

DF 活体浮游植物在线监测结果 与叶绿素 a 的关系研究

刘爱玲¹ 李梅² 熊丽黎²

(1.江西省鄱阳湖水文局,江西 星子 332800;2.江西省水文局,江西 南昌 330002)

摘 要: 本文针对鄱阳湖水体中常见的优势藻类,在进行纯培养后利用 DF 活体浮游植物在线监测系统和多参数水质分析仪(YSI6600)测定样品的叶绿素 a 含量。通过分析 6 组荧光值与叶绿素 a 含量之间的关系,建立了单种藻和混合藻中叶绿素 a 含量与荧光值之间的校准公式。在野外监测时,校准公式只需经简单调整,得到的叶绿素 a 含量与同步监测基本一致,表明该方法具有一定的适用性。

关键词: 鄱阳湖;藻类;延迟荧光;浮游植物;在线监测系统;叶绿素 a;校准公式

中图分类号: S946 TV213.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4701(2013)01-0011-06

1 概 述

鄱阳湖是中国最大的淡水湖。近年来,随着湖区周边工业经济水平的不断提高,各种污水流入鄱阳湖,使得水体富营养化越来越严重,藻类生长繁殖加快,影响用水质量。因此,加强水体中藻类含量的监测,对人民群众的用水安全具有保障作用。

衡量水体中浮游植物现存量的方法很多,可以用藻细胞密度、生物量、叶绿素 a,或其他指标表示^[1]。叶绿素 a 存在于所有的浮游植物中,是估算浮游植物生物量的重要指标^[2,3]。叶绿素 a 能吸收光能,在激发光的照射下能产生荧光,荧光的强弱与其含量有着密切的关系。

浮游植物叶绿素 a 的测定方法主要有分光光度法和荧光法^[4]两种,它的测定比用计数法测定藻类的数量要简便和快捷,为目前一种常用测定藻类现存量的办法^[5]。

延迟荧光(Delayed Fluorescence, DF)是植物光合器官在光照停止后的发光现象,是活细胞的专属特性,是光合效率的指示指标,叶绿素在其中起关键作用^[6]。1951 年,科学家研究发现了植物光诱导延迟荧光现

象^[7],其激发光谱取决于受试细胞的色素情况,此特征可以用于区别不同的藻属,并可通过数学计算来评估群落光合中不同色群的贡献率。延迟荧光技术可有效屏蔽再悬浮、死的生物和腐殖质对测量精度的干扰,而其他荧光测量技术无法实现。因此,延迟荧光技术已成为目前水华监测的研究热点。

匈牙利科学家利用延迟荧光技术对浮游生物的辨别与测量能力研制了 DF 活体浮游植物及生态环境在线监测系统。通过研究光合速率、量子效率、延迟荧光强度、叶绿素含量及初级生产量之间的关系,寻找延迟荧光强度与叶绿素含量及初级生产力的关系,并通过浮游植物色素的激发光谱来辨别不同的藻属^[8]。该系统已在匈牙利巴拉顿湖、以色列金纳雷特湖、蒂萨河(匈牙利区域)进行了推广应用,并取得了较好的效果^[9-12],而在国内尚无使用先例。

2011 年,为了填补藻类在线监测的空白,江西省鄱阳湖水文站引进了 DF 活体浮游植物在线监测系统,依托于鄱阳湖蛇山水量水质水生态自动监测站进行了鄱阳湖藻类试验监测研究。本研究立足于 DF 监测数据中的 6 组荧光值,通过分析纯种藻中荧光值与其叶绿素 a 的关系,尝试建立叶绿素 a 与监测荧光值的校准公式,

收稿日期:2013-01-16

基金项目:水利部“948”项目(201109)。

作者简介:刘爱玲(1985-),女,硕士。

以便在野外监测中予以应用。

2 材料与方法

2.1 试验材料

在不同季节,鄱阳湖藻类优势种也各自不同。本研究根据鄱阳湖藻类生长现状,选取具有代表性的藻种开展相关研究。以微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、鱼腥藻(*Anabeana*)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricanda*)、卵圆隐藻(*Oval Cryptophyta*)、小环藻(*Cyclotella*)分别代表蓝藻、绿藻、隐藻和硅藻,该纯种藻均购自中国科学院水生生物研究所。

本研究采用的 DF 活体浮游植物在线监测系统可识别包括蓝藻、绿藻(包括绿藻、裸藻等)、硅藻(包括硅藻、金藻、黄藻等)和隐藻类 4 种藻类。

2.2 试验方法

根据 DF 活体藻类在线监测系统监测所得不同波长荧光值计算出不同藻类所对应的叶绿素 a 值,与 YSI6600 所测的叶绿素 a 值进行比较,并建立校准公式,同时考虑监测过程中的误差,进行参数调整,使校准公式能够更为精准地体现叶绿素 a 状况。

2.2.1 相关性分析

用 EXCEL 分析 DF 活体藻类在线监测系统所检测的 6 种不同波段荧光值与不同藻类所对应的叶绿素 a 含量的相关关系,结果表明两者呈线性相关 $y=ax$ 。

2.2.2 纯种藻叶绿素 a 和荧光值之间的校准公式的建立

将纯种培养的蓝藻(微囊藻、鱼腥藻)、隐藻、硅藻(小环藻)和绿藻(栅藻)配置成不同浓度的标准样品,用 DF 系统进行检测,同时用 YSI6600 测定叶绿素 a 含量。本研究通过分析每个样品中 6 组荧光值与叶绿素 a 值之间的相关关系,应用加权平均建立纯藻荧光值和叶绿素 a 的校准公式($y=ax_1+bx_2\cdots fx_6$)。

2.2.3 混合藻叶绿素 a 和荧光值之间的校准公式的建立

将纯种藻标准样品按一定比例混合,根据各种藻在各个波段下荧光值/叶绿素 a 的值,运用加权平均,计算出各种藻在各个波段下所分配的荧光值。依次将所分配的荧光值代入单种藻的校准公式中,并将计算结果与实际检测值进行对比,找出测定值与计

算值之间的相关关系,将新的 a 值(a')代入公式中得到 $y=a'(ax_1+bx_2\cdots fx_6)$,得到混合藻中荧光值和叶绿素 a 的校准公式。

2.3 校准公式在野外监测中的应用

DF 活体藻类在线监测系统在使用过程中其结果受到泥沙、光照等因素的影响,为了减少监测误差,我们将野外监测结果中的荧光值代入所建立的公式中,计算相应的叶绿素 a,并与实际检测值进行对比,找出计算测定值与计算值之间的相关关系,将新的 a 值(a'')代入公式中得到 $y=a''a'(ax_1+bx_2\cdots fx_6)$,得到野外监测过程中荧光值和叶绿素 a 的校准公式。

3 结果分析

3.1 纯种藻叶绿素 a 及其荧光值的校准公式

图 1 是厂家根据 DF 活体藻类分析仪测定纯种藻的荧光值,以及各个样品的叶绿素 a 值和其他经验值,所作出的不同藻类在不同波段下荧光值/叶绿素 a 的关系,反映了在不同波段下,每种藻中单位叶绿素 a 含量所占的荧光值。

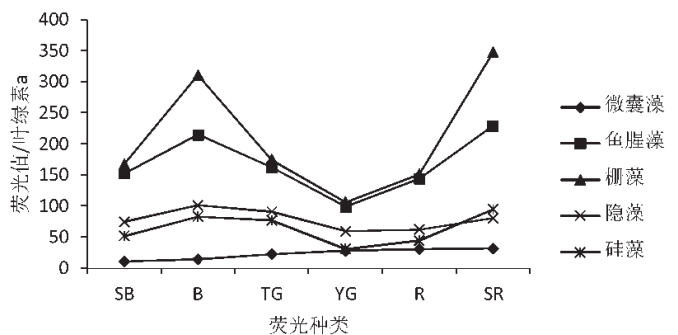


图 1 不同荧光值与纯种藻叶绿素 a 的关系图

由图 1 可知,同一波段下不同的藻类,荧光值对叶绿素 a 的贡献是有很大差异的。

在图 1 的基础上研究不同的藻类在不同波段下荧光值与叶绿素 a 值的相关关系。在研究相关关系时,分别以 y_1, y_2, y_3, y_4, y_5 分别表示微囊藻、鱼腥藻、栅藻、隐藻和硅藻的叶绿素 a 值, x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 和 x_6 分别表示荧光种类 SB、B、TG、YG、R 和 SR 对应的各个波段荧光值。以栅藻为例,根据监测结果(见表 1),计算出不同波段荧光值与叶绿素 a 的关系(见表 2)。从表 2 可以看出

荧光值与叶绿素 a 之间呈线性相关, 相关关系较好。根据计算出的线性关系, 结合图 1 显示的各波段荧光与叶绿素 a 关系, 通过加权平均, 建立栅藻叶绿素 a (y) 与各个波段荧光值 (x) 的线性关系。

采用同样方法可建立其他藻类叶绿素 a 与各个波段荧光值的校准公式, 结果如下:

微囊藻: $y_1=0.00067x_1+0.0005x_2+0.00033x_3+0.00017x_4+$

$0.00017x_5+0.00017x_6$

鱼腥藻: $y_2 =0.0031x_1 +0.71 \times 0.0022x_2 +0.0029x_3 +1.54 \times 0.0047x_4 +0.0032x_5 +0.66 \times 0.0021x_6$

隐藻: $y_4=0.0042x_1 + 0.74 \times 0.0031x_2 +0.82 \times 0.0035x_3 +1.26 \times 0.0052x_4 +1.21 \times 0.005x_5 +0.0038x_6$

硅藻: $y_5=0.0027x_1 +0.62 \times 0.0018x_2 +0.67 \times 0.0020x_3 +1.68 \times 0.0040x_4 +1.17 \times 0.0030x_5 +0.55 \times 0.0016x_6$

表 1 不同浓度栅藻荧光值与叶绿素 a 原始检测值

样品	荧光种类						叶绿素 a /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
	SB	B	TG	YG	R	SR	
原样	14 340	26 294	14 970	9 290	13 030	29 356	328.0
1/3 原样	3 385	6 295	3 465	2 270	3 138	7 519	83.0
1/9 原样	1 623	2 924	1 714	1 117	1 506	3 343	38.0

表 2 不同荧光值与栅藻叶绿素 a 的关系

荧光种类	线性关系	相关系数 R
SB	$y_3=0.023x_1$	0.999 70
B	$y_3=0.0125x_2$	0.999 80
TG	$y_3=0.022x_3$	0.999 50
YG	$y_3=0.0354x_4$	0.999 90
R	$y_3=0.0252x_5$	0.999 85
SR	$y_3=0.0112x_6$	1.000 00
$y_3=0.0038x_1+0.54 \times 0.0021x_2+0.0037x_3+1.57 \times 0.0059x_4+$ $1.10 \times 0.0042x_5+0.48 \times 0.0019x_6$		

2.2 混合藻叶绿素 a 及其荧光值的校准公式

将 DF 测得的混合藻样品荧光结果代入所建公式

中进行计算, 结果见表 3。与仪器测定的叶绿素 a 结果相差较大。所以要确定混合藻中各种藻的叶绿素 a (y) 与荧光值 (x) 的相关关系, 需要进一步校准相关参数。

根据图 1 中各种藻在各个波段下荧光值/叶绿素 a 的值, 计算出每种藻中每份叶绿素所占荧光值占该波段总荧光值的比例, 结果见表 4。

将所计算出的比例代入混合藻的荧光值中, 计算各种藻在各个波段下所分配的荧光值。依次将各种藻在各个波段所分配的荧光值代入单种藻的校准公式中, 重新计算各种藻相应的叶绿素 a 含量, 与实际叶绿素 a 含量进行比较, 结果见表 5。

由表 5 可知, 根据公式计算出来的叶绿素 a 值测定值有一定差异, 需要进一步对其校准参数进行分析。在此, 建立各种藻中叶绿素 a 计算值与实际值相关曲线, 详见图 2 至图 5。微囊藻、鱼腥藻、栅藻、隐藻的线性参数分别为 4.116、0.595 5、1.433 6、0.720 6, 因此, 混合藻

表 3 方程计算的叶绿素 a 与测定值结果对比

样品	叶绿素 a 计算值					叶绿素 a 测定值
	微囊藻	鱼腥藻	栅藻	隐藻	总值	
混合藻原样	14.4	119.9	138.5	172.4	445.2	150.05
1/2 原样	7.7	64.2	74.3	92.5	238.7	79.50
1/4 原样	4.3	36.2	41.8	52.0	134.3	40.05

中微囊藻、鱼腥藻、栅藻和隐藻的叶绿素 a 与荧光值的校准公式分别调整为:

微囊藻: $y_1 = 4.116 \times (0.00067x_1 + 0.0005x_2 + 0.00033x_3 + 0.00017x_4 + 0.00017x_5 + 0.00017x_6)$

鱼腥藻: $y_2 = 0.5955 \times (0.0031x_1 + 0.71 \times 0.0022x_2 + 0.0029x_3 + 1.54 \times 0.0047x_4 + 0.0032x_5 + 0.66 \times 0.0021x_6)$

栅藻: $y_3 = 1.4336 \times (0.0038x_1 + 0.54 \times 0.0021x_2 + 0.0037x_3 + 1.57 \times 0.0059x_4 + 1.10 \times 0.0042x_5 + 0.48 \times 0.0019x_6)$

隐藻: $y_4 = 0.7206 \times (0.0042x_1 + 0.74 \times 0.0031x_2 + 0.82 \times 0.0035x_3 + 1.26 \times 0.0052x_4 + 1.21 \times 0.005x_5 + 0.0038x_6)$

表 4 各种藻占总荧光值的比例 %

藻种类	微囊藻	鱼腥藻	栅藻	隐藻	硅藻
所占比例	4.17	30.85	38.82	14.40	11.76

表 5 叶绿素 a 方程计算值与测定值结果对比

样品	微囊藻		鱼腥藻		栅藻		隐藻	
	计算值	测定值	计算值	测定值	计算值	测定值	计算值	测定值
混合藻原样	0.6	2.53	36.98	22.59	53.78	79.1	24.82	18.35
1/2 原样	0.32	1.27	19.81	11.3	28.82	39.55	13.32	9.18
1/4 原样	0.18	0.63	11.15	5.65	16.23	19.78	7.48	4.59

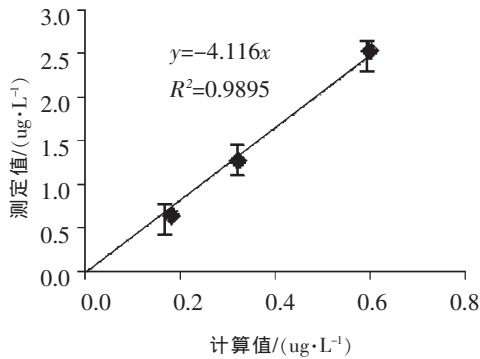


图 2 微囊藻中叶绿素 a 计算值与实际值相关关系

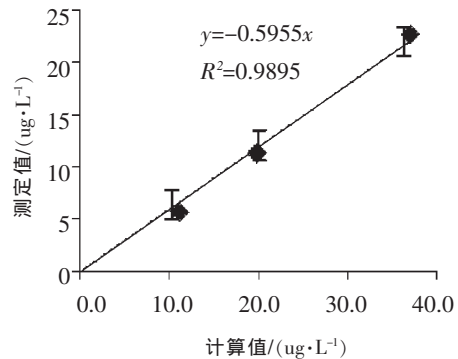


图 3 鱼腥藻中叶绿素 a 计算值与实际值相关关系

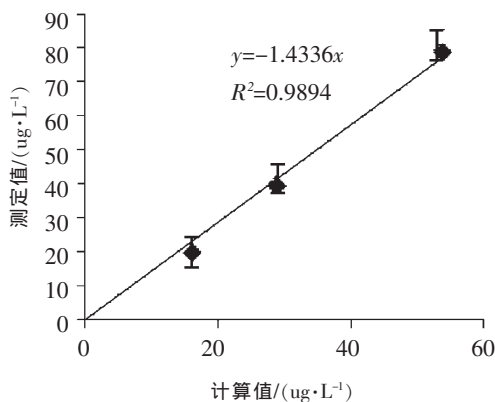


图 4 栅藻中叶绿素 a 计算值与实际值相关关系

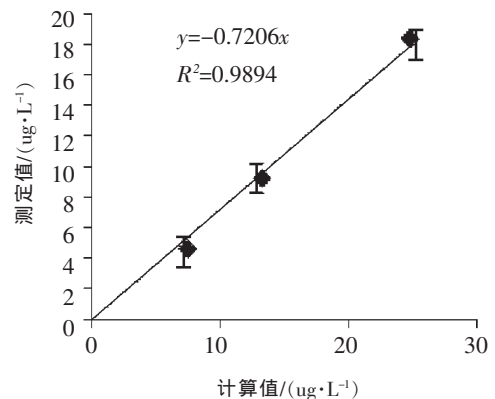


图 5 隐藻中叶绿素 a 计算值与实际值相关关系

4 校准公式在野外监测中的应用

为验证所建立的校准公式在野外监测结果中的应用效果,本次试验选取了 2012 年某时段连续 8 d 的监测结果,分别应用校准公式计算出相应的微囊藻、鱼腥藻、栅藻和隐藻的叶绿素 a 值,并将结果相加,与多参数水质分析仪同步监测的叶绿素 a 值进行比较见表 6。

由于校准公式是建立在纯培养藻类的基础上,没有考虑任何外界环境如泥沙等的影响,而且也没有加上硅藻的叶绿素 a 值。而鄱阳湖水体含沙量高,湖水中的泥沙, TSS 等极大的干扰了 DF 仪对藻类的测定。因此,为了找到这些因素的影响参数,将计算的叶绿素 a 值与多参数水质分析仪测定的叶绿素 a 值建立相关曲线,如图 3。

将图 3 中得到的野外校准参数 0.0386 为系数,加

入校准公式,则野外监测下叶绿素 a 与荧光值的校准公式调整为:

微囊藻: $y_1 = 0.0386 \times 4.116 \times (0.00067x_1 + 0.0005x_2 + 0.00033x_3 + 0.00017x_4 + 0.00017x_5 + 0.00017x_6)$

鱼腥藻: $y_2 = 0.0386 \times 0.5955 \times (0.0031x_1 + 0.71 \times 0.0022x_2 + 0.0029x_3 + 1.54 \times 0.0047x_4 + 0.0032x_5 + 0.66 \times 0.0021x_6)$

栅藻: $y_3 = 0.0386 \times 1.4336 \times (0.0038x_1 + 0.54 \times 0.0021x_2 + 0.0037x_3 + 1.57 \times 0.0059x_4 + 1.10 \times 0.0042x_5 + 0.48 \times 0.0019x_6)$

隐藻: $y_4 = 0.0386 \times 0.7206 \times (0.0042x_1 + 0.74 \times 0.0031x_2 + 0.82 \times 0.0035x_3 + 1.26 \times 0.0052x_4 + 1.21 \times 0.005x_5 + 0.0038x_6)$

利用校准公式计算得到的叶绿素 a 结果见表 6,与多参数水质分析仪测定的叶绿素 a 建立相关曲线,见图 4。由图可见,加入野外校准参数后,计算出的叶绿素 a 值与实际测定值相关曲线斜率已经接近 1, R^2 为 0.7787,表明实测数据和计算数据具有较强的相关性,表明所建立的校准公式经调整后可以适用于野外监测。

表 6 野外监测中方程计算的叶绿素 a 和 YSI6600 监测结果

测次	荧光种类						叶绿素 a 计算值	YSI6600 叶绿素 a	计算值乘以 0.0386
	SB	B	TG	YG	R	SR			
1	844	840	861	807	828	826	59.73	2.73	2.69
2	782	753	751	755	745	780	54.64	2.19	2.11
3	502	477	511	466	490	529	35.23	2.23	2.13
4	443	439	441	465	460	448	32.60	0.93	1.45
5	424	412	407	414	414	418	29.86	1.46	1.58
6	868	1462	1082	780	854	1389	69.12	2.14	3.05
7	986	1647	1140	844	950	1510	75.88	4.22	3.47
8	1086	1838	1268	873	1004	1715	82.27	3.52	3.33

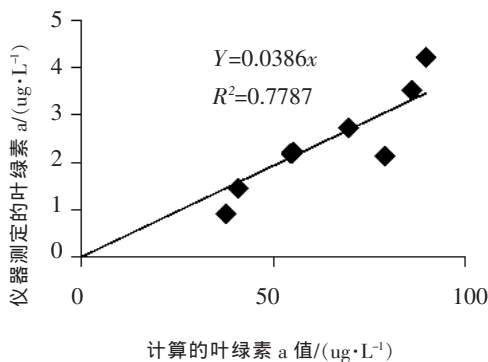


图 3 方程计算的叶绿素 a 值与野外实测值相关关系图

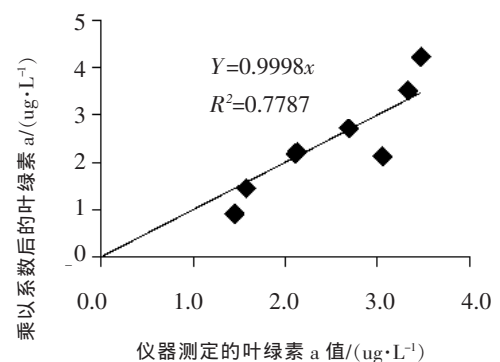


图 4 野外校准公式计算的叶绿素 a 与测定值关系图

4 结论

DF活体藻类在线监测系统所检测的6种不同波段荧光值与不同藻类对应的叶绿素a值呈线性相关。该系统在匈牙利等国家使用过程中取得良好的效果,但是DF活体藻类在线监测系统在使用过程中其结果受到不同藻类荧光遮挡的影响以及泥沙、光照等水文气象因素的影响。在不同的地方荧光强度与叶绿素a之间的计算参数是不一样的。我们通过多次校准获得符合鄱阳湖实际情况的参数,初步实现了DF活体藻类在线监测系统在鄱阳湖叶绿素a自动监测过程中的使用。

系统在使用过程中应尽量调整参数至精准,使用者可通过所在地的实际情况和监测数据按照本文介绍的方法来进行参数调整,得出符合实际的校准方程。该系统具有进一步在其它河流湖泊推广应用的价值。

参考文献:

- [1] 于海燕,周斌,胡尊英,等.生物监测中叶绿素a浓度与藻类密度的关联性研究[J].中国环境监测,2009,25(6):40-43.
 [2] 美国公共卫生协会等(著),宋仁元,等(译).水和废水标准检验法[M].北京:中国建筑工业出版社,1985:901-904.

- [3] 金相灿,屠清瑛.湖泊富营养化调查规范[M].北京:中国环境科学出版社,1990:268-270.
 [4] 韩桂春.淡水中叶绿素a测定方法的探讨[J].中国环境监测,2005(1):55-57.
 [5] 董正臻,董振芳,丁德文.快速测定藻类生物量的方法探讨[J].海洋科学,2004,28(11):1-2,5.
 [6] Istvánovics V., Honti M., Osztóics A., H. M. Shafik, Padisák J., Y. Yacobi and W. Eckert. On-line delayed fluorescence excitation spectroscopy, as a tool for continuous monitoring of phytoplankton dynamics and its application in shallow Lake Balaton (Hungary) [J]. Freshwater Biology, 2005, 50: 1950-1970.
 [7] Strehler B, Arnold W. J. Gen. Physiol., 1951, 34: 809
 [8] 曾礼漳,邢达.植物光诱导延迟荧光与光合作用的内在关联性研究[J].激光生物学报,2006,15(3):236-239.
 [9] Honti M., Istvánovics V. and Osztóics A. Measuring and modelling in situ dynamic photosynthesis of various phytoplankton groups [J]. Verh. Internat. Verein. Limnol. 2005, 29: 194-196.
 [10] Honti M., Istvánovics V. and Osztóics A. Stability and change of phytoplankton communities in a highly dynamic environment the case of large, shallow Lake Balaton (Hungary) [J]. Hydrobiologia, 2007, 581: 225-240.
 [11] Honti M., Istvánovics V. and Kozma Zs. Assessing phytoplankton growth in River Tisza (Hungary) [J]. Verh. Internat. Verein. Limnol, 2008, 30(1): 87-89.
 [12] Istvánovics V. and Honti M. Longitudinal variability in phytoplankton and basic environmental drivers along Tisza River, Hungary [J]. Verh. Internat. Verein. Limnol, 2008, 30(1): 105-108.

Study on relationship between the monitoring results of On-line Delayed Fluorescence excitation spectroscopy and chlorophyll-a

LIU Ai-ling¹, LI-Mei², XIONG Li-li²

(1. Hydrology bureau of Poyang Lake, Jiangxi Xingzi 332800, China;
 2. Hydrology bureau of Jiangxi Province, Nanchang 330002, China)

Abstract: The algae content in water is the key to determine the eutrophication. In this paper, we cultured several representative species of algae of the Poyang Lake, then determined the biomass by the On-line Delayed Fluorescence excitation spectroscopy (DF), and tested the chlorophyll-a with the Multi-parameter water quality analyzer (YSI6600). By analyzing the relationship between the six fluorescence values and chlorophyll a content, the calibration formulas between a single species of algae and mixed algae chlorophyll a and fluorescence values were established. The outdoor results showed that, the chlorophyll-a contents from the adjusted calibrate formula were basically the same with the observation, and the method was applicability.

Key words: Poyang Lake; Algae; Delayed Fluorescence; Phytoplankton; chlorophyll-a; Calibrate formula

编辑 许 瑛