

浮游植物叶绿素 a 含量的测定及误差分析

郑晓艳

(山西省环境监测中心站,山西太原 030027)

摘要:本文在国家环境保护总局《环境监测技术规范》(第四册)中叶绿素 a 的测定(简称为“标法”)方法基础上,对叶绿素 a 测定中常见的实验误差进行了分析和讨论,并对丙酮萃取、研磨细胞破碎法进行改进,优化浸提步骤和计算方法,使叶绿素 a 的浸提效率显著增加,并提高了实验数据的准确性和精密度。

关键词:浮游植物;叶绿素 a;方法;误差

中图分类号:TQ611.5 文献标识码:B 文章编号:1006-8759(2016)02-0055-03

DISCUSSING ABOUT THE DETERMINATION OF THE CHLOROPHYLL A

ZHENG Xiao-yan

(shanxi environment monitoring central station, Taiyuan 030027, China)

Abstract: Based on the standard method, the extraction step and calculation process was optimized. The common experimental error of the determination of chlorophyll a was analysed and discussed. The extraction efficiency of the chlorophyll a was increased significantly, and the accuracy and precision of the experimental data were increased.

Key words: phytoplankton; chlorophyll a; method; error

随着我国工农业生产的迅速发展和城市化进程的加快,工业废水和生活污水排放量日益增加。富营养化已成为中国地表水普遍面临的重要环境问题,是地表水营养盐含量不断上升、生产力从低的贫营养状态逐步向生产力高的富营养状态过渡的一种现象^[1]。水质富营养化程度不断加剧,使得藻类大量繁殖,严重破坏水体生态平衡,也严重影响到人类的生产和生活。浮游植物(又称浮游藻类,是悬浮于水中生活的微小藻类植物的总称)的种群生物量是水生生态系统研究的一个重要生物指标,是水华预警防治监测过程中最为直接有效的方法之一^[2-5]。

叶绿素是植物光合作用中的重要光合色素,广泛存在于藻类等绿色植物组织中。浮游植物和其他的绿色植物一样具有叶绿素。当植物细胞死亡后,叶绿素即游离出来。叶绿素是一类含脂的色

素家族,包括叶绿素 a、b、c、d、f 以及原叶绿素和细菌叶绿素等。叶绿素很不稳定,光、酸、碱、氧、氧化剂等都会使其分解。在酸性条件下叶绿素生成绿褐色的脱镁叶绿素,在稀碱液中可水解成鲜绿色的叶绿酸盐以及叶绿醇和甲醇。在光合作用中,绝大部分叶绿素的作用是吸收及传递光能,仅极少数叶绿素 a 分子起转换光能的作用。因此通过测定浮游植物叶绿素 a,可一定程度反映藻类现存量,掌握水体的初级生产力情况;其含量高低与水环境质量密切相关,是水理化性质动态变化的重要指标;是合理评价水体富营养化现状及科学预测其发展趋势的基础^[6-7]。

浮游植物叶绿素 a 的测定方法主要有荧光光度计法、高效液相色谱法、分光光度计法等。由于荧光光度计法和高效液相色谱法分析步骤繁琐,不能用于野外快速检测等缺点,不被广泛使用^[8-11]。

我国目前采用较多的仍是国家环境保护总局

《环境监测技术规范》(第四册)中叶绿素 a 的测定(简称为标法)^[10]。通过大量实验证明,该方法存在耗时长、人员操作误差较大等不足导致结果不准确。

本文在该方法基础上,提出叶绿素 a 与脱镁叶绿素 a 含量的测定,并对该方法中丙酮萃取、研磨细胞破碎法进行改进,大大提高了实验效率,并根据大量实验实践和文献调研,对常见实验误差进行了分析和讨论,以提高浮游植物叶绿素 a 测定的精确度和准确性。

1 实验部分

1.1 样品采集

采集水样时拟表层采样,采样体积视叶绿素含量而异(一般富营养化水体需要 250 mL,贫营养水体需要 1 000~2 000 mL)。样品采集后立即加入 1%碳酸镁(每升样品加 1%碳酸镁 1 ml)以防止酸化引起色素变性,同时罩黑色塑料袋避光,并于阴凉处保存。

1.2 实验仪器

乙酸纤维滤膜(0.45 μ m)、抽滤装置、765 型紫外可见分光光度计、抽滤瓶、真空泵、低温台式离心机、10 ml 容量瓶具塞刻度离心管(10 ml)、烧杯、移液枪等。

1.3 试剂

丙酮、盐酸、MgCO₃ 均为分析纯试剂。

1.4 实验步骤

1.4.1 样品浓缩

用乙酸纤维滤膜过滤适量充分摇匀的水样,控制抽滤负压约 30 kPa(防止滤膜破碎),并注意避光。水样抽完后需继续抽 1~2 min,尽量减少滤膜上水分含量。

1.4.2 样品萃取

“标法”中,是将滤膜冷冻干燥 6~8 h 后放入组织研磨器中,加入少量碳酸镁粉末和 90%丙酮充分研磨,而后转移至离心管中离心 10 min,将上清液转移入容量瓶中定容。继续加入 2~3 ml 90%丙酮于研磨器中研磨,离心后合并上清液,定容测定^[10]。由于该方法提取过程涉及反复研磨费时费力、且转移过程容易造成叶绿素 a 损失等缺点导致结果不准确。

本方法是抽滤完后取下滤膜,小心剪碎,并置于 10 mL 离心管中。加入 5 mL 90%丙酮,充分震

荡摇匀,使滤膜完全浸于液面下,在-20℃冰箱中浸提 16~20 h 后取出,用低温离心机(4℃)4 500 r/min 离心 20 min。将上清液小心转入 10 ml 容量瓶中,加 3 mL 90%丙酮于离心管沉淀中,充分混匀,离心,合并上清液,最后样品用 90%丙酮定容至 10 ml,摇匀待测。

本方法较“标法”而言,用浸提法代替研磨,不仅避免了研磨过程中丙酮对人的伤害,降低了叶绿素 a 在光下的暴露,而且减少了反复转移过程中叶绿素 a 的损失。

1.4.3 样品测定

以 90%丙酮作为参比液,用 1 cm 比色皿对上述待测液进行比色,分别读取波长 750、663、645 和 630 nm 处的吸光值,然后在样品比色皿中加 1 滴 1 mol/L 盐酸,加盖摇匀,对样品酸化,1 min 后重新在上述波长处测吸光值(该过程注意避免样品挥发损失)。

1.4.4 计算方法

在天然水体中,浮游植物中同时存在具有光合活性的叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a。由于脱镁叶绿素 a 没有光合活性,因此计算作为浮游植物生产量的主要指标叶绿素 a 时,必须消除脱镁叶绿素 a 的干扰^[12]。

叶绿素 a 经酸处理后,卟啉环中心的镁原子被氢原子取代,转化为脱镁叶绿素 a。脱镁叶绿素 a 较叶绿素 a 在 663 nm 波长下具有较低的摩尔消光系数,故测定叶绿素 a 酸化前后吸光值的变化,可区分叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a。如果天然水体中脱镁叶绿素含量相对较高,酸化处理后吸光值的变化就较小;反之,酸化处理后吸光值的变化就越大。

本研究中叶绿素 a 含量的计算方法仍采用多色法^[13],计算公式如下:

$$C_x = \frac{[11.64 \times (E_{663}^x - E_{750}^x) - 2.16 \times (E_{645}^x - E_{750}^x) + 0.10 \times (E_{630}^x - E_{750}^x)] \cdot V_1}{V \cdot \delta} \quad (1)$$

$$chla = C_A - C_B \quad (2)$$

$$apochla = C_A - chla \quad (3)$$

其中, *chla*、*apochla* 分别为叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a 的浓度(mg/m³); E_{663}^x 、 E_{645}^x 、 E_{630}^x 、 E_{750}^x 分别为样品在加酸前后 663 nm、645 nm、630 nm、750 nm 处的吸光值;x 可以为 A 或 B,分别代表酸化前后的样品(A 为酸化前、B 为酸化后),V 为水样体积(L); δ 为比色皿光程(cm); V_1 为定容体积

(mL); 、分别表示酸化前与酸化后测定的叶绿素 a 含量(注:测定过程中,各波长的吸光值减去相同条件下 750 nm 处的吸光值是消除样品中悬浮颗粒的干扰)。

2 结果和讨论

2.1 方法优化及比较

本文改进了标法中对叶绿素 a 的提取,采用低温浸提,而对于浸提时间的优化,也做了对比试验,试验结果见表 1。

表 1 不同浸提时间对叶绿素 a 含量测定的影响

水样	浸提时间							
	1h	6h	12h	16h	20h	24h	28h	
1#	22.3	26.5	27.8	29.3	29.6	28.8	25.7	
2#	10.3	12.5	13.8	14.4	14.9	12.9	10.8	
3#	29.3	34.2	35.8	36.5	36.3	35.7	33.8	

表 1 对三个不同的样品 1~28 h 浸提时间进行比较表明,不同样品中叶绿素 a 的浸提效率在 1~20 h 随着时间增加而增加,16~20 h 达到稳定峰值。而继续增加浸提时间,叶绿素 a 的浸提效果不增反降,分析原因可能与叶绿素 a 的稳定性有关。故改进法中采用 16~20 h 浸提时间。

表 2 为采集的三个样品,分别用标法及本文改进后的方法(简称“改进法”)测定叶绿素 a 含量,每种方法设四个重复。实验结果见表 2。

表 2 叶绿素 a 用不同方法测定结果统计

水样	提取方法	1	2	3	4	平均值	标准偏差(%)
1#	标法	12.3	14.7	13.9	16.7	14.4	11
	改进法	29.6	28.3	27.9	29.0	28.7	2
2#	标法	8.4	6.9	7.9	6.0	7.3	13
	改进法	14.9	15.3	15.7	14.6	15.1	3
3#	标法	20.6	23.6	24.3	18.7	21.8	10
	改进法	36.3	36.0	35.9	35.5	35.9	0.7

两种不同的测定方法测定叶绿素 a 结果(表 2)表明,改进法对浮游植物叶绿素 a 的提取效率显著高于标法,且试验重复性较好。而标法作为常用藻类叶绿素 a 测定方法,操作步骤繁琐,研磨费时费力,而且需多次转移,人为误差较大;其研磨过程中叶绿素 a 易发生光降解而导致目标物损失,这些影响因素大大降低了实验结果的精密度和准确性。另外,标法中对叶绿素 a 的计算公式未考虑脱镁叶绿素 a 的干扰,造成实验结果偏离实

际值,准确性降低。而本文的改进法则显著提高萃取效率,操作简便、安全可靠、且实验重复性较高,大大提高实验精密度,而计算时,消除了脱镁叶绿素 a 的干扰,结果准确性增大。

2.2 叶绿素 a 含量测定误差分析

叶绿素 a 测定结果偏低的可能原因^[4]:采集水样后,未立即加入 1 mL 1% MgCO₃ 悬浊液,导致色素变性;叶绿素 a 又是对光、酸性物质和温度比较敏感,在操作过程中特别要避免这些因素的影响,否则会造成结果偏低;较高的真空压力导致藻类细胞破坏穿过 0.45 μm 滤膜流失等等。

叶绿素 a 测定结果偏高的可能原因:计算叶绿素 a 含量时,未区分叶绿素 a 和脱镁叶绿素 a,造成结果偏高;加酸比色时,盐酸加入量为 1 滴,当加入过量时,会造成结果偏高等。

叶绿素 a 测定过程中,测定液在 750 nm 处吸光值应小于 0.005,当其大于 0.005 时,表明萃取液太浑浊,应重新离心或过滤,尽量减小溶剂空白对结果的影响。

3 结论

本文在标法基础上,对丙酮萃取、研磨细胞破碎法进行改进,优化浸提步骤和计算方法,大大提高了叶绿素 a 的浸提效率、提高了实验数据的准确度和精密性。另外,本文根据大量实验实践和文献调研,对叶绿素 a 测定中常见的实验误差进行了详细的分析和讨论,为广大科研人员提供科学参考。

参考文献

- [1] 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,12(2):185-188.
- [2] 杜胜蓝,黄岁棵等.浮游植物现存量表征指标间相关性研究 I:叶绿素 a 与生物量.水资源与水工程学报,2011,22: 40-44.
- [3] 吴琼.太湖五里湖叶绿素-a 与环境因子的灰关联分析. [J].农业环境科学学报,2006,25(增刊):673-675.
- [4] 陈宇炜,陈开宁等.浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差探讨.湖泊科学,2006,18(5):550-552.
- [5] 翁美艳,林美爱等.地表水浮游植物叶绿素 a 测定方法比较研究.中国环境监测,2009,25(3),36-39.
- [6] Reynolds C S. The ecology of fresh water phytoplankton[M]. London: Cambridge Univ. Press,1984.
- [7] Pan Y L. Chlorophyll-a and the primary productivity in ocean [J]. Ocean Science, 1987,11:62-65.

(下转第 34 页)

过低,否则极易形成有害氯气,同时由 ORP 控制投入适量漂水,正常情况原水 pH 在 5 左右,无需进行调整;二氧化由 pH 计控制 PH:10 左右,同时由 ORP 控制投入适量漂水,通过漂水氧化作用将次、亚磷酸盐氧化成正磷酸盐,同时将络合类物质氧化破除,之后加入碱、氯化钙、混凝剂,在碱性条件下正磷酸盐生成磷酸钙沉淀物,镍离子形成氢氧化镍沉淀物;为保证重金属镍稳定达到《电镀污染物排放标准》(GB21900-2008)中表三规定的排放限值标准,设置离子交换器进行深度处理,当化学沉淀无法完全达到表三标准时,通过离子交换把关深度处理,使废水稳定达标排放。

4.3 主要构筑物尺寸

各主要构筑物尺寸见表 2:

表 2 主要构筑物

名称	基本尺寸(m×m×m)	数量(只)	备注
pH 调整池	1.2×1.2×3.5	2	地上钢砼
氧化池	2.0×2.0×3.5	2	地上钢砼
混凝反应池	1.2×1.2×3.5	3	地上钢砼
沉淀池	4.0×4.0×4.5	1	地上钢砼
多介质过滤器	Φ2.0	1	钢制
离子交换器	Φ2.2	1	钢制

5 工程运行效果与分析

5.1 运行效果

该工程自 2014 年 11 月设备安装完成后开始使用,经过一个多月的运行调试,均达到设计要求,设备运行良好,达到预期目的,主要水质指标均低于标准值,详见表 3。

5.2 效果分析

由进出水水质分析,采用酸性氧化+钙盐沉淀法处理化学镍废水,辅以离子交换深度把关处理,废水中总磷≤0.5,去除率达 99%;总镍≤0.1,去除率达 99%,SS≤30,去除率达 99%。出水水质

表 3 达标验收监测结果

编号	监测站位	样品外观	pH 值	总磷 (mg/L)	总镍 (mg/L)	SS (mg/L)
141230	废水调节池	混浊	4.3	95	50	100
141230	沉淀池出口	无色 清澈	9.5	0.30	0.15	12
141230	离子交换出口	无色 清澈	8.0	0.25	0.002	1.5
141231	废水调节池	混浊	5.0	110	45	95
141231	沉淀池出口	无色 清澈	9.3	0.15	0.1	10
141231	离子交换出口	无色 清澈	8.2	0.12	0.001	1.2

稳定达到《电镀污染物排放标准》(GB21900-2008)中表三规定的排放限值标准。

6 讨论

清污分流,由于该类废水为电镀废水中的一类,分流不彻底容易导致其它类重金属超标;

废水反应自动化程度要求较高,需配套稳定可靠的 pH/ORP 仪表,确保反应条件控制在合适值;

反应 pH 值不能控制太低,否则容易产生挥发性氯气,对生产运行环境影响大。

7 结论

采用酸性氧化+钙盐沉淀法处理化学镍废水,辅以离子交换深度处理,出水水质稳定达到《电镀污染物排放标准》(GB21900-2008)表三排放要求。该工艺处理系统具有处理效率高、流程简单等优点,运行稳定。

参考文献

- [1] 马捕徐立冲陆柱,化学镀镍废水处理研究.净水技术 1996,56(2):5-7.
- [2] 刘西德,化学镀镍废水的处理.枣庄学院学报 2005,22(5):77-79
- [3] 桂鹤,化学镀镍废水处理新工艺.全国转化膜及表面精饰学术年会,2012,104-106

(上接第 57 页)

- [8] 韩桂春,谷丰.淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨.中国环境监测,2005,21(1):55-57.
- [9] Yentsch C S and Menzel D W. A method for the determination of phytoplankton chlomphyll and phaeoPhytin by fluorescence. Deep-Sea Res,1963,10:221-231.
- [10] 水和废水监测分析方法(第四版)[M].中国环境科学出版社,2002.

- [11] Neveux J and Panouse M.Spectrofluometric determination of chlorophylls and pheophytins.Arch.Hydrobiol,1987, 109:567 - 581.
- [12] 梁兴飞,郭宗楼.超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化.水生生物学报,2010,34(4):856-860.
- [13] 高一平,陈萧建.地表水中叶绿素 a 的测定.福建分析测试,2009,18(3):17-19.