

15 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定^{*}

陈宇炜 高锡云

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

提 要 本文比较研究了浮游植物叶绿素 a 含量测定的 2 种常用方法——国内常用的丙酮萃取分光光度法和国际上较通用的热乙醇萃取分光光度法。实验结果显示, 热乙醇法具有操作简便、快捷、萃取完全, 低毒害等优点, 两种方法有显著统计差异及很好的相关性, 其回归方程为: $Chla_{乙醇} = 1.261 Chla_{丙酮} - 3.5$ ($R = 0.998$)。

关键词 浮游植物 叶绿素 a 丙酮萃取法 热乙醇萃取法

分类号 Q945.11

浮游植物的主要光合色素是叶绿素(Chlorophyll), 常见的有叶绿素 a、b 和 c。叶绿素 a 存在于所有的浮游植物中, 大约占有有机物干重的 1—2%, 是估算浮游植物生物量的重要指标^[1,2]。浮游植物细胞内叶绿素 a 含量随种类或类群而有所不同, 同时还受年龄、生长率、光和营养条件的影响^[3]。

浮游植物叶绿素 a 的测定方法主要有分光光度法^[4]和荧光法^[5]两种。荧光法具有较高的灵敏度, 但需要荧光光度计等设备, 在此不作讨论。分光光度法又分为三色法和单色法两种。过去通常采用三色法, 但由于结果计算较粗, 误差大, 现已较少采用。目前大多采用 Lorenzen 提出的单色法, 此法只测定叶绿素 a, 并对脱镁叶绿素 a 的干扰进行了校正^[4]。根据萃取溶剂不同 Lorenzen 单色法又分为丙酮法和乙醇法, 我国多年来一直使用丙酮法, 近年来国际上从萃取效果、安全和保健等考虑, 已逐渐改用乙醇法, 而国内考虑到资料的可比性, 仍继续使用丙酮法^[6]。本研究正是在此基础上, 进行了丙酮法与乙醇法的比较, 为引进乙醇法, 以使国内叶绿素 a 测定结果能与国际上高水平研究结果进行比较而提供科学的参考意见。

1 方法

1.1 水样的采集、处理和保存

根据章宗涉等的“淡水浮游生物研究方法”和金相灿等的“湖泊富营养化调查规划”所述方法采集并处理水样^[1,2], 取合适体积水样经滤纸(Waterman GF/C 玻璃纤维滤纸或国产微孔滤膜)过滤后, 将带样品的滤纸放入冰箱冷冻室保存, 若置于低温冰箱(-20℃)中, 则可较长期(三个月)保存样品。

1.2 丙酮萃取分光光度法(丙酮法)简易步骤

参照“淡水浮游生物研究方法”和“湖泊富营养化调查规范”, 取带样品的滤纸剪碎后在研钵中加适量 90% 丙酮研磨至足够细, 移入具塞刻度试管中于暗处静置萃取 6—20h 后, 过滤或离心得清液定容, 721 或 752 型分光光度计于波长 665nm 和 750nm 处测吸光值, 然后加入几滴 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸酸化, 于波长 665nm 和 750nm 处再测吸光值^[7], 结果计算公式为:

$$Chla_{丙酮} = 27.3 \times [(E_{665} - E_{750}) - A_{665} - A_{750}] \times V_{丙酮} / V_{水样}$$

其中, $Chla_{丙酮}$ 为丙酮法测定的叶绿素 a 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); E_{665} 为丙酮萃取液于波长 665nm 的吸光值; E_{750} 为丙酮萃取液于波长 750nm 的吸光值; A_{665} 为丙酮萃取液酸化后于波长 665nm 的吸光值; A_{750} 为丙酮萃取液酸化

• 国家自然科学基金项目(39600025)、中国科学院重大项目(KZ951-B1-205-02)、中国科学院重点项目(KZ952-S1-220)和中国科学院“九五”特别支持项目(KZ95T-04-04)联合资助。

收稿日期: 1999-07-02; 收到修改稿日期: 2000-03-03。陈宇炜, 男, 1969 年生, 助理研究员。

后于波长 750nm 的吸光值; $V_{丙酮}$ 为丙酮萃取液的体积 (mL); $V_{水样}$ 为水样过滤的体积 (L).

1.3 热乙醇萃取分光光度法(乙醇法)步骤

带样品的滤纸必须经过冰箱冷冻室冷冻 12h 以上或过夜,取出后迅速用 90% 的热乙醇(80℃)于 80℃ 热水浴萃取 2min,再用超声波清洗机超声振荡处理 10min,于暗处静置萃取 2—6h 后,过滤得清液定容.721 或 752 型分光光度计于波长 665nm 和 750nm 处测吸光值,然后加入几滴 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸酸化,于波长 665nm 和 750nm 处再测吸光值,结果计算公式为:

$$\text{Chla}_{乙醇} = 27.9 \times [(E_{665} - E_{750}) - A_{665} - A_{750}] \times V_{乙醇} / V_{水样}$$

其中, $\text{Chla}_{乙醇}$ 为乙醇法测定的叶绿素 a 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); E_{665} 为乙醇萃取液于波长 665nm 的吸光值; E_{750} 为乙醇萃取液于波长 750nm 的吸光值; A_{665} 为乙醇萃取液酸化后于波长 665nm 的吸光值; A_{750} 为乙醇萃取液酸化后于波长 750nm 的吸光值; $V_{乙醇}$ 为乙醇萃取液的体积 (mL); $V_{水样}$ 为水样过滤的体积 (L).

1.4 乙醇法和丙酮法测定结果统计比较

在同一水域采 10 个平行水样,同时用丙酮法和乙醇法测定叶绿素 a 含量,用统计方法比较两种方法是否存在差异.另外在 10 个不同水域采样,同时用丙酮法和乙醇法测定叶绿素 a 含量,用统计方法计算两组结果的差异和相关系数,并得出回归方程.

2 结果和讨论

2.1 乙醇法和丙酮法在实际操作过程中的比较

比较叶绿素 a 含量测定的乙醇法和丙酮法操作过程可以看出,丙酮法的测定过程比较繁杂,其中样品研磨需花费大量时间和精力,且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.而乙醇法由于样品经过冷冻和快速热水浴提取,运用冷热差将浮游植物细胞破碎,再加上超声波的粉碎作用,且热溶液的萃取效果高于冷溶液,对叶绿素 a 的萃取较完全,且省时省力.不过,过高的温度会破坏叶绿素 a,在操作时必须严格控制水浴温度(80℃)和热萃取时间(2min),防止过高温破坏叶绿素 a 而影响测定结果.另外丙酮对人体的毒害远大于乙醇,长期使用对操作者的毒害较大,因而国际上用乙醇法取代丙酮法也是考虑到操作者的健康.此外,我国尚未自行生产可用于过滤浮游植物的玻璃纤维滤纸,依靠进口产品价格较高,因而有些单位用醋酸纤维微孔滤膜代替,这种滤膜在丙酮中完全溶解,对分光光度计吸光值测定有影响,也就影响了叶绿素 a 含量的测定结果.而醋酸纤维微孔滤膜在乙醇中基本不溶,对吸光值的测定不会有影响,保证叶绿素 a 含量的测定结果可靠.

2.2 乙醇法和丙酮法测定结果的统计比较

表 1 乙醇法和丙酮法测定结果比较

Tab. 1 The comparable results between the hot-ethanol method and the cool-acetone method

同一水域样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{Chla}_{乙醇} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	181.9	185.3	180.8	181.9	176.3	180.8	181.5	179.8	183.3	182.8
$\text{Chla}_{丙酮} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	157.2	149.6	148.5	148.6	144.1	146.3	148.8	146.6	152.8	153.7
不同水域样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{Chla}_{乙醇} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	18.97	34.60	75.89	176.3	181.9	185.3	180.8	221	337	181.9
$\text{Chla}_{丙酮} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	14.20	29.48	60.06	144.1	157.2	149.6	146.3	180.6	261.2	148.5

根据上表中在同一水域的平行水样,对两种方法所得的结果进行统计:

平均值: $X_{乙醇} = 181.44$; $X_{丙酮} = 149.62$

方差: $S_{乙醇}^2 = 5.0564$; $S_{丙酮}^2 = 13.7716$

标准误: $SE_{乙醇} = 0.711$; $SE_{丙酮} = 1.1745$

对两种方法结果的方差进行 F 检验, $F = S_{丙酮}^2 / S_{乙醇}^2 = 2.723 < 5.85 (F_{0.995}(10, 10))$

因此,两种方法结果的方差极具显著差异.

对两种方法结果平均值进行 t 检验, $t(=22, 0) > t_{0.995}$ ($=2.8784$).

因此,两种方法结果平均值极具显著差异.乙醇法测定的结果高于丙酮法的结果,在统计意义上说明乙醇法对浮游植物的叶绿素 a 萃取较完全.另外乙醇法测定结果的方差和标准误差都低于丙酮法测定的结果,也说明乙醇法带来的操作误差较小^[8].

图 1 是乙醇法和丙酮法测定结果的相关关系图.由于乙醇法和丙酮法存在极显著差异,根据在不同水域样品的测定结果,计算出两方法的相关系数 $R(=0.998) > R_{0.995}(10-2)(=0.872)$,说明两方法存在极显著相关关系.因而得出回归方程为: $Chla_{乙醇} = 1.261 Chla_{丙酮} - 3.5$.可以用此回归方程将以前的丙酮法测定结果换算为乙醇法的结果.在今后的叶绿素 a 含量测定中建议使用乙醇法,以便将结果直接与国外最新的研究成果进行比较.

总之,乙醇法测定浮游植物叶绿素 a 含量具有操作简便、快捷,低毒害和萃取效率高优点,为了在湖泊学研究和环境监测领域与国际同行进行研究结果比较,建议广大湖泊学工作者和环境监测人员尽早使用乙醇法,或在此基础上研究出更便捷准确的测定方法.

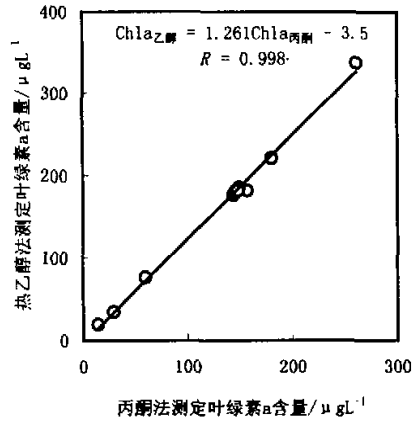


图 1 测定叶绿素 a 含量的乙醇法和丙酮法结果相关关系

Fig. 1 The correlation between hot-ethanol method and cool-acetone method for measuring chlorophyll a

参 考 文 献

- 1 美国公共卫生协会等著,宋仁元等译.水和废水标准检验法,第 15 版.北京:中国建筑工业出版社,1985:901-904
- 2 金相灿,屠清瑛.湖泊富营养化调查规范.第二版.北京:中国环境科学出版社,1990.268-270
- 3 Hallegraeff G M. Pigment diversity, biomass and species diversity of three Dutch lakes. Rotterdam: Bronder-Offset B V, 1976
- 4 Lorenzen C J. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol & Oceanogr.* 1967, 12:243
- 5 Yentsch C S, Menzel D W. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.* 1963, 10:221
- 6 章宗涉,黄祥飞.淡水浮游生物研究方法.北京:科学出版社,1991.345-348
- 7 王 建,王 霖.浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法. *武汉植物学研究*, 1984, 2(2):321-328
- 8 洪再吉.概率统计.南京:江苏科学技术出版社,1984

Comparison of Two Methods for Phytoplankton Chlorophyll-a Concentration Measurement

CHEN Yuwei GAO Xiyun

(Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract

This study compared two simplified methods for phytoplankton chlorophyll-a concentration measurement — the hot ethanol method which use 90% hot ethanol as the chlorophyll-a extraction agent and the cool acetone method which use 90% cool acetone as the chlorophyll-a extraction agent. The hot ethanol method is used widely in the world now but the cool acetone method is normally used in China. The results show that the hot-ethanol method has more advantages than the cool-acetone method, which are faster and easier to handle, more complete extraction and lower toxic. There is significant statistical difference between these two methods. By using the formula $Chla_{ethanol} = 1.261 Chla_{acetone} - 3.5$, the cool-acetone method data can be transferred to the hot-ethanol method data.

Key Words Phytoplanktonic, Chlorophyll-a, Cool-acetone method, Hot-ethanol method

17

[国际会议简讯]

由德国研究理事会(DFG),中国国家自然科学基金委员会(NSFC),德国马普学会(MPG)和中国科学院(CAS)联合资助,德国吉森大学国际环境与发展研究中心(ZEU/CIDER),德国吉森大学地理研究所(GG)和中国科学院南京地理与湖泊研究所主办的中德双边学术研讨会将于2000年8月28日-31日,在德国Walberberg(德国波恩附近)会议中心举行.会后将对莱茵河流域考察一周.

研讨会的主题是:中国长江和德国莱茵河流域水灾害和土地利用冲突——可持续流域风险管理对策.研讨会将邀请长江和莱茵河流域科学研究和管理的中国和德国学者各20名参加会议,并做专题学术报告.研讨会将专题研究长江流域国际合作研究的可能性.

研讨会主页为 [Http://www.uni-giessen.de/yangtze](http://www.uni-giessen.de/yangtze).

研讨会中方组织人:姜彤博士(中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京市北京东路73号,邮编:210008,电话:025-3614163-12;Email:jiang.t@niglas.ac.cn)