

浮游植物叶绿素 a 的微波法研究及其与反复冻融法的比较*

林罗敏¹, 唐鹤辉¹, 彭亮¹, 韦桂峰^{1**}, 林叔忠², 李湘姣², 杨浩文²

(1: 暨南大学生态学系, 热带亚热带水生生态工程教育部工程研究中心, 广州 510632)

(2: 广东省水文局, 广州 510150)

摘要: 为缩短样品处理时间和提高测定准确度, 本文设计和优化了微波处理辅助提取浮游植物叶绿素 a 的方法, 并比较了反复冻融法和微波法对浮游植物叶绿素 a 的提取效率。结果表明: (1) 微波法提取叶绿素 a 的最优处理条件为: 高火 (额定输出功率 800 W) 处理 60 s 左右。过滤水量为: 贫营养型水体为 1000 ml 以上, 中、富营养水体为 100~500 ml。 (2) 反复冻融法在测定贫营养型水体时更稳定, 而微波法对中、富营养水样提取率显著高于冻融法, 可提高 7%~12%, 对具胶被及硅质外壳的藻类提取效率极显著高于冻融法, 测定结果的相对偏差更小, 且提取时间较冻融法缩短一半以上, 适用于富营养化水体的应急监测。

关键词: 微波法; 反复冻融法; 提取; 浮游植物; 叶绿素 a

Microwave-assisted method for extracting chlorophyll-a in phytoplankton and its comparison with freezing-thawing extraction method

LIN Luomin¹, TANG Quehui¹, PENG Liang¹, WEI Guifeng^{1**}, LIN Shuzhong², LI Xiangjiao² & YANG Hao-wen²

(1: *Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering Ministry of Education, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou 510632, P.R.China*)

(2: *Hydrological Bureau of Guangdong Province, Guangzhou 510150, P.R.China*)

Abstract: In order to save time of sample processing and to improve the determining accuracy, a microwave-assisted extraction method was designed and optimized to extract chlorophyll-a in phytoplankton, and was compared to the freezing-thawing method for extraction efficiency of chlorophyll-a. The results showed that microwave-assisted extraction method was optimal in 60 s treatment with output power of 800 W, and the appropriate water volume for filtration was about 100–500 ml for samples collected in meso-eutrophic waterbodies and 1000 ml for those from oligotrophic waterbodies. The chlorophyll extraction rate of microwave-assisted extraction method was significantly higher than that of freezing-thawing method in meso-eutrophic waterbodies, which can increased by 7%–12%, while freezing-thawing method was more stable in measuring chlorophyll-a of oligotrophic waterbodies. For those algae with a glue shell or siliceous shell, microwave-assisted extraction method had a higher efficiency for chlorophyll-a extraction and a lower relative standard deviation than the freeze-thaw method. The microwave-assisted extraction method needs only one half operation time of the freezing-thawing extraction method, so that it is more suitable for emergency monitoring of eutrophic waterbodies, while the freezing-thawing extraction method is more suitable for monitoring oligotrophic waterbodies.

Keywords: Microwave-assisted extraction method; freezing-thawing method; extraction; phytoplankton; chlorophyll-a

叶绿素 a 是表征藻类现存量的一个重要指标^[1], 可在一定程度上反映水体初级生产力和浮游植物生物量^[2], 是水体富营养化评价的重要指标和水华预警的重要依据^[3]。因此, 叶绿素 a 浓度的准确测定是水体富营养化研究和水质评价的重要基础^[1]。在叶绿素 a 的测定过程中, 较高的提取率是保证测定结果准确性和

* 广东省水利科技创新项目“广东省河流水生态健康评价指标体系及评价方法研究”(2014-01)资助。2015-10-23 收稿; 2015-12-16 收修改稿。林罗敏(1990~), 女, 硕士研究生; E-mail: linluomin@126.com.

** 通信作者; E-mail: tweigf@jnu.edu.cn.

稳定性的前提. 目前常用的提取方法是利用反复冻融细胞破碎藻类细胞,再用丙酮或乙醇等有机溶剂浸提细胞溶出物中的叶绿素^[4-7],该方法冻融操作简单,与有毒溶剂接触时间短^[7-8],但耗时相对较长,且可能对具胶被或硅质壳藻细胞的破碎能力较弱.

自 1986 年开始利用微波技术从羽扇豆中提取鹰爪豆生物碱以来^[9],微波辅助技术(microwave-assisted extraction, MAE)在色素的提取工艺中被广泛应用^[10-12].微波法通过升温汽化胞内液体,使细胞膨胀破裂,内容物自由流出,因此萃取率较高^[13].但此方法对浮游植物细胞尤其是具胶被或硅质壳藻细胞是否具有较强的破碎能力和较高的叶绿素提取效果还有待验证.为缩短样品处理时间和提高测定的准确度,本文设计并优化了微波法提取浮游植物叶绿素 a 的处理条件,比较了优化后的微波法和反复冻融法(Freezing-thawing, FT)对叶绿素 a 的提取率及两种方法的稳定性,提出适合不同营养水平水体叶绿素 a 的测定方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

纯藻液样品:实验室培养的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和颗粒直链藻(*Melosira granulata*).

野外样品:湖泊(暨南大学南湖 S1、明湖 S2)、河流(流溪河石海桥 S3、珠江猎德大桥 S4)、水库(流溪河水库 S5、南屏水库 S6),其中 S1、S3、S5 叶绿素浓度较低,S2、S4、S6 叶绿素浓度较高.

1.2 实验方法

实验内容包括微波处理条件优化及其与反复冻融法提取叶绿素效果比较两部分,具体实验设计见表 1.

1.2.1 微波法操作步骤及实验条件优化 用醋酸纤维滤膜(0.45 μm)过滤一定量的水样,再将滤膜折叠为 1/4 后,置于对折的定性滤纸中遮光并吸去滤膜背面水分.将滤膜连同定性滤纸和装有小半杯水的烧杯(防止微波炉空烧)放入微波炉(型号:P80D23N2L-A9(R0),额定输出功率 800 W)中,在高火(额定输出功率 100% 输出,即 800 W 功率输出^[14])条件下进行微波破壁处理.

破壁处理后将滤膜取出放入盛有 10 ml 90% 丙酮溶液的离心管中,用快速混匀器/手摇震荡 1 min 后放于 4℃ 冰箱浸提 8 h 以上,再经过 7000 转/min 离心 15 min 后,用 Hitachi U-3900 紫外分光光度计于 630、645、663 和 750 nm 波长测量吸光值后计算得出叶绿素 a 浓度^[15].

根据叶绿素 a 的测定结果,确定微波法中最优的微波处理时长和过滤水量.

1.2.2 比较微波法和反复冻融法提取效果 分别用微波法和反复冻融法(-20℃ 冷冻 20 min,取出室温融解 5~10 min,反复冻融 5 次,90% 丙酮 4℃ 浸提 20 h)^[8]提取纯藻液(铜绿微囊藻、蛋白核小球藻和颗粒直链藻)以及野外水样(S1、S2、S3、S4、S5 和 S6)的叶绿素 a 浓度.微波法和反复冻融法样品统一批次、浓度及过滤水量等条件,保证结果的可比性;所有实验设置 5 组平行,保证重复性.

表 1 实验设计*

Tab.1 Experimental design

	微波法处理条件优化			微波法与反复冻融法比较	
	不同微波处理时间对提取效果的影响		过滤水量对微波法提取效果的影响	纯培养藻实验	野外水样实验
水样来源	S1	<i>Mic.</i> 、 <i>Chl.</i>	S2	<i>Mic.</i> 、 <i>Chl.</i> 、 <i>Mel.</i>	S1、S2、S3、S4、S5、S6
稀释倍数	—	10x、5x、2.5x、x; x<5 $\mu\text{g/L}$	—	稀释至中/ 富营养水平	—
过滤水量/ml	100	100	50、100、500、1000	100~500	100~500
微波处理时间/s	30、60、90、120、150	60、80、100、120	60	60	60

* *Mic.*:铜绿微囊藻;*Chl.*:蛋白核小球藻;*Mel.*:颗粒直链藻.

1.3 数据分析与绘图

利用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析;用 Origin 8.0 软件完成绘图.

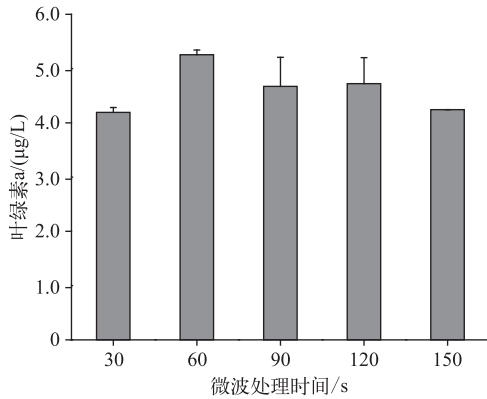


图1 不同微波处理时间对野外水样(S1) 叶绿素 a 浓度测定结果的影响

Fig.1 Effect of microwave treatment time on determination of chlorophyll-a concentration from field water samples

2 结果与讨论

2.1 微波法的处理条件筛选

2.1.1 微波处理时间对叶绿素提取效果的影响 微波法主要通过微波破壁产生裂缝和空隙^[11-12],有助于有机溶剂丙酮有效地溶出叶绿素.微波处理时长直接影响提取效果.对于野外水体(S1),微波处理60 s后的叶绿素 a 浓度的测定结果显著高于处理30 s后的测定结果($P<0.05$),且相对标准偏差较小(图1).但随着处理时间的增加,叶绿素 a 浓度的测定结果并未显著升高,当处理时间达150 s时,微波可能破坏了藻细胞体内的叶绿素 a 结构^[15],导致测定的叶绿素 a 浓度显著下降($P<0.05$).对于室内培养的不同浓度的微囊藻藻液和小球藻藻液,微波处理时间超过60 s时,叶绿素 a 浓度的测定结果无显著差异($P>0.05$)(图2).因此,最适的微波破壁处理时长为60 s左右.

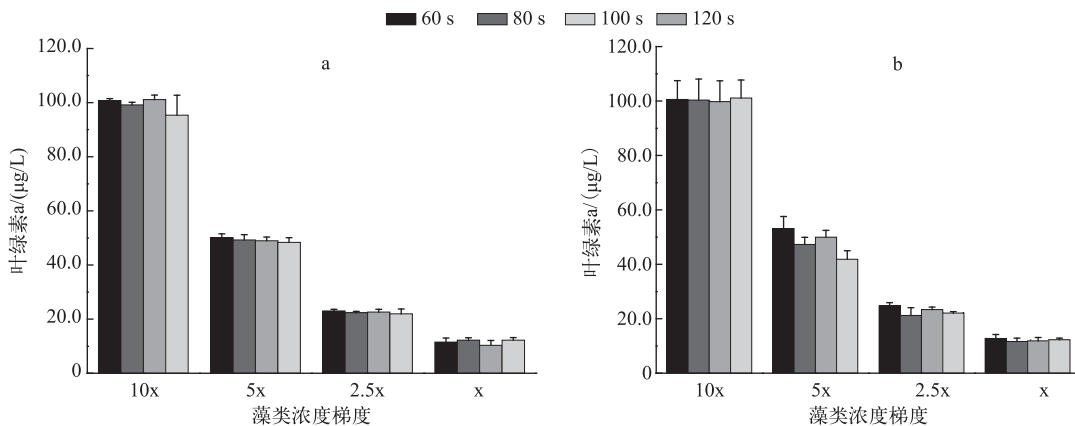


图2 不同微波处理时间对室内培养藻液叶绿素 a 浓度的影响(a:铜绿微囊藻; b:蛋白核小球藻)

Fig.2 Effect of microwave irradiation time on determination of chlorophyll-a concentration from cultured samples (a: *Microcystis aeruginosa*; b: *Chlorella pyrenoidosa*)

2.1.2 过滤水量对微波法提取效果的影响 过滤水量为50 ml时,S2水样的叶绿素 a 提取效果较差,可能是由于此时滤膜上叶绿素过少,浓度低于检测限,导致测量值偏低(图3).当过滤水量增加到100、500 ml时,提取效果显著提高($P<0.05$),但当过滤水量为1000 ml时,叶绿素 a 浓度测定值略降低(图3),这可能与过滤时间较长,叶绿素部分分解有关^[16],也可能与泥沙等杂质增多,干扰测定结果的准确性有关.因此,以叶绿素 a 浓度为15 µg/L左右的富营养水样为例,微波法提取叶绿素 a 的最适过滤水量为100~500 ml.随着叶绿素 a 浓度的升高或降低,应相应调整过滤水量:贫营养型水体为1000 ml;中、富营养水体为100~500 ml.

2.2 微波法和反复冻融法对叶绿素 a 提取效果的比较

对于室内培养的微囊藻藻液,微波法和反复冻融法对叶绿素 a 的提取效果无显著差异(图4a),这可能与微囊藻细胞体积小、细胞壁薄^[8]有关;对于室内培养的小球藻和直链藻藻液,微波法提取效果显著高于反复冻融法($P<0.05$),这可能是因为微波辐射均匀,选择性强^[13],对具细胞个体胶被的小球藻和具硅质外壳的直链藻细胞壁的破碎效果较好.而反复冻融法通过冷冻使细胞内形成冰粒和细胞液浓度增高引起溶

胀^[17],依赖多次反复冷冻及室温解冻,受环境因素影响较大,破壁效果较差。

用微波法和反复冻融法分别测定以蓝、绿藻占优势的湖泊和水库水样以及以硅藻占优势的河流水样中的叶绿素 a 浓度。当叶绿素 a 浓度较低时(S1、S3 和 S5),两种方法的测定结果无显著差异;当叶绿素浓度较高(S2、S4 和 S6)时,微波法的测定结果显著高于反复冻融法($P<0.05$),且相对标准偏差较小,此时微波法的提取效果更好(图 4b)。

3 结论

1)微波法提取叶绿素 a 的最优处理条件为:高火(额定输出功率 800 W)60 s 左右。最佳过滤水量为:贫营养型水体为 1000 ml;中、富营养水体为 100~500 ml。

2)微波法提取对具有胶被和硅质外壳的藻类提取效率优于冻融法,且误差更小。

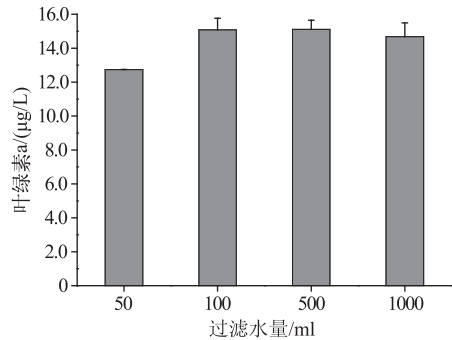


图 3 微波法对不同体积野外水样(S2)叶绿素 a 浓度的测定结果

Fig.3 The determination of chlorophyll-a concentration in field samples with different volumes by MAE

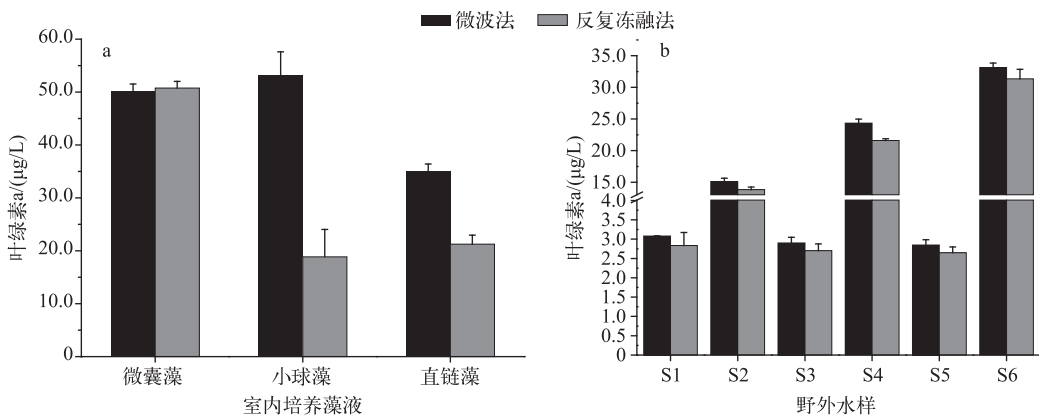


图 4 微波法和反复冻融法对室内培养藻液(a)和野外水样(b)叶绿素 a 浓度测定结果的比较

Fig.4 Comparison of determination of chlorophyll-a concentration in cultured samples(a) and in field samples(b) by MAE and FT

3)两种方法在操作上均较简单易行。反复冻融法在测定贫营养水体叶绿素 a 浓度上具有一定的优势(采用反复冻融法建议贫营养水体过滤水量为 500~1000 ml^[8]),但当叶绿素 a 浓度较高时,微波法提取率显著高于反复冻融法,测定结果的相对偏差较小,且提取时间较冻融法缩短一半以上,适用于富营养化水体的应急监测。

4 参考文献

- [1] SEPA "Aquatic Organisms Monitoring Handbook" editorial ed. Aquatic organisms monitoring handbook. Nanjing: Southeast University Press, 1993: 177-180 (in Chinese). [国家环境保护局《水生生物监测手册》编委会. 水生生物监测手册. 南京: 东南大学出版社, 1993: 177-180.]
- [2] Kim Sangchan, Tu Qingying eds. Eutrophication survey specifications (2nd edition). Beijing: China Standard Press, 1990: 268-270 (in Chinese). [金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范(第2版). 北京: 中国标准出版社, 1990: 268-270.]
- [3] Huang Yingbo. An improved method for extraction of chlorophyll a in phytoplankton; freezing-thawing method. *China Sci-*

- ence and Technology Information, 2012, (10): 157 (in Chinese with English abstract). [黄莹波. 浮游植物叶绿素 a 提取方法的改进: 反复冻融—浸提法. 中国科技信息, 2012, (10): 157.]
- [4] Rosen BH, Lowe RL. Physiological and ultrastructural responses of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta) to light intensity and nutrient limitation. *Journal of Phycology*, 1984, **20**(2): 173-183.
- [5] Levasseur M, Thompson PA, Harrison PJ. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of Phycology*, 1993, **29**(5): 587-595.
- [6] Párista É, Ács É, Böddi B. Chlorophyll-a determination with ethanol—a critical test. *Hydrobiologia*, 2002, **485**: 191-198.
- [7] Feng Jing, Li Yanbo, Zhu Qing *et al.* Comparison of methods for phytoplankton chlorophyll-a concentration measurement. *Ecology and Environment*, 2008, **17**(2): 524-527 (in Chinese with English abstract). [冯菁, 李艳波, 朱擎等. 浮游植物叶绿素 a 测定方法比较. 生态环境, 2008, **17**(2): 524-527.]
- [8] Lin Shaojun, He Lijing, Huang Peisheng *et al.* Comparison and improvement on the extraction method for chlorophyll a in phytoplankton. *Ecology and Environment*, 2005, **24**(1): 9-11 (in Chinese with English abstract). [林少君, 贺立静, 黄沛生等. 浮游植物中叶绿素 a 提取方法的比较与改进. 生态科学, 2005, **24**(1): 9-11.]
- [9] Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1986, **371**: 299-306.
- [10] Xie Mingyong, Chen Yi. The research progress of microwave assisted extracting technology. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, **25**(1): 105-114 (in Chinese with English abstract). [谢明勇, 陈奕. 微波辅助萃取技术研究进展. 食品与生物技术学报, 2006, **25**(1): 105-114.]
- [11] Eskilsson CS, Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 2000, **902**(1): 227-250.
- [12] Ren Qingguo. The study of microwave assistant extraction on chlorophyll from silkworm and chlorophyll-copper-sodium preparation [Dissertation]. Dalian: Dalian University of Technology, 2005 (in Chinese with English abstract). [任清国. 微波辅助萃取蚕沙中叶绿素及叶绿酸铜钠的研究 [学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2005.]
- [13] Pasquet V, Chérouvrier JR, Farhat F *et al.* Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 2011, **46**(1): 59-67.
- [14] Jiang Xiuxin ed. Microwave repair atlas. Harbin: Harbin Engineering University Press, 2006: 31 (in Chinese). [蒋秀欣. 微波炉维修图集. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2006: 31.]
- [15] Li Zhenguo, Lu Jun, Wang Guoxiang *et al.* Comparison of measurement of phytoplankton chlorophyll-a concentration by spectrophotometry. *Environmental Monitoring in China*, 2006, **22**(2): 21-23 (in Chinese with English abstract). [李振国, 卢军, 王国祥等. 分光光度法测定浮游植物叶绿素 a 的比较研究. 中国环境监测, 2006, **22**(2): 21-23.]
- [16] Zhang Wuchang, Wang Rong. Effect of light and temperature on the degradation of chlorophyll a and phaeophorbidea. *Marine Science*, 2000, **24**(4): 50-52 (in Chinese with English abstract). [张武昌, 王荣. 光和温度对叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a 降解的影响. 海洋科学, 2000, **24**(4): 50-52.]
- [17] Sun Liqin, Wang Changhai, Jiang Tao. Research on the methods of *Porphyridium cruentum* cells fragmentation. *Marine Science Bulletin*, 2004, **23**(4): 71-74 (in Chinese with English abstract). [孙利芹, 王长海, 江涛. 紫球藻细胞破碎方法研究. 海洋通报, 2004, **23**(4): 71-74.]