

基于叶绿素 a 测定的分光光度法与 bbe 法比较:以千岛湖为例

周 静,胡忠军,李培培,刘其根,赵良杰

(上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室,上海 201306)

摘要: 2009年7月-2010年6月,采用bbe法和分光光度法对千岛湖3个采样点的叶绿素a进行了定量分析。全湖叶绿素a测定结果,分光光度法显著高于bbe法,二者存在极显著的相关关系,但个别数据差异较大。相同月份叶绿素a测定结果,叶绿素a的最大值、最小值都是出现在相同的月份,偏相关分析表明,2种方法测定的叶绿素a的月份变化较为一致。相同深度叶绿素a测定结果,2种方法测出叶绿素a的浓度在各采样点的垂直变化趋势一致。分光光度法与bbe法测定得到的叶绿素a含量显著相关,但后者比前者普遍偏小。分光光度法不适于河流等水体扰动较大和采样平台不稳定的水体环境。

关键词: 叶绿素a;分光光度法;bbe藻类现场分析仪;千岛湖

中图分类号: X830.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2013)02-0080-05

叶绿素a是所有浮游植物中均含有的主要吸光色素,其含量通常用来估量浮游植物的生物量(Gregor et al, 2004)和初级生产力(林少君等, 2005),反映水体的营养状况和作为水体富营养状况评价中的关键参数(王飞儿等, 2004)。监测水体叶绿素a对了解水环境质量现状及演变趋势具有重要意义。因此,建立一种操作简单和结果准确的叶绿素a测定方法很必要(余员龙, 2010)。

浮游植物叶绿素的测定方法主要有分光光度法(Lorenzen, 1967)、荧光法(Yentsch et al, 1963)和高效液相色谱法(Schmid et al, 1998)。荧光法具有高效、灵敏的优点,高效液相色谱法可以同时测定多种色素且结果更准确(Yentsch et al, 1963),但这2种方法所需仪器价格昂贵且操作复杂,难以作为常规的监测方法。分光光度法具有操作简便、可靠性强的特点而被广泛采用(王德铭, 1993;金相灿等, 1990;杨彩根等, 2007)。其他叶绿素a测定方法还包括水色传感器SeaWiPS遥感法(曾银东等, 2004)和机载海洋激光雷达法(贺岩等, 2004)。这些方法中有些已经使用了几十年,优点是可以充分将藻类细胞壁破碎,对叶绿素的提取速度快、效率高,但是采集样品过程需要按照一定的程序进行,样品的需求量较大,在贮存、运输的过程中样品中叶绿素a的

含量可能发生变化,在研磨过程中叶绿素a容易发生光降解使结果偏低,而且提取过程操作繁琐,转移过程中人为误差较大,导致叶绿素a含量的测定结果与水体实际含量存在一定的偏差(Gregor et al, 2004;林少君等, 2005)。此外,研磨过程需花费较多的时间和精力,与丙酮的接触时间长,不利于操作人员的健康(林少君等, 2005)。在实际操作中,人们已认识到丙酮-研磨法存在的缺点,并从多方面如提取液、提取方式、提取温度和提取时间等进行改进(陈宇炜等, 2000;司大英等, 2000;吴志旭等, 2002;张如美等, 2002)。

bbe藻类现场分析仪(bbe-FluoroProbe)是德国bbe公司基于叶绿素的荧光反应特征(Gregor et al, 2004)研制的能潜入水体中快速检测叶绿素浓度的仪器(Beutler et al, 2002)。bbe藻类现场分析仪能快速检测最深100m处的叶绿素浓度,检测数据可以通过串口在线显示或者存储在设备中等待后续分析。除检测叶绿素含量,该仪器还可以检测到藻的存在,并将藻按光谱分类(蓝藻/青蓝菌藻、绿藻、硅藻/甲藻、隐藻)。在国外,利用bbe-FluoroProbe检测分析藻类(以下简称bbe法)应用较为广泛,Moreno-Ostos等(2007)利用bbe法现场分析仪检测水库浮游植物群落的组成及其动态变化,Leboulanger等(2002)利用bbe法监测水体的藻类并预测蓝藻暴发,Gregor等(2005)、Beutler等(2002)比较了不同方法测定叶绿素a结果,bbe法测定结果与其他方法测定结果相关性较高。我们于2009年7月至2010年6月,在大型深水型水库——千岛湖分别使用分光光度法和bbe法测定水体的叶绿素a浓

收稿日期:2012-11-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30670388, 31072218)和上海市重点学科项目(Y1101)联合资助。

通讯作者:刘其根。E-mail: qgliu@shou.edu.cn

作者简介:周静,女,1986年生,硕士研究生。E-mail: zhouxuejunjun@yahoo.com.cn

度,验证二者测定结果的相关性,以期能找出结果更精确、使用更方便的叶绿素a测定方法。

1 材料与方法

1.1 样点设置

新安江是千岛湖最主要的入库地表径流,同时是千岛湖营养盐主要的源头。新安江大坝是千岛湖水流出口。根据千岛湖的水体形态、水流等特点,从上游至下游设置3个采样点(图1、表1),分别位于千岛湖的西北、中心和东南湖区。其中S1点属于上游河流区,流速较快,泥沙含量较大,水体浑浊;S4点位于中游过渡区,流速较缓,水体较为平静,水体较为清澈,藻类生物量较高;S9点位于下游静水区,水体最为平静且浮游动物较多,水体较为清澈。

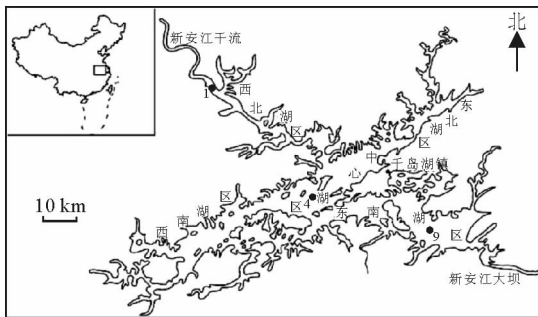


图1 千岛湖采样点

Fig. 1 Sampling stations of Qiandao Lake

表1 千岛湖采样点的位置

Tab. 1 Location of sampling stations of Qiandao Lake

采样点	S1	S4	S9
名称	赤山	猴岛	密山
湖区	西北湖区	中心湖区	东南湖区
经度	118°45'08.5"E	118°57'56.6"E	119°08'55.5"E
纬度	29°42'37.1"N	29°34'47.7"N	29°31'46.8"N

1.2 分光光度法测定

水样采集在每月中旬进行。根据各采样点水深情况,对各点水样进行相应的分层采集。其中,S1按照0.5、4、8、12、16、20和25 m等水层依次采集;S4按照0.5、4、8、12、16、20、25和30 m等水层依次采集;S9按照0.5、4、8、12、16、20、25、30、35、40、45和50 m等水层依次采集。采样方法和叶绿素a的测定按金相灿等(1990)方法进行。

1.3 bbe法测定

与分光光度法的水样采集同时进行。使用前,先将仪器置于水体表层,完成对深度的校准。校准完毕后,启动仪器的测量功能,匀速释放线缆,电脑会自动记录测量的各项指标,当水深达到预定测量水深时,停止测量,保存数据。

2 结果与分析

2.1 全湖叶绿素a测定

成对T检验表明,分光光度法测定得到的叶绿素a含量显著高于bbe法的测定结果(表2)。对2种方法测得的全湖全年的数据进行相关性分析,发现二者存在极显著的相关关系($r = 0.83, n = 293, P < 0.01$),但个别数据差异较大(图2)。将分光光度法测定的叶绿素a浓度划分为3个浓度组,分别与bbe法测定叶绿素a进行相关分析。结果表明,低浓度组($< 3 \mu\text{g/L}$)、中浓度组($3 \sim 12 \mu\text{g/L}$)的相关系数分别为0.452($P < 0.001, n = 250$)和0.682($P < 0.001, n = 42$),高浓度组($> 12 \mu\text{g/L}$)仅1对样本,未进行相关分析。

表2 2种测定方法得到的叶绿素a差异性比较

Tab. 2 Comparison of chlorophyll a measured by two methods

测定方法	平均值	样本数	均值的 标准误差	t值	P值
bbe法	1.242	293	0.132	4.354	<0.001
分光光度法	1.564	293	0.104		

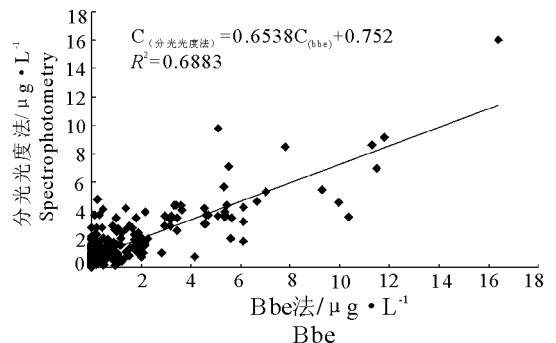


图2 2种方法测定的全湖叶绿素a及相关性

Fig. 2 The correlation of chlorophyll a concentrations by two methods in the whole lake

2.2 相同月份叶绿素a测定

相同月份叶绿素a测定结果见图3。2种方法测定出的叶绿素a的最大值、最小值都是出现在相同的月份。偏相关分析表明,2种方法测定的叶绿素a的月份变化较为一致,偏相关系数站点S1为0.841($P < 0.001$),S4为0.852($P < 0.001$),S9为0.778($P < 0.001$)。

2.3 相同深度叶绿素a测定

相同深度叶绿素a测定结果见图4。2种方法测出叶绿素a的浓度在各采样点的垂直变化趋势一致,表层水中的叶绿素a浓度最高,基本上都是随着深度的增加叶绿素a浓度逐渐降低,即水深越深,叶绿素a浓度越低。偏相关分析表明,2种方法测定

的叶绿素 a 的垂直变化趋势也较为一致, 偏相关系数 $S1$ 点为 0.799 ($P < 0.001$), $S4$ 点为 0.813

($P < 0.001$), $S9$ 为 0.666 ($P < 0.001$)。

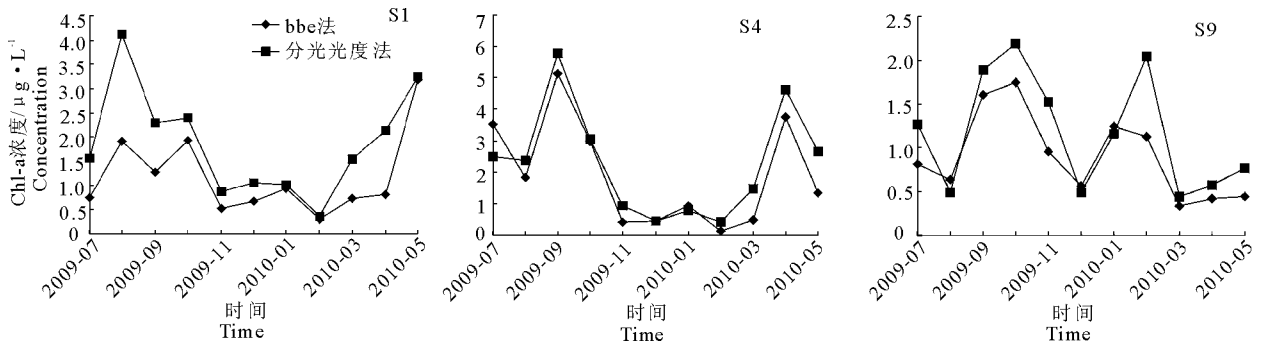


图3 相同月份叶绿素 a 测定结果

Fig.3 Chlorophyll a content at same month

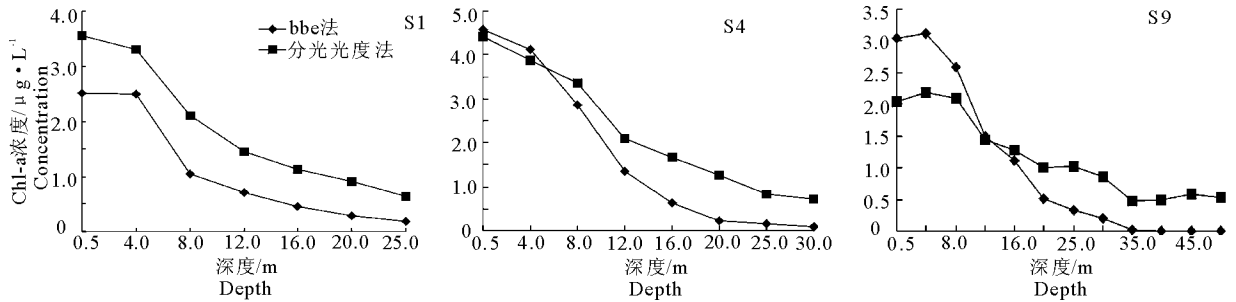


图4 相同深度叶绿素 a 测定结果

Fig.4 Chlorophyll a content at same depth

3 讨论

3.1 bbe 法数据低于分光光度法的原因

分析发现,我国通用的标准分光光度法与国际上运用较多的 bbe 法测定得到的叶绿素 a 含量显著相关,但后者比前者普遍偏小。分光光度法在叶绿素 a 提取过程中,如果使用塑料材质的离心管提取叶绿素 a(丙酮对塑料具有腐蚀作用)或者冷藏时间过长,测定的藻类叶绿素 a 值都会偏大(赵玉华等, 2007),本文采用塑料材质的离心管进行提取,从而导致结果偏高。本研究采用的 bbe 法是根据高效液相色谱(HPLC)分析的校准参数对叶绿素 a 含量进行定量的(Meyns et al, 1994)。叶绿素 a 样品中含有一些异质同晶体和其他叶绿素衍生物,分光光度法能在 665 nm 光谱下检测出这些物质,并将其作为叶绿素 a 的一部分;但 bbe 能识别这些物质,未将其作为叶绿素 a 的一部分,从而导致 bbe 法测定数据低于分光光度法(Meyns et al, 1994)。而且,本研究使用的 bbe 法能减少黄色物质(即有色可溶性有机物, CDOM)的影响,导致 bbe 法数据比分光光度法偏低。CDOM 存在于所有自然水体中,是溶解性有机物的重要组成部分(Rochelle-Newall et al, 2002),

在紫外短波光的激发下会发出长于吸收光波长的荧光(张运林, 2006); CDOM 的吸收还延展到可见光的蓝光部分,与浮游植物叶绿素 a 和非生物悬浮颗粒物的吸收重叠,从而影响水体初级生产力(Carder et al, 1989; Carder et al, 1991; Rochelle-Newall et al, 2002; Nelson et al, 1998)。有研究表明,在沿岸水域,若忽略了黄色物质的影响,将使叶绿素浓度下降 35% ~ 60%(Bricaud et al, 1987)。

3.2 水文条件对 2 种方法测定结果的影响

比较 3 个样点 2 种方法的周年叶绿素 a 测定结果, $S1$ 点相关性偏低,特别是 2009 年 8 月和 2010 年 4-5 月分光光度法的测量值要明显高于 bbe 法。 $S1$ 点位于新安江来水方向的最前沿,属于河道型的环境,因此水流要强于其他区域。在 2009 年 7 月末和 2010 年 3 月,该流域经历过大面积的降雨,因此过水量增加,水位升高,水体流速变快。由于我们所使用的分光光度法采样时定深是依靠所释放的缆绳的长度来衡量的,所以在水流比较急的情况下,对于深度的定位偏差较大,所采水层可能并未达到目标深度,而较浅处通常情况下光照条件更好,浮游植物生物量和叶绿素含量都较高些; bbe 法采用的是压力定深,每次使用前还根据当时的大气压力进行校

准,因此深度定位是比较准确的,不会受到水流的影响。所以,在这 2 个时期,由于水文条件导致的采样误差,致使分光光度法的结果与 bbe 法结果有较大的差异,也说明分光光度法在采样过程中存在流水中深度定位不准的瑕疵,不适于河流等水体扰动较大和采样平台不稳定的水体环境。S4 点和 S9 点是静水区,风浪水流均较小,虽然分光光度法的测定值偏大,与 Gregor 等(2004)的研究结果相似,但 2 种方法的测定结果相关性较高, R 值接近。

最后需要指出的是,尽管低浓度组和中浓度组 2 种方法测得的叶绿素 a 含量的相关性均达到了显著水平,但均较明显地低于全浓度组,可能与划分浓度组后,各浓度组的变异范围即变化尺度变小有关。低浓度组的相关性下降比较多,可能是浓度低组人为测定误差对数据的“贡献”大于高浓度组,对相关性的影响较大。

参考文献

陈宇炜,高锡云. 2000. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定[J]. 湖泊科学, 12(2): 185-188.

贺岩,吴东. 2004. 机载海洋激光雷达测量叶绿素 a 浓度,悬移质浓度和浅海深度的性能估计[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 34(4): 649-654.

金相灿,屠清瑛. 1990. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京:中国环境科学出版社.

李培培,史文,刘其根,等. 2011. 千岛湖叶绿素 a 的时空分布及其与影响因子的相关分析[J]. 湖泊科学, 23(4): 568-574.

林少君,贺立静,黄沛生,等. 2005. 浮游植物中叶绿素 a 提取方法的比较与改进[J]. 生态科学, 24(1): 9-11.

司大英,杨旭. 2000. 测定生产力中“叶绿素 a”的方法探讨[J]. 环境工程, 18(003): 52-53.

王德铭. 1993. 水生生物监测手册[M]. 福州:东南大学出版社.

王飞儿,吕唤春,陈英旭,等. 2004. 千岛湖叶绿素 a 浓度动态变化及其影响因素分析[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 30(1): 22-26.

吴志旭,张雅燕. 2002. 浮游植物体内叶绿素 a 测定方法的改进[J]. 化学分析计量, 11(6): 37-38.

薛俊增,材楨,姚建良,等. 2011. 千岛湖水温垂直分布的季节演变对透明层昼夜垂直迁移的影响[J]. 科技导报, 29(29): 65-71.

杨彩根,宋学宏,孙丙耀. 2007. 浮游植物叶绿素 a 含量简易测定方法的比较[J]. 海洋科学, 31(1): 6-9.

余文永,胡迪琴,年冀,等. 2003. 分光光度法测定水体叶绿素 a 含量的测量不确定度分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 16(3): 25-32.

余员龙. 2010. 千岛湖浮游植物群落结构时空分布格局及其与主要环境因子的关系[D]. 上海:上海海洋大学.

张如美,孙晓斌. 2002. 对叶绿素 a 测定方法的改进[J]. 环境监测管理与技术, 14(2): 31-31.

张运林. 2006. 水体中有色可溶性有机物的研究进展[J]. 海洋湖沼通报, (3): 119-127.

赵玉华,刘畅,薛飞,等. 2007. 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, 23(3): 482-484.

曾银东,商少凌,张彩云,等. 2004. 南海东北部基于标准经验算法的遥感叶绿素 a 反演结果比较分析[J]. 海洋科学, 28(8): 14-18.

Beutler M, Wiltshire K H, Meyer B. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ[J]. Photosynthesis Research, 72(1): 39-53.

Bricaud A, Morel A. 1987. Atmospheric corrections and interpretation of marine radiances in CZCS imagery: use of a reflectance model[J]. Oceanologica Acta, 7: 33-50.

Carder K L, Hawes S K, Baker K A, et al. 1991. Reflectance Model for Quantifying Chlorophyll-a in the Presence of Productivity Degradation Products [J]. Geographical Research, 96(C11): 20599-20611.

Carder K L, Steward R G, Harvey G R, et al. 1989. Marine humic and fulvic acids; Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll[J]. Limnology and oceanography, 68-81.

Gregor J, Geriš R, Maršúlek B, et al. 2005. In situ Quantification of Phytoplankton in Reservoirs Using a Submersible Spectrofluorometer [J]. Hydrobiologia, 548(1): 141-151.

Gregor J, Geriš R, Maršúlek B. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods[J]. Water Research, 38(3): 517-522.

Leboulanger C, Dorigo U, Jacquet S, et al. 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study[J]. Aquatic microbial ecology, 30(1): 83-89.

Lorenzen C J. 1967. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations[J]. Limnology and oceanography, 12(2): 343-346.

Meyns S, Illi R, RiBi B. 1994. Comparison of chlorophyll-a analysis by HPLC and spectrophotometry: where do the differences come from? [J] Archiv für Hydrobiologie, 132(2): 129-139.

Moreno-Ostos E, Cruz-Pizarro L, Basanta D A, et al. 2007. The spatial distribution of different phytoplankton functional

- groups in a Mediterranean reservoir[J]. *Aquatic Ecology*, 42(1): 115–128.
- Nelson N, Siegel D, Michaels A. 1998. Seasonal dynamics of colored dissolved material in the Sargasso Sea [J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 45(6): 931–957.
- Rochelle-Newall E, Fisher T. 2002. Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay[J]. *Marine Chemistry*, 77(1): 23–41.
- Rochelle-Newall E, Fisher T. 2002. Production of chromophoric dissolved organic matter fluorescence in marine and estuarine environments: an investigation into the role of phytoplankton[J]. *Marine Chemistry*, 77(1): 7–21.
- Schmid H, Bauer F, Stich H B. 1998. Determination of algal biomass with HPLC pigment analysis from lakes of different trophic state in comparison to microscopically measured biomass[J]. *Journal of Plankton Research*, 20(9): 1651–1661.
- Yentsch C S, Menzel D W. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence[J]. *Deep Sea Research*, 10(3): 221–231.

(责任编辑 张俊友)

Comparison between Spectrophotometry and Bbe-FluoroProbe for Measuring Chlorophyll a ——Illustrated by the Example of Qiandao Lake

ZHOU Jing, HU Zhong-jun, LI Pei-pei, LIU Qi-gen, ZHAO Liang-jie

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization of the
Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University,
Shanghai 201306, P. R. China)

Abstract: From July 2009 to June 2010, we have analyzed the quantitative of chlorophyll a from three sampling sites in Qiandao Lake by bbe-FluoroProbe and spectrophotometry. The measuring result of chlorophyll a from the whole lake shows that significant correlation exists between bbe-FluoroProbe and spectrophotometry, and the individual data is quite different. The chlorophyll a is more by spectrophotometry than by bbe-FluoroProbe. The result of chlorophyll a measured in the same month shows that the maximum and minimum of chlorophyll a all have appeared in the same month. The partial correlation analysis shows that the month changes for measuring chlorophyll a by two ways are more consistent. By measuring chlorophyll a in the same water depth, the result shows that the vertical change trend of chlorophyll a concentration measured by two ways from each sampling site is consistent. The concentration of chlorophyll a, which is getting from spectrophotometry and bbe-FluoroProbe, is significant correlated, but the latter generally smaller than the former. Spectrophotometry is not suitable for aquatic environment with big water disturbance and unstable sampling flat.

Key words: chlorophyll a; spectrophotometry; bbe-FluoroProbe; Qiandao Lake