖水体叶绿素 a 浓度测定试验表明:基于离散三维活体荧光光谱法的水体藻类原位测定仪(AFA)测定湖泊叶绿素 a 的性能优于 YSI 多参数水质检测仪和 BBE 藻类现场分析仪,与分光光度法无显著性差异,与分光光度法和 BBE 藻类现场分析仪具有较好的相关性,离散三维活体荧光光谱法在浮游植物叶绿素 a 浓度及分类测量上的准确率和精密度优于普通荧光法,在实时监控湖泊水体藻类生长情况和水华及时预警上可靠性更好.

致谢:江苏省环境监测中心太湖野外观测站和无锡市环境监测中心站协助了野外试验,特此致谢.

### 4 参考文献

- [ 1 ] "Water and wastewater monitoring and analysis method" editorial board of State Environmental Protection Administration of China ed. Monitoring and analysis methods of water and wastewater; fourth edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 670-671. [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: 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 670-671.]
- [ 2 ] Almela L, Fernandez-Lopez JA, Roca MJ. High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. *Journal of Chromatography A*, 2000, **870**: 483-489.
- [ 3 ] Hu J, Liu X, Wang L et al. RP-HPLC determination of photosynthetic pigments. *Marine Sciences*, 2011, **35**(11): 19-28. [胡俊, 柳欣, 王磊等. 应用反相高效液相色谱定性和定量浮游植物光合色素. 海洋科学, 2011, **35**(11): 19-28.]
- [ 4 ] Xu JG, Wang ZB eds. Fluorescence analysis method; 3th Edition. Beijing: Science Press, 2006: 15-16. [许金钩, 王尊本. 荧光分析法: 第3版. 北京: 科学出版社, 2006: 15-16.]
- [ 5 ] Xiang QQ, Tang HQ, Zhu LH et al. Rapid determination of chlorophyll-a in lake water by direct fluorophotometry. *Journal of Wuhan University of Technology*, 2011, **33**(11): 112-115. [相青青, 唐和清, 朱丽华等. 直接荧光分光光度法快速测定水体中叶绿素 a. 武汉理工大学学报, 2011, **33**(11): 112-115.]
- [ 6 ] Chen LF, Zheng F. Application of rapid determination of algal biomass by chlorophyll fluorescence technique. *City and Town Water Supply*, 2007, (6): 51-52. [陈丽芬, 郑锋. 叶绿素荧光技术快速测定水体藻类生物量的应用. 城镇供水, 2007, (6): 51-52.]

- 水, 2007, (6): 51-52.]
- [ 7 ] Chen L, Sun JX. Rapid and simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by fluorophotometry. *Sichuan Environment*, 2013, **32**(3): 20-23. [陈立, 孙静娴. 荧光光度法同时快速测定水体中叶绿素 a 和叶绿素 b. 四川环境, 2013, **32**(3): 20-23.]
- [ 8 ] Cui J, Cui JS. Preparation of chlorophyll fluorescence detector and its performance research. *Hebei Chemical Engineering and Industry*, 2012, **35**(6): 72-75. [崔静, 崔建升. 海水叶绿素荧光测定仪的研制及性能研究. 河北化工, 2012, **35**(6): 72-75.]
- [ 9 ] Ding JQ, Zhang JY. Application of YSI6600 for Cyanobacteria bloom early warning in Taihu Lake. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2011, **23**(1): 67-70. [丁建清, 张军毅. YSI6600 传感器在太湖蓝藻预警工作中的应用. 环境监测管理与技术, 2011, **23**(1): 67-70.]
- [10] Liu Y, Chen YW, Deng JM. Discussion on accuracy and errors for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using YSI (Multi-parameter water analyzer). *J Lake Sci*, 2010, **22**(6): 965-968. DOI:10.18307/2010.0622. [刘苑, 陈宇炜, 邓建明. YSI (多参数水质检测仪)测定叶绿素 a 浓度的准确性及误差探讨. 湖泊科学, 2010, **22**(6): 965-968.]
- [11] Song T, Zhu BC, Yan F. Environmental monitoring and forewarning, 2016, **8**(5): 14-18. [宋挺, 朱冰川, 严飞. YSI6600V2 水质多参数仪现场快速法与实验室分光光度法测定湖泊藻类叶绿素的比较. 环境监控与预警, 2016, **8**(5): 14-18.]
- [12] Li YP, Huang LJ, Yan X. Comparative research on monitoring the content of chlorophyll-a in the water body of Dianchi Lake by hydrolab DS5 multi-parameter instrument and acetone spectrophotometry. *Environmental Science Survey*, 2015, **34**(5): 88-91. [李娅萍, 黄丽娟, 颜翔. Hydrolab DS5 水质多功能监测仪与丙酮分光光度法测定滇池水体中叶绿素 a. 环境科学导刊, 2015, **34**(5): 88-91.]
- [13] Chen Y, Zhao YY, Pan SY. Classifying different kinds of algae and determining their chlorophyll by PHYTO-PAM. *Modern Scientific Instruments*, 2009, **4**: 100-103. [陈元, 赵洋雨, 潘双叶. PHYTO-PAM 对浮游植物中叶绿素的分类测定. 现代科学仪器, 2009, **4**: 100-103.]
- [14] Wang YF, Yang SB, Liu DY. Comparison of different methods for phytoplankton chlorophyll-a concentration measurement: A study case of water in Baiyangdian area. *Journal of China Hydrology*, 2014, **34**(5): 57-60. [王玉芳, 杨士斌, 刘得银. 浮游植物叶绿素 a 含量不同方法测定比较——以白洋淀区域水体为例. 水文, 2014, **34**(5): 57-60.]
- [15] Zhou J, Hu ZJ, Li PP. Comparison between spectrophotometry and bbe-fluoroprobe for measuring chlorophyll a—illustrated by the example of Qiandao Lake. *Journal of Hydroecology*, 2013, **34**(2): 80-84. DOI:10.15928/j.1674-3075.2013.02.011. [周静, 胡忠军, 李培培. 基于叶绿素 a 测定的分光光度法与 bbe 法比较: 以千岛湖为例. 水生生态学杂志, 2013, **34**(2): 80-84.]
- [16] Jin XC, Tu QY eds. Specification for investigation of lake eutrophication; 2th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 1990: 268-270. [金相灿, 屠清英. 湖泊富营养化调查规范: 第 2 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 268-270.]
- [17] Wu MY. Comparisons on detection methods of chlorophyll a. *Journal of Fujian Fisheries*, 2011, **33**(4): 61-63. [吴妹英. 叶绿素 a 测定方法之比较. 福建水产, 2011, **33**(4): 61-63.]
- [18] Han GC, Gu F, Zhang ZC. Discussing about chlorophyll a determination method in fresh water. *Environmental Monitoring in China*, 2005, **21**(1): 55-57. [韩桂春, 谷丰, 张忠臣. 淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨. 中国环境监测, 2005, **21**(1): 55-57.]
- [19] Zhang G, Hu H, Xie F. Discussing about “chlorophyll a determination method” in the determination of productivity. *Environmental Study and Monitoring*, 2006, **19**(1): 20-21. [张幅, 虎华, 谢翡. 对生产力测定中“叶绿素 a 测定”方法的探讨. 环境研究与监测, 2006, **19**(1): 20-21.]
- [20] Yin GF, Zhao NJ, Hu L *et al.* Classified measurement of phytoplankton based on characteristic fluorescence of photosynthetic pigments. *Acta Optica Sinica*, 2014, **34**(9): 312-317. DOI: 10.3788/AOS201434.0930005. [殷高方, 赵南京, 胡丽等. 基于色素特征荧光光谱的浮游植物分类测量方法. 光学学报, 2014, **34**(9): 312-317.]
- [21] Lv PY, Cui JS, Duan LL. Effect of turbidity on fluorescence intensity of chlorophyll-a in water. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2015, **51**(6): 741-744. DOI: 10.11973/lhxy-hx201506002. [吕鹏翼, 崔建升, 段莉丽. 浊度对荧光光谱法测定水体中叶绿素 a 的影响. 理化检验-化学分册, 2015, **51**(6): 741-744.]
- [22] Lv PY, Cui JS. Temperature effect on the determination of in situ fluorescence of chlorophyll-a in water. *Environmental Monitoring in China*, 2015, **31**(2): 130-134. [吕鹏翼, 崔建升. 温度对现场荧光法测定水体中叶绿素 a 的影响. 中国环境监测, 2015, **31**(2): 130-134.]