

激光诱导叶绿素荧光寿命的测量及其特性分析*

万文博 华灯鑫[†] 乐静 刘美霞 曹宁

(西安理工大学机械与精密仪器工程学院, 西安 710048)

(2013年5月16日收到; 2013年5月31日收到修改稿)

提出了一种用于评估植物生长状况及环境监测的激光诱导叶绿素荧光寿命测量方法. 采用波长 355 nm 的激光作为光源激发叶绿素荧光, 由光电倍增管接收其荧光信号, 由于被测叶绿素荧光衰减函数与激光脉冲、仪器响应函数卷积在一起, 根据它们的特性, 运用时间分辨测量法分别测得叶绿素荧光及其背景信号, 并结合一种新型解卷积算法可分离出真实的叶绿素荧光衰减函数, 从而获取叶绿素的荧光寿命. 测试结果表明: 该方法能够实现叶绿素荧光寿命的高精度实时监测, 对不同叶绿素含量的溶液荧光寿命进行了测试, 证明叶绿素含量与其荧光寿命具有相关性, 并且拟合了叶绿素含量与荧光寿命的标定曲线.

关键词: 荧光寿命, 激光诱导荧光, 时间分辨测量法, 叶绿素含量

PACS: 06.20.F-, 06.30.Ft, 06.30.Dr, 02.70.Hm

DOI: 10.7498/aps.62.190601

1 引言

随着人类工业技术的飞速发展, 生态环境已成为全球性问题, 环境对植物生长变化影响较大, 若能在肉眼观测到这些变化前捕捉到植物的变化征兆, 那么就能预测植物的生长变化, 植物叶绿素吸收光能为光合作用提供能量, 部分多余能量以荧光的形式散耗掉^[1]. 理论上, 能够通过测量叶绿素荧光获取植物的生长信息. 尽管荧光很弱, 但能够用高分辨率的仪器对其探测, 通过激光遥感技术探测植物荧光以实现大面积植物生长状况的实时监测已称为该领域的研究热点. 美国国家航空航天局 (NASA) 于 2011 年公布了第一张地球植物荧光地图, 显示了全球植物的分布情况, 该荧光地图是根据日本温室气体探测卫星 (GOSAT) 光谱仪小组 2009 年采集的数据制作而成的. 欧洲空间局 (ESA) 的植物荧光探索 (fluorescence explorer, FLEX) 计划本来存在众多争议, 但新的研究成果为这一计划提供了有力的支持, 目前该计划已处于可行性研究中期阶段, FLEX 的发射日期尚未确定.

植物叶绿素荧光探测领域的研究重点在于探

测仪器精度的提高、叶绿素荧光与植物生长情况的关联以及荧光信号处理技术三个方面^[2]. 叶绿素荧光探测技术中, 一般通过检测叶绿素分子的荧光强度或寿命来实现被测成分的分析, 由于荧光寿命是荧光信号的本征参量, 不易受环境光、荧光散射角度以及叶绿素见光分解等因素的干扰, 因此对叶绿素荧光寿命的测量具备更好的检测精度及稳定性^[3]. 本文以光合作用理论为基础, 利用激光诱导荧光 (laser-induced fluorescence, LIF) 寿命为探针以图建立植物生理状况与荧光信息的关系模型.

叶绿素荧光寿命的测量难度较大, 目前的荧光寿命测量方案都存在明显不足. 如数据拟合法与脉冲时延法不能利用整个荧光衰减过程的信息从而影响检测精度, 传统的相平面结合迭代解卷积的方法又须要繁琐的数值算法, 很难实现荧光寿命的实时监测; 而新兴的荧光寿命成像技术须要配备造价昂贵、对环境要求较高的 ICCD, 且该技术不易实现远距离的遥感探测^[4-6]. 而本文采用的时间分辨荧光测量技术是近几年生物光学和化学光学领域中研究信号快速变化过程的主要工具之一^[7-9], 通过时间分辨光谱同时对某一固定波长的荧光强度

* 国家自然科学基金 (批准号: 61275185)、高等学校博士学科点专项科研基金 (批准号: 20106118110005) 和陕西省教育厅科学与研究计划项目 (批准号: 2010JK759) 资助的课题.

[†] 通讯作者. E-mail: xauthdx@163.com

及其瞬态过程两个参量进行信号分辨,可以直观地反映植物叶绿素荧光信号的衰减过程,能够用于分析叶绿素分子的激发态辐射跃迁过程.并根据荧光衰减函数的特性,提出了一种改进型的向前迭代卷积法,能够有效剔除非特异荧光的干扰,以反演叶绿素荧光寿命.经反复试验,证明该方法能够快速、准确地实现叶绿素荧光寿命的遥感探测.

2 激光诱导叶绿素荧光寿命的基本原理

2.1 激光诱导叶绿素荧光寿命的特性

时间分辨测量法通常用激光脉冲激发叶绿素产生荧光,由高速探测器记录其衰减函数,并且所用激光脉冲宽度须小于被测荧光衰减时间.激光能够实现远距离、大范围植被生理状况的遥感探测,但实际时域光谱分析中,激光脉冲不为 δ 函数^[10].当激发光脉宽远小于被测物的荧光衰减时间时,探测器观测到得荧光衰减曲线为被测物真实的荧光衰减曲线,如图 1(a) 所示;而当激光脉宽接近被测物的荧光衰减时间时,激光脉冲被认为是由无数个窄脉冲组成的,如图 1(b) 所示,分别用 p_1, p_2, p_3 等表示各窄脉冲的幅度,脉冲幅度与受激分子数成正比,其中 p_2, p_3 激发分子的衰减曲线如图 1(b) 中曲线 2, 3 所示.

t_i 时刻激光诱导荧光的总强度为所有窄脉冲激发荧光在此时刻的总和,即

$$y(t_i) = \sum_{l=1}^n p_l \cdot A \cdot \exp[-(t_i - t_l)/\tau]. \quad (1)$$

由于激发过程是一连续函数,所以式 (1) 可以表示为

$$y(t_i) = \int_0^{t_i} p(x) \cdot A \cdot \exp[-(t_i - x)/\tau] dx. \quad (2)$$

因此,激光诱导叶绿素荧光衰减函数 $y(t)$ 就能表示为激光脉冲函数 $p(t)$ 与真实叶绿素荧光衰减函数 $g(t)$ 的卷积

$$\begin{aligned} y(t) &= \int_{-\infty}^{+\infty} p(x) \cdot A \cdot \exp[-(t-x)/\tau] dx \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} p(x) \cdot g(t-x) dx \\ &= p(t) \otimes g(t). \end{aligned} \quad (3)$$

2.2 叶绿素荧光寿命测量原理

当仪器响应时间接近叶绿素荧光衰减时间时,仪器采集到的信号实际为激光诱导荧光衰减函数 $y(t)$ 与仪器响应函数 $\text{irf}(t)$ 的卷积^[11,12].整个系统的卷积形式可表示为

$$\begin{aligned} m(t) &= \text{irf}(t) \otimes y(t) \\ &= \text{irf}(t) \otimes [p(t) \otimes g(t)]. \end{aligned} \quad (4)$$

由此可见,叶绿素荧光衰减信息卷积在仪器采集到的荧光信号 $m(t)$ 中.选取不会产生荧光的物质(如蒸馏水或石英玻璃)作背景材料,其荧光衰减函数 $g(t)$ 为 1^[13],此时采集到的信号表示系统响应函数

$$m_0(t) = \text{srf}(t) = \text{irf}(t) \otimes p(t). \quad (5)$$

将系统响应函数代入 (4) 式可得

$$m(t) = \text{srf}(t) \otimes g(t). \quad (6)$$

因此,只要测得系统响应函数,用 $m(t)$ 对其解卷积就能得到 $g(t)$.

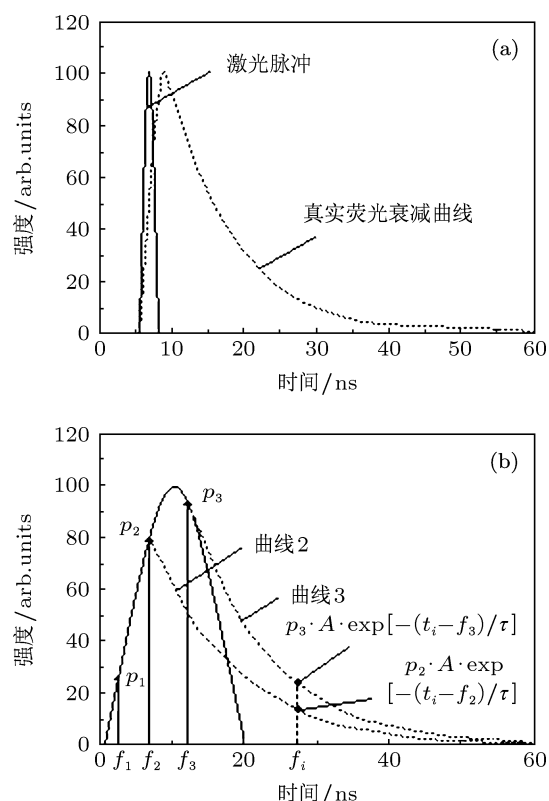


图 1 激光脉冲对荧光衰减曲线的影响 (a) 激光脉冲远小于荧光衰减时间的情况; (b) 激光脉冲接近荧光衰减时间的情况

2.3 解卷积算法

理论上,频域法能够反演叶绿素荧光寿命,但实际结果噪声较大,且卷积核谱存在零点时,结果

无意义^[14]; 相平面法简单易行但精度有限, 若与传统的迭代卷积法结合数值算法又过于繁琐, 无法实现荧光寿命的实时监测^[15].

根据叶绿素荧光衰减函数的特性, 提出一种改进型的向前迭代卷积法, 能够显著提高叶绿素荧光寿命的测量精度. 假定 $\text{srf}(t)$ 的长度为 N , $m(t)$ 长度为 M , 则 $g(t)$ 的长度 L 为 $M - N + 1$, 但 $\text{srf}(t)$ 与 $m(t)$ 中都存在大量与荧光衰减无关的信息, 所以实际计算中的 L 应为 $(M - N + 1) \cdot \epsilon$, 这里 $\epsilon (0 < \epsilon < 1)$ 为荧光衰减系数. $m(t)$, $\text{srf}(t)$ 与 $g(t)$ 之间的卷积形式

可化为

$$m(n) = \sum_{x=0}^{L-1} \text{srf}(n-x)g(x). \quad (7)$$

依 (7) 式的定义, 并满足如下条件:

$$\begin{aligned} m(i) &= 0, & i < 0 \text{ 或 } i > M - 1, \\ \text{srf}(j) &= 0, & j < 0 \text{ 或 } j > N - 1, \\ g(k) &= 0, & k < 0 \text{ 或 } k > L - 1. \end{aligned} \quad (8)$$

可将 (7) 式化为以下矩阵形式:

$$\begin{bmatrix} m(0) \\ m(1) \\ m(2) \\ \vdots \\ m(k) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{srf}(0) & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ \text{srf}(1) & \text{srf}(0) & 0 & \cdots & 0 \\ \text{srf}(2) & \text{srf}(1) & \text{srf}(0) & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \text{srf}(k) & \text{srf}(k-1) & \text{srf}(k-2) & \cdots & \text{srf}(0) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} g(0) \\ g(1) \\ g(2) \\ \vdots \\ g(k) \end{bmatrix}. \quad (9)$$

从 $m(0)$ 起对 (7) 式迭代求解, 可将 (9) 式的矩阵形式化为

$$g(n) = [m(n) - \sum_{i=1}^n \text{srf}(i)g(n-i)] / \text{srf}(0). \quad (10)$$

根据 (10) 式求得 $g(n)$, 再采用立方插值法对 $g(n)$ 在横坐标方向放大 $1/\epsilon$ 倍, 便能得到真实的叶绿素荧光衰减函数 $g(n/\epsilon)$, 再根据荧光衰减函数与荧光寿命的关系便可求得其荧光寿命. 该方法测量精度高, 算法简便, 适用于反演叶绿素荧光寿命.

3 荧光寿命测量系统设计

叶绿素荧光寿命测量系统如图 2 所示, 采用输出波长 355 nm、单脉冲能量 50 mJ 的 Nd:YAG 激光器作光源. 该系统出射光束经 355 nm 高反分光镜分离杂散光后, 再用平面反射镜调整方向, 由凸透镜汇聚到远处盛放叶绿素溶液的石英比色皿上, 产生的荧光再经凸透镜折射转化为一组平行光束, 透过中心波长 680 nm 的窄带滤光片由另一凸透镜汇聚到光电倍增管 (photomultiplier, PMT), 用示波器采集到数据 $m(t)$, 同时在分光镜后方放置一高速光电探测器 (PD) 接收激光散射信号, 来触发示波器采集信号. 测量系统响应函数时, 用石英比色皿盛放蒸馏水, 将 680 nm 的滤光片更换为 355 nm 的滤光片, 并加置衰减片, 将衰减后激光脉冲聚焦到 PMT 上, 此时示波器采集到的信号为 $\text{srf}(t)$. 将示波

器采集的数据存储并传输给计算机进行处理, 即可反演得到叶绿素荧光寿命.

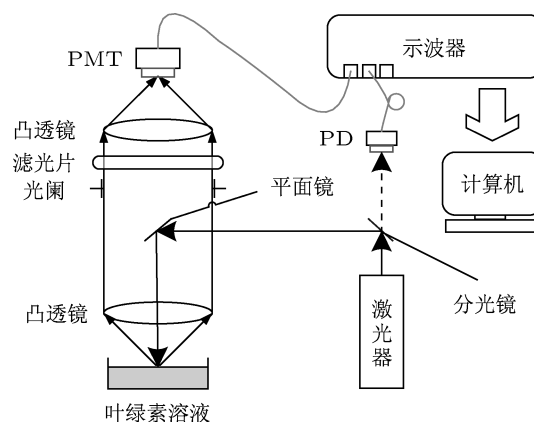


图 2 叶绿素荧光寿命测量系统的原理图

4 实验结果与分析

为验证荧光寿命测量系统及反演算法的可靠性, 利用该系统分别对特定浓度的乙醛、若丹明溶液以及不同比例的碘化钾、若丹明混合溶液的荧光信号进行测量, 用改进型向前迭代卷积法反演的荧光寿命并与文献数据进行对比, 相对误差小于 3%^[16-18].

4.1 叶绿素荧光光谱分析

选取生长状态良好的墨叶碧玉植株, 裁剪

6 cm² 叶片放入 5 ml 用 95% 的乙醇和 80% 的丙酮以体积比 1:2 关系配制的混合溶液里, 静置在暗室中 (叶绿素见光会分解)^[19], 观察叶片组织完全变白后, 就能得到叶绿素提取液. 355 nm 激光激发叶绿素提取液、丙酮与乙醇的混合溶液及墨叶碧玉叶片在 400—800 nm 的荧光光谱如图 3 所示. 植物叶片的荧光在 685 nm 和 740 nm 附近最为明显; 由于叶绿素提取液中的部分植物组织已被破坏, 所以叶绿素提取液只有 685 nm 处的荧光峰值比较明显^[20,21]; 由叶绿素的背景溶液 (即丙酮、乙醇混合) 的荧光光谱可知, 叶绿素提取液在 500—600 nm 处的荧光是由丙酮、乙醇的混合液产生的.

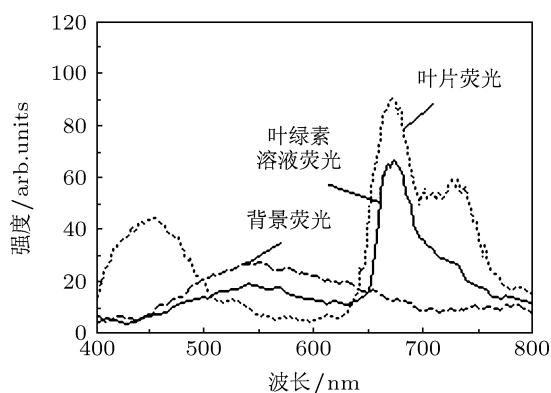


图3 叶绿素荧光光谱

4.2 叶绿素荧光寿命的测量结果分析

用该系统对叶绿素溶液进行测试时, 示波器采集的数据取 30 次平均值. 先用石英比色皿盛放蒸馏水测得系统响应函数; 测量叶绿素溶液时, 叶绿素分子失去细胞壁的保护, 在激光激励下迅速分解, 如图 4 所示, 当激光诱导荧光强度达到最大值后, 随叶绿素的分解荧光强度逐渐降低, 60 s 时减小到最大值的约一半处, 但荧光衰减时间始终固定, 由此也能说明测量荧光寿命比测量荧光强度更具稳定性. 而荧光强度最大时, 衰减过程最明显, 反演荧光寿命的误差也最小.

分别配制 22.21 mg/L, 10.53 mg/L, 5.88 mg/L, 2.78 mg/L 的叶绿素溶液进行测试, 用示波器采集各溶液激光诱导荧光强度最大时的曲线, 如图 5 所示. 对示波器采集的系统响应 $srf(t)$ 及各浓度溶液的激光诱导荧光信号 $m(t)$ 进行去噪处理后, 再对 $m(t)$ 解卷积就能得到被测溶液真实的叶绿素荧光衰减曲线, 如图 6 所示. 并经反复实验证明浓度越高的叶绿素溶液荧光寿命越长, 由此可见, 叶绿素荧光寿命与叶绿素含量具有相关性.

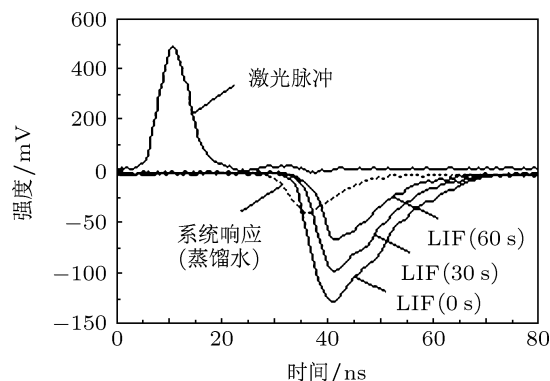


图4 叶绿素溶液的激光诱导荧光衰减曲线

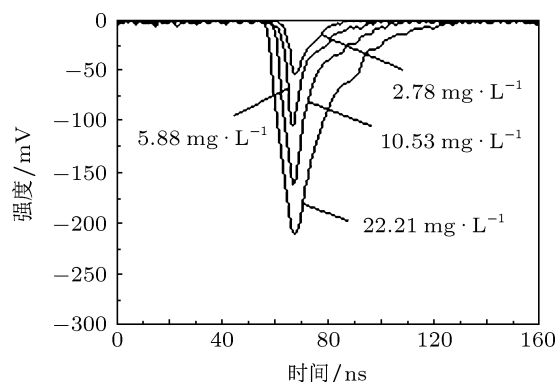


图5 叶绿素溶液的激光诱导荧光衰减曲线

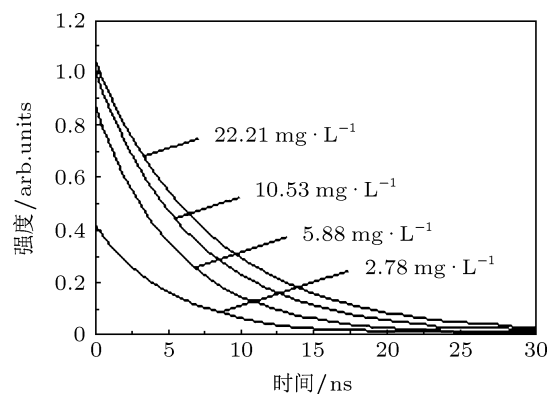


图6 真实的叶绿素溶液荧光衰减曲线

4.3 叶绿素含量的标定曲线

将上述 4 种含量叶绿素溶液进一步配制成叶绿素含量相差 ~ 0.16 mg/L 的一组溶液, 分别采用相平面法和改进型向前迭代法反演其荧光寿命, 可得到叶绿素含量的标定曲线如图 7 所示 (由标定曲线能够分析未知含量的叶绿素溶液). 由图 7 看出, 虽然两种算法求得的曲线存在差异, 但两条曲线在一定范围内都呈线性关系, 相平面法得到的标定曲线的线性相关系数 $r = 0.8612$ 而改进型向前迭代法

反演的标定曲线的线性相关系数 $r = 0.9396$, 由此可见改进型向前迭代法明显优于相平面法. 若采用改进型向前迭代法开展大量类似工作, 就能够实现精确的叶绿素含量定量分析.

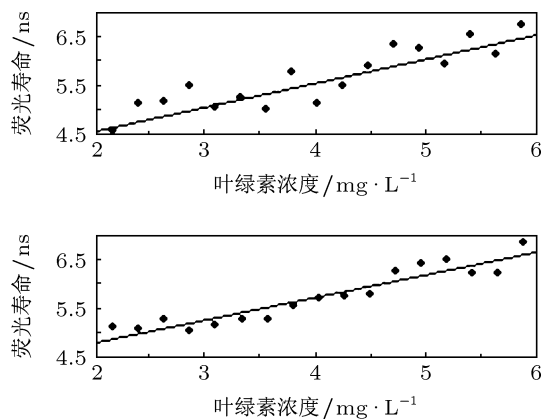


图7 相平面法与改进型向前迭代法反演得到的叶绿素溶液标定曲线

5 结论

通过搭建叶绿素荧光寿命测量系统, 运用时间分辨测量法结合改进型的向前迭代卷积法成功测得了不同叶绿素含量溶液的荧光寿命. 结果表明, 该方法不但克服了以往荧光寿命测量方法精度不高、算法繁琐或须要昂贵仪器的缺陷, 而且具有非接触、大视场等测量优点, 可实现对叶绿素溶液荧光寿命的实时测量, 该技术不但能够用于对河流、湖泊等各种水样的叶绿素含量进行连续监测, 而且具有预测植物的生长变化的前景. 这些特性表明激光诱导荧光寿命技术在植物环境监测领域具有很大应用潜力, 荧光寿命也将会成为表示植物生长状况的一个新指标, 计划下一阶段将运用脉冲宽度更窄的激光光源实现活体植物荧光寿命的连续观测及其随季节的变化情况.

- [1] Janusauskaite D, Feiziene D 2012 *Acta Agr. Scand. B-S*. P. 62 7
- [2] Du G Y, Li W T, Li H B, Chung I K 2012 *Journal of Plant Biology* **55** 159
- [3] Zhao M, Peng L L 2010 *Optics Letters* **35** 2910
- [4] Eva F S 2012 *Journal of Luminescence* **32** 2059
- [5] Sun Y W, Qu J L, Zhao L L, Xu G X, Ding Z H, Niu H B 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 772 (in Chinese) [孙怡雯, 屈军乐, 赵羚伶, 许改霞, 丁志华, 牛慈笨 2008 物理学报 **57** 772]
- [6] Yeh Y C, Yuan C T, Kang C C, Chou P T, Tang J 2008 *Applied Physics Letters* **93** 223110
- [7] Tol V, Verhoef R 2009 *Agricultural and Forest Meteorology* **6** 96
- [8] Shrestha S, Applegate B E, Park J, Xiao X D, Pande P, Jo J A 2010 *Optics Letters* **35** 2558
- [9] Irishina N, Moscoso M, Carminati R 2012 *Optics Letters* **37** 951
- [10] García M, Vázquez R, Isakina S, López R 2012 *Electrical Communications and Computers* **27** 317
- [11] Kumar A T N, Raymond S B, Bacskai B J, Boas D A 2008 *Optics Letters* **33** 470
- [12] Fang J, Papaioanou T, Marcu L 2004 *Journal of Biomedical Optics* **9** 743
- [13] Brand L, Johnson L 2008 *Fluorescence Spectroscopy* (Netherlands: Elsevier Academic Press) pp 228—351
- [14] Wang K, Zeng Y, Ding Z H, Meng J, Shi G H, Zheng Y D 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 2471 (in Chinese) [王凯, 曾焱, 丁志华, 孟婕, 史国华, 张雨东 2010 物理学报 **59** 2471]
- [15] Chen W J, Lin M S, Jiang H L 1985 *Acta Optica Sinica* **5** 904 (in Chinese) [陈文驹, 林美束, 姜宏丽 1985 光学学报 **5** 904]
- [16] Skala M C 2007 *Multiphoton Microscopy Fluorescence Lifetime Imaging and Optical Spectroscopy for the Diagnosis of Neoplasia* (Carolina: Duke University)
- [17] Miao Z, Li S F, Zhang Q Y 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 4321 (in Chinese) [苗壮, 李善锋, 张庆瑜 2006 物理学报 **55** 4321]
- [18] Yang Z L, Liu Y Q, Yang Y Q 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 037805 (in Chinese) [杨振岭, 刘玉强, 杨延强 2012 物理学报 **61** 037805]
- [19] Duan Y L 2012 *Chinese Journal of Lasers* **39** 1 (in Chinese) [段亚丽 2012 中国激光 **39** 1]
- [20] Lichtenthaler H K, Langsdorf G, Lenk S 2005 *Photosynthetica* **43** 355
- [21] Fang W H, Li Z W, Li Z L, Qu G N, Ouyang S L, Men Z W 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 153301 (in Chinese) [房文汇, 里佐威, 李占龙, 曲冠男, 欧阳顺利, 门志伟 2012 物理学报 **61** 153301]

Laser-induced chlorophyll fluorescence lifetime measurement and characteristic analysis*

Wan Wen-Bo Hua Deng-Xin[†] Le Jing Liu Mei-Xia Cao Ning

(School of Mechanical and Precision Instrument Engineering, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China)

(Received 16 May 2013; revised manuscript received 31 May 2013)

Abstract

A laser-induced fluorescence lifetime measurement method is presented to evaluate living status for plant growth and the environmental monitoring. A 355 nm laser is used as excitation source for exciting chlorophyll fluorescence, and the fluorescence signals are received by a photomultiplier. Because the measured signal is the convolution of the reliable fluorescence decay signals, laser pulse and instrument response function, according to their characteristics, the time-resolved measurement method is used to estimate the chlorophyll fluorescence and background signals separately; the real fluorescence decay signals are separated by combining a novel deconvolution method, and the chlorophyll fluorescence lifetime can be retrieved. Experiment shows that the method proves to be a high accuracy and real-time monitoring chlorophyll fluorescence lifetime technique; and the chlorophyll solution fluorescence lifetime is measured for different concentrations. The result can prove that the chlorophyll concentration is related to its fluorescence lifetime, and the calibration curves of chlorophyll concentration and fluorescence lifetime is fitted.

Keywords: fluorescence lifetime, laser-induced fluorescence, time-resolved measurement, chlorophyll concentration

PACS: 06.20.F-, 06.30.Ft, 06.30.Dr, 02.70.Hm

DOI: 10.7498/aps.62.190601

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61275185), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20106118110005), and the Shaanxi Program of Education Science and Research China (Grant No. 2010JK759).

[†] Corresponding author. E-mail: xaauthdx@163.com