

浮游植物叶绿素 a 含量简易测定方法的比较

杨彩根^{1,2}, 宋学宏^{1,2}, 孙丙耀²

(1. 苏州大学 水产研究所, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 用乙醇、DMF (N, N-二甲基甲酰胺)、丙酮 3 种不同有机溶剂分别萃取苏州环城河水样中的浮游植物细胞叶绿素 a, 在分光光度计上测定其叶绿素 a 含量, 试验数据经方差分析、*Q* 检验, 结果显示, 乙醇法、DMF 法的叶绿素 a 萃取率极显著高于丙酮 ($F=54.20 > F_{0.01(2,18)}(6.01)$)。另用这 3 种萃取方法分别测定无常蓝纤维藻 (*Dactylococcopsis irregularis*) 纯培养液叶绿素 a 含量, 通过直线回归, 同样证明乙醇法、DMF 法重复率较高, 稳定性好, 萃取率高。从安全、简便、重复性高等方面综合考虑, 认为用乙醇萃取法是目前水域环境中浮游植物叶绿素 a 简易测定的最佳方法。

关键词: 浮游植物; 叶绿素 a; 有机溶剂; 萃取

中图分类号: Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)01-0006-04

浮游植物叶绿素 a 含量作为估算水体浮游植物生物量的重要指标^[1-3], 在水域环境生物学研究及渔业初级生产力调查中已被广泛应用。浮游植物叶绿素 a 含量的测定方法主要有分光光度法、荧光法、高效液相色谱 (HPLC) 法^[4], 最近, 还有水色传感器 SeaWiFS 遥感法^[5]、机载海洋激光雷达测量叶绿素 a 浓度^[6]的报道。其中, 分光光度法因其具有操作简便、可靠性强的特点而被广泛采用。目前, 采用分光光度法测定叶绿素 a 时, 用来萃取叶绿素 a 的有机溶剂主要有丙酮^[7]、乙醇^[8]和 DMF (N, N-二甲基甲酰胺)^[9]等 3 种。丙酮萃取法应用较早, 因而被较多地采用^[1-4,7]。但是, 以丙酮为萃取溶剂常导致滤膜溶解, 给后续的过滤和测定带来困难, 因而, 乙醇和 DMF 被用来替代丙酮作为萃取叶绿素 a 的有机溶剂。目前, 有关这 3 种萃取方法的比较研究鲜见报道, 为了筛选出测定结果准确率、稳定性、灵敏度和重复性等较优的适于水体浮游植物叶绿素 a 测定的萃取方法, 作者进行了上述 3 种萃取方法的比较试验, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 水样来源、保存与抽滤

水样分别取自河道自然水体及无常蓝纤维藻

(*Dactylococcopsis irregularis*) 纯培养液。其中河道水样取自苏州环城河 7 个不同地段。纯培养液是作者所在的实验室培养的生长高峰期的无常蓝纤维藻液, 用双蒸水按体积分数稀释成 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14% 7 个等级。

每升水样加 1% MgCO₃ 悬浊液 1 mL, 以防酸化。抽滤水样为 600 mL。抽滤滤膜采用国产醋酸纤维滤膜 (0.45 μm)。抽滤前滤膜上加 0.2g MgCO₃ 和 10 mL 蒸馏水, SHZ-DIII 型循环水式真空泵抽滤得浮游植物细胞。测试试剂均购于上海国药集团。

1.2 样品处理

抽滤完毕, 样品分别按以下 3 种方法萃取, 每个浓度每种方法均重复 3 次。

丙酮法: 将具样品的滤纸剪碎放入盛有 5 mL 90% 丙酮的研钵中研磨, 至浮游植物细胞大部分破碎, 充分转移入具塞刻度试管, 在冰箱 4℃ 下黑暗静置 16h

收稿日期: 2005-06-20, 修回日期: 2006-02-28

基金项目: 苏州市农业科技招标项目 (ZN0308)

作者简介: 杨彩根(1965-), 男, 江苏苏州人, 理学学士, 高级实验师, 主要从事渔业资源环境调查教学与科研; 孙丙耀, 通讯作者, E-mail: sunbingyao@suda.edu.cn

(萃取), 然后于 80-2 型台式离心机 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液定容至 10 mL 待测。

乙醇法: 抽滤后样品转入具塞刻度试管迅速转移至冰箱冷冻室 -20 °C 冷冻过夜, 取出后立即加入预热 (80 °C) 的 10 mL 95% 乙醇萃取, 并在 HH-W21 型恒温水浴锅中 80°C 萃取 2 min, 紧接着在 KS-1200 型超声波细胞粉碎仪上 (冰浴中) 进行浮游植物细胞粉碎 (300W, 3, 5, 50s), 在冰箱 4°C 下黑暗静置 4 h 后于 80-2 型台式离心机 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

DMF 法: 将抽滤后的样品放入装有 10 mL DMF 溶液的具塞刻度试管中, 并不停摇动直至全部溶于 DMF 液中, 然后在冰箱 4 °C 下黑暗静置 12 h, 进行萃取, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

1.3 测定方法

丙酮法与乙醇法的样品测定方法相同, 即在 UV755B 紫外分光光度计上, 用光径 1 cm 比色皿于波长 665 nm 和 750 nm 处测吸光值, 然后加 3 滴 1 mol/L 盐酸酸化, 1 min 后于波长 665 nm 和 750 nm 处再测吸光值。DMF 法样品测定方法是在光径 2 cm 的比色皿中读取波长 625, 647, 664, 750 nm 处吸光值。

1.4 计算公式

丙酮法测定的叶绿素 a 质量浓度的计算公式为:

$$c(\text{Chl-a}_{\text{丙酮}}) = 27.3 \times [(A_{665,A} - A_{750,A}) - (A_{665,B} - A_{750,B})] \times V_{\text{丙酮}} / v_{\text{水样}}$$

式中, $c(\text{Chl-a}_{\text{丙酮}})$ 为丙酮法测定的叶绿素 a 质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); $A_{665,A}$, $A_{750,A}$ 分别为丙酮萃取液酸化前于波长 665 nm 和 750 nm 处的吸光值; $A_{665,B}$, $A_{750,B}$ 分别为丙酮萃取液酸化后于波长 665 nm 和 750 nm 处的吸光值; $V_{\text{丙酮}}$ 为丙酮萃取液体积 (mL); $v_{\text{水样}}$ 为抽滤

的水样体积 (L)。

乙醇法测定的叶绿素 a 质量浓度计算公式为:

$$c(\text{Chl-a}_{\text{乙醇}}) = 27.9 \times [(A_{665,A} - A_{750,A}) - (A_{665,B} - A_{750,B})] \times V_{\text{乙醇}} / v_{\text{水样}}$$

式中, $c(\text{Chl-a}_{\text{乙醇}})$ 为乙醇法测定的叶绿素 a 质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); $A_{665,A}$, $A_{750,A}$ 分别为乙醇萃取液酸化前于波长 665 nm 和 750 nm 处的吸光值; $A_{665,B}$, $A_{750,B}$ 分别为乙醇萃取液酸化后于波长 665 nm 和 750 nm 处的吸光值; $V_{\text{乙醇}}$ 为乙醇萃取液体积 (mL); $v_{\text{水样}}$ 为抽滤的水样体积 (L)。

DMF 法测定的叶绿素 a 质量浓度计算公式为:

$$c(\text{Chl-a}_{\text{DMF}}) = (12.65A_{664} - 2.99A_{647} - 0.04A_{625}) \times V_{\text{DMF}} / 2v_{\text{水样}}$$

式中, $c(\text{Chl-a}_{\text{DMF}})$ 为 DMF 法测定的叶绿素 a 质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); A_{664} , A_{647} 和 A_{625} 分别为 DMF 萃取液于波长 664, 647 和 625 nm 处的吸光值; V_{DMF} 为 DMF 萃取液体积 (mL); $v_{\text{水样}}$ 为抽滤的水样体积 (L)。

1.5 数据分析

直线回归、方差分析与 Q 检验的方法进行分析。

2 结果

表 1 显示河道 (苏州环城河) 自然水体中浮游植物叶绿素 a 测定结果。将表 1 中 3 种方法测定的叶绿素 a 质量浓度数据进行单因子方差分析, 得 $F=54.20$, 远大于 $F_{0.01(2,18)}(6.01)$, 因此, 存在极显著的差异。再进行显著性检验 (Q 检验), 结果显示, 乙醇法、DMF 法与丙酮法测定的叶绿素 a 平均质量浓度之差 (11.72, 11.56 $\mu\text{g/L}$) 大于 $LSR_{0.01}(5.42)$, 即乙醇法与 DMF 法的叶绿素 a 萃取率均极显著地高于丙酮法, 但是乙醇法与 DMF 法差异不显著。

表 1 3 种不同萃取法测定的苏州环城河自然水体浮游植物叶绿素 a 质量浓度

Tab. 1 Contents of Chl-a extracted from phytoplankton in natural water of Suzhou moat by ethanol, DMF and acetone extractions

萃取方法	叶绿素质量浓度 ($\mu\text{g/L}$)						
	采样点						
	1	2	3	4	5	6	7
丙酮法	18.20	25.25	28.67	17.36	18.42	14.79	17.30
DMF 法	28.26	35.23	41.13	24.32	28.76	26.97	23.66
乙醇法	28.79	35.41	43.94	25.50	29.60	28.03	25.89

7 个浓度级无常蓝纤维藻纯培养液分别通过丙酮法、DMF 法和乙醇法 3 种方法测定浮游植物叶绿

素 a 质量浓度, 浮游植物叶绿素 a 质量浓度的结果见图 1。从图中可以看出, 3 种测定方法所测得的叶绿

素 a 质量浓度中乙醇法最高, 其次是 DMF 法和丙酮法。而且, 从平行的数据中可以发现乙醇法、DMF 法重复率较高, 稳定性好。

用直线回归的方法将 3 种萃取方法所得叶绿素 a 质量浓度与水样稀释度之间进行直线回归, 得回归方程:

$$Y_{乙醇}=44.89X-34.776 \quad R=0.9957 > \lambda_{0.01} (\lambda_{0.01}=0.990)$$

$$Y_{DMF}=38.95X-27.679 \quad R=0.9936 > \lambda_{0.01} (\lambda_{0.01}=0.990)$$

$$Y_{丙酮}=29.226X-28.323 \quad R=0.9821 > \lambda_{0.05} (\lambda_{0.05}=0.950)$$

从方程式中的相关系数也可以看出, $R_{乙醇} > R_{DMF} > R_{丙酮}$, 乙醇法、DMF 法与丙酮法萃取的效果存在显著差异, 乙醇法、DMF 法明显优于丙酮法, 而乙醇法有优于 DMF 法的趋势, 但二者之间差异不显著。

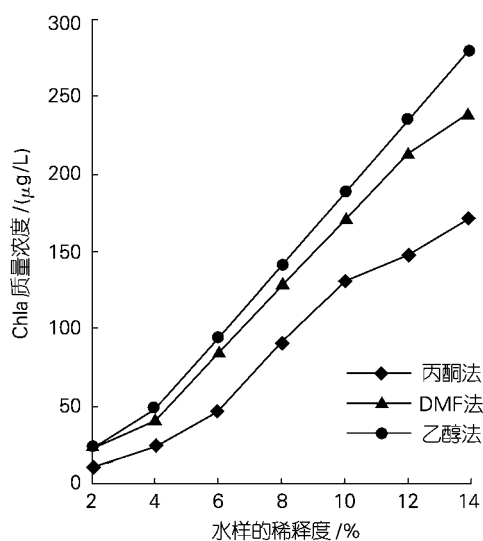


图 1 乙醇法、DMF 法和丙酮法测定的实验室纯培养液浮游植物叶绿素 a 质量浓度

Fig. 1 Contents of Chl-a extracted from phytoplankton in cultured water by ethanol, DMF and acetone extractions

3 讨论

3.1 不同萃取方法的叶绿素 a 的萃取效率

作者对实验室培养藻类的测定结果显示, 乙醇法和 DMF 法的萃取效率显著地高于丙酮法的效率。自然水体浮游植物叶绿素 a 测定结果同样证实了乙醇法和 DMF 法的萃取效果显著优于丙酮法。叶绿素 a 的萃取效率常受浮游植物细胞破碎程度影响, 丙酮法

采用研磨破碎浮游植物细胞, 不容易将浮游植物细胞完全磨碎, 影响到叶绿素 a 的萃取效率; 同时, 国内生产的醋酸纤维微孔滤膜在丙酮中完全溶解, 对分光光度计吸收值测定有影响, 也就影响了叶绿素 a 质量浓度的测定结果^[10]。乙醇萃取法先利用冷热处理破碎细胞, 再经超声波进一步破细胞处理, 因而叶绿素 a 的萃取较完全, 同时醋酸纤维微孔滤膜不溶于乙醇, 对测定结果不会有影响。DMF 法利用 DMF 的强渗透性来破碎浮游植物细胞, 无需研磨, 只浸泡 6~12 h 即可萃取完全^[9], 本实验也取得较好的萃取效果。但当水样中的叶绿素 a 质量浓度大于 84.232 µg/L 时, DMF 溶液的萃取率低于乙醇的萃取效率。同时, 从样品的 3 个重复测定的结果看, 乙醇法与 DMF 法的重复效果也明显优于丙酮法。因此, 从叶绿素 a 的萃取效率看, 乙醇法与 DMF 法均比丙酮法有效。

3.2 不同萃取方法对叶绿素 a 萃取的易操作性和安全性

从叶绿素 a 的萃取效率看, 乙醇法与 DMF 法均比丙酮法有效。从实验的易操作性分析, 丙酮法的测定过程比较繁杂, 其中样品磨碎费工费时, 手工研磨后细胞破碎不完全, 且转移细胞破碎液时易损耗样品, 也不适于大批量样品的操作。乙醇法与 DMF 法的操作较简便, 样品不需转移, 无损耗。

DMF 渗透性强, 对人体皮肤有害; 丙酮的挥发性极强, 对人体的毒害远大于乙醇, 长期使用对操作者的毒害较大。从对操作人员的安全性角度考虑, 也应尽可能以乙醇作为萃取叶绿素 a 的有机溶剂。因此, 3 种萃取方法中乙醇法最安全, 乙醇法正替代丙酮法而得到广泛的应用^[7]。

综上所述, 采取乙醇萃取的分光光度法测定浮游植物叶绿素 a 质量浓度操作简便、快捷、毒害低、萃取完全、重复性好。建议在湖泊渔业及水环境监测领域采用乙醇萃取法。

参考文献:

- [1] 美国公共卫生协会. 水和废水标准检验法(第 15 版)[M]. 宋仁元, 张亚杰, 王维, 等译. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985.901-904.
- [2] 金相灿, 屠清英. 湖泊富营养化调查规范(第 2 版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.268-270.
- [3] 黄祥飞. 湖泊生态调查观测与分析[M]. 北京: 中国标准出版社, 1999. 77-79.
- [4] 刘仁沿, 傅云娜, 贺广凯, 等. HPLC 方法分析表层海水叶

- 绿素 a 含量[J].海洋通报, 2004,23(4): 75-78.
- [5] 曾银东, 商少凌, 张彩云, 等. 南海东北部基于标准经验算法的遥感叶绿素 a 反演结果比较分析[J]. 海洋科学, 2004, 28(8): 14-18.
- [6] 贺岩, 吴东. 机载海洋激光雷达测量叶绿素 a 浓度、悬移质浓度和浅海深度的性能估计[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 649-654.
- [7] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991.345-348.
- [8] Nusch E A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination[J]. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*, 1980,14: 14-36.
- [9] 戴玉蓉, 卢敬让. 养殖水体浮游植物叶绿素 a 的简易测定[J]. 齐鲁渔业, 1997, 14(2):25-26.
- [10] 陈宇炜, 高锡云. 浮游植物叶绿 a 含量测定方法的比较测定[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 185-188.

Comparison of simple methods for extraction and measurement of phytoplanktonic Chlorophyll-a

YANG Cai-gen^{1,2}, SONG Xue-hong^{1,2}, SUN Bing-yao²

(1. Fisheries Research Institute, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Received: Jun., 20, 2005

Key words: phytoplankton; chlorophyll-a; organic solvents; extraction

Abstract: Chlorophyll-a (Chl-a) concentration is generally used as an estimate of phytoplankton biomass. Based on the fact that Chl-a is soluble in organic solvents and absorbs light at certain wavelengths, Chl-a concentration can be measured by the classic spectrophotometric method. Water samples were collected from moat river in Suzhou to determine phytoplanktonic Chl-a concentrations. The extractions of Chl-a with ethanol, DMF (dimethyl sulfoxide) and acetone were carried out, respectively, and the Chl-a concentration was measured spectrophotometrically. The data were analyzed by analysis of variance followed by Q test. The results show that the efficiencies of Chl-a extraction with ethanol and/or DMF are significantly higher than that with acetone ($F=54.20 > F_{0.01(2,18)}(6.01)$). Additionally, pure cultures containing *Dactylococcopsis shinensis* were also used to determine Chl-a contents, the results analyzed by linear regression supported that extractions with ethanol and/or DMF were more excellent than that with acetone in repeatability, stability and efficiency. When safety, convenience, and repeatability involved in the extraction and measurement procedures were taken into consideration, we suggest that ethanol be the optimal solvent for extracting phytoplanktonic Chl-a.

(本文编辑: 张培新)