

可见分光光度法测定伪鱼腥藻与二形四链藻混合藻液生物量

近期研究表明, 伪鱼腥藻(*Pseudoanabaenasp.*)普遍存在于南方的湖泊、水库、河流和养殖池塘等水体, 是铜绿微囊藻(*Microcystisaeruginosa*)以外又一常见的蓝藻水华种, 并已成为我国重要水体水华的绝对优势种群, 其细胞密度最高达到 77.5%, 在一些水库中平均比例达 22.75%。伪鱼腥藻藻华使水体呈现灰红色、产生异常嗅味的代谢物二甲基异次醇, 分泌藻毒素导致动物肝脏毒性等一系列毒性效应, 严重威胁水域生态环境稳定、养殖效益和人身健康, 从而急需引起高度重视。

藻类生物量的监测是防控水华发生的最基本依据。叶绿素 a 荧光定量法用于检测藻类生物量, 具有检测周期短、时效性强的优势, 但荧光定量法极易受藻团大小、藻种结构、环境因子条件变化影响, 检测结果可靠性和精确性成为叶绿素 a 定量检测的瓶颈。可见分光光度法, 通过吸光度直接建立一元线性回归方程, 即可测定藻密度或叶绿素 a 浓度。荧光光度法和可见分光光度法检测叶绿素 a 的比较研究表明, 当藻密度较低时, 采用荧光分光光度法具有一定优势, 而当藻密度处在较高密度濒临水华状态时, 采用可见分光光度法表现出显著优势。近年关于可见分光光度法测定叶绿素 a 含量的研究和应用多局限于单一藻种, 对包含多种藻类混合生物量的研究不多, 仅见涂波等对 6 种微绿藻混合生物量的研究。采用可见分光光度法测定微藻不同门类混合藻液生物量的研究鲜见报道。应用可见分光光度法检测重要水体中临近水华状态条件下高密度、多种类藻类藻密度及叶绿素 a 浓度无疑是重要水体水华防控经济而有效的途径。

已有的研究表明, 采用可见分光光度法测定水体中的藻类密度时, 形态不规则的藻类含量与光密度的相关性较差, 而形态规则的近球形藻种, 相关性较好。

二形四链藻(*Tetrademusdimorphus*), 常以 4 个近长椭圆形细胞组成群体形式存在;伪鱼腥藻则常为不分枝丝状, 细胞圆柱形。在导致藻华的藻类中, 伪鱼腥藻最适生长温度在 25℃左右, 绿藻栅藻通常在较低水温下易占优势, 最适生长温度为 25℃。而部分蓝藻(如微囊藻等)的最适生长温度则高于 25℃水温, 达到 30 ~ 35℃, 远高于绿藻和伪鱼腥藻。因此, 二形四链藻作为富营养湖泊的绿藻门优势种, 常可与伪鱼腥藻共存。该研究通过室内纯种培养的伪鱼腥藻和二形四链藻, 研究其可见光光谱吸收特征, 分析吸光度与单一及混合藻液细胞密度、叶绿素 a 浓度的相关性, 探讨重要水体水华发生的不同阶段单一藻类生物量定量和自然水体多门类混合藻类生物量之间的相互关系, 以期为进一步研发经济有效的水华预警技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 藻种培养试验藻种伪鱼腥藻(*Pseudoanabaenasp.*)和二形四链藻

(*Tetrademusdimorphus*)购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。采用 BG - 11 培养基, 接种后置于光照培养箱中培养, 光照强度 3500lx, 光暗周期 12h : 12h, 温度(25.0±0.5)℃。每日定时摇晃 3 次。培养至指数期, 使藻密度达到 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

1.2 藻种吸收光谱扫描伪鱼腥藻和二形四链藻的吸光度使用紫外可见分光光度计 (UV - 1100)测定, 以蒸馏水调零, 在 400 ~ 800nm 波长范围内扫描, 扫描间隔为 5nm。

1.3 纯种藻密度的相关性分析二形四链藻以 4.7×10^6 个/mL、伪鱼腥藻以 5.7×10^7 个/mL 为初始浓度。用移液枪吸取一定藻液, 用蒸馏水稀释至 10mL, 以此配制成稀释倍数为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、100.0 的浓度梯度, 每

梯度 3 个平行，用蒸馏水调零。用上述 2 种藻液共同对应的最大吸收波长测定溶液 OD 值，每个样测定 3 次，取平均值。每梯度藻细胞的密度，显微镜下用血球计数板计数，制片计数 3 次，取平均值。以此结果进行稀释倍数的倒数与吸光度、吸光度与藻密度之间的相关性分析。

1.4 纯种藻叶绿素 a 的相关性分析取指数期上述 2 种藻液，用蒸馏水稀释 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 倍，配制成不同浓度梯度，每梯度 3 个平行，取一定量体积，用 whatman 玻璃纤维滤膜(直径25mm)过滤，立即将滤膜对折于试管中，加入 5mL95%的乙醇溶液，4℃冰箱中避光萃取 24h，期间数次摇晃。将萃取后的上清液于恒温离心机中以 5000r/min 离心 10min，取上清液分别在波长 665、649nm 下测吸光度，叶绿素 a 浓度的计算根据李合生 [20] 的方法进行。同时对每梯度藻细胞进行计数，方法同“1.3”。以此结果进行叶绿素 a 浓度与藻密度之间的相关性分析。

1.5 混合藻种藻密度与叶绿素 a 的相关性分析将“1.4”所配制的藻液浓度梯度，参考涂波等 [13] 的方法，各取一定体积 1：1 等比例混合。在 2 种微藻共有的明显吸收峰波长处分别测定各浓度梯度下的 OD 值、总细胞密度、叶绿素 a 浓度，以此来研究藻种藻密度与叶绿素 a 之间的关系。

2 结果与分析

2.1 两种微藻的光吸收曲线从图 1 可以看出，伪鱼腥藻在 440、575 和 680nm 处有较大的吸收峰；二形四链藻在 440nm 处有较弱的吸收峰，在 685nm 处有最大的吸收峰；2 种微藻在 680nm 左右均有明显的吸收峰。

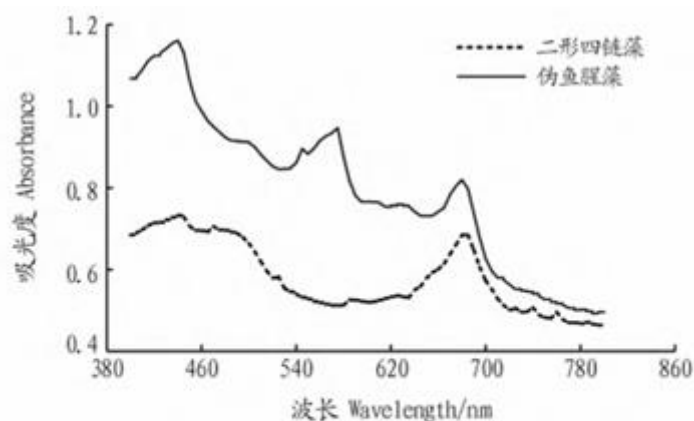


图 1 伪鱼腥藻与二形四链藻的光吸收图谱

Fig.1 Absorption spectrum of *Pseudoanabaena* sp. and *T. dimorphus*

2.2 藻种稀释梯度与吸光度的相关性为验证不同吸收峰波长下吸光度是否与藻密度有线性关系，分别在不同波长下测定各藻液密度的吸光度。结果表明(表 1)，2 种藻液稀释梯度(x)与其吸光度(y)之间均具有显著线性相关($R^2 \geq 0.9996$)，伪鱼腥藻 680nm 的相关系数略高于 440 和 575nm，二形四链藻在 440、680、685nm 的相关系数差异不显著。将 2 种藻液按体积比 1：1 混合后配制成不同浓度梯度，在共同吸收峰波长 680nm 时，其稀释梯度与混合藻液的吸光度之间仍具有显著线性相关($R^2=0.9997$)。

表 1 不同波长下 2 种微藻稀释梯度与吸光度的相关性

Table 1 Correlation between the dilution and absorbance of two microalgae species at different wavelengths

藻种 Algae type	波长 Wavelength /nm	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)
二形四链藻 <i>T. dimorphus</i>	440	$y = 0.8810x + 0.0007$	0.9999
	680	$y = 0.8155x + 0.0015$	0.9999
	685	$y = 0.8195x + 0.0019$	1.0000
伪鱼腥藻 <i>Pseudoanabaena</i> sp.	440	$y = 1.4134x + 0.0064$	0.9997
	575	$y = 1.1086x + 0.0056$	0.9996
	680	$y = 1.0011x + 0.0029$	0.9998
混合藻 <i>Mixed algae</i>	680	$y = 0.8941x + 0.0078$	0.9997

2.3 藻种吸光度与藻密度的相关性分析吸光度和藻密度之间的相关性(表 2)，2 种

微藻在各自吸收峰处，吸光度(x)和藻密度(y)均存在显著的线性相关($R^2 \geq 0.9993$)，这表明在试验波长条件下藻液的吸光度能够反映藻液的藻细胞密度；但藻液在 680nm 处的 R^2 略高于 440nm 处；在 680nm 处，混合藻液的吸光度与总藻细胞密度之间也具有显著的线性相关($R^2 = 0.9998$)，说明 OD680 可以相对准确地反映出试验藻混合藻液的细胞密度。

表 2 不同波长下 2 种微藻吸光度与藻密度的相关性
Table 2 Correlation between the absorbance and algal density of two microalgae species at different wavelengths

藻种 Algae type	波长 Wavelength /nm	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)
二形四链藻 <i>T.dimorphus</i>	440	$y = 530.86x - 0.44$	0.999 3
	680	$y = 573.52x - 0.96$	0.999 4
	685	$y = 570.72x - 1.15$	0.999 5
伪鱼腥藻 <i>Pseudoanabaena</i> sp.	440	$y = 3\ 579.30x - 17.36$	0.999 7
	575	$y = 4\ 562.40x - 20.03$	0.999 5
	680	$y = 5\ 053.60x - 9.37$	0.999 8
混合藻 <i>Mixed algae</i>	680	$y = 2\ 670.10x + 16.25$	0.999 8

2.4 藻种叶绿素 a 浓度与藻密度的相关性将伪鱼腥藻和二形四链藻叶绿素 a 浓度与其对应的藻密度进行相关性分析，结果表明(图 2)，2 种藻液叶绿素 a 浓度与相应藻密度之间具有显著的线性相关($R^2 \geq 0.9944$)，其回归方程分别为 $y = 883.53x + 77.43$ 和 $y = 372.83x + 15.23$ ，可据此方程，依据藻密度得到相应的叶绿素 a 浓度。将两者 1 : 1 混合后，总藻密度和叶绿素 a 浓度之间也存在显著的线性相关($R^2 = 0.9960$ ，图 3)。因此，求得伪鱼腥藻、二形四链藻及两者混合后吸光度与叶绿素 a 之间的回归方程分别为 $y = 5.4750x$ 、 $y = 2.8288x$ 、 $y = 2.9673x$ ，且方程相关系数 $R^2 \geq 0.9900$ ，均有显著的线性相关。这一结果表明可见分光光度法的 OD680 值可以相对准确地反映出试验藻混合液的叶绿素 a 浓度。

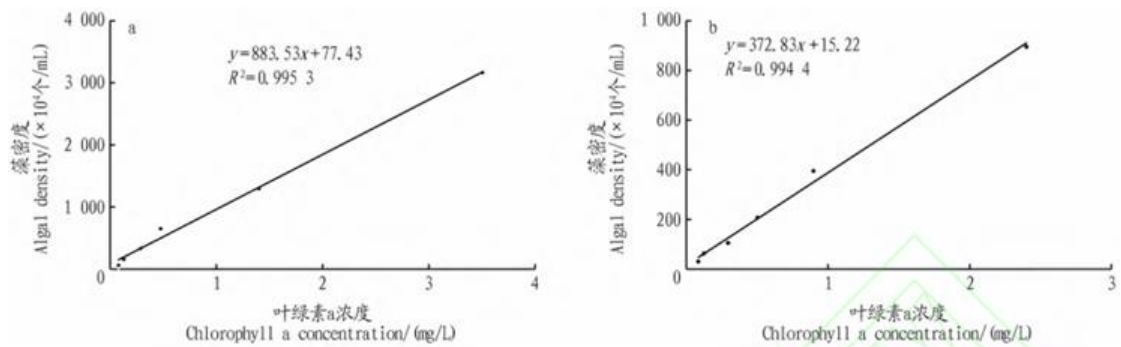


图2 伪鱼腥藻(a)和二形四链藻(b)叶绿素a浓度与藻密度的关系

Fig.2 Relationship between chlorophyll a concentration and algal density of *Pseudoanabaena* sp.(a) and *T.dimorphus*(b)

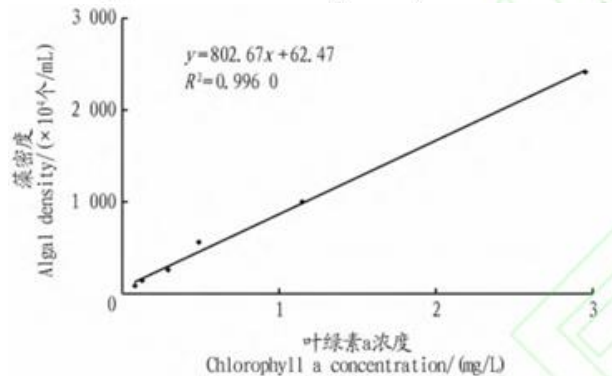


图3 2种微藻混合后叶绿素a浓度与藻密度的关系

Fig.3 Relationship between chlorophyll a concentration and algal density after mixing two microalgae species

3 讨论与结论

3.1 可见分光光度法测定混合藻液细胞密度波长的选择波长的选择是可见分光光度法测量过程中最关键的因素。以往的研究中，因藻种不同使用的波长存在较大差异，即便是同一藻种也不尽相同。例如，周利等研究伪鱼腥藻的生长采用的是665nm可见光;而李麒龙等研究二形栅藻生长采用680nm。在对小球藻的研究过程中，学者们分别采用540、570和680nm的可见光。对一些绿藻吸收光谱的扫描研究表明，藻类吸收峰可分为3个区，其研究显示，200~400nm紫外光区的吸收峰主要是藻体中的蛋白质引起;由于藻蛋白含量受藻生长时间的影响变化很大，因此一般不宜采用该波长对藻类生物量进行定量测量。而在>400~600nm蓝光区，叶绿素、类胡萝卜素等色素则出现明显的吸收峰，且各色素吸收峰相距较近，容易相互干扰或常表现交叠。因藻类都含有叶绿素a，所以其吸收

光谱具有明显的相似性，叶绿素 a 在 670 ~ 680nm 的红光区吸收峰最为显著。该研究结果也显示，二形四链藻在蓝光区域没有明显的吸收峰，但在 680nm 左右与伪鱼腥藻一样，均有一个明显的吸收峰，这一结果与上述研究结论非常相近。此外，赵巧华等认为同一藻的标准化吸收光谱在不同生长时期基本恒定不变，色素组成及其比例的不同是引起藻类间吸收光谱变化的主要原因；涂波等对 6 株 4 属绿藻的研究表明，形态上的巨大差异、不同生长时间、不同生理状态并不影响它们在 685nm 处都具有最大吸收峰的特征，685nm 处的 OD 值能准确反映微小绿藻生物量的变化；对于单一藻种，虽然在其他波长测定藻细胞密度也能获得极显著的线性相关，该研究结果也证实了这一点，但是为了便于种类间比较以及应用的普遍性，选用吸收峰 680nm 最为适宜。

3.2 可见分光光度法测定混合藻液生物量的准确性可见分光光度法测定藻细胞密度多见于室内单种研究。在自然水体采集的藻类样本，常常门类众多，这使得研究单一藻种光吸收与藻细胞密度之间关系存在明显的局限性。而采用可见分光光度法测定混合藻液细胞密度与光吸收之间关系的研究还很少见。涂波等用 6 株绿藻培养到 20d，按等体积比例将 6 种藻液混合，设置不同梯度浓度，在 685nm 可见光测定 OD 值，分析其与混合藻液藻细胞密度之间关系，结果显示，OD₆₈₅ 与总细胞密度存在显著的线性相关；这一研究结果表明，在 685nm 可见光下，藻液的 OD 值可以有效反映混合藻液的细胞密度，且精确度及稳定性均高于常规显微计数。在该研究中，将二形四链藻与伪鱼腥藻混合后，测定混合藻液在 680nm 处的 OD 值，发现其与总藻密度之间也存在显著的线性相关。由此可见，可见分光光度法能够有效反映吸光度与不同门类混合藻液细胞密度之间的线性相关。

在现有的文献中，藻密度和叶绿素 a 之间的关系研究多仅限于纯藻种之间，

如铜绿微囊藻等。该研究结果显示，单种或混合藻种在 680nm 处的吸光度与藻密度、藻密度与叶绿素 a 之间均具有显著的线性相关性，证明可见分光光度法可用于蓝藻伪鱼腥藻与绿藻混合藻样生物量的测定研究。这无疑为重要自然水体中特别在水华初期尚未形成绝对优势种群时快速检测浮游植物的生物量提供有效方法，从而为水华初级阶段的有效预警提供了重要技术支撑。然而，并不是所有微藻的细胞密度与吸光度之间均呈显著的线性相关，沈萍萍等选用绿藻门、金藻门、黄藻门、甲藻门在内的 15 种不同微藻，经回归分析表明，形状越规则的细胞，藻液的吸光度与细胞密度之间的线性相关性越好；而甲藻类细胞形状多样，且细胞体积较大，其相关性明显较差。相关研究同时显示，因藻细胞形态和在计数框线位置的原因，在镜检条件下进入观察视野框线的藻细胞经常不被计入统计；因此，采用显微计数制定藻密度标准曲线，在统计过程中会出现与真实数据间有显著误差的情况。这一研究结果提示，在使用可见分光光度法测定藻细胞生物量实践中，要特别关注样品中哪些藻种细胞形态与大小对测定结果的影响。

3.3 可见分光光度法测定混合藻液生物量的应用展望近年来，有关碳生物量与吸光系数之间关系已经逐步开展。沈萍萍等通过藻体积计算出其碳生物量，并将碳生物量与吸光系数进行回归分析，结果显示，只要测得单一藻液或者混合藻液的吸光系数，就可以通过回归方程求得它们的碳生物量，从而大大简化浮游植物作为碳积累和排放重要载体过程中生物量的测定过程与方法。可见分光光度法测定浮游植物生物量，能够同步测定藻密度、叶绿素 a 浓度和碳生物量及其相互转换。此外，骆巧琦等通过几种饵料藻种的室内试验，研究表明基于可见分光光度法导数数学模型可不受藻类所处生长周期的影响；其算法简单快速、精确度高，非常适宜微藻进入生长平台期和衰退期的评估和判断。结合该研究结果初步表明，可见

分光光度法测定不同门类混合藻液样品的生物量具有操作简便、结果稳定准确的优点，为相关理论和方法的进一步研究提供了重要的应用价值依据。可见分光光度法仪器要求低、方法简便和相对准确的优势，对基层环保单位和养殖户具有重要应用价值，但目前分光光度法应用于自然水体混合藻液生物量的研究仅限于个别报道，仍需要进一步深入研究。

文章来源：[1]曾祥波,李丁恒.可见分光光度法测定伪鱼腥藻与二形四链藻混合藻液生物量[J/OL].安徽农业科学,1-4[2025-04-16].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1076.S.20250228.1517.018.html>.