

荧光法测定浮游植物色素计算公式的修正

王 荣

(中国科学院海洋研究所)

一、前 言

利用植物色素的荧光特性用荧光光度计测定水体中叶绿素 a 及其降解产物的含量, 已成为现代海洋调查和许多生态学研究的重要手段。它较之传统的三波长分光光度计法有快速、灵敏和需水量小等特点; 它还可以不必过滤抽提直接测定生活细胞中的叶绿素 (*in vivo*)。这又对现场连续走航测量 (*in situ*) 和数据的自动化处理提供了极大方便。

1963年, Yentsch and Menzel^[10] 首先提出了利用荧光法测定海水中叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a 的方法。1966年, Lorenzen 使这一方法更趋完善^[4]。1972年, Strickland and Parsons 在那本著名的《实用海水分析手册》^[8]中, 以及1984年 Parsons 等重新整理编写的《海水化学和生物学分析手册》^[6]中, 有关荧光法测定叶绿素的章节都是采用 Lorenzen 的方法和计算公式。方法这里不再赘述, 其所用的两个计算公式为:

$$\begin{aligned} & \text{毫克} \cdot \text{叶绿素 a} / \text{米}^3 \\ & = F_d \frac{r}{r-1} (R_b - R_a) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} & \text{毫克} \cdot \text{脱镁叶绿素 a} / \text{米}^3 \\ & = F_d \frac{r}{r-1} (r R_a - R_b) \end{aligned} \quad (2)$$

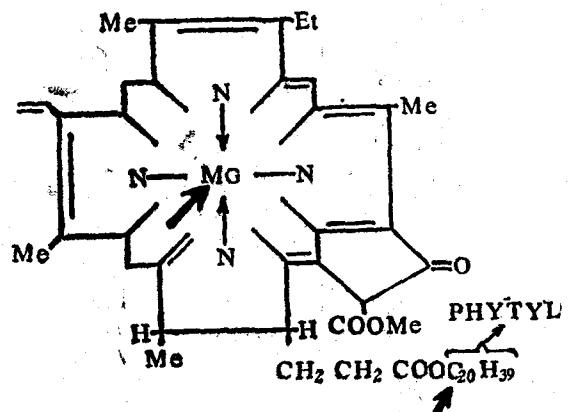
这里引用的是 Strickland 和 Parsons 给出的形式, 它们与 Lorenzen 的原始公式相同, 只是省去了与取样体积有关的因子, 表达更清楚

些。现在被广泛采用的也正是这个形式。R_b 为酸化前样品的荧光读数, R_a 为酸化后样品荧光读数, r 为纯叶绿素 a 的酸化比, F_d 是与所用仪器和选用的灵敏度等有关的换算因子, 等号左侧的浓度采用什么单位都可以, 但要与 F_d 一致。

上述两个公式中, (1) 式是正确的, (2) 式是错误的。它给出的不是脱镁叶绿素 a 的重量浓度, 而是与其分子浓度相等的叶绿素 a 的重量浓度。这造成了高于实际 50.8% 的误差。这不仅意味着过去二十年来用这一方法所得资料需要修正, 更重要的是在这些资料基础上得出的概念和推论需要重新考虑它的真伪。

二、叶绿素 a 的降解

由于海洋浮游植物中主要含叶绿素 a, 因而海洋学研究所采用的荧光光度计, 其光源、激发光与发射光滤光片的组合大都是专为

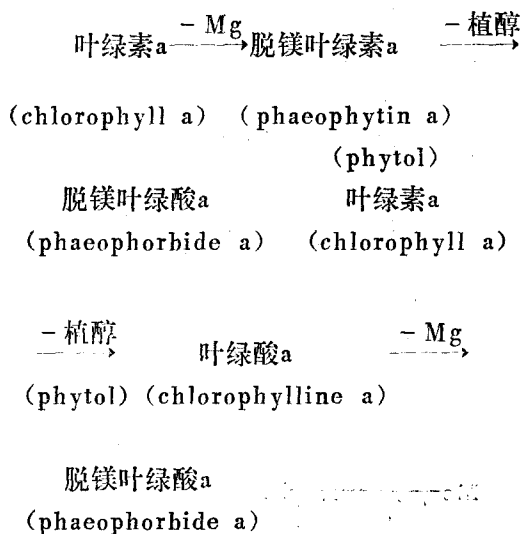


叶绿素 a 的结构图

The structure figure of chlorophyll a
(箭头所指处为降解时发生取代和断裂的位置)

测定叶绿素a所设置的。这里只讨论叶绿素a的降解和测定。叶绿素a的结构见结构图。

六十年代初,脱镁叶绿素a被认为是叶绿素a的主要降解产物。所以Yentsch and Menzel (1963),以及Lorenzen(1966)在计算公式中用的是脱镁叶绿素a这个名称。Strickland和Parsons在引用这一公式时改用了褐色素(Phaeopigment)这个更概念化的名称。这是一个没有严格组成和结构概念的名称。现已证实海水特别是有光层以下的深水中,和草食性浮游动物的粪便球中,脱镁叶绿素a是叶绿素a降解产物的主要形式。所以现在的资料中,包括Lorenzen自己在使用这一公式时都采用脱镁叶绿素a这一名称^[7]。海洋中的叶绿素a降解为脱镁叶绿素a被认为有两条可能的路线:



酸化法是一种间接方法,即利用酸化前后的荧光读数和叶绿素a的酸化比去推算叶绿素a和脱镁叶绿酸a的浓度。样品是混和的不能直接测定。公式(2)给出的是与降解产物分子浓度相当的叶绿素a的浓度(下面证明)。因此,不论降解产物采用什么名称对结果都没有影响。但当标明降解产物名称,并采用重量浓度时,差别就很大了。叶绿素a的分子量为893.48,而脱镁叶绿酸a因失去镁和植醇(或译作叶绿醇)这个长链,分子量降为592.67,仅为叶绿素a的66.33%。

三、公式的推导

荧光法的基本公式是:

荧光物质浓度 = 荧光强度 × 换算因子 (3)
 换算因子是用已知浓度所测荧光物质测定荧光读数求得的,也就是单位荧光读数相当的浓度。

一个样品,其中既含有叶绿素a也含有脱镁叶绿酸a。酸化前荧光读数(R_b)中包括两部分:叶绿素a产生的荧光值($R_{chl.b}$)和脱镁叶绿酸a所产生的荧光值($R_{pha.b}$),即:

$$R_b = R_{chl.b} + R_{pha.b} \quad (4)$$

同样也有:

$$R_a = R_{chl.a} + R_{pha.a} \quad (5)$$

R_a 为样品酸化后的荧光读数, $R_{chl.a}$ 和 $R_{pha.a}$ 分别为酸化后叶绿素a和脱镁叶绿酸a的荧光值。对于脱镁叶绿酸a讲,酸化比为1,故:

$$R_{pha.b} = R_{pha.a} \quad (6)$$

而根据酸化比的定义,

$$R_{chl.b} = r R_{chl.a} \quad (7)$$

或
$$R_{chl.a} = \frac{1}{r} R_{chl.b} \quad (8)$$

r 是纯叶绿素a的酸化比,其值约为2.2。在没有纯叶绿素a的情况下,也可以用指数生长期的硅藻培养液过滤抽提,用分光光度计测出叶绿素a的浓度,以代替纯叶绿素a,后者酸化比略低于2.2。

根据荧光方法的基本公式,叶绿素a的浓度(C_{chl})可用下式求得:

$$C_{chl} = F_d \cdot R_{chl.b} \quad (9)$$

现在检查公式(1)是否与此式一致。 F_d 是叶绿素a的换算因子。求法是:先用纯叶绿素a配成母液,再把母液稀释成一系列不同浓度的溶液并分别测定荧光读数,最后用直线回归法算出标定线的斜率,即 F_d 。根据式(4)和(5),

(1)式可写成:

$$C_{chl} = F_d \frac{r}{r-1} (R_{chl.b} + R_{pha.b} - R_{chl.a} - R_{pha.a})$$

$$\begin{aligned}
 &= F_d \frac{r}{r-1} (R_{chl.b} - R_{chl.a}) \\
 &= F_d \frac{rR_{chl.b} - R_{chl.b}}{(r-1)} \\
 &= F_d \frac{R_{chl.b}(r-1)}{(r-1)} \\
 &= F_d \cdot R_{chl.b}
 \end{aligned}$$

这与式(9)完全一致, 证明公式(1)的确给出了一个混和样品中叶绿素a的浓度。下面再分析一下公式(2)。

(2)式中的 $(rR_a - R_b)$ 实际上是样品中脱镁叶绿酸a与其相同分子浓度的叶绿素a的荧光差。由前述关系有:

$$\begin{aligned}
 rR_a - R_b &= r(R_{chl.a} + R_{pha.a}) \\
 &\quad - (R_{chl.b} + R_{pha.b}) \\
 &= rR_{pha.a} - R_{pha.b} \\
 &= R_{pha.b}(r-1) \quad (10)
 \end{aligned}$$

将(10)代入公式(2), 并以 C_{pha} 代表脱镁叶绿酸a浓度。

$$\begin{aligned}
 C_{pha} &= F_d \cdot \frac{r}{r-1} (r-1) R_{pha.b} \\
 &= F_d \cdot r R_{pha.b}
 \end{aligned}$$

其中 $r \cdot R_{pha.b}$ 等于样品中的脱镁叶绿酸a, 如果再转换成叶绿素a所应有的荧光值, 再乘以叶绿素a的转换因子 F_d , 就是与样品中脱镁叶绿酸a的分子浓度相等的叶绿素a的浓度。如果希望得到脱镁叶绿酸a的重量浓度, 则公式(2)必须加一个修正因子0.6633(脱镁叶绿酸a的分子量与叶绿素a的分子量之比值)。即:

$$C_{pha} = 0.6633 F_d \cdot \frac{r}{r-1} (rR_a - R_b) \quad (11)$$

(11)式的正确性还可从另一角度去证实。按基本公式, 脱镁叶绿酸a的浓度计算应如下式:

$$C_{pha} = F'_d \cdot R_{pha.b} \quad (12)$$

F'_d 为脱镁叶绿酸a的换算因子。现在看一看 F'_d 与 F_d 有什么关系。当用纯叶绿素a标定仪器时,

$$F_d = \frac{\text{试管内叶绿素a浓度}}{\text{叶绿素a的荧光强度}} = \frac{C_{chl}}{R_{chl.b}}$$

酸化后试管中的叶绿素a全部转化成脱镁叶绿

酸a, 其重量浓度为 $0.6633C_{chl}$, 荧光强度也

降为 $\frac{1}{r}R_{chl.b}$ 。因此,

$$\begin{aligned}
 F'_d &= \frac{\text{试管中脱镁叶绿酸a的浓度}}{\text{脱镁叶绿酸a的荧光强度}} = \frac{C_{pha}}{R_{pha.b}} \\
 &= \frac{0.6633C_{chl}}{\frac{1}{r}R_{chl.b}} \\
 &= 0.6633r \cdot \frac{C_{chl}}{R_{chl.b}} \\
 &= 0.6633r \cdot F_d \quad (13)
 \end{aligned}$$

又从(10)式知道,

$$R_{pha.b} = \frac{r}{r-1} (rR_a - R_b) \quad (14)$$

将(13), (14)代入(12)有:

$$C_{pha} = 0.6633 F_d \cdot \frac{r}{r-1} (rR_a - R_b)$$

此式与(11)式完全相同, 再次证实公式(2)必须要用0.6633这个因子修正。

四、讨 论

作者对Lorenzen这样知名的专家出现这一错误并长期未被发现不理解。为了慎重和弄清原委, 作者曾同仍在华盛顿大学执教的Lorenzen通信直接讨论这一问题。感谢他十分坦率也十分明确的肯定了作者对其计算方法的理解和他原始公式推导的正确性。他解释说: 之所以产生这样的问题是因为当时认为脱镁叶绿素a是叶绿素a的主要降解产物。二者的不同是前者用氢取代了镁, 分子量的变化不很大, 而现在知道脱镁叶绿酸a是主要降解产物, 偏差就大了。这种解释是不能令人满意的。因为即使脱镁叶绿素a仍被认为是主要降解产物, 公式的错误依然存在, 只有修正量小一些罢了。

在海洋学研究中叶绿素的资料除来自荧光法的测定外, 还有大量资料来自传统的三波长分光光度计法, 而叶绿素降解产物的资料几乎全部来自Lorenzen的荧光法, 或称酸化法。

这一错误意味着过去所有脱镁叶绿酸a的数据都高于实际值50.8%。Lorenzen承认这是个问题,不知如何解决好,他担心更正这一公式的错误将会产生一系列新资料,不便于同过去的资料比较。

资料的价值在于它的正确性和准确性。过去的资料是否更正另当别论,但必须指出错误,使曾经使用过这些资料的人和今后可能使用的人知道存在着很大的偏差。对于那些利用这些资料做出过什么分析、推断的人,则应重新考虑这些分析、推断的正确性。今后的资料当然应当按照正确的计算方法表达。为了便于比较,将错就错是不可取的。因为资料是要使用的,而严重失真的资料是不能用的。例如,目前在研究海洋生态系统能量与物质流动时,经常采用有机碳作为计算单位,因为浮游植物总有机碳量与叶绿素a含量有一定比例关系,又常用叶绿素a及脱镁叶绿酸a的量去推算由初级生产到次级生产的转换,或者推算上层生态系的有机物向底层转移的规模。高达50%的误差将使任何能量和物质收支概算成为不可能。

Lorenzen本人就吃了他自己错误计算的亏。他同Shuman合作研究草食浮游动物对叶绿素的降解时^[7],由于计算出的脱镁叶绿酸a的浓度远高于实际浓度从而得出了植物色素经过浮游动物的摄食和消化之后可以百分之百回收的结论。由于Lorenzen的学术地位,这一结论又被一些浮游动物生态学者盲目接受。更有甚者,把植物色素当作不受消化过程影响的指示物去测定浮游动物的同化率等^[3]。错误的计算结果导致了错误的结论,在错误结论的指导下又得出了一系列虚伪的实验结果。

作者是在从事桡足类摄食研究中^[9,2]发现这些问题并最后发现计算公式错误的。我们所有的实验都证明从粪便中回收到的叶绿素a和脱镁叶绿酸a分子浓度之和永远小于浮游动物摄入量。二者之差,即“损失”部分的大小,明显与摄食强度有关,或者说与消化程度有关。在我们的实验里,“损失”部分所占比例变动在6%到80%之间。当环境中食物浓度

高、摄食强度大、肠道内食物量大(意味着消化不充分)时,损失就小。在这种情况下不仅色素损失少,相当一部分色素仍以叶绿素a的形式存在于粪便中。在所谓“过渡摄食”的情况下,甚至在粪便中可发现活的浮游植物细胞。反之,摄食率很低,肠道内色素含量甚少(意味着消化充分),色素损失就大。很明显,叶绿素a在消化过程中,根据消化程度不同,有一部分会进一步降解、破坏或被吸收。这与Lorenzen的结论正相反。我们所做的实验结果是绝对可靠的,这就迫使我们仔细研究Shuman和Lorenzen的实验,核实他们的数据,终于发现问题出在计算公式的错误上。Lorenzen的结论是虚假的。他们的实验实际上存在着20%到48%的色素损失,平均33%,也就是说回收率只有66%。由于他不理解计算出的已经是与脱镁叶绿酸a分子浓度相等的叶绿素a的浓度,计算回收率时又多余地乘以叶绿素a与脱镁叶绿酸a分子量之比1.5076,使66%变成了99.5%,从而得出了100%转换的结论。灾难全在于那个错误的公式。

参 考 文 献

- [1] Conover, R. J., R. Durvasula, S. Roy and R. Wang, (submitted). Probable loss of chlorophyll-derived pigments during passage through the gut of zooplankton, and some of the consequences. *Limnol. Oceanogr.*
- [2] Head, E. J. H., R. Wang and R. J. Conover, 1984. Comparison of diurnal feeding rhythms in *Temora longicornis* and *Centropages hamatus* with digestive enzyme activity. *J. Plankt. Res.* 6:543-551.
- [3] Landry, M. R. et al., 1984. Effect of food acclimation on assimilation efficiency of *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.* 29:361-364.
- [4] Lorenzen, C. J., 1966. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.* 13:223-227.
- [5] Lorenzen, C. J. and S. W. Jeffrey,

1980. Determination of chlorophyll in sea water. *SCOR-UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci.* №35:20 pp.
- [6] Parsons, T. R., Y. Maita and C. M. Lalli, 1984. A Manual of chemical and Biological Method for Seawater Analysis. Pergamon Press, 173pp.
- [7] Shuman, F. R. and C. J. Lorenzen, 1975. Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore. *Limnol. Oceanogr.* 20:580—586.
- [8] Strickland, J. D. and T. R., Parsons, 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 167 (second edition): 301pp.
- [9] Wang, R. and R. J. Conover (submitted). Dynamics of gut pigment in the copepod *Temora longicornis* (Muller) and the determination of *in situ* grazing rates. *Limnol. Oceanogr.*
- [10] Yentsch, C. S. and D. W. Menzel, 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.* 10:221—231.

CORRECTION OF THE FORMULA TO CONVERT FLUORESCENCE MEASUREMENT TO PHAEOPHORBIDE a CONCENTRATION IN ACIDIFICATION METHOD

Wang Rong

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

In the acidification method for measuring chlorophyll a and phaeophorbide a the fluorescence readings are converted to pigments concentration using the formulae originally given by Lorenzen (1966), which were re-written in more simple and convenient form by Strickland and Parsons (1972). They are as follows:

$$\text{mg chlorophyll a/m}^3 = F_d \frac{r}{r-1} (R_b - R_a)$$

$$\text{mg phaeo-pigment/m}^3 = F_d \frac{r}{r-1} (rR_a - R_b)$$

These two formulae have been widely used for two decades in biological oceanography studies. As we know now that phaeophorbide a is almost the only degradation product present, which is abundant in water column and in herbivores fecal pellets. Recently we found, by rederivation, that Lorenzen's second formula gives not the weight concentration of phaeophorbide a but its equivalent (on molar basis) weight concentration of chlorophyll a. So the equation must be corrected by a factor of 0.6633, the ratio of molecular weight of phaeophorbide a to that of chlorophyll a. This means that all the phaeopigment data obtained earlier by this method are 50.8% higher than their real value. Though the error is systematic, it is too big that some wrong conception and wrong conclusion can be derived.

Based on their seriously deviated data Shuman and Lorenzen (1975) concluded that the conversion of chlorophyll a to phaeophorbide a after the digestion of herbivorous copepod was 100% on a molar basis. In fact their experiments showed a pigments loss as high as 34%. Furthermore, based on this wrong conclusion, plant pigments were used as tracers to study assimilation efficiency in copepods by some zooplanktologist. Our grazing experiments showed a pigments loss ranged from 6% to 80%, which is closely related with the digestion efficiency. When food was abundant in environment, ingestion rate and gut contents were high, the pigments loss would be small, and vice versa. It seems true that some of the pigments can be destroyed or absorbed during the passage through the gut of herbivores.