

浮游植物叶绿素 a 含量不同方法测定比较

——以白洋淀区域水体为例

王玉芳¹, 杨士斌¹, 刘得银¹, 周绪申²

(1. 水利部海委海河下游管理局水文水资源管理中心, 天津 300061;
2. 海河流域水环境监测中心, 天津 300170)

摘要:实验使用国际上较通用的热乙醇萃取分光光度法、国内常用的丙酮萃取分光光度法、BBE 藻类分类测定仪及 YSI 多参数测定仪测定浮游植物的叶绿素 a, 并将这 4 种方法的测定结果进行了比较。结果表明丙酮法的测定结果相对较高;BBE 藻类分类仪检测叶绿素 a 较接近于乙醇法的叶绿素 a 的测定结果, 线性关系和回归系数也最好, 丙酮法测定的结果次之, YSI 现场多参数检测结果与乙醇法叶绿素 a 的测定结果差别较大。实验得出, BBE 藻类分类仪检测结果可进行部分采用, 而 YSI 现场多参数检测结果可作为实验的参考值, 而且离心的步骤省略对实验结果影响较大。

关键词:叶绿素 a; 热乙醇萃取法; 丙酮萃取

中图分类号: X832

文献标识码: A

文章编号: 1000-0852(2014)05-0057-04

1 引言

藻类的数量和叶绿素含量均是水体中生物量多少的重要指标^[1], 叶绿素是藻类重要的组成成分之一, 是绿色植物光合系统的重要组成部分, 几乎所有的浮游植物都含有叶绿素 a, 叶绿素 a 的含量反映了浮游植物的生物量, 其浓度的高低是表征光能自养生物量的重要指标。叶绿素 a 含量的高低与水体藻类的种类、数量等密切相关, 其浓度经常用于估测浮游植物的生物量和生产力, 也是反映水体营养化程度的一个重要参数, 通过测定叶绿素 a 含量能够在一定程度上反映水质状况, 故叶绿素 a 的含量在水质分析中作为一项重要的测定指标^[2]。水体中叶绿素 a 浓度直接与浮游植物生物量相对应, 浮游植物生物量越高叶绿素 a 浓度越高, 叶绿素 a 与浮游植物生物量有较好的相关性^[3]。

目前, 测定浮游植物叶绿素 a 含量的主要方法有分光光度法、荧光光度法、高效液相色谱(HPLC)法等^[4]。国内在该领域是采用国家环保总局《水和废水监测分析方法》(第四版)推荐的分光光度法对叶绿素 a 进行测

定^[5]。分光光度法的优点是, 灵敏度高, 仪器设备简单, 操作简便, 应用广泛; 缺点是, 准确度相对不高, 研磨时丙酮极易挥发, 对环境造成污染。荧光光度法测定水体中叶绿素 a 的灵敏度、精密度和准确度较好, 而且具有简便快捷的特点。缺点是有可能受非光合作用的影响、参数多。高效液相色谱(HPLC)法由于技术专业性强, 仪器昂贵, 难以作为常规的监测方法, 适用大型海藻叶绿素分析。本文中叶绿素 a 测定方法采用分光光度法, 现场及实验室仪器采用荧光光度法, 并根据不同仪器测定的比对进行误差校正。

2 研究方法

2.1 研究区概况

白洋淀地处北纬 38°43'~39°02', 东经 115°38'~116°07'。东界任丘、雄县, 西邻清苑、徐水, 南连高阳, 北接容城^[6]。总面积 366 km², 85%的水域在安新境内, 几乎占安新县总面积的二分之一。淀区地势自西北向东南倾斜, 自然坡度为 1:7 000, 海拔高程 7~9 m。属于东部季风区暖温带半干旱区, 大陆性气候特点显著。平

收稿日期: 2013-07-29

基金项目: 水利部公益性行业科研专项经费项目(201101018); 国家国际科技合作专项(S2013BGR0244); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07203-002)

作者简介: 王玉芳(1972-), 女, 内蒙古包头人, 硕士, 高级工程师, 主要从事水文水资源管理工作。E-mail: wangyufangxyz@163.com

均降水量 528.6 mm,白洋淀总流域面积 31 199 km²。叶绿素 a 浓度夏秋季节较高。

2.2 采样地点

分别对白洋淀湿地、上游河流和水库的样点进行采样,采样地点分别为:王家寨、枣林庄、烧车淀、南刘庄、府河入口、圈头、采蒲台、端村、王快水库、西大洋水库、安州、望亭、黄花沟、焦庄。采样地点缩略编号如表 1 所示。

表 1 采样地点编号

Table 1 The sampling sites and their codes

编号	地点	编号	地点
Wj	王家寨	D	端村
Z	枣林庄	Wk	王快水库
S	烧车淀	X	西大洋水库
N	南刘庄	A	安州
F	府河入口	Wt	望亭
Q	圈头	Hh	黄花沟
C	采蒲台	J	焦庄

3 实验方法

3.1 叶绿素 a 提取方法

叶绿素 a 提取方法有多种,有机溶剂提取法是最为普遍使用的提取方法。有机溶剂提取法提取叶绿素 a 的方式有多种,其中直接浸泡、研磨、超声法最为常用^[5]。由于水质采样中叶绿素 a 的提取方法各式各样,其中的差异未知,为校正不同方法提取的误差,本实验叶绿素 a 提取方法采用—反复冻融浸提法。该方法将反复冻融对藻类细胞壁的破坏作用运用到叶绿素 a 的提取,利用胞壁内外的梯度渗透作用提高叶绿素 a 的提取效率^[6],并以丙酮、乙醇作为萃取剂进行比对,运用不同仪器测定的比对进行误差校正。

3.2 实验分析方法

3.2.1 丙酮—冻融分光光度法

抽滤水样为 1 000 mL,抽滤滤膜采用国产酸纤维滤膜 (0.45 μm),HAILEA 型循环水式真空泵抽滤,得到浮游植物细胞,在-4℃的冰箱和零上的外界环境中进行反复冻融,用丙酮(90%)萃取浮游植物中的叶绿素 a,并放入离心机,在 4 000 r/min 的转速下离心 10 min,分光光度计测萃取液在不同波长下的吸光值。

根据公式计算:

$$Ca = [(11.64E_{663} - 2.16E_{645} + 0.10E_{630}) \cdot V_1] / V_2 \cdot L$$

式中:Ca 为叶绿素 a 的浓度,mg/L;V₁ 为提取液的定容

体积,ml;V₂ 为过滤水样的体积,L;L 为比色池的光程长度,mm;E 为经 750nm 波长校正后的吸光值,即 E 值应扣除 E₇₅₀ 的数值,光程用 1cm 比色皿。

3.2.2 乙醇—冻融分光光度法

由乙醇替换成丙酮做为萃取液,采用反复冻融进行细胞破碎。乙醇法则缺省离心,以检验离心是否对叶绿素的测定有损失。

3.2.3 其它方法

现场采用 YSI 多参数测定仪进行测定;BBE 藻类分类测定仪进行实验室测定。以往的研究表明,乙醇法测定较其它方法准确,故本实验采用乙醇法测定结果,并校正其它方法测定的结果。

4 实验结果

不同的实验方法测定结果如图 1 所示。

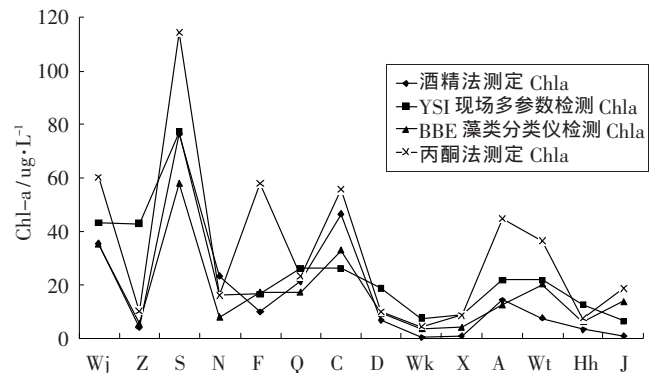


图 1 叶绿素 a 的不同实验方法测定结果

Fig.1 The chlorophyll-a results by different experimental methods

由图 1 可以看出,在各个样点的测定中,本研究中的 4 种方法测定均较一致,但具体数值均有小幅变动;在大部分样点的结果中,丙酮法测试的叶绿素 a 值最高,较少部分最高值出现在 YSI 现场多参数的测定结果中。BBE 藻类测定仪的测定结果较 YSI 现场多参数的测定结果低,其结果较接近于乙醇法的测定结果。

将 YSI 现场多参数检测叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的结果进行比对,如图 2 所示。

由图 2 所示,YSI 现场多参数检测叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的测定结果呈正相关,线性关系为 $y=0.9398x-5.2522$,回归系数为 $R^2=0.6652$,相关性较小。

将 BBE 藻类分类仪检测叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的结果进行比对,结果如图 3 所示。

由图 3 可知,BBE 藻类分类仪检测叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的测定结果呈较好的正相关,线性

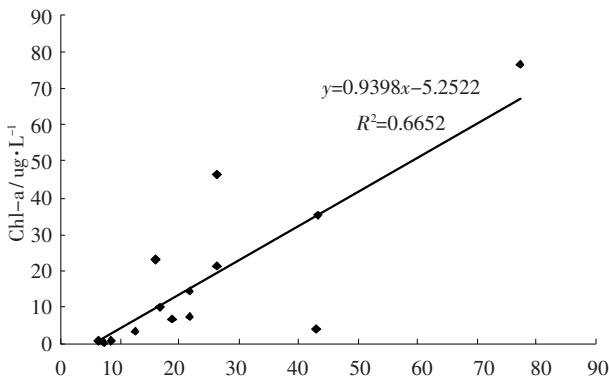


图2 YSI 现场多参数与乙醇法的叶绿素 a 的测定结果
Fig.2 The comparable results between the ethanol method and multi-parameter YSI method

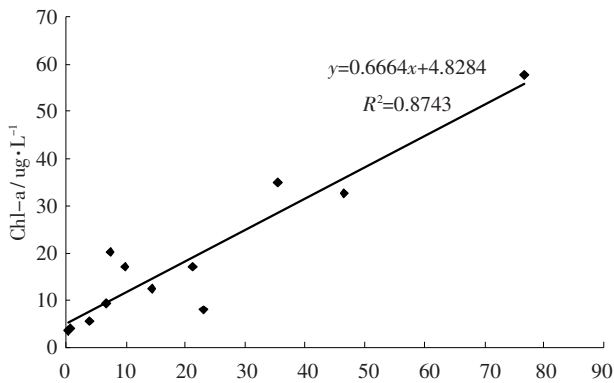


图3 BBE 藻类分类仪与乙醇法的叶绿素 a 的测定结果
Fig.3 The comparable results between the BBE FluoroProbe method and ethanol method

关系为 $y=0.6664x+4.8284$ ，回归系数为 $R^2=0.8743$ ，相关性较大。

将丙酮法测定叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的结果进行比对，结果如图 4 所示：

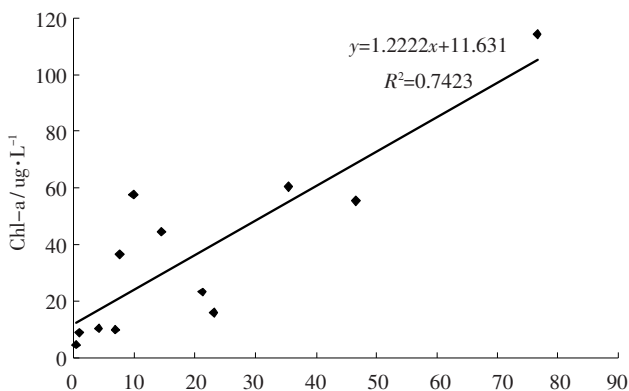


图4 丙酮法测定与乙醇法的叶绿素 a 的测定结果

Fig.4 The comparable results between the acetone method and ethanol method

由图 4 可知，丙酮法测定叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 的测定结果呈正相关，线性关系为 $y=1.2222x+11.631$ ，回归系数为 $R^2=0.7423$ ，相关性介于 BBE 藻类分类仪检测叶绿素 a、YSI 现场多参数检测叶绿素 a 与乙醇法测定叶绿素 a 相关性之间。

4 主要结论和讨论

BBE 藻类分类仪检测叶绿素 a 较接近于乙醇法的叶绿素 a 的测定结果，线性关系和回归系数也最好，丙酮法测定的结果次之，YSI 现场多参数检测结果与乙醇法叶绿素 a 的测定结果差别较大。

BBE 藻类分类仪检测结果可进行部分采用，而 YSI 现场多参数检测结果可作为实验的参考值，而离心的步骤省略对实验结果影响较大。

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°C) 和热萃取时间 (2min)，防止过高温度破坏叶绿素 a 而影响测定结果。另外从试剂的毒性考虑，丙酮的挥发性极强对人体的毒害远大于乙醇，长期使用对操作者的毒害较大^[4]。BBE 等仪器的检测不用化学试剂，对人体几乎无害。从对操作人员的安全性角度考虑，也应尽可能以乙醇作为萃取叶绿素 a 的有机溶剂，保护操作者的健康。

参考文献：

- [1] 陈丽芬, 郑峰. 叶绿素荧光技术快速测定水体藻类生物量的应用[J]. 城镇供水, 2007,6:51-52. (CHEN Lifen, ZHENG Feng. Application of rapid determination of algal biomass by chlorophyll fluorescence technique[J]. City and Town Water Supply, 2007,6:51-52. (in Chinese))
- [2] 段洪涛, 张柏, 宋开山, 等. 查干湖叶绿素 a 浓度高光谱定量模型研究[J]. 环境科学, 2006,27(3):503-507. (DUAN Hongtao, ZHANG Bai, SONG Kaishan, et al. Hyperspectral remote sensing of chlorophyll-a in the Chagan Lake, China[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2006,27(3): 503-507. (in Chinese))
- [3] 王伟, 顾继光, 韩博平. 华南沿海地区小型水库叶绿素 a 浓度的影响因素分析[J]. 应用与环境生物学报, 2009,15(1):64-71. (WANG Wei, GU Jiguang, HAN Boping. Analysis of factors affecting chlorophyll

- a concentration in small reservoirs in south China[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009,15(1):64-71. (in Chinese))
- [4] 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. (CHEN Yuwei, GAO Xiyun. Comparison of two methods for phytoplankton chlorophyll -a concentration measurement[J]. Journal of Lake Science, 2000,12(2):185-188. (in Chinese))
- [5] 国家环保总局,水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京:中国环境科学出版社, 2002. (State Environmental Protection Administration of China, Editorial Board of Water and Wastewater Monitoring and Analyzing Method. Water and Wastewater Monitoring and Analyzing Method (the 4th edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (in Chinese))
- [6] 田美影,王学东,马雪姣,等. 白洋淀气候变化及对生态系统的影响[J]. 南水北调与水利科技, 2013,12(3):76-80. (TIAN Meiyong, WANG Xuedong, MA Xuejia, et al. Climate change in the Baiyang Lake and its impact on ecological system [J]. South-to-North Water Transfers and Water Science&Technology, 2013,12(3):76-80. (in Chinese))

Comparison of Different Methods for Phytoplankton Chlorophyll-a Concentration Measurement: A Study Case of Water in Baiyangdian Area

WANG Yufang¹, YANG Shibin¹, LIU Deyin¹, ZHOU Xushen²

(1. Management Bureau of Haihe River Lower Reaches, HWCC, Tianjin 300061, China;

2. Haihe River Basin Water Environment Monitoring Center, Tianjin 300170, China)

Abstract: This study compared the 4 methods for phytoplankton chlorophyll-a concentration measurement, i.e. the hot ethanol extraction method, acetone extraction method, BBE fluoroprobe instrumental method and YSI 6600 instrumental method. The hot ethanol extraction method is used widely in the world now and the acetone extraction method is normally used in China. The study results show that there is a good comparability on measurement results between ethanol extraction method and the BBE fluoroprobe instrumental method. The concentration value level may be overestimated by the acetone extraction method. Some difference of results may be existed between the YSI 6600 instrumental method and hot ethanol extraction method. The results of BBE fluoroprobe instrumental method can be partially adopted. The results of YSI 6600 instrumental method can be used as a reference value of the experiment. The omission of centrifugation in the acetone extraction method caused some differences to the results.

Key words: Chlorophyll-a; hot ethanol extraction method; acetone extraction method

(上接第 50 页)

Gamma-Cloud Model for Eutrophication Evaluation

LIU Dengfeng¹, WANG Dong¹, DING Hao², ZHANG Liyuan³

(1. Key Laboratory of Surficial Geochemistry, MOE, Department of Hydrosiences, School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing 210046, China; 2. Taihu Basin Authority, Shanghai 200434, China; 3. Water Resources Service Center of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China)

Abstract: An eutrophication evaluation method of Gamma-Cloud model was proposed based on the theory of cloud model, with the assumption of asymmetry and unilateral constraint in membership distribution. Numeric characteristics of Gamma-Cloud model belonging to each eutrophication level were determined according to the established indicators; and the weight was calculated by analytic hierarchy process to generate Gamma-Cloud models of all indicators. Distribution of the certainty degrees belong to each level were determined after weight calculation; and the eutrophication level corresponding to the maximum certainty degree is the final evaluation. 12 lakes and reservoirs were evaluated with this model. Comparative researches with the methods of single index, variable fuzzy sets and normal cloud model shows that Gamma-Cloud model is effective and provides a new way of eutrophication evaluation.

Key words: cloud model; Gamma distribution; AHP; eutrophication evaluation; water environment