

# 酸-碱滴定法测定海洋浮游植物细胞表面积\*

王修林 马延军 李继亮 郁纬军 孙汉章

(青岛海洋大学, 青岛 266003)

**提要** 1995年改进了浮游植物表面面积的酸碱滴定测定法, 其中应用改进 BET 方程对酸滴定曲线拟合求最大表面酸量, 由此测定了 18 种海洋浮游植物(包括 8 种绿藻, 7 种硅藻, 2 种甲藻, 1 种红藻)的细胞表面积。结果表明, 该方法精密度为 15.2%, 所测定的 18 种海洋浮游植物的表面积为  $2.78 \times 10^{-8}$ — $6.9 \times 10^{-6} \text{m}^2$ , 变异系数为 0.9%—31.3%, 较传统的用光 / 电子显微镜粗略估算的方法, 更为精确, 并且设备简单, 操作方便。

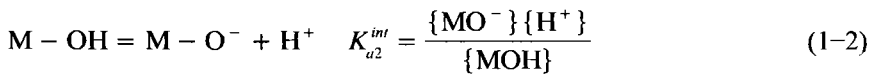
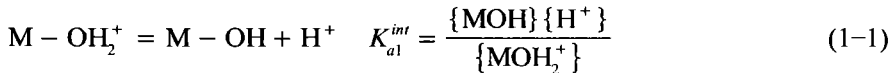
**关键词** 海洋浮游植物 表面积 酸碱滴定

疏水性有机物 (Hydrophobic Organic Chemicals, HOCs), 具有稳定的化学性质, 不易降解, 易在浮游植物中生物富集, 这在很大程度上决定着海水中 HOCs 的迁移、循环以及对海洋生态系的影响 (Kuhn et al., 1990)。因此, 许多作者已认识到, 浮游植物表面积是影响其生物富集能力的主要因素 (Rice et al., 1973; Swackhamer, 1991)。但是, 目前只能利用光 / 电子显微镜技术粗略估算细胞表面积 (Rice et al., 1973; Fisher et al., 1983)。

Wang 等 (1993) 首次应用酸-碱滴定法测定了 9 种海洋浮游植物细胞的表面积, 其中最大表面酸 / 碱量是由碱 / 酸返滴实验得到。在此基础上, 本文改进了最大表面酸量的测定方法, 即由浮游植物细胞表面酸滴定曲线, 根据改进 BET 方程求算最大表面酸量, 并应用该方法测定了 18 种海洋浮游植物的细胞表面积, 为研究浮游植物细胞表面积与生物富集因子之间的定量关系奠定了基础。

## 1 原理

实际上, 水中浮游植物细胞壁由于键合  $\text{H}_2\text{O}$  分子, 所产生的具有 Brönsted 酸性质的表面羟基 (Hecky et al., 1973) 与水合矿物表面 (如氧化物、粘土等) (Wang et al., 1991) 相似, 这样, 也可将细胞表面水化层作为“颗粒态二元酸”处理:



其中,  $K_{a1}^{in}$  和  $K_{a2}^{in}$  为颗粒内禀酸度常数;  $\{\text{MOH}_2^+\}$  和  $\{\text{MO}^-\}$  分别为颗粒表面酸和碱量。假

\* 国家自然科学基金资助项目, 49376271号。王修林, 男, 出生于1960年6月, 教授。

收稿日期: 1995年9月3日, 接受日期: 1997年3月18日。

定表面  $H^+$  浓度  $\{H^+\}$  与溶液  $H^+$  浓度  $[H^+]$  关系遵循 Boltzman 方程:

$$\{H^+\} = [H^+] \exp \frac{-F\psi_0}{RT} \quad (2)$$

其中法拉第常数  $F = 96485 \text{ C/mol}$ ; 摩尔气体常数  $R = 8.314 (\text{Pa} \cdot \text{m}^3) / (\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $T$  为绝对温度 ( $^{\circ}\text{K}$ )。根据 Gouy-Chapman 双电层理论 (Chapman, 1913), 假定表面电位  $\psi_0$  和表面电荷密度  $\sigma_0$  分别等于最近层表面电位和表面电荷密度, 则有:

$$\psi_0 = \frac{1}{zb} \ln \left[ \left( \frac{\sigma_0}{a\sqrt{I}} \right) + \left[ \left( \frac{\sigma_0}{a\sqrt{I}} \right)^2 + 1 \right]^{0.5} \right] \quad (3)$$

其中,  $a = z \left( \frac{RT\epsilon}{2\pi} \right)^{0.5}$ ;  $b = \frac{F}{2RT}$ ;  $\sigma_0 = \frac{q_0}{A_r} = \frac{q_0}{NA}$ ; 海水介质介电常数  $\epsilon = 6.23 \times 10^{-10} \text{ C} / (\text{V} \cdot \text{m})$ ;  $I$  为海水介质离子强度 (一般海水  $I = 701 \text{ mol/m}^3$ );  $z$  为扩散层中同离子电价;  $N$  为细胞总数;  $A_r$  为细胞总表面积 ( $\text{m}^2$ );  $A$  为单个细胞表面积 ( $\text{m}^2 / \text{细胞}$ );  $q_0$  为表面电荷。由于  $q_0 = F(\{\text{MOH}_2^+\} - \{\text{MO}^-\})$ , 在  $\text{pH} < \text{pHpzc}$  时,  $q_0^+ = F\{\text{MOH}_2^+\}$ , 而在  $\text{pH} > \text{pHpzc}$  时,  $q_0^- = -F\{\text{MO}^-\}$ , 其中“+”和“-”分别代表正、负电荷表面,  $\text{pHpzc}$  为细胞零电荷点。如令

$$m = F \left( \frac{2\pi}{IRT\epsilon} \right)^{1/2} \quad (4)$$

则

$$\psi_0^+ = \frac{1}{z^+b} \ln \left[ \frac{m\{\text{MOH}_2^+\}}{NA} + \left( \frac{m^2\{\text{MOH}_2^+\}^2}{N^2A^2} + 1 \right)^{0.5} \right] \quad (5-1)$$

$$\psi_0^- = \frac{1}{z^-b} \ln \left[ \frac{m\{\text{MO}^-\}}{NA} + \left( \frac{m^2\{\text{MO}^-\}^2}{N^2A^2} + 1 \right)^{0.5} \right] \quad (5-2)$$

且定义  $\{M\}_T = \{\text{MOH}_2^+\} + \{\text{MOH}\} + \{\text{MO}^-\}$ , 则在实验中当  $\text{pH} < \text{pHpzc}$  时, 即进行酸滴定时最大表面酸量  $\{M^+\}_T \doteq \{M\}_T = \{\text{MOH}_2^+\} + \{\text{MOH}\}$ , 而当  $\text{pH} > \text{pHpzc}$  时, 即当进行碱滴定时最大表面碱量  $\{M^-\}_T \doteq \{M\}_T = \{\text{MOH}\} + \{\text{MO}^-\}$ 。令

$$Y_A = \frac{(\{M^+\}_T - \{\text{MOH}_2^+\})[H^+]}{\{\text{MOH}_2^+\}} \quad (6-1)$$

$$Y_B = \frac{(\{M^-\}_T - \{\text{MO}^-\})}{\{\text{MO}^-\}[H^+]} \quad (6-2)$$

其中据改进 BET 方程 (Gu, 1982) 对  $\{\text{MOH}_2^+\}$  随  $[H^+]$  变化曲线进行拟合即可求得  $\{M^+\}_T$ , 对  $\{\text{MO}^-\}$  随  $[\text{OH}^-]$  变化曲线进行拟合即可求得  $\{M^-\}_T$ , 然后分别根据方程 (6-1) 和 (6-2) 求得  $Y_A$  和  $Y_B$ 。对于 1:1 支持电解质, 通过组合上述方程以及简单的数学推导可得到以下方程:

$$Y_A = K_{al}^{int} \left[ \frac{2m^2\{\text{MOH}_2^+\}^2}{N^2A^2} - 2 \frac{m\{\text{MOH}_2^+\}}{NA} \left( \frac{m^2\{\text{MOH}_2^+\}^2}{N^2A^2} + 1 \right)^{0.5} + 1 \right] \quad (7-1)$$

$$Y_B = \frac{1}{K_{a2}^{int}} \left[ \frac{2m^2 \{MO^-\}^2}{N^2 A^2} - 2 \frac{m \{MO^-\}}{NA} \left( \frac{m^2 \{MO^-\}^2}{N^2 A^2} + 1 \right)^{0.5} + 1 \right] \quad (7-2)$$

由泰勒级数展开并忽略高次项, 方程(7-1)和(7-2)可分别简化为:

$$Y_A = K_{a1}^{int} - \frac{2mK_{a1}^{int}}{NA} \{MOH_2^+\} + \frac{2m^2K_{a1}^{int}}{N^2A^2} \{MOH_2^+\}^2 - \frac{m^3K_{a1}^{int}}{N^3A^3} \{MOH_2^+\}^3 \quad (8-1)$$

$$Y_B = \frac{1}{K_{a2}^{int}} - \frac{2m \{MO^-\}}{K_{a2}^{int} NA} + \frac{2m^2 \{MO^-\}^2}{K_{a2}^{int} N^2 A^2} - \frac{m^3 \{MO^-\}^3}{K_{a2}^{int} N^3 A^3} \quad (8-2)$$

这样, 依据方程(8-1)或(8-2)对  $Y_A - \{MOH_2^+\}$  曲线或  $Y_B - \{MO^-\}$  曲线进行三元线性拟合即可求得  $A$ 。

## 2 实验

**2.1 设备与试剂** 所用设备为广州医疗器械厂生产的 LRH-250G 光照培养箱。自制恒温滴定池。美国 Fisher Scientific 公司生产的 Accumet 925pH 计。美国 Cole-Parmer 公司生产的复合电极和螺旋式微量滴定管。

所用试剂为山东省莱阳县化工厂生产的 HCl(分析纯), 用二次水配制约 0.1mol / L 溶液, 用无水  $Na_2CO_3$ (分析纯)标定后备用。

**2.2 浮游植物** 选取 18 种较为常见的海洋浮游植物(包括 8 种绿藻, 7 种硅藻, 2 种甲藻, 1 种红藻), 所有藻种均由青岛海洋大学微藻实验室提供, 其名称及部分细胞大小见表 1。

表1 海洋浮游植物细胞的等效半径、表面积和相应的变异系数

Tab.1 Equivalent radii, surface areas of marine phytoplankton cells and their variation coefficients

浮游植物	等效半径 ( $\times 10^{-6}m$ )	表面积 ( $\times 10^{-8}m^2/个$ )	变异系数 (%)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3.0 ± 1.0	2.78	1.4
<i>Chlorella marine</i>	4.0 ± 1.0	2.98	4.4
<i>Nitzschia closterium</i>	4.0 ± 1.0	3.08	14.6
<i>Chlorella stimulatophora</i>		5.72	7.9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin	5.5 ± 1.5	13.2	1.5
<i>Chaetoceros</i> sp.	6.5 ± 1.5	18.6	9.1
<i>Chaetoceros ceratosporus</i>		32.2	2.5
Unidentified diatom		40.2	15.4
<i>Skeletonema costatum</i> Gneville	6.5 ± 0.5	59.8	29.3
<i>Dunaliella salina</i>		76.7	31.3
<i>Nitzschia angularis</i>	13.5 ± 2.5	80.2	2.5
<i>Amphidinium hoefleri</i>		113	9.0
<i>Dunaliella salina</i> var.	14.0 ± 4.0	125	9.6
<i>Zooxanthella microdriatica</i>		171	9.2
<i>Platymonas subcordiformis</i>	9.5 ± 1.5	156	1.2
<i>Pyramidomonas</i> sp.		298	8.1
<i>Rhodorus marinus</i>		324	0.9
<i>Dunaliella viridis</i>		690	4.8

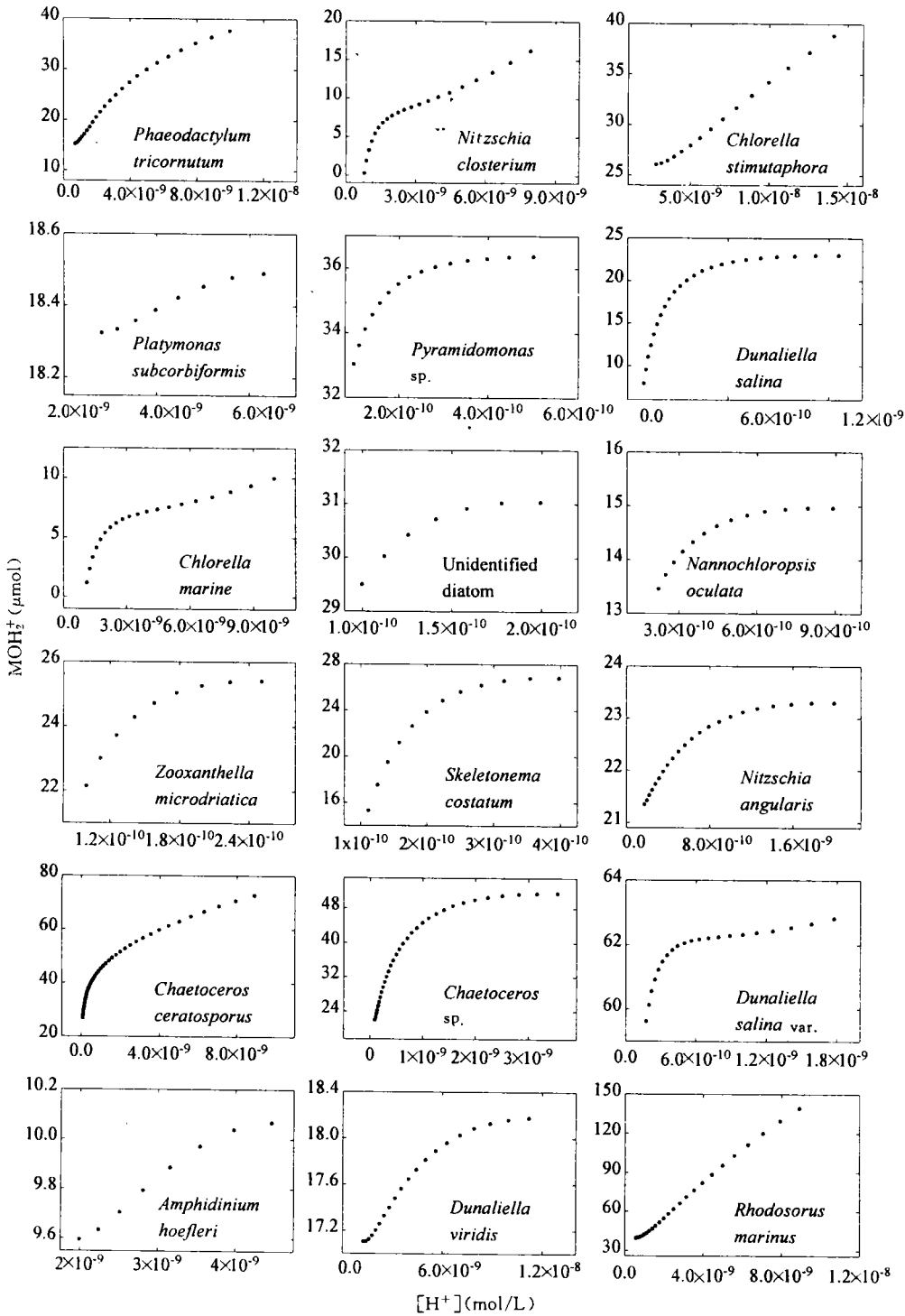


图 1 海洋浮游植物细胞表面酸量 {MOH<sub>2</sub><sup>+</sup>} 随 [H<sup>+</sup>] 变化曲线

Fig. 1 Plot of surface acid amount of the marine phytoplankton cells {MOH<sub>2</sub><sup>+</sup>} versus [H<sup>+</sup>]

**2.3 培养液** 海水取自东海(盐度约为 32), 通过 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 煮沸, 加入氮、磷、硅营养元素及多种微量元素( $f/2$  营养液配方), 用稀 HCl 调节 pH 约为 8.1 用作培养液。用于浮游植物培养的仪器均洗净后, 进行灭菌处理(160 $^{\circ}$ C 烘 2h)。

**2.4 方法** 选取一定体积长势良好的藻种液加到 1 000ml 培养液中, 置于光照培养箱中培养, 光源为白色日光灯, 照度约为 6 000lx, 光暗比为 12:12h。计数法监测浮游植物的生长情况, 并用 pH 计监测培养液 pH 的变化。待生长达到指数生长中期时(pH 一般为 9—10), 部分藻液过滤(真空度 < 25.3kPa) (Parsans et al., 1984) 后平行取 200ml 滤液作为空白, 平行另取 200ml 藻液作为样品, 分别在自制恒温滴定池中用标准 HCl 溶液(0.098 2mol / L) 滴定至海水 pH 以下。为尽量减少 H<sup>+</sup> 可能通过细胞壁进入细胞体内所引起的误差, 每次滴定后 20s 内记录其稳定 pH。为抑制生物活动对酸滴定的影响, 对于高温型藻(最适温度大约为 20—30 $^{\circ}$ C), 于 5 $^{\circ}$ C 下进行滴定; 对于低温型藻(最适温度大约为 10—20 $^{\circ}$ C), 则于 25 $^{\circ}$ C 下进行滴定。这样, 样品酸滴定量与空白酸滴定量之差即为浮游植物表面酸量 {MOH<sub>2</sub><sup>+</sup>}, 结果如图 1 所示。

### 3 结果与讨论

18 种浮游植物酸滴定曲线, 即 {MOH<sub>2</sub><sup>+</sup>} 随 [H<sup>+</sup>] 的变化曲线见图 1, 表明其酸滴定曲线遵循改进 BET 方程(Gu, 1982):

$$\{\text{MOH}_2^+\} = \{\text{M}^+\}_T \frac{b \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0}}{\left(1 - \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0}\right) \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0} (b-1)\right)} \quad (9-1)$$

或

$$\frac{\frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0}}{\{\text{MOH}_2^+\} \left(1 - \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0}\right)} = \frac{1}{\{\text{M}^+\}_T b} + \frac{b-1}{\{\text{M}^+\}_T b} \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]_0} \quad (9-2)$$

其中, [H<sup>+</sup>]<sub>0</sub> 为相应 {M<sup>+</sup>}<sub>T</sub> 的 [H<sup>+</sup>];  $b$  为与吸附剂表面性质相关的常数。据方程(9-2)对酸滴定曲线(图 1)进行线性拟合, 即可求得 {M<sup>+</sup>}<sub>T</sub>。然后, 由方程(6-1)求得  $Y_A$ , 再根据方程(8-1)对酸滴定曲线进行三元线性拟合, 即可求得浮游植物细胞表面积, 结果见表 1。

精度实验( $n = 6$ )表明, 酸滴定法测定浮游植物表面积的实验精密密度为 15.2%。由表 1 可见, 对于实验所测定的 18 种浮游植物(包括 8 种绿藻、7 种硅藻、2 种甲藻、1 种红藻), 其细胞表面积为  $2.78 \times 10^{-8}$ — $6.9 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>, 变异系数为 0.9%—31.3%, 而且大部分细胞表面积的测定结果大小顺序与其细胞大小相关, 但普遍比细胞几何表面积大约 2—3 个数量级, 原因有待于进一步研究。这表明, 较之传统的用光 / 电子显微镜粗略估算的方法, 更为精确, 并且设备简单, 操作方便。

### 参 考 文 献

Chapman, P. L., 1913, *Philos. Mag.*, 25: 475—482.

- Fisher, N. S. et al., 1983, *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 432—447.
- Gu, T. R., 1982, *Colloid Interface Sci.*, **85**: 601—603.
- Hecky, R. E. et al., 1973, *Mar. Biol.*, **49**: 103—111.
- Kuhn, R. and Pattard, M., 1990, *Water. Res.*, **24**: 31—38.
- Parsans, T. R. et al., 1984, *A Manual for Biological and Chemical Methods for Seawater Analysis*, Pergamm Press (Oxford) P. 398.
- Rice, C. P. and Sikka, G. C., 1973, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **9**: 116—123.
- Swackhamer, D. L., 1991, *J. Environ. Sci. (China)*, **3**: 15—21.
- Wang, X. L. et al, 1991, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **9**(3): 253—262.
- Wang, X. L. and Fisher, N. S., 1993, Determining the surface area of marine phytoplankton cells by acid-base titration, PACON China Symposium, Sir George Fisher Centre for Tropical Studies (Townsville), 361—370.

## DETERMINING SURFACE AREAS OF MARINE PHYTOPLANKTON CELLS BY ACID-BASE TITRATION METHOD

Wang Xiulin, Ma Yanjun, Li Jiliang, Yu Weijun and Sun Hanzhang

(*Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003*)

**Abstract** In 1995, the acid-base titration method for determining the surface area of marine phytoplankton cells was improved, in which the modified BET equation was used to estimate the maximum surface acid amount  $\{M^+\}_T$  by fitting the surface acid amount  $\{MOH_2^+\}_T$  to  $[H^+]$ . Estimate of  $\{M^+\}_T$  with the modified BET equation is more feasible and reliable than measurement by the back-titration technique liable to under or overestimate of  $\{M^+\}_T$ . The acid-base titration technique to measure  $\{MOH_2^+\}$  of phytoplankton cells is based on the assumption that the hydrous cell walls have carbohydrates or other structural compounds which can behave as surface Brönsted acid-base sites due to coordination of environmental  $H_2O$  molecules. The improved method was applied to 18 diverse phytoplanktons species (including 7 diatoms, 2 flagellates, 8 green phytoplanktone and 1 red phytoplankton) maintained in seawater cultures. For the species examined, the surface area of individual cell (A) ranged from  $2.78 \times 10^{-8} m^2$  for *Nannochloropsis oculata* to  $690 \times 10^{-8} m^2$  for *Dunaliella viridis*. Measurement accuracy was 15.2% ( $n = 6$ ). A values of marine phytoplankton may relate to, but is not dominated by, the cell size. Furthermore, A values were approximately 2 to 4 orders of magnitude more than the geometric surface area of the cell, assuming that the phytoplankton cell is a smooth ball. This suggested that marine phytoplankton A determined by the acid-base titration method may reveal the actual surface area of marine phytoplankton cells in seawater. Preliminary study showed that the improved method may be more promising and accurate than light/ electron microscopic measurements for coarse estimation of the surface areas of phytoplanktons

only if the cell walls behave like a Brönsted acid-base site due to the coordination of environmental  $H_2O$  molecules. In addition, the method has merits, such as use of simple equipment, convenient operation, and easy dissemination. It is useful for study on the quantitative relationship between bioconcentration of HOC in marine phytoplankton and their surface areas.

**Key words** Marine phytoplankton Surface area Acid-base titration

\*\*\*\*\*  
\* 学报简介 \*  
\*\*\*\*\*

## 《海洋与湖沼》(学报)简介

《海洋与湖沼》学报遵循科学技术要面向经济建设的宗旨, 倡导不同学术观点的争鸣, 开展国内外学术交流, 以繁荣学术、提高研究水平; 报道最新科研成果, 为促进科学技术的发展和加速社会主义现代化建设服务; 发挥老科学家的指导作用、中年科技人员的骨干作用, 热情扶植青年学者, 以利于科技人才的尽快成长, 从而不断壮大科技力量。

《海洋与湖沼》学报, 系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物, 以报道基础研究、应用基础研究论文为主, 同时重视应用研究、开发研究成果的发表; 论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科。设研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣、综述、学术简讯、考察报告、科学家简介、书评等栏目。对于发明创造和同国计民生有重大关系的研究成果、带有崭新学术观点的论文, 特点是青年学者的优秀论文, 将予以优先刊登。酌登英文论文。

《海洋与湖沼》学报选登学科前沿和生长点的论文, 以及发明创造、国家自然科学基金资助项目、国家重大攻关项目、各部委基金资助项目、填补空白项目的研究成果, 尤欢迎不同学术观点交锋的论文。对具重大创见性的自选课题的论文同样重视。

《海洋与湖沼》学报于 1957 年创刊, 由中国海洋湖沼学会主办, 中国科学院海洋研究所承办。第一任主编为中国科学院院士、第三世界科学院院士曾呈奎教授, 第二任主编为中国科学技术协会全国委员会委员刘瑞玉教授, 现任主编为中国科学院院士、中国海洋湖沼学会理事长秦蕴珊教授。由于一向注重高水平、高质量, 为学术交流、国家建设、人才成长作出引人注目的贡献, 因而刊物在国内外均享有较高声誉。1988—1997 年获省部级以上优秀科技期刊等奖 13 项, 最高为国家二等奖。双月刊, 定价: 12.00 元。全国各地邮局发行, 邮发刊号 CN37-1149。