

## 溶解有机物三维荧光光谱技术在赤潮藻识别中的应用

吕桂才<sup>1,2</sup>, 赵卫红<sup>1\*</sup>, 王江涛<sup>2</sup>

1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071

2. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

**摘要** 将赤潮藻生长过程中产生的荧光溶解有机物(fluorescent dissolved organic matter, FDOM)的三维荧光光谱与主成分分析相结合, 尝试建立了我国沿海 10 种常见赤潮藻的识别测定技术。用主成分分析提取三维荧光光谱第一主成分载荷谱作为识别特征谱, 建立了浮游植物荧光特征谱库, 在此基础上利用 Bayesian 判别方法进行识别测定。甲藻在种水平上的正确识别率 $\geq 92\%$ , 硅藻在属水平上的正确识别率 $\geq 75\%$ , 其中褐指藻属和角毛藻属的正确识别率 $\geq 90\%$ 。从结果可以看出, 利用赤潮藻生长过程中的溶解有机物三维荧光光谱结合主成分分析的方法实现对赤潮藻在属水平上的识别测定是可行的。

**关键词** 三维荧光光谱; 主成分分析; 赤潮藻; 识别

**中图分类号:** X132; Q331 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)01-0141-04

### 引言

有害赤潮肆虐于我国和世界各国沿海, 是国际社会共同关注的重大海洋生态环境问题和自然灾害。赤潮频发对我国沿海的海洋生态、资源、环境造成了重大的经济损失。要预防和减少有害赤潮灾害, 首先要能够准确、实时地对发生赤潮的肇事藻种进行识别测定。图像识别技术<sup>[1, 2]</sup>、色素分析技术<sup>[3, 4]</sup>以及荧光技术<sup>[5, 6]</sup>等是目前常用的浮游植物种类鉴别技术。荧光技术以其简单、高灵敏度、易实时检测以及良好的特异性等优点而倍受关注。

目前利用三维荧光光谱对赤潮藻进行识别测定多是利用赤潮藻活体的三维荧光光谱<sup>[7-9]</sup>, 利用微藻生长过程中所产生的荧光溶解有机物(fluorescent dissolved organic matter, FDOM)的三维荧光光谱进行识别测定的研究鲜有报道。本实验室曾发现不同微藻在生长过程中产生的溶解有机物荧光有所不同, 其荧光特征与藻种及其生长阶段有一定关系<sup>[10]</sup>。本文基于微藻生长过程中所产生的 FDOM 的三维荧光光谱, 用主成分分析和 Bayesian 判别法对我国沿海常见的 10 种赤潮藻进行分析判别, 尝试建立一种赤潮藻实时、快速的荧光识别测定技术。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与分析条件

采用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计测定了溶解有机物的三维荧光。测定参数参见文献<sup>[11]</sup>。

#### 1.2 藻种培养

表 1 列出了所选用的五种甲藻和五种硅藻, 分别取自中国科学院海洋研究所藻种室和中国海洋大学污染生态化学实验室。实验中所用玻璃仪器均经 HCl 浸泡、清洗、高温灭菌(160 °C, 1 h)后使用。所用培养基海水经 0.45 μm 滤膜过滤按 f/2 配方加入营养物质(甲藻不加硅营养盐)后蒸汽灭菌(121 °C, 0.56 kg·cm<sup>-2</sup>, 30 min)。培养温度(22±1)°C, 光照 3 000 lux, 明暗周期 12 h: 12 h。每隔 1~2 d 取 20ml 藻液样品用 GF/F 膜过滤, 测定滤液荧光。每个藻种平行培养 3 份, 其中一份的光谱数据作为训练集, 用于建立识别方法, 其余样品的光谱数据作为测试集, 用于所建方法的验证。

#### 1.3 数据分析与运行软件

实验获三维荧光光谱数据 462 个。采用 Milli-Q 水空白消除拉曼散射, 将出现瑞利散射的地方置零。然后将光谱进行归一化处理(以每个三维荧光光谱的最大值为基准)。用主成分分析方法选取识别特征谱, 然后用 Bayesian 判别法进行判别。利用 Matlab 7.0 软件完成以上数据分析。

收稿日期: 2010-01-08, 修订日期: 2010-04-12

基金项目: 国家(863 计划)项目(2006AA09Z180)资助

作者简介: 吕桂才, 1985 年生, 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室硕士研究生 e-mail: lvguicai@163.com

\* 通讯联系人 e-mail whzhao@ms.qdio.ac.cn

**Table 1** Species of phytoplankton for the experiments

| 门类      | 属      | 代码     | 藻种      | 代码    |
|---------|--------|--------|---------|-------|
| 硅藻门     | 角毛藻属   | Ch     | 旋链角毛藻   | Cu    |
|         |        |        | 双突角毛藻   | Di    |
|         |        |        | 柔弱角毛藻   | De    |
|         | 褐指藻属   | Ph     | 三角褐指藻   | Pht   |
|         | 骨条藻属   | Sk     | 中肋骨条藻   | Skc   |
|         | 甲藻门    | 亚历山大藻属 | 微小亚历山大藻 | Alm   |
| 塔玛亚历山大藻 |        |        | Alt     |       |
| 原甲藻属    |        |        | Pr      | 东海原甲藻 |
|         |        |        | 海洋原甲藻   | Prm   |
|         | 斯科里普藻属 | Sc     | 锥状斯科里普藻 | Sct   |

## 2 结果与讨论

### 2.1 特征提取

三维荧光光谱中水的散射峰的存在掩盖了光谱的本质特征,本研究利用空白扣除法消除拉曼散射的影响,将出现瑞利散射的地方置零,消除瑞利散射的影响。将去散射后的三维荧光光谱进行最大值归一化处理,以消除荧光光强的影响。然后对归一化后的光谱进行特征提取,选取合适的识别特征谱。光谱特征提取方法有很多种,主成分分析的方法是常用的一种<sup>[12-16]</sup>,主成分分析对一组相关变量进行线性变换,得到一组主成分,主成分的维数和原始数据一致,且相互正交,用前几个主成分就可以代替原始数据,并尽可能多地反映原始数据所提供的信息。主成分分析常见的计算方法有非线性偏最小二乘、乘幂法、奇异值分解和特征值分解等,它们的原理基本上都是基于特征值问题,计算结果也基本相同。本文采用奇异值分解的方法来实现。

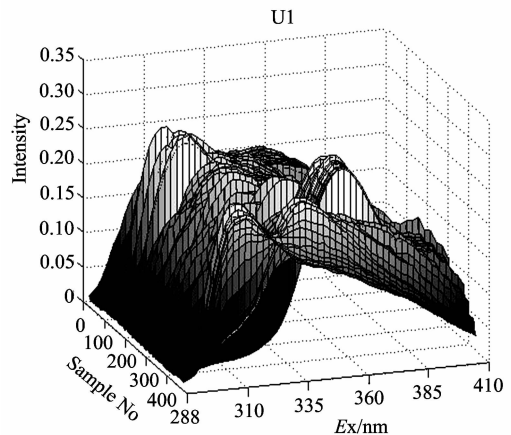
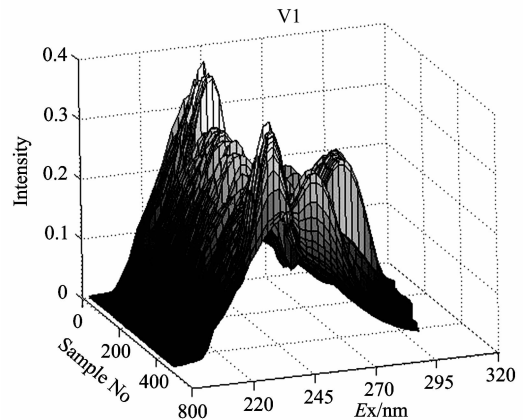
首先对原始光谱做去散射和归一化处理,然后依次进行奇异值分解,选取分解得到的载荷矩阵第一列 V1 与得分矩阵第一列 U1 作为候选特征光谱,一共得到 462 个 V1 和 462 个 U1,其中 V1 对应激发光谱,U1 对应发射光谱,分别将 V1 和 U1 按藻种顺序排列在一起,得到激发和发射特征谱,其三维图见图 1。显然,不同藻种的 V1 和 U1 都存在显著差异,V1 的同种藻特征光谱相似性比 U1 要好,因此取 V1 作为识别特征谱进行判别分析。

### 2.2 特征荧光光谱的分类判别

通过识别特征谱判别未知样品的种类归属,是一种“有监督的”模式识别问题:用一组已知类别的样本作为训练集,对未知样品的种类进行判别,常用的方法有 Fisher 判别法、Bayesian 判别法、线性学习机和 K 邻域判别法等。在光谱分析中,通常是利用峰位置和强度等特征信息进行识别。首先构造恰当的特征矢量,选择适当的判别分析方法,然后用相应的统计分析软件,将测试集光谱与训练集光谱进行匹配,就可完成未知样品的种类判别。

选用经典的 Bayesian 判别法对前面得到的识别特征谱进行判别分析,结果见表 2。甲藻在种水平上的正确识别率  $\geq 92\%$ ,硅藻在属水平上的正确识别率  $\geq 75\%$ ,其中褐指藻属和角毛藻属的正确识别率  $\geq 90\%$ ,中肋骨条藻的识别率较

低,为 75%。从识别结果可以看出,利用赤潮藻滤液的溶解有机物荧光及主成分分析的方法可以较为准确的对十种赤潮藻在属水平上进行识别测定。

**Fig. 1** Excitation and emission characteristic spectra

Sample No. Sct: 1-59; Prm: 60-128; Alm: 129-194; Alt: 195-254; Prd: 255-313; Skc: 314-349; Cu: 350-378; De: 379-408; Di: 409-426; Pht: 427-462

**Table 2** Discrimination of 10 red tide species

| 代码  | 训练集样品数/个 | 测试集样品数/个 | 正确识别数/个 | 正确识别率/% |
|-----|----------|----------|---------|---------|
| Sct | 20       | 39       | 37      | 95      |
| Prm | 23       | 46       | 44      | 96      |
| Prd | 22       | 44       | 43      | 98      |
| Alt | 20       | 40       | 37      | 93      |
| Alm | 20       | 39       | 36      | 92      |
| Skc | 12       | 24       | 18      | 75      |
| Pht | 12       | 24       | 23      | 96      |
| Ch  | 26       | 51       | 46      | 90      |

## 3 结论

本研究将赤潮藻滤液的溶解有机物荧光与主成分分析相结合,尝试建立了一种赤潮藻实时、快速的荧光识别测定技术。甲藻在种水平上的正确识别率  $\geq 92\%$ ,硅藻在属水平上

的正确识别率 $\geq 75\%$ , 其中褐指藻属和角毛藻属的正确识别率 $\geq 90\%$ 。结果表明: 利用赤潮藻滤液的溶解有机物荧光结合主成分分析的方法实现对赤潮藻在属水平上的识别测定是

可行的。随着仪器和光谱信号处理技术的发展, 利用 FDOM 三维荧光光谱技术识别测定浮游植物群落组成必然更加快捷和准确。

## References

- [1] Culverhouse P F, Simpson R G, Ellis R, et al. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 139: 281.
- [2] Sieracki C K, Sieracki M E, Yentsch C S. *Marine Ecology Progress Series*, 1998, 168: 285.
- [3] Lewitus A J, White D L, Tymowski R G, et al. *Estuaries*, 2005, 28: 160.
- [4] Mackey M D, Mackey D J, Higgins H W, et al. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 144: 265.
- [5] Beutler M, Wiltshire K H, Arp M, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1604: 33.
- [6] Seppälä J, Balode M. *Hydrobiologia*, 1998, 363: 207.
- [7] SU Rong-guo, LIANG Sheng-kang, HU Xu-peng, et al(苏荣国, 梁生康, 胡序朋, 等). *Marine Environmental Science(海洋环境科学)*, 2008, 27(3): 265.
- [8] SU Rong-guo, HU Xu-peng, ZHANG Chuan-song, et al(苏荣国, 胡序朋, 张传松, 等). *Environmental Science(环境科学)*, 2007, 28(7): 1529.
- [9] SU Rong-guo, LIANG Sheng-kang, HU Xu-peng, et al(苏荣国, 梁生康, 胡序朋, 等). *Advances in Marine Science(海洋科学进展)*, 2007, 25(2): 238.
- [10] ZHAO Wei-hong, WANG Jiang-tao, CUI Xin, et al(赵卫红, 王江涛, 崔鑫, 等). *High Technology Letters(高技术通讯)*, 2006, 16(4): 425.
- [11] LÜ Gui-cai, ZHAO Wei-hong, WANG Jiang-tao(吕桂才, 赵卫红, 王江涛). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2010, 38(8): 1144.
- [12] ZHANG Fang, WANG Liang, SU Rong-guo, et al(张芳, 王良, 苏荣国, 等). *Chinese Journal of Sensors and Actuators(传感技术学报)*, 2007, 20(10): 2143.
- [13] Tomas P, Margareta W. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 434: 179.
- [14] CHU Xiao-li, YUAN Hong-fu, LU Wan-zhen(褚小立, 袁洪福, 陆婉珍). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2000, 28(4): 421.
- [15] XU Yong-qun, SUN Su-qin, YUAN Zi-min, et al(徐永群, 孙素琴, 袁子民, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2002, 30(10): 1231.
- [16] Zhang Q Q, Lei S H, Wang X L, et al. *Spectrochimica Acta A*, 2006, 63: 361.

## Applications of Three-Dimensional Fluorescence Spectrum of Dissolved Organic Matter to Identification of Red Tide Algae

LÜ Gui-cai<sup>1, 2</sup>, ZHAO Wei-hong<sup>1\*</sup>, WANG Jiang-tao<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China

**Abstract** The identification techniques for 10 species of red tide algae often found in the coastal areas of China were developed by combining the three-dimensional fluorescence spectra of fluorescence dissolved organic matter (FDOM) from the cultured red tide algae with principal component analysis. Based on the results of principal component analysis, the first principal component loading spectrum of three-dimensional fluorescence spectrum was chosen as the identification characteristic spectrum for red tide algae, and the phytoplankton fluorescence characteristic spectrum band was established. Then the 10 algae species were tested using Bayesian discriminant analysis with a correct identification rate of more than 92% for Pyrrophyta on the level of species, and that of more than 75% for Bacillariophyta on the level of genus in which the correct identification rates were more than 90% for the phaeodactylum and chaetoceros. The results showed that the identification techniques for 10 species of red tide algae based on the three-dimensional fluorescence spectra of FDOM from the cultured red tide algae and principal component analysis could work well.

**Keywords** Three-dimensional fluorescence spectrum; Principal component analysis; Red tide algae; Identification

(Received Jan. 8, 2010; accepted Apr. 12, 2010)

\* Corresponding author