

海水叶绿素 *a* 现场测量仪研究*

夏达英 王振先 夏敬芳[†] 夏荣环 辛海英

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

[†](复旦大学物理系, 上海 200433)

提要 采用荧光测量方法研究成功的海水叶绿素 *a* 现场测量仪, 是用于海上现场实时测量海洋中浮游植物体内叶绿素 *a* 含量的新型海洋仪器。本仪器采用低功耗、高强度、低重复频率、窄脉冲宽度的脉冲氙灯, 为激发光源及相应的脉冲检测技术测量荧光信号。该仪器可在海表层至 50m 水深内任一日光强度下工作; 测量海洋中浮游植物体内叶绿素 *a* 的浓度范围为 $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9} \text{g/cm}^3$; 当仪器走航拖曳速度为 2m/s 时, 其空间分辨度为 1m, 仪器具有海上现场测量实用价值。

关键词 叶绿素 *a* 现场测量仪 荧光测量方法 脉冲检测技术

长期以来, 人们曾采用过显微镜下的计数法、黑白瓶法、¹⁴C 法、分光光度法、实验室荧光测量法等多种方法测量海水中的浮游植物量。这些取样分析测量方法存在取样困难、定位误差大、数据资料少和周期长及耗费人力、财力等缺点, 迫使人们寻求研究能在现场直接测量的仪器。1990 年作者在国内首次研制成功了海水叶绿素 *a* 现场测量仪。该新型海洋仪器能在海洋中现场实时、快速、大面积测量浮游植物体内叶绿素 *a* 浓度, 进而了解浮游植物的时间、空间分布、蕴藏量及其变化规律, 特别是对于水色遥感需要使用现场实时测量海洋中浮游植物体内叶绿素 *a* 浓度的仪器与空中或船上的遥感测量同步, 以便反映“海面真值”。

1 海水叶绿素 *a* 现场测量仪的工作原理

由于荧光测量法具有灵敏度高、简便、样品不需作任何处理, 就可在现场实时测量物质的浓度; 荧光仪器的输出量与被测样品的未知浓度成比例关系; 对荧光物质具有良好的鉴别性, 使得在测量该物质时不受其它微粒物质的干扰等优点。因此, 作者采用荧光测量法来达到现场测量海洋中浮游植物体内叶绿素 *a* 含量的目的。

根据物质分子吸收光谱和荧光光谱能级跃迁机理, 在吸光过程中, 荧光物质的分子可以有几个不同的吸收带, 但荧光只有一个峰带。吸收和荧光呈带状是由于基态和激发态都各自有不同的能级分布。显然, 不同的荧光物质由于它们的分子结构和能量分布的差异, 各自显示出不同的吸收光谱和荧光光谱特性(陈国珍, 1975)。叶绿素 *a* 的二个明显的吸收光谱带的峰值分别在 420nm 和 665nm 附近。浮游植物体内叶绿素的存在基本上

**“七五”国家重点科技攻关项目, 75-76-04-06号。夏达英, 男, 出生于1940年5月, 副研究员。刘建立同志帮助上墨, 谨志谢意。

收稿日期: 1996年7月5日, 接受日期: 1997年1月18日。

决定了自然密度浮游植物的吸收光谱特性, 浮游植物的二个强烈吸收光谱带峰值波长基本上在 440nm 和 670nm 附近(图 1)¹⁾。然而, 菠菜萃取液中叶绿素 *a* 的单一荧光峰值波长在 675nm 附近。而浮游植物(藻类)体内叶绿素 *a* 的荧光峰值波长约在 685nm 附近(丁永耀等, 1983)。

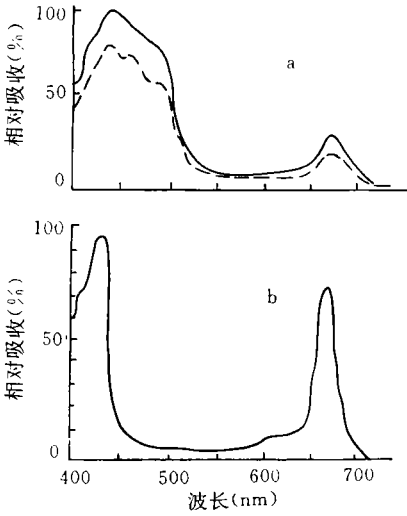


图 1 藻类(a)和叶绿素 *a*(b)吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of algal (a) chlorophyll-*a* (b) 光强度 *F* 的关系式:

——绿鞭毛藻; ---硅藻。

$$C = A - B \log(D - F) \quad (2)$$

式 中 $A = \frac{2.3}{\epsilon b} \log k \phi I_0$, $B = \frac{2.3}{\epsilon b}$, $D = k \phi I_0$ 均为常数。因为当所测量的荧光物质和仪器确定后, ϵ , k , ϕ , I_0 皆为常数(夏达英等, 1989)。因此, 通过测量浮游植物体内叶绿素 *a* 的荧光强度, 就可得出浮游植物体内叶绿素 *a* 的浓度。

因为荧光强度是由很多因素确定的。因此, 荧光强度只是相对强度。在实际测量时, 必须先作出仪器在该测量海区的工作曲线。

2 海水叶绿素 *a* 现场测量仪的设计与制造

2.1 设计要求与外观结构 为了达到海中实时测量浮游植物体内叶绿素 *a* 浓度的目的, 测量仪必须采用脉冲氙灯作激发光源及相应的脉冲检测技术作荧光信号检测器; 必须克服由于脉冲氙灯触发高压对接收电路引起的干扰和由于激发光强的起伏对测量结果的影响; 必须有效地分离叶绿素荧光与激发光的散射光, 并克服海水固有荧光的干扰。

本测量仪由带有专用遮光罩和导向舵板的水下探头及船上带微电脑数据采集系统的控制箱和纸带记录仪组成。用一根多蕊电缆将水下探头与控制箱连接, 以供给电能和传送信号。水下探头为单筒式用 O 型密封圈密封。筒内安装激发系统和接收系统, 中间用一块铁板和铜板组成的纵向隔板分开。既起到重要的光电屏蔽作用, 又起到激发部件和接收部件安装底板的支承作用。在通光孔上安装两个水密平头有机玻璃锥体, 既起到水

1) 胡嘉敏, 夏达英等, 1990, 海洋水色遥感技术与模式研究, 国家海洋局等“七五”国家重点科技攻关项目结题鉴定报告。

密封作用,又可消除水体中气泡和不必要的衰减(图2)。水下探头重量为19kg;探测海中浮游植物体内叶绿素 a 的浓度范围为 1×10^{-6} — $1 \times 10^{-9} \text{g/cm}^3$,对数工作方式;荧光信号输出为0—5V模拟电压量;仪器可在海表层到50m水深内任一日光强度下工作。

2.2 光学系统 测量仪的光学系统方框图如图3中的光学部分。脉冲氙灯S发出的白色脉冲光,通过透镜组 L_1 和滤光片 F_1 聚焦和滤光,使得水下探头机壳外的探测体积为 2cm^3 ,并给出激发光的合适波长的光照射到被测量的水体中。在垂直激发光路的光轴方向上安装一个PIN硅光电二极管,用以监测激发光强。

荧光接收光路安装在与激发光轴垂直的方向上,通过玻璃锥体 G_2 进入接收器的散射光(含荧光)被滤光片 F_2 又一次滤光。用一个较大孔径的透镜组 L_2 汇集被检测到的荧光信号至光电倍增管PM的光阴极上,转换成电信号。

为了有效地分离被激发光照射的浮游植物体内叶绿素 a 所产生的荧光和激发光的散射光,除了将荧光信号的检测选择在粒子散射最小的角度(90°)附近外,同时还采用了高阻塞系数窄带干涉滤光片作光谱滤光。激发滤光片的中心波长 $\lambda_0 = 440 \text{nm}$,半宽度 $\lambda_{0.5} = 10 \text{nm}$;荧光发射滤光片的中心波长 $\lambda_0 = 685 \text{nm}$,半宽度 $\lambda_{0.5} = 10 \text{nm}$ (图4)。这就使接收器所接收到的光通量确保反映浮游植物体内叶绿素 a 的荧光,而且能有效地克服海水固有荧光的干扰。

2.3 电子学系统 测量仪的电子学系统方框图如图3中的电子学部分,主要电路安装在水下探头中。

选用低功耗、高强度的脉冲氙灯作为激发光源,该灯在 300A/cm^2 的电流密度的工作条件下,能量输出峰值在紫外和可见光短波区。从信号处理部分对信噪比的要求,及仪器在现场测量中拖曳速度对电路时间常数的要求等原因考虑,脉冲氙灯的重复频率为 10Hz 较为理想。储能电容为 $2 \mu\text{f}$,氙灯工作电压为 600V ,脉冲氙灯工作电路如图5a。

由于激发光为低重复频率的窄脉冲光,因此,作为荧光信号的接收处理电路必须采用相应的脉冲检测电路。Boxcar积分器是检测这类信号的有效方法(Hundahl et al., 1980; wheaton et al., 1981¹⁾)。本测量仪的荧光信号接收电路主要由:(a)信号通道积分

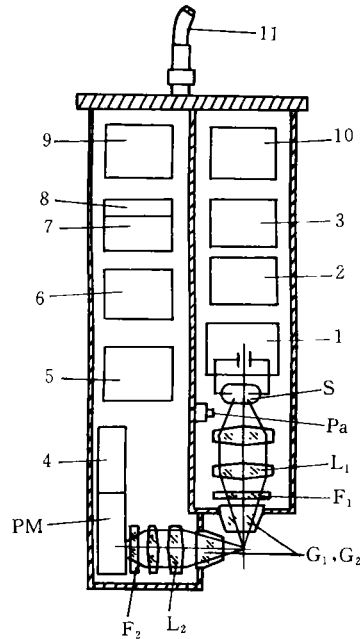


图2 测量仪水下探头结构方框图

Fig.2 Block diagram of underwater probe's structure in measurer

S 脉冲氙灯; L_1 激发透镜组; F_1 激发滤光片; G_1, G_2 平头玻璃锥体; F_2 荧光发射滤光片; L_2 接收光学透镜组; Pa 硅光电二极管; PM 光电倍增管; 1 脉冲氙灯高压电源; 2 直流变换器; 3 直流稳压电源; 4 光电倍增管高压电源; 5 阻抗匹配器; 6 前置放大器; 7 Boxcar 积分器; 8 触发和控制逻辑电路; 9 除法和对数放大器; 10 线路工作电源; 11 水下电缆。

1) Wheaton et al., 1981, underwater fluorometer measuring system, U. S. Patent, 4 293 225.

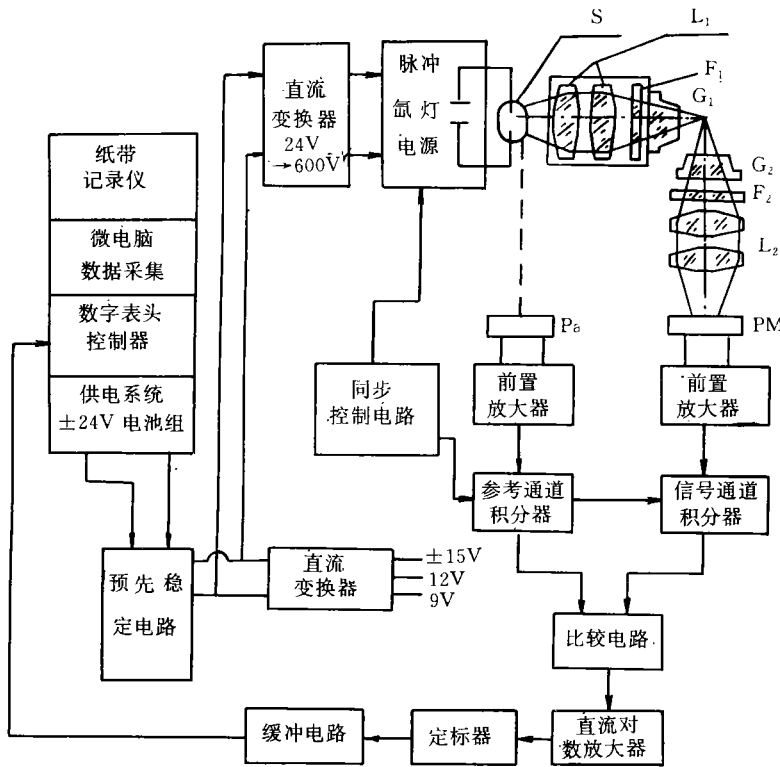


图3 测量仪光学与电子学系统方框图

Fig.3 Block diagram of measurer's optics and electronics

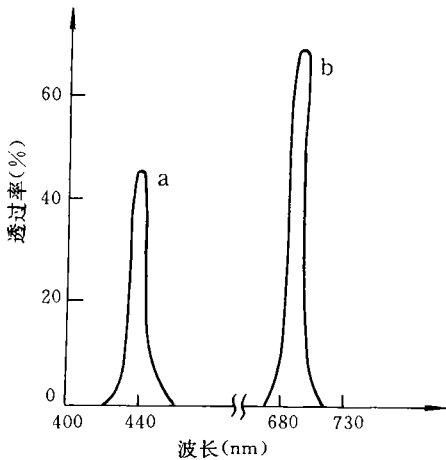


图4 叶绿素a 激发滤光片(a)和发射滤光片(b)光谱曲线

Fig.4 Spectral curves of excited filter (a) and emitting filter (b) of chlorophyll-a

器；(b)参考通道积分器；(c)触发及控制逻辑电路；(d)除法电路及对数放大器；(e)直流电源等五部分组成，如图5b所示。其时间常数为100μs。当仪器的拖曳速度为2m/s时，空间分辨为1m，这是具有现场走航测量实用价值的。

由于激发光强度有较大的起伏，对测量结果影响较大。因此，采用双光路双通道测量方法(图3)：PIN硅光电二极管接收脉冲氙灯的微小部分光强度作为参考信号，与荧光信号分别通过相同的(只有增益不同)积分器，然后经除法电路得到满意的归一结果，有效地消除了激发光强度的起伏对测量结果的影响；由于脉冲氙灯在触发启动时电磁干扰很强，使得整机逻辑控制成为关键。为此，将激发电路部分与接收电部分用铁板和铜板

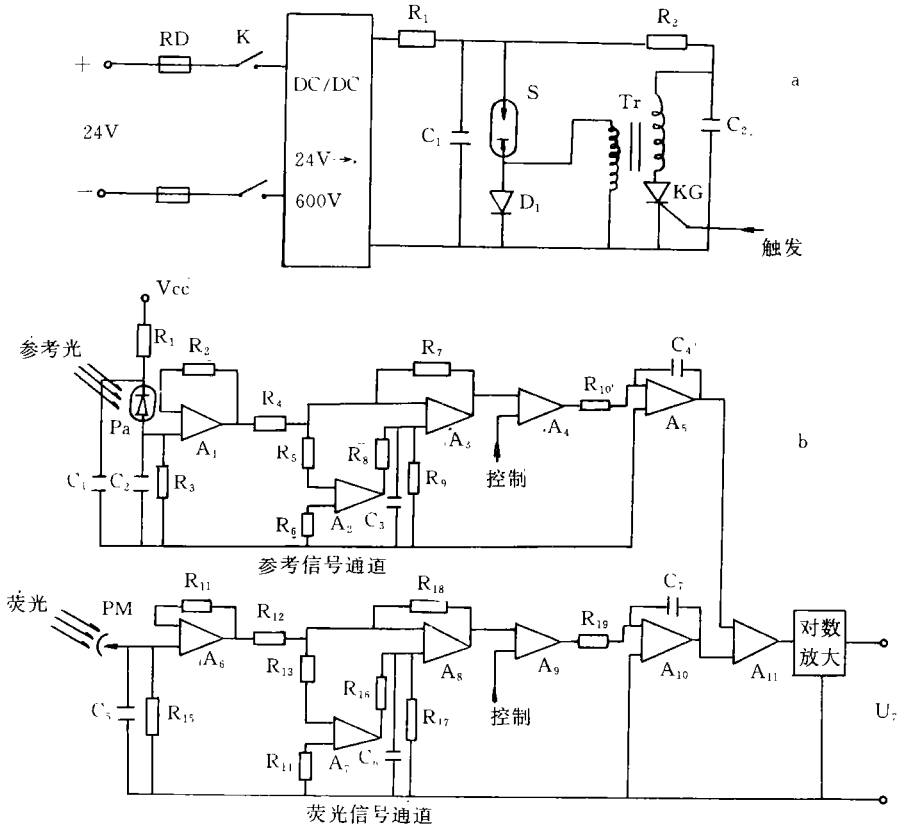


图 5 脉冲氙灯 (a) 和荧光信号接收 (b) 工作电路图

Fig.5 Operating circuit diagram of pulsed xenon lamp (a) and of the fluorescence signal receiving (b)

组成的纵向隔板分开,以作各自的电磁屏蔽。同时,使用感应脉冲氙灯触发的电信号经处理后成为逻辑电路的触发信号,有效地避开了这一强干扰。保证了精密的逻辑控制;采用时间选通技术消除其它散光的干扰;复合使用 OP-07 和 LF357,以 LF357 保证良好的频率特性,OP-07 的深度反馈,有效地抑制 LF357 的工作点的漂移。

本测量仪从水下探头输出的已是与叶绿素浓度相对应的模拟电压量(0—5V)。为了防止工作时发生短路现象及消除长电缆对信号的衰减,在水上控制箱内加了跟随器以作隔离,并接入数字电压表以作实时显示。信号输出的一路送至纸带记录仪,给出浓度曲线(电压量);另一路送至单板机作数据采集,可供计算机处理。单板机直接采集与叶绿素浓度相对应的电压量,也可根据测量仪的工作曲线将采集的电压量换算成浓度值。

3 实验结果与讨论

1990 年 1—4 月使用研制成功的海水叶绿素 a 现场测量仪配合海水叶绿素 a 遥感测量实验,现场测量海水中浮游植物体内叶绿素 a 的浓度,测量数据如图 6。

图 6 中, A 组为 1 月 8 日在实验室用分光光度计规范法测定出活体藻类体内叶绿素 a

的浓度,按一定比例注入过滤海水中,用累加法配制成不同浓度的标准样品,使用本测量

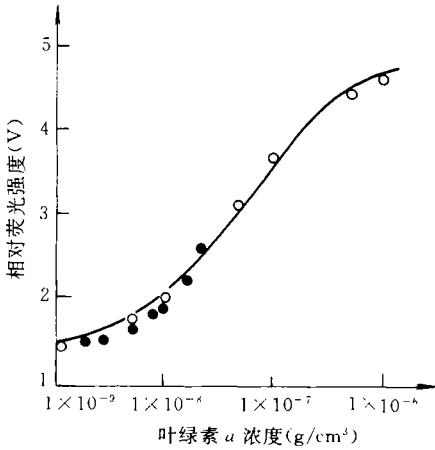


图6 测量仪工作曲线和现场测量数据

Fig.6 Calibration curve of measurer and in situ measuring data

○ 1月8日测量数据(A组);

● 4月24日测量数据(B组)。

量仪所测定的数据绘成曲线,即为本测量仪的工作曲线。B组为4月24日在海水养殖场(青岛),使用本测量仪配合水色遥感仪器WR-2型光谱仪进行海水中活体藻类体内叶绿素a遥感测量实验,本测量仪在现场不同测点所测量的数据。

将1月8日测量数据对同一浓度的每一组输出值求平均,所作出的测量仪工作曲线与4月24日现场各测点所测数据比较,得出如下结论。

3.1 本底海水(过滤海水)与浓度为 $1 \times 10^{-10} \text{g/cm}^3$ 的浮游植物体内叶绿素a海水水样可以辨别开。

3.2 海水叶绿素a浓度在 $1 \times 10^{-9} \text{g/cm}^3$ — $1 \times 10^{-10} \text{g/cm}^3$ 之间一段,本测量仪的灵敏度不高,特别是浓度在 $5 \times 10^{-10} \text{g/cm}^3$ 以下误差比较大,这是由于本底噪声和水体中

藻类含量不均匀所致。从实验测量得到本测量仪对于浮游植物体内叶绿素a的浓度测量范围为 1×10^{-6} — $1 \times 10^{-9} \text{g/cm}^3$,这对于海上现场测量具有实用价值。

3.3 现场测量值与工作曲线之间的最大相差小于17%,即本测量仪的精确度(最大相对误差) $\leq \pm 17\%$ 。这是除仪器本身的测量误差外,更多的是由于水体中藻类含量的不均匀性所引起。

3.4 本测量仪的零点比较稳定,每次开机工作无需调节,本底海水的每次测量值都在1.4V,注入活体藻类样品达到 $1 \times 10^{-10} \text{g/cm}^3$ 时,测量值为1.45V。

4 结语

通过进一步的实验研究,本测量仪的检测灵敏度可以进一步得到提高。同时在此基础上深入研究,还可测量海洋中其他物质的浓度:如测量海洋中油溢、黄色物质及荧光性污染物质的浓度;测量人工投放在海洋水域中的荧光示踪染料浓度的时间、空间分布,以研究水域中可溶性污染物质的稀释扩散和海流结构之间的关系;还可以测量海中悬浮泥沙含量等。此类仪器是一种用途极其广泛的新型海洋仪器,人们称它为“万能水中荧光计”。

参 考 文 献

丁永耀等,1983,海洋学报,5(3):340—348。

陈国珍,1975,荧光分析,科学出版社(北京),12—45。

夏达英等,1989,海洋与湖沼,20(1):58—65。

Hundahl, H., Holch, Y., 1980, Rep. Insst. Phys. Oceanogr. univ. of Copenhagen, 42: 145—153.

STUDY ON IN – SITU MEASURING SET FOR CHLOROPHYLL- a IN THE SEAWATER

Xia Daying, Wang Zhenxian, Xia Jingfan[†], Xia Ronghuan, Xin Haiying

(*First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003*)

[†](*Department of physics, Fudan university, Shanghai 200433*)

Abstract This article describes an in-situ instrument of the chlorophyll- a in seawater which has been successfully developed on the basis of fluorometry. It is mainly used for measuring the chlorophyll- a concentration in phytoplankton in the seafloor so that the distribution of sea organisms resources can be assessed. The instrument uses the pulsed xenon lamp as the excited light source which has the characteristics of low power consumption, high intensity, low repetition rate and narrow pulse width and also uses the relevant pulsed detecting technology (i. e. the Boxcar integrating circuit) for detecting the fluorescent signal. The signal strength is ratioed against the lamp intensity for each flash, by using the detecting methods of double light route and double channel at the same time, so that the accuracy of every measuring figure can be ensured, and signal variation due to undulation of the pulsed xenon lamp output intensity can be effectively eliminated. In order to effectively separate the fluorescence produced by the chlorophyll- a of the phytoplankton in the sea which is shone by the excited light and the scatter light from the excited light, we use high block coefficient narrow band filters, the center wavelength of the excitation filter is 440nm, and the fluorescent emission filter's center wavelength is 685nm. In this way, the fluorometric signal strength which is received by the receivers can be ensured to reflect the fluorescence of chlorophyll- a in the phytoplankton, and furthermore the interference from the inherent fluorescence in the seawater can be effectively prevented.

The instrument can work from the sea surface to a maximum depth of 50m, at any sunlight intensity, for detecting concentration range of chlorophyll- a in the phytoplankton in the ocean from $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9} \text{ g / cm}^3$; when the instrument is towed at a speed of 2m/s, its space resolution is 1m, and this is of practical value to us.

Key words Chlorophyll - a In - situ measuring set Fluorometry methods Pulsed detecting technique