

# 太湖底泥表层越冬藻类群落动态 的荧光分析法初步研究\*

阎 荣<sup>1,2</sup> 孔繁翔<sup>1\*\*</sup> 韩小波<sup>2</sup>

(1:中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京 210008; 2:南京大学环境学院,南京 210093)

**提 要** 为探索春季湖泊底泥表层不同藻类群落的复苏规律,本实验采集了太湖梅梁湾地区的底泥,应用荧光分析法测定藻蓝素,同时测定湖泊底泥中的叶绿素 a 和叶绿素 b,确定春季梅梁湾底泥中不同藻类类群的色素含量变化,说明荧光分析法可以应用于底泥色素分析中,初步探讨了蓝藻群落和非蓝藻群落在春季温度上升期间恢复生长过程的差异.

**关键词** 荧光分析法 蓝藻复苏 底泥 叶绿素 藻蓝素 太湖

**分类号** Q949.22 P512.32

叶绿素及其降解产物通常被视为湖泊生产力的指示性标志<sup>[1]</sup>. 由于太湖蓝藻水华是以微囊藻为优势种,且太湖中淡水红藻的报道较少<sup>[2,3]</sup>,因此在特定的水环境中藻蓝素可以用于指征蓝藻的生长水平.

目前常用于分析色素浓度的分光光度法灵敏度较低,当样品中色素含量很低时,难以检出<sup>[1,4]</sup>. 也有研究曾经采用了同步荧光法测定了海洋浮游植物的叶绿素<sup>[5]</sup>,但至今还未见用于湖泊底泥中色素分析的报道. Yuko 等人应用高效液相色谱(HPLC)法分析了 Baikal 湖湖泊沉积物中的色素<sup>[6]</sup>,该方法检测限很低,灵敏度极高. 但此法样品前处理过程较为复杂,且成本较高. 而荧光分析法灵敏度较高,所需样品量少<sup>[7]</sup>,更为简便、快速和经济. 虽然蓝藻一般在夏季形成水华,但是认识藻类在底泥中初春的动态规律有助于了解水华形成的机理. 本文以太湖梅梁湾地区的底泥为材料,利用荧光分析法测定藻蓝素含量,并用同步荧光分析法同时测定湖泊底泥中的叶绿素 a、叶绿素 b 含量,目的是利用不同色素的定量分析来表征底泥中不同类群藻类的比例,为探讨不同季节底泥中水华蓝藻存在状态与春季蓝藻复苏以及随后水华发生的时空关系提供技术支持.

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品的采集

2003 年 4 月和 6 月中旬分别在太湖梅梁湾地区的三个采样点(分别位于 31°25'49.9"N

\* 国家重点基础研究发展计划(2002CB412300)、中科院创新项目(KZCX2-311)、中国科学院百人计划项目和南京地理与湖泊研究所所长基金共同资助.

2003-7-21 收稿,2003-10-22 收修改稿. 阎荣,男,1979 年生,硕士研究生.

\*\* 通讯联系人, E-mail: kongfx@jlonline.com.

120°12′47.8″E、31°25′42.5″N 120°12′52.1″E 和 31°25′14.4″N 120°12′56.5″E, 依次记为 1、2、3 号点, 图 1) 用柱状采样器采集底泥样品, 然后用顶杆顶出上覆水, 将最上层 2 cm 左右厚度的泥柱用刮刀切下, 放入平皿中 0℃ 以下冷冻保存待测。



图 1 采样位点示意图

Fig1. Sampling sites in Meiliang Bay

## 1.2 样品的前处理

称取一定量解冻后的底泥样品, 于室内风干 10–14d 后称重, 测定含水率, 并计算底泥干重. 取一定量底泥样品, 放入研钵中仔细研磨 2–5 min, 称取 5 g 左右研磨好的样品置于 10 mL 具塞离心管中, 加入 90% 丙酮溶液 2–3 mL, 于 4℃ 黑暗环境下静置 8–10 h, 然后在 5000 r/min 下离心 3 min<sup>[1]</sup>, 用 Whatman GF/C 滤膜过滤于 10 mL 容量瓶中, 再向离心管中加入 90% 丙酮 2–3 mL, 反复萃取 3–4 次, 每次将离心所得的上清液均过滤至容量瓶中, 最后用 90% 丙酮定容至 10 mL. 此待测液用于测定叶绿素含量. 用于测定藻蓝素含量的底泥样品处理程序基本同上, 只需将提取液改为 0.05 M pH 7.0 Tris 缓冲液 (7.02 g/L Tris-HCl 和 0.67 g/L Tris-Base), 离心条件为 1240 g、10 min<sup>[8,9]</sup>.

将标准叶绿素 a、标准叶绿素 b 用 90% 丙酮溶解稀释至标准系列溶液, 将标准藻蓝素以 0.05 M pH 7.0 Tris 缓冲液溶解稀释至标准系列溶液, 用于绘制工作曲线 (以上三种标准样品均从 Sigma 公司购得).

## 1.3 色素含量的测定

1.3.1 底泥中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的测定 荧光分光光度计的测定条件: 在日立 850 型荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司) 上, 扫描速度 60 nm/min, 激发和发射单色仪带通均为 5 nm, 响应时间 2sec, PM 增益置于 LOW. 取叶绿素 a 标准系列溶液, 以 90% 丙酮为参比液, 以  $\Delta\lambda = 258$  nm 为固定波长差进行同步扫描, 在 670nm 处出现狭长的叶绿素 a 荧光发射峰<sup>[4]</sup>, 以此荧光强度对叶绿素 a 的浓度绘制工作曲线. 以  $\Delta\lambda = 193$  nm 为固定波长差对叶绿素 b 标准系列溶液进行同步扫描, 在 655 nm 处出现狭长的叶绿素 b 荧光发射峰<sup>[4]</sup>, 以此荧光强度对叶绿素 b 的浓度绘制叶绿素 b 的工作曲线.

取上述待测液在与标准样品相同的条件下进行同步荧光扫描, 由叶绿素 a 和叶绿素 b 各自的同步荧光强度在其工作曲线上求得样品中的含量.

1.3.2 底泥中藻蓝素含量的测定 测定条件为激发光波长为 620 nm, 发射光波长 647 nm, 扫描速度 60 nm/min, 激发和发射单色仪带通均为 5 nm, 响应时间 2sec, PM 增益置于 NORMAL, 以 0.05 M pH 7.0 Tris 缓冲液为参比液分别测定荧光强度, 以荧光强度对藻蓝素浓度作出工作曲线. 在与标准系列相同的条件下测定样品的荧光强度从而在工作曲线上求得样品中藻蓝素含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品的荧光扫描结果

叶绿素、藻蓝素等色素在一定的激发光下会产生特征荧光发射峰. 在特定波长的激发

光和发射光下,样品的浓度与荧光强度成正比<sup>[10]</sup>.在荧光分光光度计上分别扫描湖泊底泥中叶绿素 a、叶绿素 b 和藻蓝素提取液.结果表明,叶绿素 a 的荧光激发峰位于 436 nm,发射峰位于 670 nm;叶绿素 b 的荧光激发峰和发射峰的波长分别为 460 nm 和 655 nm;藻蓝素的激发峰位于 616 nm,发射峰位于 647 nm.其结果与文献报道基本一致<sup>[4,5,7,8,11]</sup>,说明本实验中所采用的抽提方法在底泥的色素分析中是可行的.

底泥样品中藻蓝素的激发和发射光谱分别见图 2 和图 3. 叶绿素 a 和叶绿素 b 的同步荧光光谱如图 4 所示.由图可见,以  $\Delta\lambda = 258$  nm 为激发光和发射光的固定波长差在 608 nm - 708 nm 之间进行同步扫描,在 670 nm 处可见清晰、狭长的叶绿素 a 荧光发射峰;以  $\Delta\lambda = 193$  nm 为固定波长差在 593 nm - 693 nm 之间进行同步扫描,在 655 nm 处可明显看出叶绿素 b 荧光发射峰.且在同一坐标系中可以看出应用同步荧光法可以将底泥样品中的叶绿素 a 和叶绿素 b 的荧光发射峰十分清楚地分开.

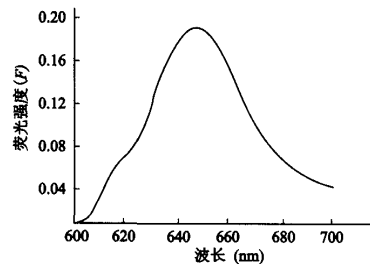
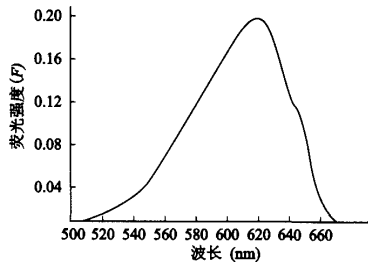


图 2 底泥样品中藻蓝素的激发光谱 ( $E_m = 647$ nm) 图 3 底泥样品中藻蓝素的发射光谱 ( $E_x = 620$ nm)  
Fig. 2 Fluorescence excitation spectra of phycocyanobilin Fig. 3 Fluorescence emission spectra of phycocyanobilin  
from sediment samples from sediment samples

## 2.2 工作曲线

为检测不同环境介质中和不同浓度的色素含量,叶绿素 a 的标准系列浓度梯度设置为 1、10、100、1000、10000  $\mu\text{g/L}$ ,叶绿素 b 和藻蓝素的标准系列浓度梯度设置均为 10、100、1000、10000  $\mu\text{g/L}$ .由于浓度范围比较宽,且相邻两个浓度相差 10 倍,在普通的荧光强度 ( $F$ ) - 浓度 ( $C$ ) 工作曲线上低浓度的几个点会很靠近而难以分清楚,因此将  $F - C$  曲线换算为双对数 ( $\lg F - \lg C$ ) 工作曲线,这样可以直观地看出线性关系(见图 5,6,7).回归方程的相关系数均达到 0.99 - 0.999,这表明在上述浓度范围内工作曲线的线性良好.

## 2.3 底泥样品的测定

三个采样点表层底泥中三种色素含量测定结果见表 1. 检测结果表明,因为叶绿素 a 是所有的藻类群落都含有的光合作用色素,因此在不同时间和不同采集点的底泥样品中叶绿素 a 的含量总是高于叶绿素 b 和藻蓝素的含量.叶绿素 b 是非蓝藻群落所含有的色素,在不同采样点所采集的底泥样品中叶绿素 b 含量略有波动,但是变化不大.而作为表征蓝藻群落的藻蓝素含量,可能由于三个采样点均处于营养化程度较高的梅梁湾,常常发生水华,因

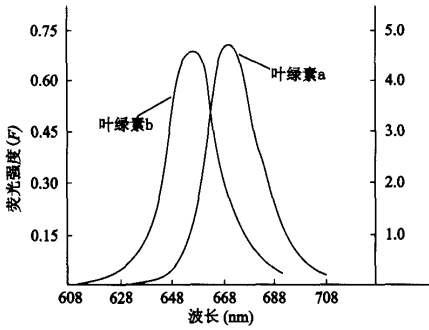


图 4 同一坐标系中叶绿素 a 和叶绿素 b 的同步荧光光谱  
Fig. 4 Synchronous fluorescence emission spectra of Chlorophyll a and Chlorophyll b

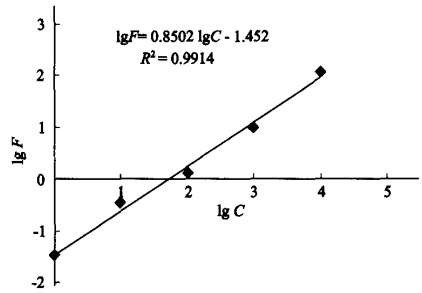


图 5 叶绿素 a 的双对数工作曲线  
Fig. 5  $\lg F - \lg C$  standard curve of Chlorophyll a

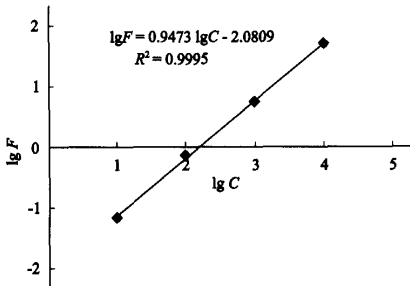


图 6 叶绿素 b 的双对数工作曲线  
Fig. 6  $\lg F - \lg C$  standard curve of Chlorophyll b

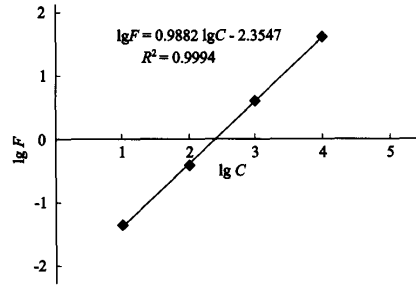


图 7 藻蓝素的双对数工作曲线  
Fig. 7  $\lg F - \lg C$  standard curve of phycocyanobilin

此不同采样点之间虽然存在差异,但差异并不明显 ( $P < 0.05$ );而三个采样点在不同时间的色素水平变化表明,底泥表层的藻蓝素含量在水体温度相对较低的 4 月份明显高于温度较高的 6 月,在三个采样点这一变化十分一致.这一现象是否表明,在春季温度和光照等外界适宜条件下,在底泥中越冬的营浮游生活方式的蓝藻细胞逐渐从底泥表面重新悬浮,进入水

表 1 三个采样点表层底泥中三种色素含量比较(单位:ng/g 底泥干重)

Tab. 1 Comparison of the contents of the three pigments in the sediment samples

色素	4 月			6 月		
	1#	2#	3#	1#	2#	3#
叶绿素 a	511.9	642.4	538.1	559.1	660.3	1018
叶绿素 b	42.87	57.77	42.88	37.61	58.25	110.2
藻蓝素	184.9	141.8	157.8	50.39	58.58	87.36

体复苏,导致底泥表面蓝藻所特有的藻蓝素含量下降,还有待进一步观察和研究.同时通过表 1 的数据比较可以看出,从 4 月到 6 月,1 号、2 号采样点底泥中叶绿素 a 的含量略有增加,叶绿素 b 的含量却变化不大;而 3 号点底泥中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均大幅度升高,使其叶绿素水平远远高于其他两个采样点.这可能说明,在 1、2 号点非蓝藻群落的变化没有蓝藻群落的复苏显著,而在 3 号点,底泥表层的非蓝藻群落的生物量增加却十分明显,可能是由于水体中这类藻细胞下沉到底泥表面的缘故,或者是由于环境温度和光照等条件适宜,导致附着在底泥表面的非蓝藻群落生物量增加.

由于荧光分析法的灵敏度较高,测定结果准确、可靠,且十分简便、迅速,因此,本实验结果表明,可以利用荧光分析法测定水体和底泥中的不同类型的色素含量,这对于在冬季蓝藻生物量很低的情况下分析蓝藻在太湖水体至底泥中时空分布规律,探索蓝藻在低温、黑暗(或弱光)条件下的特殊生理状态有着十分重要的应用价值.可见,底泥表面的蓝藻和非蓝藻群落在春季复苏进入水体的过程有比较明显的差异,这种差异是否是引起蓝藻水华暴发的基础还需其他证据佐证.

### 参 考 文 献

- 1 翟文川,潘红玺,苏晨伟.紫外可见分光光度法对湖泊沉积物中的色素测定.分析测试技术与仪器,1995,1(4):36-39
- 2 翟文川,潘红玺.太湖蓝藻中天然色素的分离提取及测定.湖泊科学,1997,9(3):284-285
- 3 陈宇炜,高锡芸,秦伯强.西太湖北部夏季藻类种间关系的初步研究.湖泊科学,1998,10(4):35-40
- 4 黄贤智,许金钧,蔡挺.同步荧光分析法同时测定叶绿素 a 和叶绿素 b.高等学校化学学报,1987,8(5):418-420
- 5 朱明远,邢军,吴宝铃.两种荧光分析法在海洋浮游植物叶绿素测定中的应用.青岛海洋大学学报,1994,24(4):533-538
- 6 Yuko Soma, et al. Photosynthetic pigments and perylene in the sediments of southern basin of Lake Baikal. *Org Geochem*, 1996, 24(5):553-561
- 7 卜建平.海洋监测规范.北京:海洋出版社,1991:688
- 8 Malcolm T. Downes<sup>1</sup>, Julie A Hall. A sensitive fluorometric technique for the measurement of phycobilin pigments and its application to the study of marine and freshwater picophytoplankton in oligotrophic environments. *Journal of Applied Phycology*, 1998, 10: 357-363
- 9 Julio Abalde, et al. Purification and characterization of phycocyanobilin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 1998, 136:109-120
- 10 张承奎等.生物化学仪器分析及技术.北京:高等教育出版社,1990:63-65
- 11 Tsai-yun Lee, et al. Quantitative determination of cyanobacteria in mixed phytoplankton assemblages by an in vivo fluorimetric method. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 302:81-87

## Analysis of the Recruitment of the Winter Survival Algae on the Sediments of Lake Taihu by Fluorometry

YAN Rong<sup>1,2</sup>, KONG Fanxiang<sup>1</sup> & HAN Xiaobo<sup>2</sup>

(1: *Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008, P. R. China;*

2: *School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China*)

### Abstract

Chlorophyll and its degraded products are often regarded as the indicative marker of the lake productivity. Since the predominant algae species of the bloom in Lake Taihu is blue algae, the content of phycocyanobilin in the water can indicate the growing level of blue algae in this lake. In order to investigate the roles of the spring recruitment of the algae on the sediment, the surface mud of the sediment samples were collected from Meiliang Bay, Lake Taihu in April and June, 2003. The content of phycocyanobilin was determined by fluorometry, and the contents of chlorophyll a and chlorophyll b were simultaneously determined by synchronous spectrofluorometry. The changes of the pigment contents on the surface of the sediments were confirmed. It is proved that fluorometry can be applied to the analysis of pigments in the sediments because the analytical method is highly sensitive and the results of this experiment are accurate and credible. The different characters of the recruitment between blue algae and non-blue-algae were discussed when the temperature increased in spring, which is significant and helpful to the further research on the succession and recruitment of algae.

**Keywords:** Fluorometry; recruitment of blue algae; sediment; chlorophyll; phycocyanobilin; Lake Taihu