

浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法

王建 王骥

(中国科学院水生生物研究所)

THE METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHLOROPHYLL AND PHAEOPIGMENTS IN PHYTOPLANKTON

Wang Jian and Wang Ji

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

提 要

叶绿素含量的测定, 早已受到生理学家的重视。在生态学范畴内, 浮游藻类的叶绿素含量既是浮游藻类现存量的一个指标, 又是推算浮游藻类生产量的重要参量。故生态学家、水产与环境科学工作者, 均日益重视叶绿素含量的测定。本文在综合国内外有关资料的基础上, 结合作者的工作经验, 对浮游藻类的光合色素组成、叶绿素与脱镁叶绿素的测算原理、测算方法作了详细介绍。

高等绿色植物与各种藻类, 以及光合作用细菌都具有光合色素。光合色素可分为三大类:

I 叶绿素。在各种光合生物中, 叶绿素主要有以下几种⁽¹⁾:

(1) 叶绿素a。除光合细菌外, 所有的光合生物(各种藻类与高等绿色植物)均含有叶绿素a。

(2) 叶绿素b。主要分布在高等绿色植物与绿藻、裸藻中。

(3) 叶绿素c。主要分布在金藻、甲藻、褐藻中。

(4) 叶绿素d。主要分布在红藻中。

在光合细菌中存在细菌叶绿素a、细菌叶绿素c、细菌叶绿素₆₅₀等。

I 类胡萝卜素。类胡萝卜素种类多,其中以 β -胡萝卜素分布最为广泛,各种藻类与高等绿色植物均含有 β -胡萝卜素。

II 藻胆素。在蓝藻门与红藻门中均有广泛分布。

在上述各种光合色素中,叶绿素a(或细菌叶绿素a)是光合作用能量传递中心。其他色素可统称为辅助色素或天线色素。生态学家则往往研究叶绿素的组成与叶绿素含量的时空分布,并以此作为评价生产潜力、阐明生态系统的结构与功能的重要参数。

由于测定水体中的叶绿素含量较为简便、快速、准确,水产科学工作者越来越重视叶绿素含量的测定。叶绿素含量的测定不仅可以直接作为浮游植物现存量的指标,也可以根据叶绿素a、b、c比例上的差异大致判断各大门类浮游植物的组成。因而在一定程度上可以取代浮游植物计数、定量工作。为此,我们综合了有关资料,并根据自己的经验与体会,尽可能详细地介绍浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法,供同志们参考。

一、测定原理

在天然水体中,浮游植物群落中不仅存在着具有光合活性的叶绿素,而且或多或少地存在着脱镁叶绿素。在生产力较高的静水中或群落更替较快的时期,脱镁叶绿素的相对含量较高。由于脱镁叶绿素没有光合活性,应用叶绿素作为计算浮游植物生产量的主要参量时,必须将叶绿素与脱镁叶绿素区分开来。

叶绿素不溶于水,溶于中性有机溶剂。因此,通常选用丙酮、乙醇、甲醇作为叶绿素的提取液。叶绿素a、b、c在90%丙酮溶液中对红、黄光波的最大吸收光谱,分别为665、645、630纳米(nm)。

由于各门藻类所含的叶绿素、类胡萝卜素、藻胆素的种类与相对量存在着较大的差异,各门藻类的光合色素在90%丙酮溶液中的光吸收曲线尽管存在着一定差别,但由于叶绿素a的主导作用,在可见光范围内除血红裸藻在470nm有个最大峰值外,其他类群的植物的最大吸收光谱仍是430nm与665nm(见图1)。

细菌叶绿素与藻类叶绿素的光吸收曲线既相似又有不同,细菌叶绿素a的光吸收曲线的主要峰值为475nm与772nm。细菌叶绿素c的光吸收曲线主要峰值为430nm与668nm(见图2),我们可以根据叶绿素a与细菌叶绿素a吸收光谱的差异,分别测算两种色素的含量。

叶绿素经酸处理后,镁(Mg)原子被氢(H)原子取代,叶绿素a降解为脱镁叶绿素a。脱镁叶绿素a与等量的叶绿素a相比,在665nm光波下,具有较低的消光系数(1.0/1.7)。因此,可用酸化的方法,测定叶绿素酸化前后光密度的变化。如果天然水体中脱镁叶绿素相对含量高,酸化处理后光密度的变化就较小;反之,脱镁叶绿素的相对含量越低,酸化处理后,光密度的变化就较大。根据这个原理,选用适当的计算公式,就可计算出

叶绿素a与脱镁叶绿素a的含量。

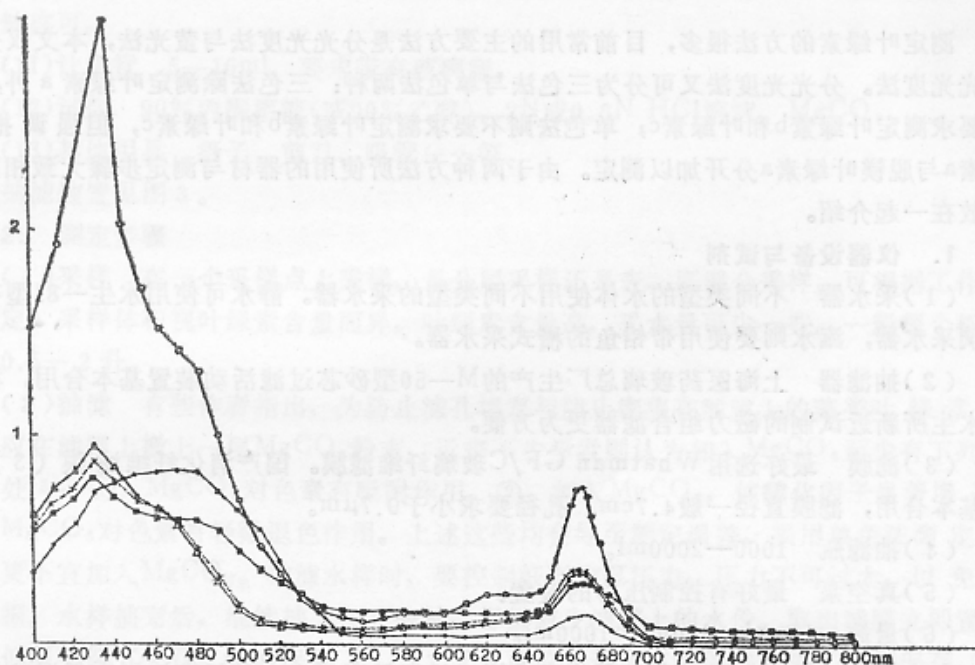


图1. 几种绿色植物在90%丙酮溶液中的光吸收曲线

○——○硅藻(直链硅藻) △——△绿藻(栅藻) ■——■蓝藻(微囊藻)
×——×大茨藻 ·——·裸藻(血红裸藻)

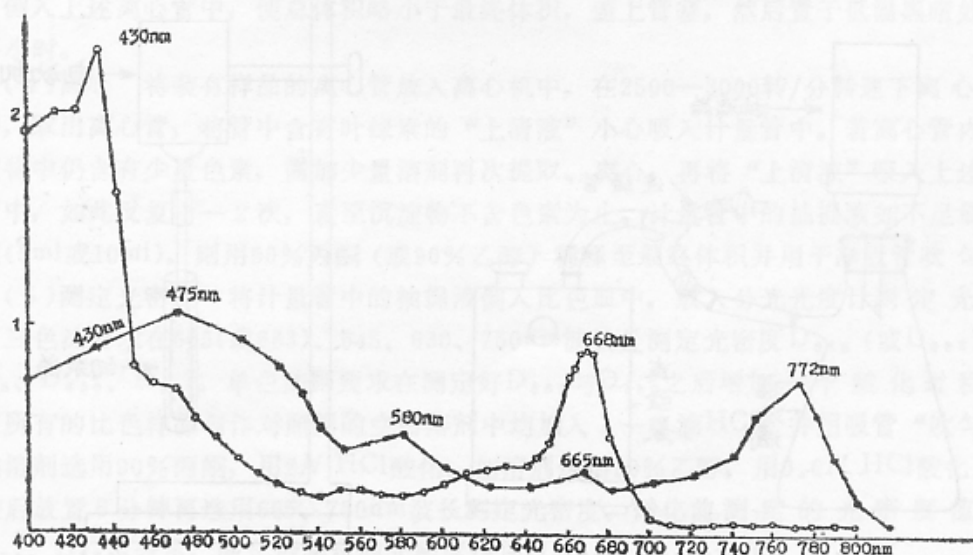


图2. 细菌叶绿素在90%丙酮中的光吸收曲线

○——○细菌叶绿素c ·——·细菌叶绿素a(仿Hussainy)

二、测定方法

测定叶绿素的方法很多,目前常用的主要方法是分光光度法与荧光法,本文仅介绍分光光度法。分光光度法又可分为三色法与单色法两种,三色法除测定叶绿素a外,同时要求测定叶绿素b和叶绿素c,单色法则不要求测定叶绿素b和叶绿素c,但强调把叶绿素a与脱镁叶绿素a分开加以测定。由于两种方法所使用的器材与测定步骤大致相同,故放在一起介绍。

1. 仪器设备与试剂

(1)采水器 不同类型的水体使用不同类型的采水器。静水可使用水生—81型有机玻璃采水器,流水则要使用带铅鱼的横式采水器。

(2)抽滤器 上海医药玻璃总厂生产的M—50型砂芯过滤活动装置基本合用,科学院水生所新近试制的磁力组合滤器更为方便。

(3)滤膜 最好选用Whatman GF/C玻璃纤维滤膜。国产消化纤维滤膜(3)号也基本合用,滤膜直径一般4.7cm,孔径要求小于 $0.7\mu\text{m}$ 。

(4)抽滤瓶 1000—2000ml。

(5)真空泵 最好有控制压力的装置。

(6)量筒 100ml、500ml、1000ml。

(7)冰箱 样品短时保存只需普通冰箱,长期保存(1—数星期)则需低温冰箱。

(8)离心机 4000转/分,甩开式较好。

(9)分光光度计 要求具750nm以上波段,光密度可读至0.01单位。国产721或751型分光光度计,均可满足此要求。

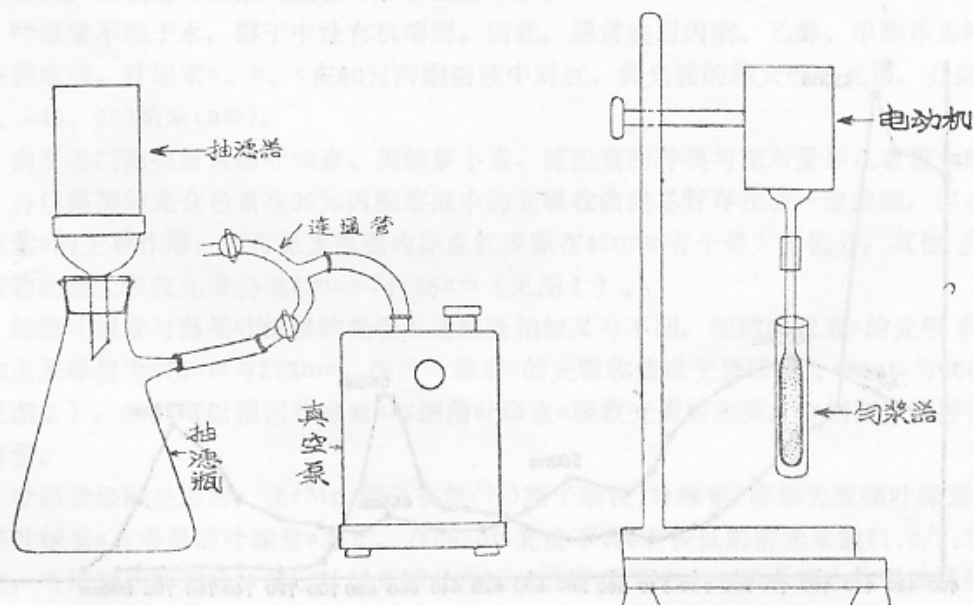


图3. 抽滤与研磨装置

(a) 抽滤装置 (b) 研磨装置

(10)研磨器 匀浆器与研钵均可作为研磨器。

匀浆器容量5—10ml,用可控制速度的马达带动。若无匀浆器,用口径5—6cm小型研钵亦可。

(11)计量管 5—10ml,要求带有玻璃塞。

(12)试剂 90%丙酮溶液(或90%乙醇)、2N或0.6N HCl溶液、 $MgCO_3$ 。

(13)其他用具 镊子、剪刀、吸管……等。

抽滤装置见图3。

2. 测定步骤

(1)采样 在一个采样点上采样,是分层采样还是表、底混合采样,可根据工作要求而定。采样体积视叶绿素含量而异,叶绿素含量高,采水量可少一些。一般每个样品采水0.5—2升。

(2)抽滤 有些作者指出,为防止滤孔堵塞与防止密集在滤膜上的藻类叶绿素酸化,应在滤膜上撒上一层 $MgCO_3$ 粉末。近来不少学者则认为加入 $MgCO_3$ 至少有下列不利之处⁽⁵⁾:①. $MgCO_3$ 对色素有吸附作用。②. 加入 $MgCO_3$,使酸化因子显著增高。③. $MgCO_3$ 对色素有轻微退色作用。上述这些均会导致测定误差。采用单色法测定叶绿素更不宜加入 $MgCO_3$ 。抽滤水样时,要控制好真空泵压力,压力不可过大,以免滤膜破损。水样抽完后,继续抽1—2分钟,尽量减少滤膜上的水份。取出滤膜立即置于黑暗低温条件下保存。短时保存(1—2天)可放入普通冰箱的冰盒中,长期保存(如1—数星期)则要放入-20℃的低温冰箱中保存。

(3)研磨提取 将载有浮游藻类样品的滤膜剪碎,放入匀浆器中,加入2ml 90%丙酮(或90%乙醇),在500—1000转/分转速下研磨1—2分钟。滤膜完全磨成糊状后,将匀浆器中的样品倒入离心管中,再用少许90%丙酮(或90%乙醇)冲洗匀浆器2—3次,倒入上述离心管中,使总体积略小于最终体积,盖上管塞,然后置于低温黑暗处抽提半小时。

(4)离心 将装有样品的离心管放入离心机中,在2500—3000转/分转速下离心10分钟,取出离心管,将管中含有叶绿素的“上清液”小心吸入计量管中。若离心管内的沉淀物中仍含有少量色素,需加少量溶剂再次提取、离心,再将“上清液”吸入上述计量管中,如此反复1—2次,直至沉淀物不含色素为止。计量管中的抽提液如不足最终体积(5ml或10ml),则用90%丙酮(或90%乙醇)稀释至最终体积并用干净吸管吹匀。

(5)测定光密度 将计量管中的抽提液倒入比色皿中,放入分光光度计测定光密度。三色法要求在665(或663)、645、630、750nm波长处测定光密度 D_{665} (或 D_{663})、 D_{645} 、 D_{630} 、 D_{750} 。单色法则要求在测定好 D_{665} 与 D_{750} 之后增加一个酸化过程,即在所有的比色样品与作对照用的空白溶剂中均加入1—2滴HCl,并用吸管“吹匀”(如溶剂选用90%丙酮,用2N HCl酸化,如溶剂选用90%乙醇,用0.6N HCl酸化),加酸后放置5分钟再选用665、750nm波长测定光密度。酸化前测定的光密度值用 D_{665b} 、 D_{750b} 表示,酸化后测定的光密度值用 D_{665a} 、 D_{750a} 表示。

(6)计算 由于三色法与单色法计算公式与计算原理有较大差异,下面分别加以阐述。

① “三色法”的计算方法

首先将测定的光密度值 D_{665} (或 D_{663})、 D_{645} 、 D_{630} 分别减去 D_{750} , 并除以比色皿的光程长度 $L(\text{cm})$, 便得到 E_{665} (或 E_{663})、 E_{645} 、 E_{630} 。

$$\text{即, } E_{665} = (D_{665} - D_{750})/L$$

$$E_{645} = (D_{645} - D_{750})/L$$

$$E_{630} = (D_{630} - D_{750})/L$$

叶绿素a、b、c在90%丙酮溶液中的含量可从下列两套公式中任选一套进行计算。

a. Parson—Strickland 计算公式(1963)(7)

$$Ca(\mu\text{g/ml}) = 11.6E_{665} - 0.14E_{630} - 1.31E_{645}$$

$$Cb(\mu\text{g/ml}) = 20.7E_{645} - 4.34E_{665} - 4.42E_{630}$$

$$Cc(\mu\text{g/ml}) = 55E_{630} - 16.3E_{645} - 4.64E_{665}$$

b. 联合国教科文组织(SCOR/UNESCO)推荐的计算公式(2)

$$Ca(\mu\text{g/ml}) = 11.64E_{663} - 2.16E_{645} + 0.10E_{630}$$

$$Cb(\mu\text{g/ml}) = 20.97E_{645} - 3.94E_{663} - 3.66E_{630}$$

$$Cc(\mu\text{g/ml}) = 55.22E_{630} - 14.81E_{645} - 5.53E_{663}$$

分光光度法测定叶绿素a、b、c含量的计算公式除上述两套公式外, 还有Richards-Thompson计算公式(1952), Humphrey-Jeffrey计算公式(1965)和Jeffrey-Humphrey计算公式(1975)等。

将上述公式计算出的各个结果 C_a 、 C_b 、 C_c , 分别乘以提取液的体积 $v(\text{ml})$, 同时除以过滤水样的体积 $V(\text{l})$, 就可得到单位水体中的叶绿素含量。

$$\text{Chla}(\mu\text{g/l}) = \frac{C_a \cdot v}{V}$$

$$\text{Chlb}(\mu\text{g/l}) = \frac{C_b \cdot v}{V}$$

$$\text{Chlc}(\mu\text{g/l}) = \frac{C_c \cdot v}{V}$$

② “单色法”的计算方法

首先计算出酸化前、后的光密度 E_{665b} 与 E_{665a} :

$$E_{665b} = D_{665b} - D_{750b}$$

$$E_{665a} = D_{665a} - D_{750a}$$

然后用Lorenzen(1967)公式计算单位水体中的叶绿素a与脱镁叶绿素a的含量(4,6)。

$$\text{叶绿素a}(\mu\text{g/l}) = \frac{A \times K \times (E_{665b} - E_{665a}) \times v}{V \times L}$$

$$\text{脱镁叶绿素a}(\mu\text{g/l}) = \frac{A \times K \times (R(E_{665a}) - E_{665b}) \times v}{V \times L}$$

其中, A ——叶绿素a的比吸光系数。在90%丙酮溶液中, $A = 11.2$, 在90%乙醇溶液中, $A = 11.5$

R —— D_b/D_a , 即纯叶绿素a酸化前后的光密度之比。 $R = 1.7$

K —— $R/R - 1 = 1.7/1.7 - 1 = 3.43$ 。

E_{665b} ——酸化前的光密度。

E_{665a} ——酸化后的光密度。

v ——提取液体积(ml)

V ——过滤水样之体积(l)

L ——比色杯光程长度(cm)

如用90%丙酮作为提取液, 则 $A = 11.2$, $R = 1.7$, $K = 2.43$ 。比色皿光程若为1cm, 则上述公式可简化为

$$\text{叶绿素a}(\mu\text{g/l}) = 27.216(E_{665b} - E_{665a}) \times \frac{v}{V}$$

$$\text{脱镁叶绿素a}(\mu\text{g/l}) = 27.216(1.7 \times E_{665a} - E_{665b}) \times \frac{v}{V}$$

应当指出, 当单位水体中叶绿素含量极低, 或水样量很少时, 用普通分光光度法测定叶绿素, 其灵敏度可能不够, 可以利用叶绿素受短波光照射后产生波长较长的荧光这一特点, 应用荧光光度计测定具有活性的叶绿素, 此法称为荧光分光光度法, 其灵敏度比一般分光光度法高10—100倍。

最后讨论一下细菌叶绿素的测定问题。

从广义概念讲, 水层中的水细菌也属于浮游植物的一部分。在水细菌中, 绝大多数属于异养菌, 只有光合自养菌才具有光合色素。天然水体一般不存在或存在极少光合细菌, 因而细菌叶绿素对浮游藻类叶绿素测定的干扰可以忽略不计。但在少数有机质含量丰富、有机污染比较严重的水体中, 特别是在照光—厌氧性生态循环系统中, 光合作用细菌群落发挥的作用极其巨大, 水体中细菌叶绿素的含量可以高出藻类叶绿素含量的很多倍。个别水体中的叶绿素甚至完全来源于光合细菌。从图1、图2可以看出, 由于细菌叶绿素与藻类叶绿素在665nm附近有着类似的吸收光谱, 当水体只存在着大量光合细菌时, 用前文介绍的测定方法测定叶绿素a与脱镁叶绿素a, 很易把细菌叶绿素误认为藻类叶绿素; 遇到这种情况, 我们将会发现: ①尽管叶绿素含量很高, 水色也可能为草绿色, 水体中的藻类数量却极少或根本没有。②由于光合细菌不具有光合系统II, 不能进行光合放氧。故用黑白瓶测氧法观察不到光合活性。毛产量(P_G)常为负值。

红硫细菌(*Chromatium* sp.)、红螺菌(*Rhodospirillum* sp.)、红极毛杆菌(*Rhodopseudomonas* sp.)均含有细菌叶绿素a, 在藻类与光合细菌混杂的水体中, 如何将藻类叶绿素a与细菌叶绿素a区分开来, Takahashi and Ichimura (1968)(3)提出了一个测算细菌叶绿素a的经验公式。

$$B.Chla(\mu\text{g/l}) = 25.2 \times E_{772} \times \frac{v}{VL}$$

其中, $B.Chla$ ——细菌叶绿素a

$$E_{772} = D_{772} - D_{850}$$

v ——提取液ml数

V——抽滤水样之体积(l)

L——比色皿光程长度(cm)

从总叶绿素a中减去用上式计算出来的细菌叶绿素a的含量,就可得到藻类叶绿素a的含量。

在照光一厌氧条件下大量出现的绿硫细菌, (*Chlorobium* sp.), 绿硫极毛杆菌 (*Chloropseudomonas*) 主要含有细菌叶绿素c (或称细菌叶绿素₆₆₀), 不含有或极少含有细菌叶绿素a。细菌叶绿素c与藻类叶绿素a的吸收光谱十分相似, 在772nm处没有光吸收峰值, 因而不能用上述公式测算其色素含量。如何将细菌叶绿素c与藻类叶绿素a的含量区分开来加以测定, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) 古谷雅树等, 1971, 植物生理学讲座, 第一卷, 光合作用, 薛德裕译, 科学出版社。
- (2) 费尊乐等, 1981, 海洋中叶绿素含量的测定, 海洋研究, 1981, (2) 76-83。
- (3) Hussainy S.U., 1972, Bacterial and algal chlorophyll in tow salt lakes in Vitoria, Australia, Water Research Pergamon press, Vol. 6, pp, 1361-1365.
- (4) Lorenzen, C.J. 1967, Determination of chlorophyll and phaeopigments, Spectrophotometric equations, Limnol. Oceanogr. 12, 343-346.
- (5) Marker A.F.H. and S.Jinks 1982, The spectrophotometric analysis of chlorophylla and phaeopigments in acetone, ethanol and methanol, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 16, 3-17.
- (6) Nusch E.A. 1980, Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14, 14-36.
- (7) Parsons, T.R. and stickland, J.D. 1963, Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophyll and carotenoids, J. Mar. Res. 21, 155-163.