

平行因子分析在赤潮藻滤液三维荧光光谱特征提取中的应用

吕桂才^{1,2} 赵卫红^{*1} 王江涛²

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, 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, 青岛 266100)

摘 要 在实验室条件下培养我国沿海常见的 10 种赤潮藻, 测定了赤潮藻生长过程中藻滤液的三维荧光光谱。用平行因子分析对光谱进行分解, 获得每种赤潮藻滤液荧光峰的个数及类型, 即每种赤潮藻的特征光谱。在此基础上比较每种藻特征光谱的相似性和差异性, 并分析了赤潮藻生长过程中滤液的荧光峰强度和生长阶段的关系, 为基于赤潮藻滤液三维荧光光谱的赤潮藻种类识别测定技术提供依据。结果表明: 不同赤潮藻的特征光谱之间存在差异。在指数生长期, 类蛋白和类腐殖质荧光峰强度与藻密度呈正相关, 说明两类有机物在水体中不断积累; 在稳定期和衰亡期, 两类有机物的荧光强度迅速增大, 这可能是衰老和死亡细胞的破碎释放, 以及细菌降解作用所致。平行因子分析可以有效提取赤潮藻的荧光特征, 考察了赤潮藻荧光峰强度和生长阶段的关系。

关键词 平行因子分析; 三维荧光光谱; 赤潮藻

1 引言

荧光溶解有机物是海洋溶解有机物中的重要组成部分, 来源主要是江河携带入海和降水等外源以及生物活动和海洋沉积间隙水释放等内源。钟润生等^[1]将三维荧光指纹光谱用于污染河流溶解性有机物来源示踪研究。海洋浮游植物是荧光溶解有机物重要的生物来源, 在赤潮发生过程中, 曾发现较强的荧光^[2]。目前, 关于微藻本体的荧光特性已有诸多研究^[3~7], 但对藻体生长过程所产生的荧光溶解有机物的研究比较少, 赵卫红等^[8]发现微藻生长过程中的溶解有机物会产生类蛋白荧光和类腐殖质荧光, 藻种不同, 所产生的光谱特征也不同; 任保卫等^[9]发现硅藻的 FDOM 在三维荧光光谱中显示出较强的类腐殖质荧光, 而甲藻在指数增长期类蛋白荧光较强, 进入消亡期后类蛋白荧光和类腐殖质荧光强度迅速增大, 对同属微藻, 光谱特征相似, 但具体荧光峰的位置有所差别。

对溶解有机物荧光的研究多采用手动挑选的方式确定荧光峰的位置, 费时费力, 且误差较大。本研究采用平行因子分析对赤潮藻生长过程中滤液的三维荧光光谱进行分解, 直接获得每种赤潮藻滤液荧光峰的个数及类型, 即每种赤潮藻的特征光谱。在此基础上可以方便地比较每种藻特征光谱的相似性和差异性, 并分析赤潮藻生长过程中滤液的荧光峰强度和生长阶段的关系, 为基于赤潮藻滤液三维荧光光谱的赤潮藻种类识别测定技术提供依据。平行因子分析通过模型分析确定峰位置, 可直接获得每种赤潮藻滤液荧光峰的个数和类型以及每个样品中荧光峰的荧光强度信息, 无需在每个三维谱图中手动挑选荧光峰。整个过程都可程序化, 简单快捷, 在此类研究中有着很好的应用前景。

2 理论部分

平行因子 (Parallel factor, PARAFAC) 分析被广泛应用于三维和高维数据的分析及应用^[10~16]。平行因子分析是基于三线分解理论, 采用交替最小二乘算法实现的一种数学模型, 它将一个三维数据矩阵 X 分解为得分矩阵 A , 载矩阵 B 和 C 。分解模型可表示为:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf}, \quad i = 1, \dots, I; \quad j = 1, \dots, J; \quad k = 1, \dots, K \quad (1)$$

将平行因子分析模型应用到溶解有机物三维荧光光谱中时, 式 (1) 中 x_{ijk} 代表第 i 个样品、发射波长 j 激

2010-02-08 收稿; 2010-04-07 接受

本文系国家 863 计划 (No. 2006AA09Z180) 项目资助

* E-mail: whzhao@ms.qdhu.ac.cn

发波长 k 处的荧光强度值; F 为载荷矩阵列数, 代表因子数; ε_{ijk} 为残差矩阵, 表示变量不能被模型解释的大小; a_{ij} 、 b_{jk} 、 c_{ki} 分别为载荷矩阵 A 、 B 、 C 中的元素, 分别代表了组分浓度、发射光谱和激发光谱信息。与二维数据模型 (如主成分分析) 不同, 平行因子分析的解是唯一的。理想情况下, 平行因子模型的因子数应该等于混合物中的组分数。每个因子的载荷代表了一种纯组分对混合物荧光的贡献。现实应用中, 由于某些组分化学结构很相似或者产生的荧光峰共变性很好, 模型很难将这些物质分离成各自相应的组分。因此, 平行因子分析的组分数是对混合物中实际荧光组分数的估计。这种技术在纯化学组分未知的复杂体系研究中是非常有用的。

近年来, 平行因子分析被成功地用于解析三维荧光光谱^[10~16]。刘海龙等^[10]用平行因子分析对绿茶样品的三维荧光光谱进行分解, 通过因子光谱特征分析确定了绿茶的三种主要成分; 2003 年, Stedmon 等^[11]首先将平行因子分析用于解析天然水体中溶解有机物的三维荧光光谱, 得到了 5 个组分, 并根据各组分的组成分析了溶解有机物的来源; 2005 年, Stedmon 等^[12]又用平行因子分析解析围隔实验中不同营养盐条件下浮游生物产生的溶解有机物的三维荧光光谱, 得到了 7 个组分, 并分析了各组分与浮游生物生长时期和营养盐条件的关系。

3 实验部分

3.1 藻种培养

选用 10 种我国沿海常见的赤潮藻, 如表 1 所示。甲藻来自中国科学院海洋研究所藻种室, 硅藻来自中国海洋大学污染生态化学实验室。实验中所用玻璃仪器经 HCl(1:9, V/V) 浸泡, 洗净后高温灭菌 (160℃, 1 h)。海水经孔径 0.45 μm 的滤膜过滤后蒸汽灭菌 (121℃, 0.56 kg/cm², 30 min)。藻种在 f/2 营养介质 (甲藻采用不加硅的 f/2 营养盐培养) 中培养。光照条件 3000 Lux; 明暗周期 12 h/12 h; 温度 (22±1)℃。每个藻种平行培养 3 份。

表 1 所选用的浮游植物种类
Table 1 Species of phytoplankton used in experiments

门类 Phylum	属 Genus	缩写 Ab	藻种 Algae species	缩写 Ab
甲藻门 Pyrrophyta	斯克里普藻属 <i>Scrippsiella</i>	Sc	锥状斯克里普藻 <i>Scrippsiella trochoidea</i>	Sct
	原甲藻属 <i>Prorocentrum</i>	Pr	海洋原甲藻 <i>Prorocentrum micans</i>	Pm
			东海原甲藻 <i>Prorocentrum donghaiense</i>	Prd
	亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i>	Al	塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>	Alt
			微小亚历山大藻 <i>Alexandrium Minutum</i>	Alm
硅藻门 Bacillariophyta	骨条藻属 <i>Skeletonema</i>	Sk	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	Skc
	角毛藻属 <i>Chaetoceros</i>	Ch	旋链角毛藻 <i>Chaetoceros curvisetus</i>	Cu
			柔弱角毛藻 <i>Chaetoceros debilis</i>	De
			双突角毛藻 <i>Chaetoceros didymus</i>	Di
	褐指藻属 <i>Phaeodactylum</i>	Ph	三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pht

3.2 取样与分析方法

定时取样测定藻细胞密度, 并每天或隔 1 天 (指数期每天取样, 其它时期隔 1 天取样) 取 20 mL 藻液, 用 GF/F (Whatman) 玻璃纤维膜 (450℃灼烧 4 h) 过滤, 滤液于棕色玻璃瓶 (450℃灼烧 4 h) 中避光冷冻保存, 并尽快用 Hitachi F-4500 型荧光分光光度计测定三维荧光光谱。激发波长 200~400 nm, 发射波长 290~530 nm, 激发与发射步长均为 5 nm; 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 10 nm, 扫描速度 12000 nm/min, 荧光强度是由仪器提供的荧光单位。

4 结果与讨论

4.1 平行因子分析因子数选择

对实验中得到的赤潮藻滤液的三维荧光光谱数据, 先用扣除 Milli-Q 水空白三维荧光光谱的方法消除拉曼散射的影响, 然后将出现瑞利散射的位置置零, 以消除瑞利散射的影响。将去除散射影响的每种藻的

三维荧光光谱数据按照样品编号、发射波长和激发波长的顺序组合成三维数据矩阵,共获得 10个三维数据矩阵。采用 DOMfluor工具箱在 Matlab7. 0 上对 10个三维数据矩阵分别进行 PARAFAC模型分析^[17]。

分别求出 10个三维数据矩阵 2~5组分平行因子模型的中心连续系数,确定模型因子数范围,再对数据进行异常值分析。结果显示,原数据中没有异常值,最后用一分为二法确定各三维数据平行因子模型所用因子数,结果见表 2。锥状斯氏藻和微小亚历山大藻为二因子平行因子模型,其它 8种藻均为三因子平行因子模型。

表 2 赤潮藻样品数及平行因子模型因子数

Table 2 Sample capacity and number of components used in parallel factor

藻种 Algae species	Sct	Pm	Prd	Alt	Alm	Skc	Cu	De	Di	Pht
样品数 Sample number	59	69	59	60	66	36	29	30	18	36
因子数 Componet number	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3

4 2 赤潮藻滤液溶解有机物荧光的特征光谱

图 1是用平行因子分析解析得到的赤潮藻各组分的等值线图。锥状斯氏藻和微小亚历山大藻有 2个特征光谱,其它 8种藻有 3个特征光谱。表 3列出了本研究所用 10种赤潮藻滤液中出现的主要荧

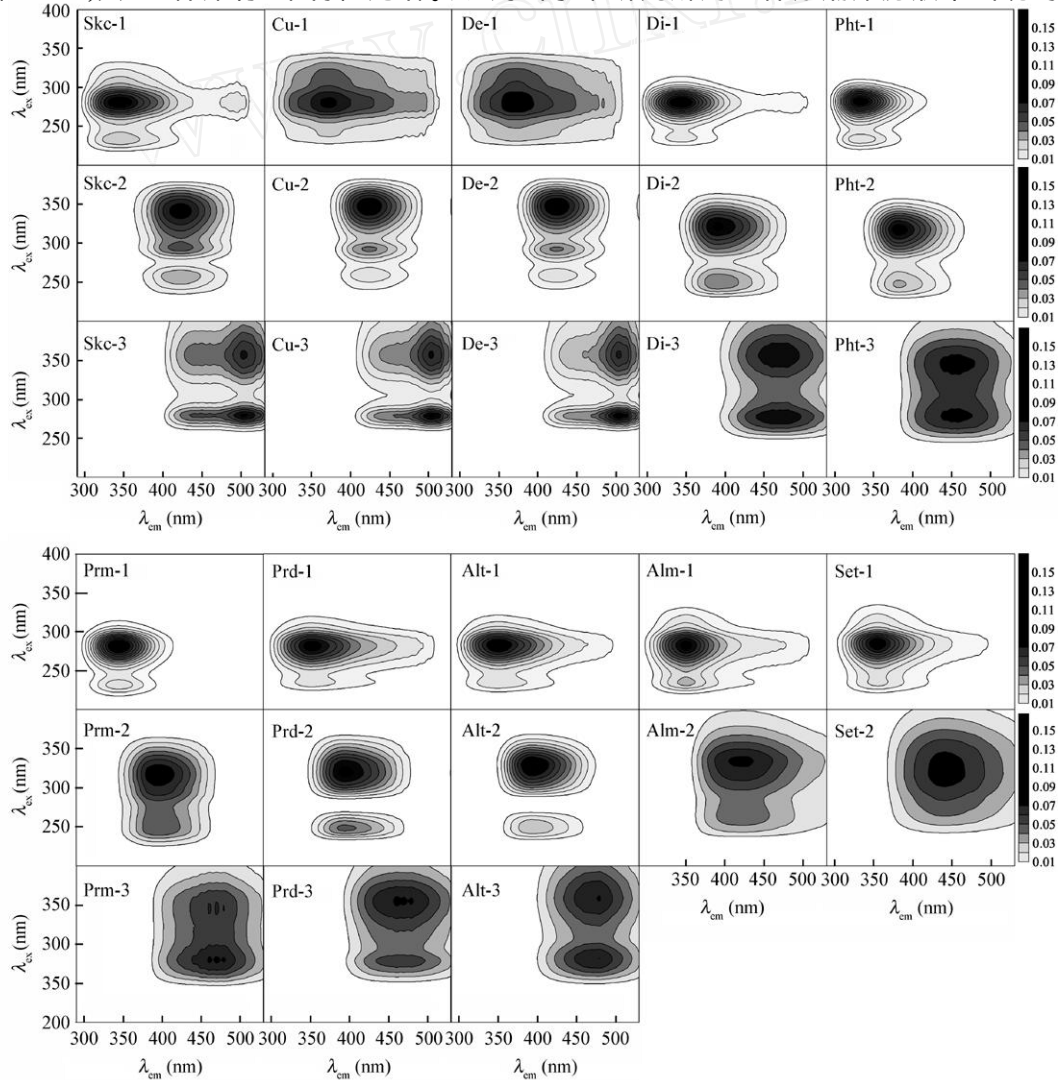


图 1 赤潮藻各组分等值线图

Fig 1 Contour plots of red tide algae components

光峰位置及峰型。荧光峰位置及代号均参照文献 [18]。

由图 1和表 3可见 ,类蛋白荧光峰主要出现类色氨酸 T峰 ,S峰以次峰的形式存在 ,强度小于 T峰 ;类腐殖质荧光峰主要出现 M峰和 C峰 ,A峰主要以次峰的形式存在。不同藻种特征光谱存在差异 ,5种硅藻中的中肋骨条藻、旋链角毛藻和柔弱角毛藻类腐殖质荧光光谱相似性较高 ;而双突角毛藻与三角褐指藻的类腐殖质荧光光谱较相似 ,与前 3种硅藻无论从光谱形状还是峰位置均有明显差异 ,5种硅藻的类蛋白荧光光谱的峰位置和形状均有所差异。5种甲藻中微小亚历山大藻和锥状斯氏藻类蛋白荧光光谱很相似 ,类腐殖质荧光峰形状有所差别 ,其它 3种甲藻特征光谱荧光峰类型和形状都很相似。

同属的旋链角毛藻和柔弱角毛藻荧光峰位置一致 ,且光谱形状也很相似 ,而和同属于角毛藻属的双突角毛藻差异较大 ;同属的海洋原甲藻和东海原甲藻出现的荧光峰类型相同 ,峰位置略有差别 ;塔玛亚历山大藻与微小亚历山大藻相比 ,塔玛亚历山大藻能够产生更多种类 的类腐殖质荧光物质。

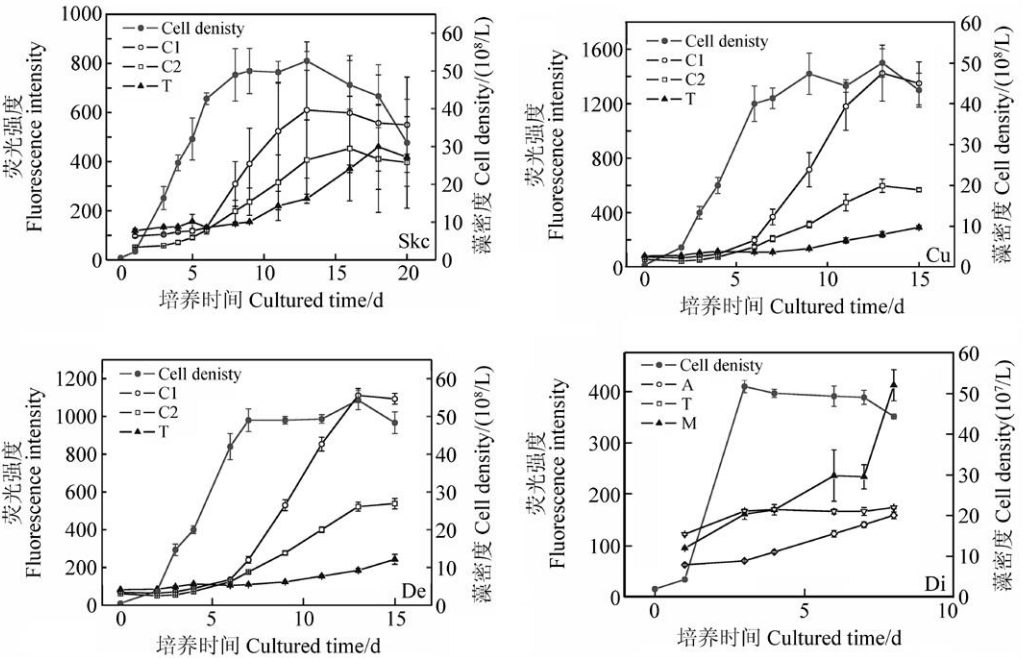
表 3 赤潮藻主要荧光峰位置及峰型

Table 3 Position and type of main fluorescent peaks of Red Tide algae

荧光峰 Fluorescent peaks	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	峰型 Fluorescent peaks type
S	230 ~ 235/330 ~ 350	类色氨酸 Protein-like (Tryp tophan)
T	280 ~ 285/330 ~ 355	类色氨酸 Protein-like (Tryp tophan)
N	280/375	生物活动所产生 A ssociated with biologic productivity
A	245 ~ 280/380 ~ 480	紫外类腐殖质 Ultraviolet humic-like
M	315 ~ 330/380 ~ 390	海洋类腐殖质 Marine humic-like
C	1320 ~ 360/420 ~ 480	可见类腐殖质 V isible humic-like
C	2280 (355) /500 ~ 505	类腐殖质 Humic-likd

4 3 赤潮藻荧光峰强度和生长阶段的关系

图 2为赤潮藻各组分最大荧光峰强度和生长阶段的关系。类蛋白和类腐殖质荧光峰强度在培养过程中均有一定程度的增大 ,类色氨酸 T峰荧光强度大于类腐殖质荧光峰强度 ,且变化较大。在指数生长期 ,锥状斯氏藻、塔玛亚历山大藻及微小亚历山大藻 T峰和 C峰荧光强度随藻密度增加而增大 ,呈明显的正相关 ,相关系数分别为 :T峰 : $r_{Sct}=0.9715, p<0.0001, n=12$; $r_{Alt}=0.9643, p<0.0001, n=17$; $r_{Am}=0.9391, p<0.0001, n=16$; C峰 : $r_{Sct}=0.9872, p<0.0001, n=12$; $r_{Alt}=0.9466, p<0.0001, n=17$; $r_{Am}=0.9515, p<0.0001, n=16$,表明这几种藻在生长过程水体中类色氨酸和类腐殖质荧光物质在不断



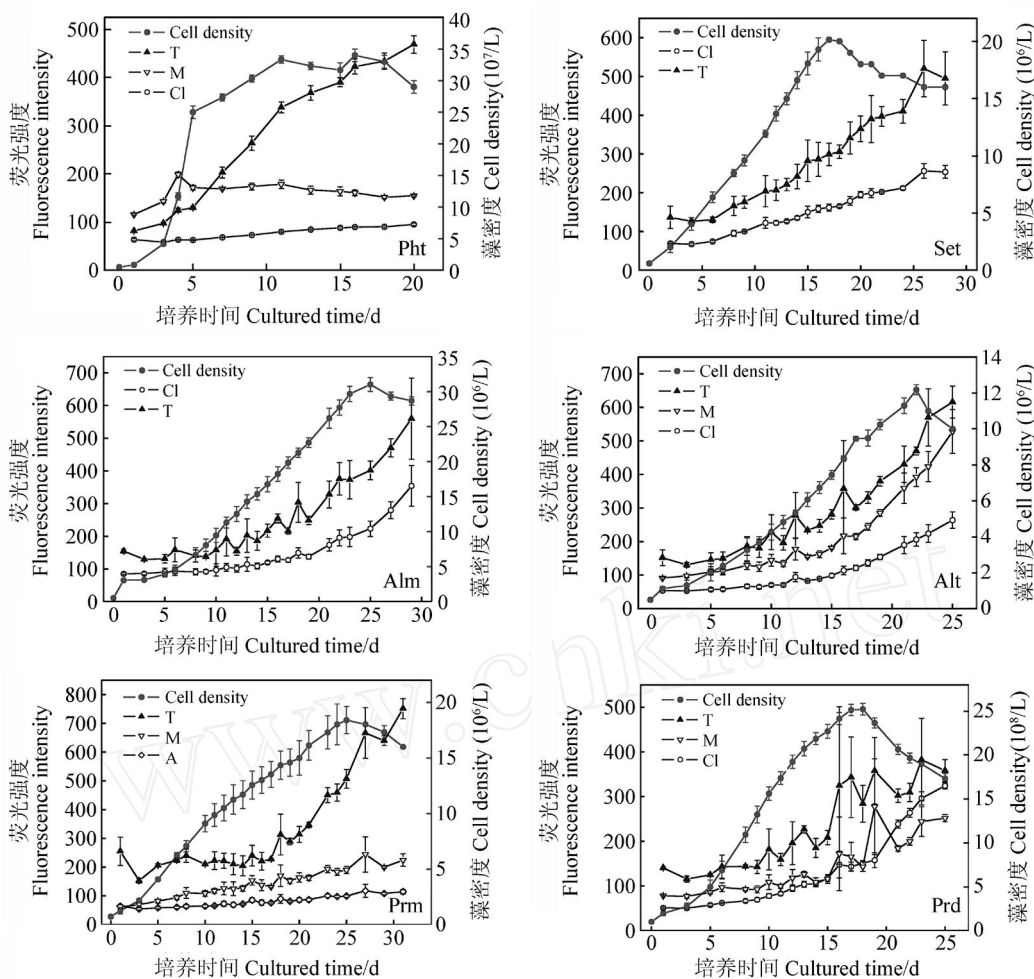


图 2 赤潮藻荧光峰强度和生长阶段的关系

Fig 2 Relationship between red tide algae fluorescence intensities and growth phases

积累。海洋原甲藻、东海原甲藻和 5 种硅藻在指数生长期内类色氨酸荧光强度变化很小,到了稳定期均大量增加。海洋原甲藻、东海原甲藻和中肋骨条藻类腐殖质荧光峰强度在指数生长期增加缓慢,到了稳定期快速增加,说明衰老和死亡细胞的破碎释放,以及细菌降解作用是水体中类色氨酸和类腐殖质荧光物质增加的重要来源。除中肋骨条藻外的其它 4 种硅藻类腐殖质荧光强度变化不大。

本实验室曾对几种微藻生长过程中藻滤液三维荧光光谱的变化进行研究^[8,9]。本实验结果与以前得到的结果一致,说明平行因子分析可以有效的提取赤潮藻荧光特征,并考察赤潮藻荧光强度和生长阶段的关系。

4.4 聚类分析

将每种藻各组分数据矩阵相加,就得到每种藻的总特征光谱。对 10 个矩阵用 matlab 软件进行聚类分析,结果见图 3。从图 3 可见,旋链角毛藻和柔弱角毛藻、微小亚历山大藻和塔玛亚历山大藻、中肋骨条藻和三角褐指藻首先聚为一类,表明同属的藻特征比较接近,且同为硅藻的中肋骨条藻和三角褐指藻特征也很相似。当距离为 0.06 时,10 种藻被分成两类。第一类包括 4 种甲藻,2 种硅藻;第二类包括 1 种甲藻,3 种硅藻。

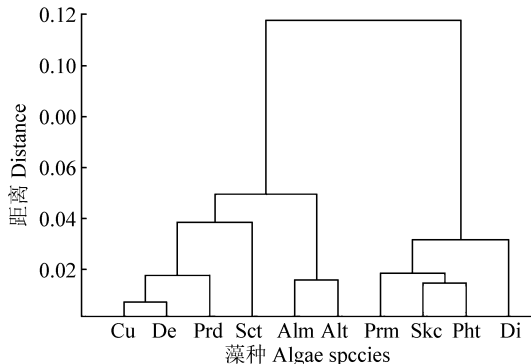


图 3 聚类分析结果

Fig 3 Cluster analysis results

当距离为 0.06 时,10 种藻被分成两类。第一类包括 4 种甲藻,2 种硅藻;第二类包括 1 种甲藻,3 种硅藻。

5 结 论

本研究采用平行因子分析对赤潮藻生长过程藻滤液的三维荧光光谱进行分析,得到了各种赤潮藻滤液中溶解有机物荧光的特征光谱。不同赤潮藻的特征光谱之间存在一定的相似性和差异性,聚类分析显示同属赤潮藻特征光谱的一定程度上相似性较高。赤潮藻各组分荧光峰强度与生长阶段显示出一定的关系:在指数生长期,水体中类蛋白和类腐殖质荧光物质不断积累,稳定期水体中类色氨酸和类腐殖质荧光物质快速增加,主要来自衰老和死亡细胞的破碎释放,以及细菌降解作用。这和以往的研究结果一致,说明平行因子分析可以有效的提取赤潮藻荧光特征,并考察赤潮藻荧光强度和生长阶段的关系。

References

- 1 ZHONG Run-Sheng(钟润生), ZHANG Xi-Hui(张锡辉), GUAN Yun-Tao(管运涛), MAO Xian-Zhong(毛献忠). *Spectrometry and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2008**, 28(2): 347 ~ 351
- 2 JINai-Yun(季乃云), ZHAO Wei-Hong(赵卫红), WANG Jiang-Tao(王江涛), CUI Xin(崔鑫), MAO Hui(苗辉). *Environmental Science*(环境科学), **2006**, 27(2): 257 ~ 262
- 3 ZHANG Qian-Qian(张前前), LEI Shu-He(类淑河), WANG Xiu-Lin(王修林), WANG Lei(王磊), YU Ping(于萍). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2004**, 24(10): 1227 ~ 1229
- 4 SU Rong-Guo(苏荣国), LIANG Sheng-Kang(梁生康), HU Xupeng(胡序朋), WANG Xiu-Lin(王修林). *Marine Environmental Science*(海洋环境科学), **2008**, 27(3): 265 ~ 268
- 5 ZHANG Fang(张芳), SU Rong-Guo(苏荣国), WANG Xiu-Lin(王修林), HUA Yang(华洋), SONG Zhi-Jie(宋志杰). *Chinese Journal of Lasers*(中国激光), **2008**, 35(12): 2052 ~ 2059
- 6 SU Rong-Guo(苏荣国), HU Xupeng(胡序朋), ZHANG Chuan-Song(张传松), WANG Xiu-Lin(王修林). *Journal of Tropical Oceanography*(热带海洋学报), **2008**, 27(5): 24 ~ 29
- 7 SU Rong-Guo(苏荣国), LIANG Sheng-Kang(梁生康), ZHU Chen-Jian(祝陈坚), WANG Xiu-Lin(王修林). *Environmental Science & Technology*(环境科学与技术), **2008**, 31(3): 52 ~ 55
- 8 ZHAO Wei-Hong(赵卫红), WANG Jiang-Tao(王江涛), CUI Xin(崔鑫), JINai-Yun(季乃云). *High Technology Letters*(高技术通讯), **2006**, 16(4): 425 ~ 430
- 9 REN Bao-Wei(任保卫), ZHAO Wei-Hong(赵卫红), WANG Jiang-Tao(王江涛), WANG Lu(王璐). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2008**, 28(5): 1130 ~ 1134
- 10 LIU Hai-Long(刘海龙), WU Xi-Jun(吴希军), TIAN Guang-Jun(田广军). *Chinese Journal of Lasers*(中国激光), **2008**, 35(5): 685 ~ 689
- 11 Stedmon C A, Markager S, Bro R. *Marine Chemistry*, **2003**, 82: 239 ~ 254
- 12 Stedmon C A, Markager S. *Limnology and Oceanography*, **2005**, 50(5): 1415 ~ 1426
- 13 Wang Z G, Liu W Q, Zhao N J, Li H B, Zhang Y J, SiMa W C, Liu J G. *Journal of Environmental Sciences*, **2007**, 19(7): 787 ~ 791
- 14 Stedmon C A, Markager S. *Limnology and Oceanography*, **2005**, 50(2): 686 ~ 697
- 15 LIANG Xiao(凌晓), CAO Yu-Zhen(曹玉珍), MO Cui-Xun(莫翠云), LIU Xiao-Yan(刘小艳). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2001**, 29(12): 1412 ~ 1415
- 16 WANG Zhi-Gang(王志刚), LIU Wen-Qing(刘文清), ZHANG Yu-Jun(张玉钧), YIN Gao-Fang(殷高方), LIU Jian-Guo(刘建国). *China Environmental Science*(中国环境科学), **2008**, 28(2): 136 ~ 141
- 17 Stedmon C A, Bro R. *Limnology and Oceanography*, **2008**, 6: 572 ~ 579
- 18 Coble P G. *Marine Chemistry*, **1996**, 51: 325 ~ 346

Applications of Parallel Factor Analysis in Feature Extraction of Excitation-Emission Matrix Spectrum of Dissolved Organic Matter in Red Tide Algae Growth Process

LÜ Gui-Cal^{1,2}, ZHAO Wei-Hong¹, WANG Jiang-Tao²

¹ (Key Laboratory of Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology,
Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

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

Abstract Ten kinds of red tide algae were cultured under laboratory conditions. Parallel factor analysis was used to extract the features of excitation-emission matrix spectra of dissolved organic substances in red tide algae growth process. The characteristic spectra of each alga were obtained. Then the similarities and dissimilarities of characteristic spectra of each alga were compared, to provide a basis for the identification of red tide algae based on the excitation-emission matrix spectra of dissolved organic substances in red tide algae growth process. The relationships between the fluorescence intensities and algae growth phases were also investigated. The results show that the characteristic spectrum of each alga is different from each other. In the exponential phase, the positive relationships between the protein-like, humic-like fluorescence intensities and cell densities were observed. It implied that the fluorescent substances accumulated during the exponential phase. In the stationary and decadency phases, the protein-like and humic-like fluorescence intensities increased quickly, which suggested that the two kinds of fluorescent substances were produced by the broken algal cells and the degradation by marine bacteria. The results show that PARAFAC model can be successfully applied to extract the fluorescent spectra features of dissolved organic substances in red tide algae growth process and can be used to investigate the relationship between fluorescence intensities and algae growth phase.

Keywords Parallel factor analysis; Three-dimensional fluorescence spectrum; Red tide algae

(Received 8 February 2010; accepted 7 April 2010)

《英汉·汉英分析检测词汇》

该词典为适应分析检测发展和市场的需要,在《英汉·汉英分析化学词汇》所收词汇的基础上,收入了物性检测、生物医药、司法刑侦和商品检验等方面的词汇近 20000 余条,增补了近年来新出现的词汇约 2500 条,共收录英汉词汇 50000 余条,汉英词汇 50000 余条,词汇涵盖分析检测技术涉及的物质名词、性能、方法、原理、技术、设备、过程等多方面。收词专业、全面、新颖,具有很强的实用性,并且编排更具人性化,便于读者查找使用。

该词典可供分析检测领域从业者,相关领域的科研人员、贸易人员、企业管理人员及相关专业的大专院校师生参考使用。

该词典由周同惠主编,化学工业出版社于 2010 年 1 月出版,定价 148.00 元。