

快速测定藻类生物量的方法探讨

董正臻¹, 董振芳, 德文

(国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 对新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*) 藻细胞进行超声波破碎并离心, 用分光光度计在 672 nm 处测定其吸光度。这种方法与细胞计数法、叶绿素 a 含量测定法相比较, 既快速又准确, 且获得十分理想的线性相关性, 其测定的吸光度 A 值可以作为衡量藻类生物量的指标。

关键词: 新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*); 可见分光光度法; 超声波破碎; 生物量

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)11-0001-02

近年来, 随着工业废水和生活污水大量排入天然水域, 湖泊发生水花和海洋发生赤潮的频率越来越高, 带来的经济损失也越来越大, 于是, 对藻类的监控手段就显得尤为重要。通常, 反映藻类生物量的方法有细胞计数法和叶绿素 a 含量测定法, 但细胞计数法工作量大, 且重现性极差, 存在人为因素影响, 误差较大。而叶绿素 a 含量测定法操作相当繁琐, 耗费时间长, 不利于多样品的连续测定。为了得到一种既快速又准确的测定方法, 作者对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种: 实验所用的新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)、扁藻 (*Platymonas* spp.) 由山东水产集团公司海洋生态环境监测中心提供。

培养基: 采用 f/2 培养基。

主要仪器: 723 分光光度计、显微镜、高速离心机、电子天平、超净工作台、超声波发生器。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞计数法

采用血球计数板计数法^[1]。

1.2.2 叶绿素 a 含量测定法

为避免藻液研磨转移所带来的误差, 对藻液进行了直接提取, 用 90% 丙酮溶液对 2 种藻 (新月菱形藻和扁藻) 进行了提取试验。实验结果表明, 90% 丙酮溶液直接提取新月菱形藻 24 h 内能够提取完全, 扁藻 48 h 不能提取完全。于是选用新月菱形藻进行 24 h

提取试验, 考虑到脱镁叶绿素对测定的干扰, 采用 Lorenzen^[2]提出的单色分光光度法。

在不大于 50 kPa 压力下, 用混合纤维素酯微孔滤膜 (孔径 0.45 μm) 减压过滤藻液, 然后将滤膜放入 10 mL 具塞离心管, 加入 90% 丙酮溶液 10 mL, 定时充分振荡, 放置冰箱内提取 24 h。提取完毕后用离心机在 3 000~4 000 r/min 下离心 10 min, 移取上清液于 1 cm 石英比色皿中, 用 723 型可见分光光度计测定 663 nm 和 750 nm 处得吸光度, 然后向比色皿中加入 1 滴 1 mol/L HCl 酸化溶液^[3], 在 90 s 后再次测定波长为 665 nm 和 750 nm 的吸光度, 其中均以 90% 丙酮溶液作参比, 由 Lorenzen 公式^[4]的修正式计算出叶绿素 a 含量。

计算公式: $C_{chl a} = 26.73(A_b - A_a)EF/VL$

式中, $C_{chl a}$ 为样品中叶绿素 a 含量 (μg/L); E 为定容体积 (mL); F 为稀释倍数 (如果提取液需要稀释); V 为水样体积 (L); L 为比色皿厚度 (cm); A_b 为酸化前 663 nm 与 750 nm 波长处吸光度之差; A_a 为酸化后 665 nm 与 750 nm 波长处吸光度之差。

1.2.3 可见分光光度法

(1) 把正常生长条件下的新月菱形藻液摇匀, 用

收稿日期: 2003-04-30; 修回日期: 2003-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40136020)

作者简介: 董正臻 (1978-), 男, 硕士, 主要从事环境化学与赤潮生化机制研究, E-mail: qishi7809@sina.com

移液管准确移取 5 mL 于 10 mL 具塞离心管中。

(2) 调节超声波频率及功率, 使强度适中, 绘制超声波破碎藻细胞的时间 (T) - 吸光度 (A) 曲线, 找出藻细胞完全破碎的时间 T (min)。

(3) 将藻液破碎后, 盖上离心管的塞子, 在离心机中于 3 000~ 4 000 r/min 下离心 10 min。

(4) 取出上清液, 小心倒入 1 cm 石英比色皿中, 以培养液作参比, 用 723 分光光度计全波长范围内对藻液进行扫描, 确定 600~ 700 nm 最佳吸收波长 (672 nm), 测定吸光度 A 值。

2 结果与分析

2.1 几种测定方法之间的线性相关性分析

根据以上 3 种测定方法的结果 (表 1), 对藻液吸光度、细胞密度及叶绿素 a 含量之间的相互关系进行线性回归分析。

表 1 各藻液的测定值

Tab. 1 The data of algae solutions

| 序号 | 细胞密度 ($\times 10^6/\text{mL}$) | 叶绿素 a 含量 ($\mu\text{g}/\text{L}$) | 吸光度 A |
|----|-------------------------------------|--|---------|
| 1 | 0.79 | 260.28 | 0.031 |
| 2 | 1.19 | 353.24 | 0.042 |
| 3 | 1.58 | 479.23 | 0.057 |
| 4 | 2.01 | 580 | 0.069 |
| 5 | 2.32 | 682.27 | 0.082 |
| 6 | 3.24 | 878.32 | 0.104 |

藻液 A 值 (X) 与细胞密度 (Y) 间的线性关系:

$$Y = 32.554 \times 10^6 X - 0.2339 \times 10^6$$

$$r = 0.9965$$

藻液 A 值 (X) 与叶绿素 a 含量 (Y) 间的线性关系:

$$Y = 84181X - 1.2716$$

$$r = 0.9998$$

叶绿素 a 含量 (X) 与细胞密度 (Y) 间的线性关系:

$$Y = 0.0039 \times 10^6 X - 0.2309 \times 10^6$$

$$r = 0.9976$$

由以上可以看出, 线性回归分析的相关系数均大于 $r_{0.01} = 0.917$, 说明相关性极显著, 几种方法的测定结果有明显的可比性。

2.2 几种测定方法的结果比较

将细胞计数法和可见分光光度法的测定结果换算成叶绿素 a 含量, 再对 3 种测定方法的结果进行对比 (图 1)。很明显, 可见分光光度法与叶绿素 a 含量测定法的测定结果最接近。

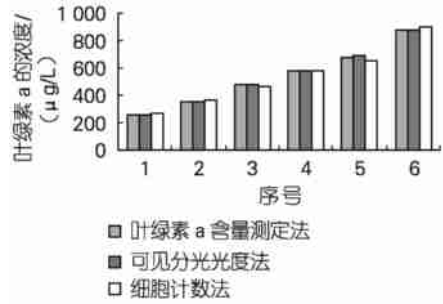


图 1 3 种测定方法的结果比较

Fig. 1 Comparison on the result of three measuring methods

2.3 可见分光光度法与基本测定方法的比较

细胞计数法和叶绿素 a 含量测定法是藻类生物量测定的基本方法, 是确定其它测定方法有效性的依据, 用这 2 种方法测得的藻液细胞密度和叶绿素 a 含量可以作为藻类生物量的指标。但细胞计数法只有在细胞处于旺盛生长的对数生长阶段, 藻的生物量才与数目之间呈完全正比关系, 而且人为误差较大。叶绿素 a 含量测定法耗时间长, 不利于连续测定。

通过几种测定方法间的线性相关性分析, 可以很清楚地看到, 采用可见分光光度法测定藻的生物量, 与前述 2 种基本测定方法有很好的—致性, 采用这种测定方法所测得的藻液吸光度 A 值在一定条件下可以作为衡量藻类生物量的指标, 在研究工作中具有非常重要的作用, 有较大的实用价值。

采用可见分光光度法测定藻类生物量, 克服了藻细胞浊度法测定时受浊度影响大, 且由于藻细胞下沉导致吸光度 A 值处于连续变化下降中的缺点。操作简单、耗时短、结果重现性好, 特别适于连续监测, 是一种非常简便、有效的测定方法。

3 结论

采用可见分光光度法测定藻类生物量, 方法简便、结果可靠, 可以替代基本测定方法, 有很大的实际应用价值。这种测定方法的应用条件是藻密度适当, 藻液中无干扰测定的有色物质。实验室应用中藻密度一般较大, 采用可见分光光度法更方便、准确。

参考文献:

- [1] 周群英, 高延耀. 环境工程微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 292-293.

(下转第 5 页)

(上接第 2 页)

[2] Lorenzen C.J. Determination of chlorophylls and phaeopigments: spectro- photometric equations[J]. *Limnol Oceanogr*, 1965, 12: 343- 346.

[3] Rai H. Methods involving the determination of photosynthetic pigments using spectrophotometry[J]. *Limnol Oceanogr*, 1973, 18: 1 864- 1 875.

[4] 金相灿. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 268- 270.

A method of quick determination of algal biomass

DONG Zheng- zhen, DONG Zhen- fang, DING De- wen
(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China)

Received: Apr. 30, 2003

Key words: *Nitzschia closterium*; visible spectrophotometry; ultrasonic shattering; biomass

Abstract: A new method was tested in the study. It determines *Nitzschia closterium* biomass by visible spectrophotometry that measures the absorbance value at 672 nm on the sample treated by ultrasonic shattering and centrifuging. Compared with cell counting and chlorophyll-a concentration measures, the visible spectrophotometry is quick and reliable. In addition, it shows a very good linear interrelations between them. The A value, index of absorbance, can be used as an indicator of algal biomass.

(本文编辑: 张培新)