

浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较及优化

张 红, 吕 富, 吕林兰, 黄金田

(盐城工学院 化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003)

摘要: 比较了丙酮萃取法和乙醇-超声波法测定水体中叶绿素 a 的方法, 并对后者进行优化。结果显示, 乙醇-超声波法的萃取效率显著地高于丙酮法的效率, 两种方法的相关系数为 0.9990, 回归方程为 $Chla_{丙酮} = 1.0932Chla_{乙醇} - 11.677$ 。优化后的乙醇-超声波法的最佳处理条件为: 带样滤膜-20℃, 冰冻 24 h 以上, 加适量 80℃ 热乙醇在 80℃ 水浴中解冻, 经超声振荡处理 3 min 后, 室温黑暗条件下萃取 6 h, 再离心定容测定。

关键词: 浮游植物; 叶绿素 a; 测定方法

中图分类号: Q945.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)10-0001-04

浮游植物的种群生物量是水生生态系统研究的一个重要指标, 叶绿素 a 存在于所有浮游植物体内, 占细胞干质量的 1%~2%, 通常可以用来快速估算种群生物量和浮游植物的增殖能力, 因此浮游植物叶绿素 a 含量的测定成为浮游植物生物量的重要指标已被广泛应用^[1-4]。叶绿素 a 常用作水体初级生产力的衡量指标, 在水域环境生物学研究及渔业初级生产力调查中被广泛应用。

目前, 浮游植物叶绿素 a 的测定方法主要有高效液相色谱法、荧光光度计法和分光光度计法。分光光度计法因操作简单、准确可靠等优点成为了目前普遍使用的测定浮游植物叶绿素 a 的方法^[5-6]。目前国际上仍广泛使用丙酮作为萃取溶剂的单色法测定浮游植物叶绿素 a 的含量, 但从萃取效果和安全性等考虑, 已逐渐采用乙醇作溶剂进行萃取。目前已有一些关于叶绿素 a 测定方法的比较, 热乙醇法测定误差的探讨及方法优化等的报道, 但直接以天然养殖池塘的水样作为分析对象, 考虑热乙醇法的各个因素对提取叶绿素 a 的影响未见报道^[7-9]。因此, 本研究比较了热乙醇法和丙酮法, 并利用方差分析优化热乙醇法提取浮游植物叶绿素 a 方法中各影响因素的最佳条件, 以期得到更为精确、有效、简便的测定方法, 为快速估算养殖水体种群生物量提供基本依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

水样取自射阳盐场达阳养殖区 D13 池塘, 该塘

约 13 ha(200 亩), 采用鲫鱼为主, 鲢鱼为辅的混养模式, 以五点取样法, 于水面以下 0.5~1.0 m 采样。

1.2 试验方法

1.2.1 水样的处理和保存

根据金相灿等^[1]的“湖泊富营养化调查规划”和章宗涉等^[10]的“淡水浮游生物研究方法”所述方法, 取 300 mL 水样经微孔滤膜过滤后, 将带样品的滤膜剪碎放入 10 mL 离心管中于冰箱冷冻室 -20℃ 保存。

1.2.2 热乙醇萃取分光光度法(乙醇法)步骤

经冷冻的带样滤膜迅速用 90% 的热乙醇(80℃)于 80℃ 热水浴中萃取 2 min, KS-1200 型超声波破碎机超声(300 W, 3、5、50 s)振荡处理 2 min, 于室温暗处静置萃取 4~6 h 后, 离心得上清液定容, UV-2100 型分光光度计于波长 665 nm 和 750 nm 处测吸光值 E , 后加入 2 滴 1 mol/L 盐酸酸化, 于波长 665 nm 和 750 nm 处再测吸光值 A , 叶绿素 a 计算公式为:

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

1.2.3 丙酮萃取分光光度法(丙酮法)步骤

根据金相灿等^[1]和章宗涉等^[10]所述方法, 取带样滤膜剪碎后在研钵中加适量 90% 丙酮研磨至足够细, 移入试管中于暗处静置萃取 4~10 h 后, 离心得

收稿日期: 2011-09-26; 修回日期: 2011-12-19

基金项目: 江苏省水产三项工程项目(PJ2010-59)

作者简介: 张红(1978-), 女, 江苏江都人, 硕士研究生, 主要从事植物生理学方面的研究, E-mail: yczhhong@126.com; 黄金田, 通信作者, E-mail: hjt@ycit.cn

清液定容, UV-2100 型分光光度计测定方法同上, 叶绿素 a 计算公式为: $Chla_{丙酮} = 27.3 \times [(E_{665} - E_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \times V_{丙酮} / V_{水样}$

1.3 试验设计

1.3.1 乙醇法和丙酮法测定比较

在同一水域采 5 个平行水样, 同时用丙酮法和乙醇法测定叶绿素 a 含量, 另在 5 个不同水域采样, 也用两种方法测定, 用方差分析 F 检验比较结果。

1.3.2 乙醇-超声法测定条件优化

在乙醇-超声法处理时, 试验设置冷冻时间为 0 和 24 h, 各重复 5 次。试验设置萃取时间依次为 2、4、6、8、10 h; 超声波破碎时间依次为 0、1、2、3、4 min; 水浴温度依次为 50、60、70、80、90, 以上各重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 乙醇法与丙酮法测定结果的统计比较

据表 1 结果, 经方差分析 F 检验, $F=20.046$ 大于 $11.26(F_{0.01}(1.8))$ 。说明两种方法的测定结果具极显著差异, 乙醇法测定结果显著高于丙酮法结果, 说明乙醇法对浮游植物的叶绿素 a 萃取较完全。乙醇法测定结果的方差和标准误差都低于丙酮法测定结果,

也说明乙醇法带来的操作误差较小。

根据在不同水域样品的测定结果, 计算相关系数 $R^2=0.9990$, 说明两方法存在显著相关关系, 回归方程为: $Chla_{丙酮} = 1.0932Chla_{乙醇} - 11.677$ (如图 1)。

2.2 乙醇-超声法是否冻融测定结果的比较

结果表明, 同一水域的样品运用冻融法测定结果极显著高于非冻融法(表 2)。经 SPSS 方差分析, 结果为 $S_{冷冻}(0.824) > S_{不冷冻}(0.739)$, 样品经冻融处理后叶绿素 a 提取率显著高于非冻融法。

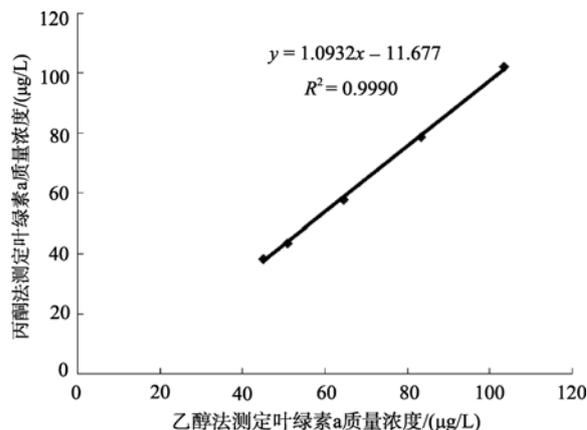


图 1 测定叶绿素 a 含量的乙醇法和丙酮法结果相关关系
Fig. 1 The correlation between hot-ethanol and cool-acetone method for measuring chlorophyll a

表 1 乙醇法和丙酮法测定结果比较

Tab. 1 The comparasion between the ethanol and acetone method

样品编号	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm S.D.$
同一水域						
Chla _{乙醇} ($\mu\text{g/L}$)	46.04	48.36	44.64	47.26	46.28	46.52 ± 1.39
Chla _{丙酮} ($\mu\text{g/L}$)	41.01	38.52	44.92	39.63	38.71	40.56 ± 2.63
不同水域						
Chla _{乙醇} ($\mu\text{g/L}$)	44.92	64.45	83.33	103.51	50.78	
Chla _{丙酮} ($\mu\text{g/L}$)	38.41	57.94	78.77	102.21	43.62	

表 2 冻融对叶绿素 a 提取的影响

Tab 2 Effect of extraction freezing on extraction of chlorophyll a

同一水域样品编号	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm S.D.$
Chla _{冷冻} ($\mu\text{g/L}$)	74.40	75.60	76.26	74.38	75.56	75.24 ± 0.82
Chla _{不冷冻} ($\mu\text{g/L}$)	56.73	55.80	54.87	56.33	55.38	55.82 ± 0.74

2.3 乙醇-超声法萃取时间的比较

如图 2 所示, 叶绿素 a 含量随萃取时间的增加而增加。萃取时间为 10 h 时叶绿素 a 含量最高, 但与 6 h 和 8 h 萃取时间相比, 叶绿素 a 含量没有显著差异; 萃取时间为 4 h 和 2 h 时, 叶绿素 a 含量均显著

低于 6 h。故考虑萃取 6 h 为宜。

2.4 乙醇-超声法超声波破碎时间的比较

随超声波破碎时间的延长, 叶绿素 a 含量逐渐增高(图 3)。超声波破碎时间为 4 min 时达最高值 $55.05 \mu\text{g/L}$, 与破碎时间 3 min 相比, 不存在极显著

差异,但极显著高于破碎时间 2 min 及以下结果。因此,考虑超声波破碎 3 min 为宜。

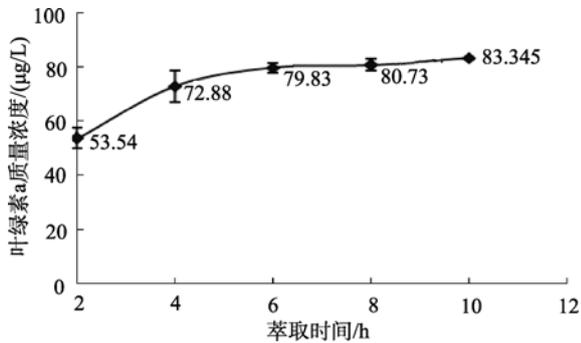


图 2 萃取时间对叶绿素 a 提取的影响

Fig. 2 Effects of extraction time on extraction of chlorophyll a

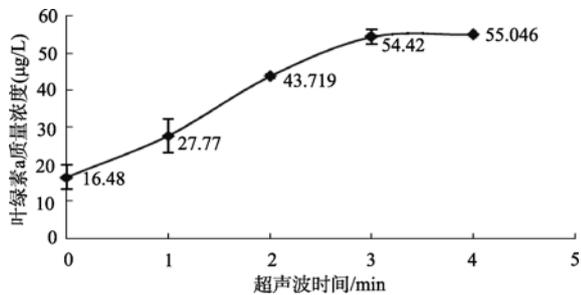


图 3 超声波时间对叶绿素 a 提取的影响

Fig. 3 Effects of ultrasonic time on extraction of chlorophyll a

2.5 乙醇-超声法热提取不同水浴温度的比较

由图 4 可知,水浴温度从 50 增加到 80 时,叶绿素 a 含量也逐步上升,在水浴温度为 80 时叶绿素 a 含量达最高值为 73.64 µg/L,而水浴温度 90 时却突然下降,且极显著低于 80 时的数值。故考虑最佳水浴温度为 80 。

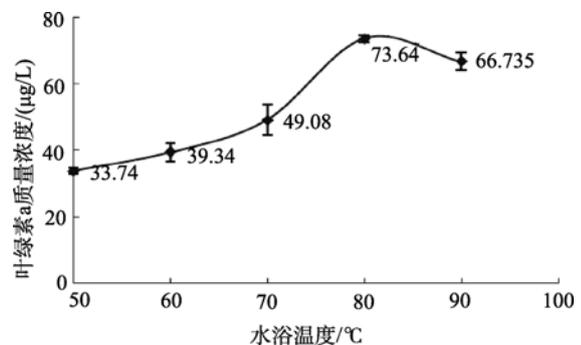


图 4 水浴温度对叶绿素 a 提取的影响

Fig. 4 Effects of water bath temperature on extraction of chlorophyll a

3 结论与讨论

3.1 不同萃取方法的叶绿素 a 的萃取效率

本实验对养殖水体的同一水域或不同水域的测定结果均显示,乙醇-超声波法的萃取效率显著高于丙酮法。这与杨彩根等^[3]的实验结果类似,认为乙醇-超声波法明显优于丙酮法。从试验的易操作性分析,丙酮法样品磨碎费工费时,手工研磨细胞破碎不完全,不利于大批量样品的测定。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^[11-12]。而乙醇法先利用冷处理破碎细胞,经热乙醇萃取后再利用超声波进一步粉碎细胞处理,叶绿素 a 的萃取较完全。建议在养殖水体监测及水环境监测叶绿素 a 含量领域采用乙醇-超声波法。

3.2 乙醇-超声法测定条件的优化

本试验表明,运用乙醇-超声法测定浮游植物叶绿素 a 含量时,应将带样品的滤膜-20 冰冻 24 h 以上,加适量 80 热乙醇在 80 水浴中解冻,经超声波破碎机超声振荡处理 3 min 后,室温黑暗条件下萃取 6 h,再离心定容测定。这与赵玉华^[13]试验结果相似,合适的萃取时间为 6~8 h。梁兴飞等^[9]由正交优化试验得出最佳条件为:萃取温度 80 ,萃取时间 2 h,乙醇浓度 90%,超声波(40W, 20kHz)破碎 10 min,并且,随着超声波破碎时间过长,会造成提取液局部温度上升,叶绿素开始降解,进而影响叶绿素含量的测定。

水浴温度为 80 ,这与绝大多数研究结果相同,当水浴温度达 90 时,叶绿素 a 的值明显下降,表明叶绿素因温度过高而被破坏^[14]。另外乙醇的沸点是 81 ,当水浴温度高于 80 时会使得乙醇部分蒸馏而出,降低了乙醇的浓度,影响了热乙醇的萃取^[15]。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 杨彩根,宋学宏,孙丙耀. 浮游植物叶绿素 a 含量简易测定方法的比较[J]. 海洋科学, 2007, 37(1): 6-9.
- [4] 杨东方,高振会,孙培艳,等. 浮游植物增殖能力的研究探索[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 19-21.
- [5] 冯菁,李艳波,朱擎. 浮游植物叶绿素 a 测定方法比

- 较[J]. 生态科学, 2008, 17(2): 524-527.
- [6] 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[J]. 中国环境监测, 2006, 22(2): 21-23.
- [7] 陈宇炜, 高锡云. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 185-188.
- [8] 陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨[J]. 湖泊科学, 2006, 18(5): 550-552.
- [9] 梁兴飞, 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 856-861.
- [10] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 333-356.
- [11] 李振国, 卢军, 王国祥, 葛绪广. 分光光度法测定浮游植物叶绿素 a 的比较研究[J]. 中国环境监测, 2006, 22(2): 21-23.
- [12] 张如美, 孙晓斌. 对叶绿素 a 测定方法的改进[J]. 环境监测管理与技术, 2002, 14(2): 28-31.
- [13] 赵玉华, 刘畅, 薛飞. 影响分光光度法检测藻类叶绿素 a 的因素[J]. 沈阳建筑大学学报(自然科学版), 2007, 23(3): 482-484.
- [14] 吴志旭, 张雅燕. 浮游植物体内叶绿素 a 测定方法的改进[J]. 化学分析计量, 2002, 11(6): 37-38.
- [15] Nusch E A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination[J]. Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol, 1980, 14: 14-36.

Comparison and optimization of the methods for extraction and measurement of chlorophyll-a from phytoplankton

ZHANG Hong, LÜ Fu, LÜ Lin-lan, HUANG Jin-tian

(Department of Chemical And Biological Engineering of Yancheng Institute of Technology, Jiangsu Yancheng 224003, China)

Received: Sep., 26, 2011

Key words: Phytoplankton; Chlorophyll a; Determination Method

Abstract: The acetone method and ethanol-ultrasonic method to extract chlorophyll a in the water were compared and the latter was optimized. The results showed that the extraction efficiency of ethanol-ultrasonic method is significantly higher than that of acetone method. The correlation coefficient of the two methods was 0.9990. The linear regression equation between the acetone and ethanol-ultrasonic method was $Chla_{acetone} = 1.0932 Chla_{ethanol} - 11.677$. After optimization, the best treatment condition for ethanol ultrasonic method was: taking sample filtration membrane at $-20^{\circ}C$, frozen for more than 24 h, adding ethanol at $80^{\circ}C$ bathing with $80^{\circ}C$ water, oscillating with ultrasonic for 3 min, extracting for 6 h at room temperature in the dark, centrifugalizing and adding ethanol to constant volume for measurement.

(本文编辑: 康亦兼)