

微藻光谱衰减特性测量的一种改进方法

李兴灿¹, 赵军明^{1*}, 刘林华^{1*}, 张琳²

1. 哈尔滨工业大学能源科学与工程学院, 哈尔滨 150001;

2. 东北林业大学机电学院, 哈尔滨 150040

* 联系人, E-mail: jmzhao@hit.edu.cn; lhliu@hit.edu.cn

2016-01-25 收稿, 2016-03-01 修回, 2016-03-02 接受, 2016-06-01 网络版发表

国家自然科学基金(51336002, 51276051, 51421063, 51306030)资助

摘要 给出了一种可更准确测量微藻混悬液及微藻细胞光谱衰减特性的改进方法, 该方法利用不同藻液光程的两个比色皿进行测试, 充分考虑了多层介质间的多次反射作用. 利用改进的双光程法测得蒸馏水的光谱衰减系数与文献中的数据吻合较好. 实验结果表明在300~700 nm波段, BG11培养基的光谱衰减系数显著高于蒸馏水, 而大于700 nm波段时, 其光谱衰减系数与蒸馏水基本相同. 在300~1300 nm波段, 小球藻混悬液的光谱衰减系数随波长变化明显且随着浓度的增大而增大, 而在1300~1800 nm波段时, 浓度对其的影响减弱. 在测量波段, 不同浓度小球藻的衰减系数及衰减截面随着波长增大逐渐减小, 且不同浓度小球藻衰减截面非常接近.

关键词 双光程法, 微藻, 衰减系数, 衰减截面

随着世界范围内人口增长和经济发展对能源需求的加大, 寻找可以替代化石能源的新能源已成当务之急. 目前, 国际上对藻类生物质能源的研究越来越重视, 特别是微藻, 它可通过光自养过程合成大量油脂, 被认为是一种极具潜力的可大规模制备生物柴油的原料^[1]. 开发绿色能源已成为世界学者研究和关注的重点, 与其他新能源相比, 微藻具有光合效率高、生长周期短、可在海水、废水中生长等显著优点.

微藻的辐射特性是研究微藻光生物反应效率的基本参数. 光谱衰减系数是基本辐射特性之一, 一般可借助于光谱仪通过对法向-法向透过率的测量而得到^[2]. Berberoglu等人^[3]基于透过率测量获得了海洋小球藻衰减系数, 把小球藻离心后置入PBS溶液内(在可见光波段吸收较小的溶液), 以置入PBS溶液的比色皿为参照来消除玻璃和界面产生的多次反射的影响, 最终得到纯小球藻的衰减系数. 但小球藻在离心处理后, 外在环境的变化对藻细胞测量结果产生

的影响无从知晓, 而且以内置PBS溶液比色皿为参照并不能准确消除玻璃和界面产生的多次反射的影响, 因此这种方法有一定的局限性. Yun和Park^[4]采用只考虑单次反射的Beer-Lambert法对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)混悬液可见光波段的光谱衰减特性进行了研究, 发现其衰减特性存在明显的光谱依赖性. 目前的研究中, 对微藻混悬液测量时都没有充分考虑比色皿介质界面产生的多次反射和折射作用的影响.

传统的透射法测量光谱衰减系数仅考虑了单次透射过程结合Beer-Lambert定律进行测量, 由于没有计及界面的多次反射和折射过程, 使得测得的藻液衰减系数可能会存在较大误差. 本文给出了一种可更准确测量微藻混悬液及微藻细胞衰减系数的改进双光程法, 该方法充分考虑多层介质间的多次反射, 有效地消除了藻液与玻璃界面对液体产生的影响. 文中基于改进的双光程法对淡水小球藻细胞及藻液在可见光和近红外波段(300~1800 nm)的光谱衰减特

引用格式: 李兴灿, 赵军明, 刘林华, 等. 微藻光谱衰减特性测量的一种改进方法. 科学通报, 2017, 62: 328–334

Li X C, Zhao J M, Liu L H, et al. An improved method for determining optical extinction characteristics of microalgae (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 328–334, doi: 10.1360/N972016-00105

性进行了实验研究, 获得了该波段内小球藻细胞的光谱衰减截面, 为微藻光谱衰减系数的准确测量和纳米粒子光谱吸收特性的研究提供一定的方法参考。

1 实验系统

1.1 实验方法

准确测量液体溶液透射率时需要消去玻璃和界面多次反射的影响. 本文给出一种可更准确测量微藻混悬液及微藻细胞衰减系数的双光程法 (double optical pathlength transmission method, DOPTM), 该方法是用光谱仪测量用两个材质相同、光程不同(透光面玻璃间距厚度不同)并盛放同一种混悬液的比色皿透射比, 采用考虑界面间多次反射和折射的三层介质模型并建立两个透射比方程, 然后利用优化算法迭代求解出待测微藻混悬液和微藻细胞的衰减系数。

Large等人^[5]对两层玻璃容器的光线传输进行了建模推导, 并给出了多层介质透射比的离散表示形式, 但由于模型是基于两层玻璃间介质是空气而建立的, 不便于实际应用, 因此该文发展了两层玻璃间为吸收性介质的三层介质光线追踪模型. 图1是三层介质光线追踪原理图, 光源发出的光依次通过空气-玻璃-液体-玻璃-空气后到达探测器, 图中 I_0, I_1, I_2 是透射方向的光强; J_0, J_1 是反射方向的光强; T_1, T_2, T_3 分别为玻璃、液体和玻璃每层介质的透射比; L_1, L_2, L_3 分别为玻璃、液体和玻璃此三层介质的厚度, m; τ_2 是液体的透射率. 三层介质的复折射率分别为 $n_1+ik_1, n_2+ik_2, n_3+ik_3$, 其中空气为 $n_0+ik_0, n_0=1, k_0=0$. 图2为用椭圆偏振法测量得到比色皿光学玻璃的光学常数^[6], 两层玻璃材质相同, 所以 $n_1+ik_1=n_3+ik_3$. R_1, R_2 为光线在透射方向传输时1, 2层玻璃的反射比, R'_1, R'_2 为光线在反射方向传输时1, 2层玻璃的反射比。

在已知玻璃光学常数(n_1+ik_1, n_3+ik_3)的条件下, 可通过光谱透过率测量利用1.2节介绍的双光程法获得中间介质层(待测样品)的光学常数(n_2+ik_2). 若把微藻混悬液等效为连续介质, 则可由上述方法测得等效的光学常数($n_{\text{eff}}+ik_{\text{eff}}$), 然后可根据等效吸收指数获得微藻混悬液的光谱衰减系数. 下面给出等效吸收指数与微藻光谱衰减系数的关系式. 微藻混悬液的光谱衰减系数表示为^[7]

$$\beta = (\alpha_p + \sigma_p - \varepsilon\sigma_p) + (1 - f_v)\alpha_m = \beta_p - \varepsilon\sigma_p + (1 - f_v)\alpha_m, \quad (1)$$

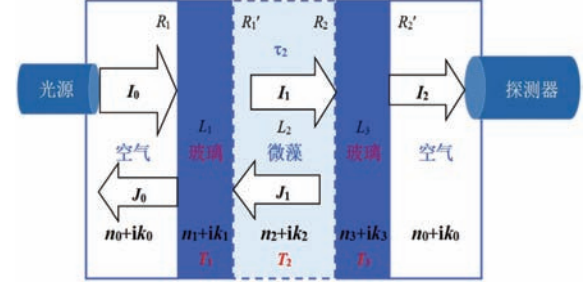


图1 (网络版彩色)三层介质光线追踪原理图

Figure 1 (Color online) Ray tracing schematic diagram of three layer system

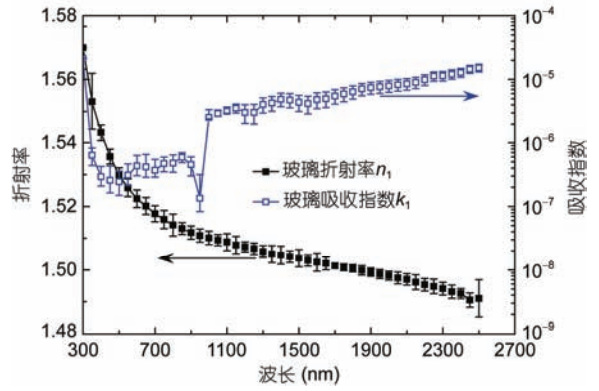


图2 (网络版彩色)比色皿光学玻璃的光学常数^[6]

Figure 2 (Color online) Optical constant for optical glass of cuvette^[6]

式中, β 为总光谱衰减系数, cm^{-1} ; α_p 为微藻光谱吸收系数, cm^{-1} ; σ_p 为微藻光谱散射系数, cm^{-1} ; $\beta_p = \alpha_p + \sigma_p$ 为微藻衰减系数, cm^{-1} ; α_m 为培养基吸收系数, cm^{-1} ; f_v 为微藻细胞的体积百分比; ε 为前向散射峰值修正

系数, 计算为: $\varepsilon = \frac{1}{2} \int_0^{\theta_c} \Phi_\lambda(\theta) \sin \theta d\theta$. 由于测量时微藻混悬液的浓度较低, 此时 $f_v \ll 1$. 此外, 前向散射峰修正系数 ε 与探测器的探测角度相关, 对于本研究的测量装置, 通过Henyey-Greenstein散射相函数分析计算表明 $\varepsilon = 0.013$ (探测器直径为2 mm, 它距离出射比色皿平面距离为200 mm, 其半接收角为 $\theta_c = 0.29^\circ$, 取小球藻典型非对称因子 $g = 0.97$), 因而散射修正对光谱衰减系数的影响在1%左右, 可以忽略. 此时, 式(1)可简化为

$$\beta = \beta_p + \alpha_m, \quad (2)$$

培养基溶液的光谱吸收系数可表示为

$$\alpha_m = \frac{4\pi k_m}{\lambda}, \quad (3)$$

式中, k_m 为培养基的吸收指数; λ 为波长, m. 以连续

介质作为比拟, 小球藻混悬液的等效光谱衰减系数计算为

$$\beta = \frac{4\pi k_{\text{eff}}}{\lambda}, \quad (4)$$

式中, k_{eff} 为小球藻混悬液的等效吸收指数.

1.2 计算原理

双光程法是把两个不同厚度的透射比方程联立:

$$T = f(n_1, n_2, n_3; k_1, k_2, k_3; L_1, L_2, L_3), \quad (5a)$$

$$T' = f(n_1, n_2, n_3; k_1, k_2, k_3; L_1, L'_2, L_3), \quad (5b)$$

式中, 只有 n_2 , k_2 是未知数, 可通过迭代求出小球藻混悬液及培养基的吸收指数, 进而得到小球藻混悬液的衰减系数和培养基的吸收系数, 结合公式(1)得到小球藻的衰减系数.

双光程法如图1中所示, 可建立如下方程组^[8]:

$$J_0 = I_0 R_1 + J_1 T_1, \quad (6)$$

$$J_1 = I_1 R_2 \tau_2, \quad (7)$$

$$I_1 = I_0 T_1 \tau_2 + J_1 R'_1 \tau_2, \quad (8)$$

$$I_2 = I_1 T_3, \quad (9)$$

总透射比可由方程组求解得出:

$$T = \frac{I_2}{I_0} = T_1 \tau_2 T_3 \frac{1}{1 - R'_1 R_2 \tau_2^2}, \quad (10)$$

其中, 光线在反射方向传输时第1层玻璃的反射比 R'_1 为^[9]

$$R'_1 = r_{21} + \frac{t_{21} t_{12} r_{10} e^{-2\alpha_1 L_1}}{1 - r_{12} r_{10} e^{-2\alpha_1 L_1}}, \quad (11)$$

光线在透射方向传输时第2层玻璃的反射比 R_2 为

$$R_2 = r_{23} + \frac{t_{23} t_{32} r_{30} e^{-2\alpha_3 L_3}}{1 - r_{32} r_{30} e^{-2\alpha_3 L_3}}. \quad (12)$$

第1, 2层玻璃的透射比分别表示为^[9]

$$T_1 = \frac{t_{01} t_{12} e^{-\alpha_1 L_1}}{1 - r_{10} r_{12} e^{-2\alpha_1 L_1}}, \quad T_3 = \frac{t_{23} t_{30} e^{-\alpha_3 L_3}}{1 - r_{32} r_{30} e^{-2\alpha_3 L_3}}, \quad (13)$$

液体透射率为

$$\tau_2 = e^{-\alpha_2 L_2}, \quad (14)$$

界面反射率可表示为^[10]

$$r_{ij} = \frac{(n_j - n_i)^2 + (k_j - k_i)^2}{(n_j + n_i)^2 + (k_j + k_i)^2}, \quad (15)$$

式中, i, j 分别代表界面两侧介质的序号. 对于弱吸收性介质, $k \ll n$, 则上式可以简化为

$$r_{ij} = \frac{(n_j - n_i)^2}{(n_j + n_i)^2}, \quad (16)$$

界面透射率表示为: $t_{ij} = 1 - r_{ij}$. 介质的吸收(衰减)系数 α_i 可以根据吸收指数 k_i 计算为

$$\alpha_i = \frac{4\pi k_i}{\lambda}. \quad (17)$$

1.3 实验测量

实验通过J.A.Woollam公司的V-VASE光谱型椭圆偏仪测量两个盛满小球藻混悬液的不同光程比色皿在可见光、近红外(300~1800 nm)连续光谱的透射比(垂直入射). 椭圆偏仪的实验测量温度为18℃, 测量压力为标准大气压. 实验用微藻为淡水小球藻, 培养基为BG11, 培养温度为20℃左右, 培养约一周时间. 图3为生物显微镜下的小球藻, 显微镜型号为UB203i-5.0M. 图4为FEI扫描电子显微镜下拍摄的小球藻. 从两图中可以看出小球藻的形状接近为椭球形, 且

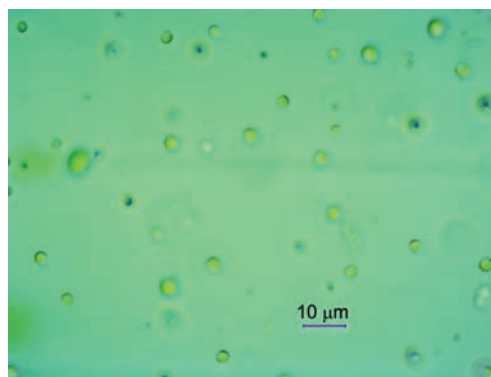


图3 (网络版彩色)小球藻光学显微照片

Figure 3 (Color online) Optical micrograph of Chlorellasp

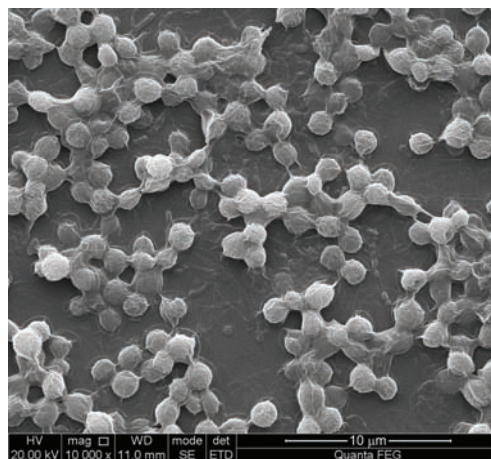


图4 扫描电子显微镜下的小球藻

Figure 4 Micrographs of Chlorellasp. obtained by scanning electron microscopy

直径为2~4 μm 左右,小球藻的浓度是通过血球计数板在生物显微镜下5次计数后取均值得到.实验中根据微藻的吸收特性选择的两个比色皿的测量厚度分别为 $L_2=1\text{ cm}$ 和 $L'_2=0.5\text{ cm}$.实验测量前,对待测微藻混悬液样本进行超声波分散,这可保证测量过程中微藻混悬液的均匀性.

2 结果与分析

2.1 方法验证与分析

首先对改进的双光程法测量液体介质衰减系数的准确性进行验证,这里以蒸馏水的光谱衰减系数为基准进行验证.蒸馏水的测量实验中,在300~1000 nm波段比色皿的测量厚度分别为 $L_2=10$ 和 $L'_2=5\text{ cm}$,在1000~1800 nm波段比色皿的测量厚度分别为 $L_2=5$ 和 $L'_2=3\text{ mm}$,水在可见光吸收较小,在近红外吸收较大是如此选择厚度间距的原因.图5为双光程法测得蒸馏水和在300~1800 nm波段的衰减系数与Segelstein^[11]的数据进行比较.在波段为300~1800 nm时,蒸馏水的吸收较大,散射相对较小,可忽略散射的影响,此时测得的衰减系数就近似为吸收系数.从图5中可看出蒸馏水吸收系数与文献数据吻合较好,在300~700 nm区间有一些小的偏差,分析可知是受到蒸馏水的生产质量和储存时间等因素影响.

2.2 小球藻混悬液衰减系数

图6为双光程法测得培养基和蒸馏水的吸收系数.从图中可知,培养基折射率比蒸馏水的稍大(随

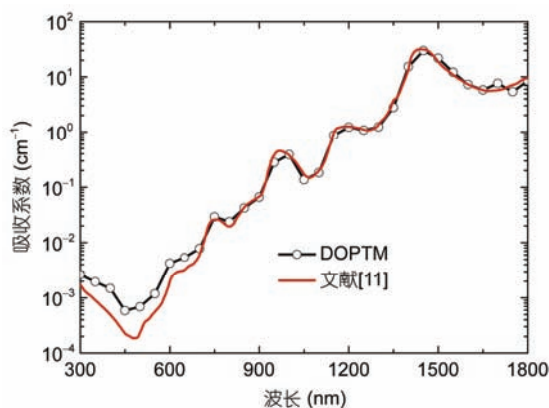


图5 (网络版彩色)蒸馏水吸收系数的双光程法与文献值^[11]

Figure 5 (Color online) DOPTM and literature value of absorption coefficient for distilled water^[11]

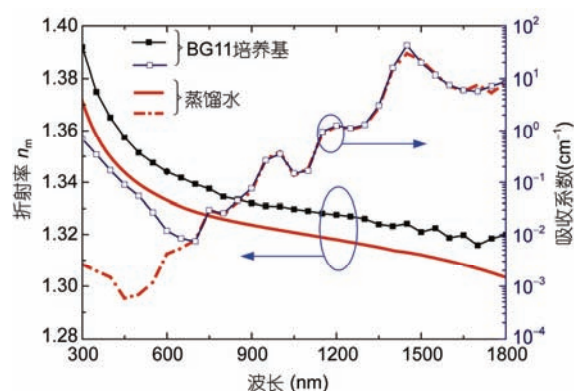


图6 (网络版彩色)培养基与蒸馏水的折射率 n_m 和吸收系数

Figure 6 (Color online) Refractive index and absorption coefficient of culture medium and distilled water

波长从1.39降至1.32),但两者整体变化趋势接近一致.在300~700 nm波段时培养基的吸收比蒸馏水大,在700~1800 nm波段时基本吻合,BG11培养基中含有的化学成分和土壤提取液是造成这一差异的主要原因.

图7和8给出了双光程法测量3种浓度 N 分别为 5.87×10^{12} , 2.95×10^{12} , 1.57×10^{12} 个/ m^3 的小球藻混悬液在300~1800 nm波段的光谱折射率、吸收指数和衰减系数.由图7中可得,3种不同浓度小球藻悬浮液的(等效)折射率在300~1800 nm波段从1.40降至1.33,且反演得到的折射率数值几乎不随浓度变化,吸收指数随着浓度变化显著.由于混悬液的吸收指数远小于折射率,由式(16)可知,玻璃和混悬液界面的反射主要由折射率不同所引起,说明利用混悬液等效光学常数与直接利用培养基光学常数进行进行界面反射(透射)计算是近似等价的,这也证明了基于等效光学参数的处理方式的合理性.从图8中可知,在300~1300 nm波段时,小球藻混悬液的光谱衰减系数随波长变化较明显且随着浓度的增大而增大;在1300~1800 nm波段时,小球藻混悬液衰减系数变化较剧烈且浓度对其的影响减弱,结合图6分析可知,培养基在此波段吸收较大,而小球藻吸收较小,所以浓度变化对衰减系数的影响较弱.

2.3 不同浓度小球藻衰减系数与衰减截面

基于已经得到小球藻混悬液的衰减系数 β 和培养基的吸收系数 α_m ,可利用公式(2)求得小球藻的衰减系数 β_p .图9给出了测得的3种不同浓度分别为 5.87×10^{12} , 2.95×10^{12} , 1.57×10^{12} 个/ m^3 的小球藻细胞在300~1800 nm波段的衰减系数变化曲线.随着波长的

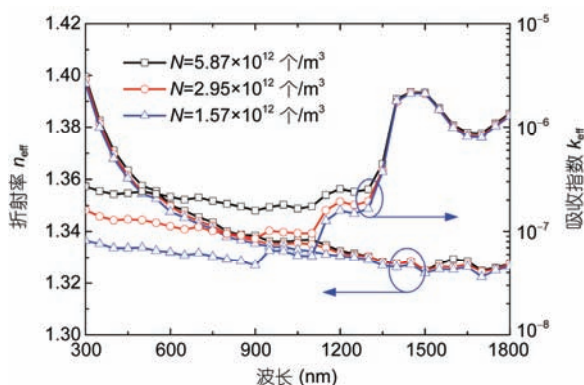


图7 (网络版彩色)不同浓度小球藻混悬液的折射率 n_{eff} 和吸收指数 k_{eff}
Figure 7 (Color online) Refractive index and absorption index of Chlorellasp. suspensions at different concentrations

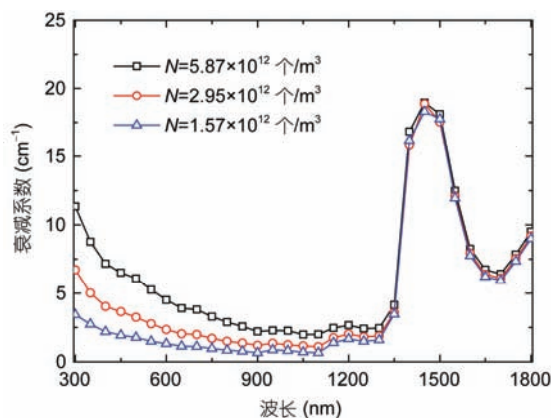


图8 (网络版彩色)不同浓度小球藻混悬液的衰减系数
Figure 8 (Color online) Extinction coefficient of Chlorellasp. suspensions at different concentrations

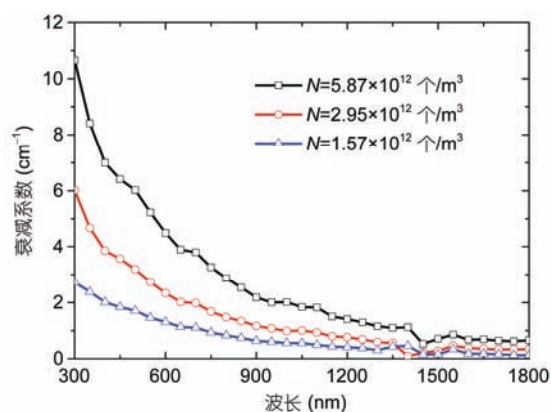


图9 (网络版彩色)不同浓度小球藻的衰减系数
Figure 9 (Color online) Extinction coefficient of Chlorellasp. at different concentrations

增大, 3种不同浓度小球藻的衰减系数逐渐减小且规律性较好. 在1400 nm附近出现衰减波谷, 结合图6可

知, 培养基在此波段吸收较大, 从而由公式(2)获得的小球藻衰减系数变小.

在已知藻细胞数密度 N 的情况下, 通过衰减系数可计算其单细胞光谱衰减截面为

$$C_{\beta} = \frac{\beta_p}{N}, \quad (18)$$

式中, C_{β} 为单细胞光谱衰减截面, m^2 ; N 为单位体积内的微藻细胞个数, $\text{个}/\text{m}^3$. 图10给出了3种不同浓度小球藻在300~1800 nm波段的光谱衰减截面. 可以看出, 3种不同浓度光谱衰减截面非常接近, 数值曲线在研究波段基本重合, 说明测得的光谱衰减截面不依赖于藻细胞浓度, 这也证明了测量结果的合理性.

3 结论

给出了一种可更准确测量微藻混悬液及微藻细胞衰减系数的改进双光程法, 该方法利用不同藻液光程的两个比色皿进行测试, 考虑多层介质间的多次反射, 有效地消除了由于界面引起的衰减效应. 基于所改进的双光程法, 对淡水小球藻细胞及藻液在可见光和近红外波段(300~1800 nm)的光谱衰减特性进行了实验研究, 获得了该波段内小球藻的单细胞光谱衰减截面. 在可见光300~700 nm波段, 本文使用的BG11培养基的折射率稍高于水, 光谱衰减系数显著高于蒸馏水, 而在大于700 nm波段时, BG11培养基的光谱衰减系数与蒸馏水基本相同. 文中获得小球藻混悬液等效折射率随浓度变化不明显. 在300~1300 nm波段时, 小球藻混悬液的光谱衰减系数随波长变化较明显且随着浓度的增大而增大, 在

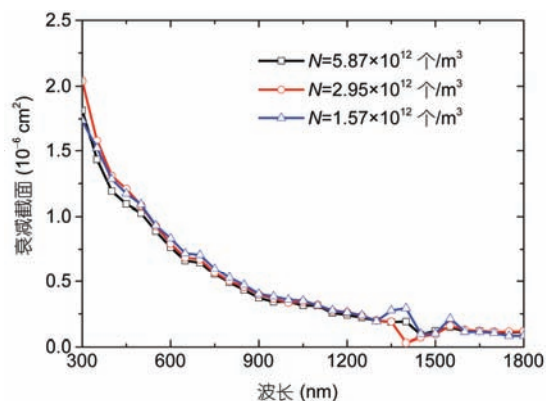


图10 (网络版彩色)不同浓度小球藻的衰减截面
Figure 10 (Color online) Extinction cross-section of Chlorella sp. at different concentrations

1300~1800 nm波段时, 浓度对其的影响减弱. 随着波长的增大, 3种不同浓度小球藻的衰减系数逐渐减小. 测得了小球藻的单细胞光谱衰减截面, 其数值与浓度无关, 证明了测量结果的合理性.

参考文献

- 1 Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 294–306
- 2 Tan H P, Liu L H, Yi H L, et al. Recent progress in computational thermal radiative transfer (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2627–2637 [谈和平, 刘林华, 易红亮, 等. 计算热辐射学的进展. *科学通报*, 2009, 54: 2627–2637]
- 3 Berberoglu H, Pilon L. Experimental measurements of the radiation characteristics of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-U and *Rhodospira rubra* ATCC 49419. *Int J Hydrogen Energ*, 2007, 32: 4772–4785
- 4 Yun Y S, Park J M. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. *Appl Microbiol Biot*, 2001, 55: 765–770
- 5 Large M C J, McKenzie D R, Large M I. Incoherent reflection process: A discrete approach. *Opt Commun*, 1996, 128: 307–314
- 6 Li X C, Zhao J M, Liu L H, et al. Optical properties of edible oils within spectral range from 300 to 2500 nm determined by double optical pathlength transmission method. *Appl Opt*, 2015, 54: 3886–3893
- 7 Pilon L, Berberoglu H, Kandilian R. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *J Quant Spectrosc Ra*, 2011, 112: 2639–2660
- 8 Li X C, Liu L H, Zhao J M, et al. Optical Properties of sodium chloride solution within the spectral range from 300 to 2500 nm at room temperature. *Appl Spectrosc*, 2015, 69: 635–640
- 9 Zhang Z M. *Nano Microscale Heat Transfer* (MgH 2007). New York: McGraw-Hill Professional, 2007
- 10 Stenzel O. *The Physics of Thin Film Optical Spectra: An Introduction*. New York: Springer, 2005
- 11 Segelstein D J. *The Complex Refractive Index of Water*. Kansas City: University of Missouri-Kansas City, 1981

Summary for “微藻光谱衰减特性测量的一种改进方法”

An improved method for determining optical extinction characteristics of microalgae

LI XingCan¹, ZHAO JunMing^{1*}, LIU LinHua^{1*} & ZHANG Lin²

¹ School of Energy Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

² College of Mechanical and Electrical Engineering, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

* Corresponding authors, E-mail: jmzhao@hit.edu.cn; lhliu@hit.edu.cn

The urgent demand to replace traditional fossil fuels has led to emergence of biofuels as feasible alternatives. Microalgae are considered to be one promising alternative source for biofuels. Light is regarded as one of the most vital factors which affecting the photosynthetic activity. Photobioreactors are used for cultivating microalgae which absorb light as energy source for their growth. The productivity of photobioreactors are confined by light transfer. The kinetic and mathematical models for microalgal photosynthesis or growth need accurate information about light attenuation and distribution in microalgal suspensions. An improved transmission method is proposed to obtain the spectral extinction characteristics of microalgae suspensions and cells in the paper. The light attenuation in the cell mixture suspensions is considered from the combined contributions of the culture medium and the microalgae. In measuring, the microalgae suspensions are considered to be well mixed. In this method, the optical constants of the glass (cuvette) are obtained at the first step. Then, the spectral extinction coefficient of the microalgae suspensions is retrieved using the two measured normal-normal transmittance based on a rigorous theoretical model considering multiple reflections and refractions at air-glass and glass-liquid interfaces. The improved method is demonstrated to provide good results of spectral extinction characteristics over the studied spectral range 300–1800 nm. The trend of the refractive index spectra of BG11 medium and distilled water are similar, which decreases from about 1.39 to 1.32 with the increasing wavelength. The absorption coefficient between culture medium and distilled water show significant difference in the spectral range 300–700 nm while exhibit small difference in the wavelength range 700–1800 nm. The difference is attributed to the different composition between culture medium and distilled water. The effective refractive index of *Chlorellasp.* suspensions varies little with increasing concentration. The spectral extinction coefficient of *Chlorellasp.* suspensions increases significantly with cell concentrations in the spectral range 300–1300 nm, but varies little in the spectral range 1300–1800 nm. This is attributed to the photosynthetic pigments of microalgae cells being more optically active in visible spectra than in the near-infrared spectra. In spectral range 1300–1800 nm, the spectral dependence of the total extinction coefficient is very close to the spectral dependence of the absorption index of the culture medium, indicating the total extinction coefficient of mixture suspensions is dominated by culture medium. The extinction coefficient and extinction cross-sections of *Chlorella sp.* decrease with the increase of wavelength. The measured extinction cross-sections of the microalgae cells are independent of cell concentrations. This work provide a viable reference for the accurate measurement of spectral extinction characteristics of microalgae and nano-particle suspensions.

double optical pathlengths method, microalgae, spectral extinction coefficient, spectral extinction cross-section

doi: 10.1360/N972016-00105