

液氮冻融前处理优化测定浮游植物叶绿素 a 的初步研究

朱德平¹, 邹楚钧¹, 杨俊悦², 林秋奇^{1,3}, 彭亮^{1,3}

(1. 暨南大学水生生物研究中心, 广东 广州 510632;

2. 开平市大沙河供水公司, 广东 开平 529300;

3. 广东省水库蓝藻水华防治中心, 广东 广州 510632)

摘要: 叶绿素 a 是水环境评价和水生态研究中的一项重要指标。针对叶绿素 a 测定中前处理耗时长、提取不完全等问题, 研究了液氮冻融前处理对叶绿素 a 测定效率的影响。以实验室培养的小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)藻液为实验材料, 通过单因素实验和正交实验设计, 探究速冻时间、冻融次数、浸提时间等主要参数对提取效率的影响, 并确定液氮冻融前处理测定叶绿素 a 的最优条件。结果表明, 液氮冻融前处理测定叶绿素 a 的最优条件为速冻 30 s、冻融 4 次、90% 的丙酮浸提 4 h, 在此条件下, 小球藻和微囊藻叶绿素 a 浓度测定相对标准偏差分别为 0.57% 和 2.25%, 变异系数 CV 分别为 0.46% 和 1.84%。野外水样测定结果显示, 与丙酮-研磨法、分光光度法(SL 88-2012)、分光光度法(HJ 897-2017)和反复冻融浸提法相比, 液氮冻融前处理法的提取效率高与其他方法且测定结果相对偏差更小, 浸提时间较其他 4 种方法缩短 50% 以上, 其浸提效率达 93% 以上。液氮冻融前处理法对叶绿素 a 的提取效率明显高于其他方法且数据重现性较好, 具有操作简单、结果准确、操作耗时短等特点。

关键词: 液氮速冻; 叶绿素 a; 浮游植物; 正交实验

中图分类号: Q331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2021)01-0101-07

浮游植物是水域生态系统的重要组成部分, 能直接影响水生态系统的功能, 是水环境质量优劣的重要指示因子(Casé et al, 2008; Ptacnik et al, 2008; Zhang et al, 2017)。随着水体富营养化进程加速, 藻类水华频发, 浮游植物的监测也越来越受到重视。受专业技能的影响, 浮游植物的鉴定相对较难, 在实际水环境评价和水生态研究中往往把浮游植物的主要色素—叶绿素 a 作为浮游植物生物量的替代指标, 并得到广泛应用(刘鸿亮等, 1987)。

叶绿素 a 的实验室测量主要有分光光度法、荧光法、色谱法, 其中以传统的分光光度法应用最为广泛(冯菁等, 2008)。因我国普遍采用《水和废水监测分析方法》(第 4 版)中叶绿素 a 的规范方法及对规范方法的改进, 均存在耗时长、提取不完全、步骤繁琐等问题, 这些方法主要差异包括细胞破碎方式(林少君等, 2005)、提取时间(司大英等, 2000; 韩

桂春等, 2005)、提取方式(吴志旭和张雅燕, 2003)、提取溶剂(洪法水等, 2001)等。细胞破碎是测定浮游植物叶绿素 a 的关键, 目前主要有研磨、低温室温反复冻融、超声波破碎等方法(翁笑艳等, 2009)。研磨破碎细胞费时费力、提取过程繁琐且效率低、转移过程误差大、叶绿素 a 光降解加大等问题导致结果偏低(冯青英等, 2007); 传统的反复冻融法存在耗时长、提取不完全、步骤繁琐(林鸿敏, 2013); 超声波破壁对仪器参数要求较高(苏惠春等, 2007), 且可能对野外样品破壁效率不高。液氮能使细胞快速冷冻, 胞内水分瞬间固化形成冰晶, 而后快速溶解过程能显著破坏细胞结构, 达到充分提取细胞内含物的目的(张素文, 2007; Wang & Sain, 2007)。

目前, 关于液氮冻融前处理优化测定叶绿素含量的报道较少, 本研究拟对液氮前处理的因素进行探讨, 旨在为快速、高效测定水体中叶绿素含量, 并比较《水和废水监测分析方法》(第 4 版)中提到的丙酮-研磨法、反复冻融浸提法(林少君等, 2005)、《水质叶绿素的测定分光光度法》(SL 88-2012)、《水质叶绿素 a 的测定分光光度法》(HJ 897-2017)对叶绿素 a 的提取效率及 5 种方法的稳定性, 探究浮游植物叶绿素 a 的最优化测定方法。

收稿日期: 2019-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(41403061); 广东省科技计划项目(2013B091300015)。

作者简介: 朱德平, 1994 年生, 男, 硕士研究生, 研究方向为蓝藻水华去除技术。E-mail: 1039981285@qq.com

通信作者: 彭亮。E-mail: tpengliang@jnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 纯藻液样品 室内培养蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 和铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*), 培养基为 BG11, 光照强度为 $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度 25°C , 光暗周期为 12 h : 12 h, 对数生长期的藻液为实验材料。

1.1.2 样品采集 采自暨南大学校园内 3 个不同湖泊(明湖、南湖、日湖)的表层水体, 加入 1% 碳酸镁(每升样品加 1 mL)防止酸化, 避光保存。

1.2 实验方法

1.2.1 单因素实验 冻融时间、冻融次数和浸提时间是影响叶绿素提取效率的重要因素。分别以不同的液氮速冻时间、冻融次数、浸提时间为单因素, 考察各单因素对小球藻和微囊藻叶绿素 a 提取的影响; 在做每个单因素实验时, 其余 2 个因素一致, 取所实验因素的不同水平进行叶绿素 a 提取, 每个实验组设置 5 个平行, 保证重复性, 最后取其平均值作为分析数据。

实验因素 1: 液氮速冻时间分别为 10、30、50、70、90、110 s, 冻融 1 次, 90% 丙酮浸提 6 h。

实验因素 2: 冻融次数分别为 1、2、3、4、5、6 次, 速冻时间为 50 s, 90% 丙酮浸提 6 h。

实验因素 3: 浸提时间分别为 2、4、6、8、10、12 h, 速冻时间为 50 s, 冻融 4 次。

1.2.2 正交实验 根据 1.2.1 节单因素实验结果, 选取 3 个因素各自最佳值附近 3 个水平, 采用 3 因素 3 水平的 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交实验, 优化实验结果, 每个实验组设置 5 个平行, 保证重复性, 最后取其平均值作为分析数据。

1.2.3 验证实验 在正交实验所得最优处理条件下, 液氮冻融前处理小球藻和微囊藻, 分别测定处理后小球藻和微囊藻叶绿素 a 浓度, 每个处理组设置 5 个平行, 最后取其平均值作为分析数据。

1.2.4 提法方法比较 分别用 M1(液氮冻融前处理优化测定方法)与 M2《水质叶绿素 a 的测定分光光度法》(HJ 897-2017)、M3《水质叶绿素的测定分光光度法》(SL 88-2012)、M4(反复冻融浸提法)和 M5(丙酮-研磨法)共计 5 种方法提取室内培养的纯藻液和野外水样叶绿素 a 浓度。M1 测定方法和其它法样品同一批次、浓度及过滤水量等条件, 保证结果的可比性; 每个处理组设置 5 个平行, 保证重复性, 最后取其平均值作为分析数据。

1.3 液氮冻融前处理及测定方法

用醋酸纤维滤膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤一定量的水样, 再将滤膜折叠为 1/4 后, 置于对折的定性滤纸中遮光并吸去滤膜背面水分(林罗敏等, 2016)。将滤膜放入具塞离心管中, 盖上塞帽, 依次放入液氮中速冻 30 s, 放于室温解冻 5 min, 此过程反复 4 次。破壁处理后, 向离心管中加入 10 mL 的 90% 丙酮, 盖紧塞帽, 摇匀后放于 4°C 冰箱浸提, 再经过 7 000 r/min 离心 15 min 后, 最后在 630、647、664、750 nm 波长处测量吸光值后计算得出叶绿素 a 浓度, 相关计算公式如下:

$$\rho_1 = 11.85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1.54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0.08 \times (A_{630} - A_{750}) \quad (1)$$

式中: ρ_1 为试样中叶绿素 a 的质量浓度 (mg/L); A_{664} 、 A_{750} 、 A_{647} 、 A_{630} 为试样在波长 664、750、647、630 nm 下的吸光值。

1.4 数据分析与绘图

利用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析、多重比较(LSD 检验); Excel 2010 软件完成绘图。

2 结果和分析

2.1 单因素实验

2.1.1 液氮速冻时间 速冻时间是影响提取过程的一个重要因素, 主要表现在可以增强藻细胞的脆性。实验表明, 小球藻和微囊藻在液氮速冻 50 s 后, 其叶绿素 a 浓度分别为 $141.16 \mu\text{g}/\text{L}$ 和 $98.58 \mu\text{g}/\text{L}$, 显著高于 30 s 后的测定结果 ($P < 0.05$), 且相对标准偏差较小(图 1)。但随着液氮速冻时间的增加, 小球藻和微囊藻的叶绿素 a 浓度并未显著升高 ($P > 0.05$)。由此确定液氮冻融前处理最佳时间为 50 s, 此时叶绿素 a 提取效率最高。

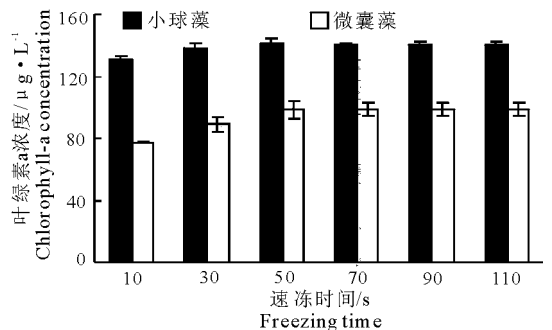


图 1 不同液氮速冻时间对室内培养小球藻和微囊藻叶绿素 a 测定结果的影响
Fig.1 Effect of liquid nitrogen quick freeze time on the determination of chlorophyll-a concentration in *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa*

2.1.2 液氮冻融次数 由图2可见,冻融次数不同,提取小球藻和微囊藻叶绿素a浓度的结果存在显著差异。其中,小球藻和微囊藻反复冻融4次提取的结果最高,叶绿素a浓度分别为162.04 $\mu\text{g/L}$ 和108.16 $\mu\text{g/L}$ 。小球藻和微囊藻冻融4次时比冻融3次提取率分别相对提高8.65%和12.14%;表明4次反复冻融条件适合藻类叶绿素a提取。随着冻融次数的进一步增加,叶绿素a浓度并没有明显的增加($P>0.05$)。

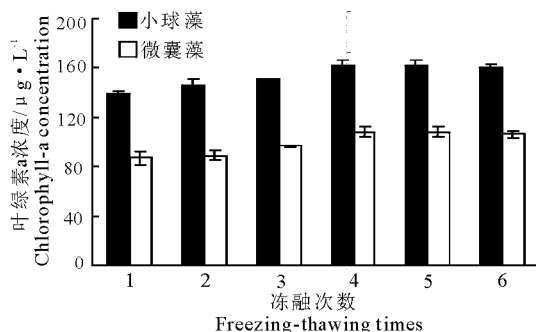


图2 不同液氮冻融次数对室内培养小球藻和微囊藻叶绿素a测定结果的影响

Fig.2 Effect of repeated liquid nitrogen freeze-thaw cycles on the determination of chlorophyll-a concentration in *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa*

2.1.3 有机溶剂丙酮浸提时间 由图3可知,小球藻和微囊藻叶绿素a浓度随着浸提时间的增加而增加,浸提4h时,两者叶绿素a浓度都达到最大值,分别为162.76 $\mu\text{g/L}$ 和98.58 $\mu\text{g/L}$ 。但随着浸提时间的延长,叶绿素a浓度增加缓慢或降低,表明浸提4h可以将小球藻和微囊藻叶绿素a基本提取完全,而样品长时间浸提可能会引起叶绿素的降解和杂质溶出,使其浓度有所降低。因此,4h为最适宜的浸提时间。

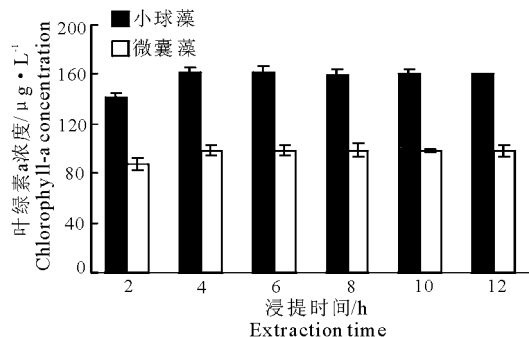


图3 不同浸提时间对室内培养小球藻和微囊藻叶绿素a测定结果的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the determination of chlorophyll-a concentration in *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa*

2.2 正交实验结果

根据单因素实验结果,进一步考察各因素影响显著性及得出液氮处理过程的最佳条件,以速冻时间、冻融次数、浸提时间为试验因素,用 $L_9(3^3)$ 进行3因素3水平正交实验,结果见表1。从表2极差大小可得影响叶绿素a浓度的主次顺序为: $B>C>A$,即液氮冻融次数 $>$ 浸提时间 $>$ 冻融时间。对正交实验结果进行显著性分析,得到与极差分析相同的结果,其最佳方案为 $A_1B_2C_2$ 。以液氮冻融前处理速冻30s,冻融4次,90%的丙酮浸提时间4h分别提取小球藻和微囊藻叶绿素a,为保证实验结果可靠性,平行测定3次,小球藻叶绿素a浓度分别达到162.14、163.68、162.04 $\mu\text{g/L}$,平均叶绿素a浓度为162.62 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差为0.57%,变异系数CV为0.46%(表3);微囊藻叶绿素a分别达到144.25、

表1 正交设计因素水平

Tab.1 Factors and levels for pretreatment optimization

水平	因素		
	速冻时间/s	速冻次数	浸提时间/h
1	30	3	2
2	50	4	4
3	70	5	6

表2 正交实验设计与结果

Tab.2 Design and results of optimization study

实验序号	A	B	C	小球藻叶绿素a浓度	微囊藻叶绿素a
	速冻时间/h	速冻次数	浸提时间/h	$/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	107.96	101.57
2	1	2	2	152.46	136.28
3	1	3	3	150.30	119.22
4	2	1	2	119.60	106.10
5	2	2	3	140.92	117.84
6	2	3	1	129.18	107.34
7	3	1	3	108.06	98.58
8	3	2	1	127.12	108.16
9	3	3	2	140.82	119.80
小球藻 k_1	136.91	111.87	121.42		
小球藻 k_2	129.90	140.17	137.63		
小球藻 k_3	125.33	140.10	133.09		
微囊藻 k_1	119.02	102.08	105.69		
微囊藻 k_2	110.43	120.76	120.73		
微囊藻 k_3	108.85	115.45	111.88		
$R_{\text{小球藻}}$	11.58	28.30	16.21		
$R_{\text{微囊藻}}$	10.17	18.68	15.04		

注: k_1 、 k_2 和 k_3 分别表示各参数在水平1、2和3时所测叶绿素a浓度的平均值; R 表示各参数在3个水平下所得的最大平均值与最小平均值的差值。

Note: k_1 , k_2 and k_3 represent the average value of chlorophyll-a concentration measured at level 1, 2 and 3; R represents the difference value between the maximum average value and the minimum average value of each parameter at three levels.

137.90、140.83 $\mu\text{g/L}$ ，平均叶绿素 a 浓度为 141.00 $\mu\text{g/L}$ ，相对标准偏差为 2.25%，变异系数 CV 为 1.84%，液氮冻融前处理测定方法提取叶绿素 a 的稳定性较好(表 4)。

表 3 小球藻叶绿素 a 浓度方差分析

Tab.3 Variance analysis of chlorophyll-a concentration of *C. pyrenoidosa*

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	203.89	2	101.95	17.12	0.055
B	1597.26	2	798.63	134.14	0.007
C	419.47	2	209.74	35.23	0.028
误差	11.91				
总和	2232.53	6			

注： $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ ， $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

表 4 微囊藻叶绿素 a 浓度方差分析

Tab.4 Variance analysis of chlorophyll-a concentration of *M. aeruginosa*

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	179.96	2	89.98	13.76	0.068
B	555.76	2	277.88	42.49	0.023
C	342.77	2	171.38	26.21	0.037
误差	13.08				
总和	1091.56	6			

注： $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ ， $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

2.3 不同测定方法对叶绿素 a 提取效果

从图 4-a 可见，M1、M3 和 M4 测定方法提取效率较高且测定结果稳定性较好。从各种方法的实验耗时来看，M1 测定方法前处理耗时较短(表 5)。用上述 5 种方法分别测定低浓度小球藻和微囊藻叶绿素 a 浓度，结果显示，M1 测定方法最好，其值为 28.49 $\mu\text{g/L}$ 和 25.89 $\mu\text{g/L}$ ；提取效果最差为 M5，其值为 26.04 $\mu\text{g/L}$ 和 24.61 $\mu\text{g/L}$ 。当叶绿素 a 浓度较低时，5 种方法测定结果无显著差异($P>0.05$)。用上述 5 种方法测定高浓度小球藻和微囊藻时，叶绿素 a 测定结果显示，M1 方法提取效果最好，其值为 138.22 $\mu\text{g/L}$ 和 135.46 $\mu\text{g/L}$ ；最低为 M5，其值为 125.31 $\mu\text{g/L}$ 和 123.07 $\mu\text{g/L}$ ；M1 显著高于其他 4 种方法($P<0.05$)且相对标准偏差较小。测定以蓝、绿藻占优势的湖泊中叶绿素 a 含量时，M1 测定方法提取效果较好(图 4-b)。另外，将室内培养纯藻液和野外水样经 M1 测定方法分别在 1 h 和 4 h 进行浸提，结果表明，1 h 浸提效率能达到 93%~97% (图 5)，且高于 M2 测定方法。因此，M1 测定方法操作简单，样品基本无损失，能够满足快速准确测定的要求。

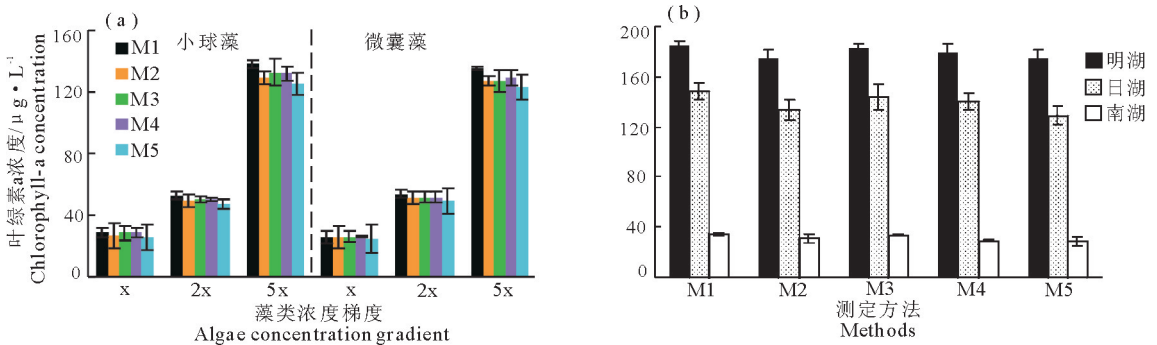


图 4 不同测定方法对室内培养纯藻液和野外水样叶绿素 a 浓度测定结果的比较

Fig.4 Comparison of chlorophyll-a concentration in algae cultures and field samples determined by different methods

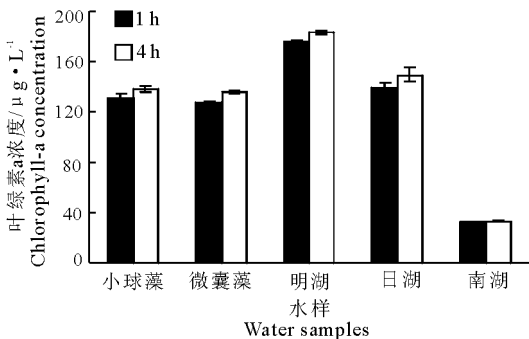


图 5 不同水样浸提时间的叶绿素 a 浓度测定结果比较

Fig.5 Effect of extraction time (1 h, 4 h) on chlorophyll-a concentration after liquid nitrogen pretreatment

表 5 5 种不同水体叶绿素 a 测定方法的预处理时间和总耗时比较

Tab.5 Comparison of analysis times for the different methods

测定方法	预处理时间/h	浸提时间/h	总耗时/h
M1	1/5	1~4	1.5~4.5
M2	1/6	2~24	2.5~24.5
M3	1.25	4~12	5.5~13.5
M4	1.25~2.5	20	21.5~22.5
M5	6~8	-	6.5~8.5

3 讨论

3.1 液氮冻融前处理条件对叶绿素 a 提取的影响

液氮冻融前处理优化测定叶绿素 a 浓度的单因素实验表明,叶绿素 a 的提取效果受多种因素的影响。其中冻融次数和浸提时间的影响显著,在一定范围内,冻融次数和浸提时间越多,越容易造成细胞溶胀,导致叶绿素 a 溶出;而速冻时间对叶绿素 a 的提取效果影响也较大,随着速冻时间的增加,叶绿素 a 浓度逐渐增加,但速冻时间过长,其未能有效增加。周顺华等(2002)研究发现,增加冻融次数能使细胞壁裂纹迅速扩展,提高破裂的几率;郑江等(2003)也认为增加冻融次数能提高浮游植物细胞的破碎;丛海兵等(2007)研究发现叶绿素受浸提时间的影响较大,当浸提时间达到 6 h,提取效果趋于稳定;梁兴飞和郭宗楼(2010)认为叶绿素最佳的浸提时间为 4 h,超过 6 h 后叶绿素含量略有下降。本实验表明,冻融 4 次、浸提时间 4 h 可以将小球藻和微囊藻叶绿素 a 基本提取完全。陈静娴等(2000)研究发现,液氮速冻 30 s 对细胞膜通透性的影响最大;也有研究者认为长时间的低温处理,叶绿素浓度会逐渐降低(李胜生等,2008;Liu et al,2012)。本实验也发现,速冻时间超过 50 s,叶绿素 a 的提取效果无明显改变。正交实验表明,影响叶绿素 a 提取效果的主次顺序为:冻融次数>浸提时间>速冻时间。液氮冻融前处理优化测定叶绿素 a 的最佳参数为速冻时间 30 s、冻融次数 4 次、浸提时间 4 h。对该方法进行验证性实验表明,液氮冻融前处理优化测定具有较高的稳定性。

3.2 不同测定方法对叶绿素 a 的提取效果比较

对于室内培养的小球藻和微囊藻,液氮冻融前处理优化测定方法对叶绿素 a 的提取效果优于其他方法。其原因可能是 M2 和 M5 测定方法破碎细胞过程中会导致叶绿素 a 发生光降解而造成测定结果偏低,同时处理步骤繁琐,需多次转移,滤膜易溶于丙酮并粘附研磨器,增加研磨难度,人为误差较大(翁笑艳等,2009;杨玉珍等,2011)。M1、M3 及 M4 测定方法都是通过低温冰冻,在室温下融解,利用在细胞内生成冰粒和增大细胞液导致溶胀,使胞壁结构破碎引起叶绿素溶出,温度越低,细胞变形性、质壁分离、细胞器及膜结构被破坏越严重(Rendal-Vázquez et al, 2001; 孙利芹等, 2004)。细胞经液氮处理后,细胞内没有完整的细胞器或结构(唐国冬等,2017)。样品与液氮间形成的汽膜较

薄,热阻较小,膜态沸腾换热系数得到提高,从而增加冷却速率,导致其细胞内的水分来不及渗透出来,细胞内外均有冰晶形成,对细胞造成更大损伤(周顺华等,2002)。翟洪稳(2017)研究发现,液氮冻融前处理后藻体细胞有明显的细胞壁破裂、内溶物流出的迹象,其细胞破碎程度较大。在高浓度叶绿素的室内培养藻液和野外水体中,M1 测定方法对浮游植物叶绿素 a 的提取效率显著高于其他 4 种方法,在低浓度叶绿素水体中,则差异不显著。测定高浓度叶绿素的水体,在液氮速冻过程中,存在液态固体接触面,可以快速传递能量,速冻速度加快,能够充分形成冰晶(Lucas et al, 1999),进而完全破碎细胞,导致叶绿素提取效率显著高于其他 4 种方法。当测定低浓度叶绿素水体时,藻细胞含量较少,均能有效破碎细胞。

为了满足水质快速准确测定的要求,往往需要考虑测定方法的耗时。M3 和 M4 测定方法的前处理及浸提需要较长时间;而 M1 测定方法前处理耗时较少,浸提时间甚至可以缩短至 1 h,其提取效率能达到 93%以上。因此,M1 测定方法提取效率高、误差小、耗时短、数据重现性好。

4 结论

(1)在 5 种测定叶绿素 a 的方法中,M1 测定方法最优,处理纯藻液时,提取效率与 M5、M3、M2 和 M4 测定方法相比,分别提高了 8.4%、3.1%、5.2%、3.0%;处理野外水样时,分别提高了 11.3%、1.7%、8.0%、7.4%。M1 方法测定时间较其他 4 种方法缩短 1/2 以上,适用于野外不同水体的叶绿素测定。

(2)液氮冻融前处理过程中,冻融时间、冻融次数和浸提时间是影响叶绿素 a 提取的重要因素,最佳条件为速冻 30 s、冻融 4 次、90%的丙酮浸提 4 h;浸提 1 h 时,效率能达 93%以上,在需要快速出结果时,可适当缩短浸提时间,满足快速检测的要求。

参考文献

- 陈静娴,吴纬,宋宁,2000.改良液氮速冻法转化大肠杆菌细胞[J].中国输血杂志,13(3):162-163.
- 丛海兵,黄廷林,周真明,等,2007.藻类叶绿素测试新方法[J].给水排水,33(6):28-32.
- 冯菁,李艳波,朱擎,等,2008.浮游植物叶绿素 a 测定方法比较[J].生态环境,17(2):524-527.
- 冯青英,唐怡,李丽容,2007.地表水中浮游植物叶绿素 a 提取方法的改进研究[J].安徽农业科学,35(31):9902-9904.

- 国家环境保护总局, 2002. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社.
- 韩桂春, 谷丰, 张忠臣, 2005. 淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨[J]. 中国环境监测, 21(1): 55-57.
- 洪法水, 魏正贵, 赵贵文, 2001. 菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应[J]. 应用化学, 18(7): 532-535.
- 李胜生, 董元华, 刘云, 等, 2008. 微囊藻中叶绿素 a 提取方法的优化[J]. 环境监测管理与技术, 20(4): 43-45.
- 梁兴飞, 郭宗楼, 2010. 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[J]. 水生生物学报, 34(4): 856-861.
- 林鸿敏, 2013. 反复冻融法和手持式测定仪测水中叶绿素的比较分析[J]. 广东水利水电, (8): 51-54.
- 林罗敏, 唐鹤辉, 彭亮, 等, 2016. 浮游植物叶绿素 a 的微波法研究及其与反复冻融法的比较[J]. 湖泊科学, 28(5): 1148-1152.
- 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.
- 刘鸿亮, 金相灿, 屠清瑛, 1987. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社.
- 司大英, 魏蓓, 杨馗, 2000. 测定生产力中叶绿素 a 的方法探讨[J]. 环境工程, 3(18): 52-54.
- 苏惠春, 程波, 傅冷西, 等, 2007. 3种破壁方法提取念珠菌总 RNA 效果的比较[J]. 中国真菌学杂志, 2(5): 286-288.
- 孙利芹, 王长海, 江涛, 2004. 紫球藻细胞破碎方法研究[J]. 海洋通报, 23(4): 71-74.
- 唐国冬, 田雨, 王倩, 等, 2017. 低温处理对葡萄果皮细胞结构的影响[J]. 食品科学, 38(5): 191-196.
- 翁笑艳, 林美爱, 严颖, 2009. 地表水浮游植物叶绿素 a 测定方法比较研究[J]. 中国环境监测, 25(3): 36-38.
- 吴志旭, 张雅燕, 2003. 叶绿素 a 测定方法的改进及最优提取时间探讨[J]. 甘肃环境研究与监测, 16(2): 150-152.
- 杨玉珍, 夏未铭, 杨瑾, 等, 2011. 水体中叶绿素 a 测定方法的研究[J]. 中国环境监测, 27(5): 25-27.
- 翟洪稳, 2017. 左旋肉碱对水溶液冰点的影响及其在超低温细胞保存中的应用[D]. 天津: 天津大学.
- 张素文, 2007. 玻璃态下冻结, 冻藏及其后续解冻对西兰花品质的影响研究[D]. 无锡: 江南大学.
- 郑江, 许秀美, 王文星, 等, 2003. 红毛藻藻蓝蛋白的提取方法研究[J]. 食品工业科技, 24(4): 27-29.
- 中华人民共和国水利部, 2012. 水质叶绿素的测定(分光光度法). SL 88-2012[S].
- 中华人民共和国环境保护部, 2017. 水质叶绿素 a 的测定(分光光度法). HJ 897-2017[S].
- 周顺华, 陶乐仁, 刘宝林, 2002. 一种新的灵芝孢子破壁工艺—过冷液氮淬取破壁[J]. 食品科学, 23(9): 80-83.
- Casé M, Leca E E, Leitao S N, et al, 2008. Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds[J]. Marine Pollution Bulletin, 56(7): 1343-1352.
- Liu X G, Xu H, Zhang J Y et al, 2012. Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis in albinism line of wheat (*Triticum aestivum*) FA85 [J]. Journal of Phytologia Plantarum, 145(3): 384-394.
- Lucas T, Flick D, Raoult-Wack A L, 1999. Mass and thermal behaviour of the food surface during immersion freezing[J]. Journal of food engineering, 41(1): 23-32.
- Ptacnik R, Solimini A G, Andersen T, et al, 2008. Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(13): 5134-5138.
- Rendal-Vázquez M E, Maneiro-Pampín E, Rodríguez-Cabarcos M, et al, 2001. Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation, and collagen expression[J]. Cryobiology, 42(1): 2-10.
- Wang B, Sain M, 2007. Dispersion of soybean stock-based nanofiber in a plastic matrix[J]. Polymer International, 56(4): 538-546.
- Zhang D, Lavender S, Muller J P, et al, 2017. Determination of phytoplankton abundances (chlorophyll-a) in the optically complex inland water-The Baltic Sea[J]. Science of the Total Environment, 601: 1060-1074.

(责任编辑 万月华)

Determination of Phytoplankton Chlorophyll-a Concentration Using a Liquid Nitrogen Freeze-Thaw Pretreatment

ZHU De-ping¹, ZOU Chu-jun¹, YANG Jun-yue², LIN Qiu-qi^{1,3}, PENG Liang^{1,3}

(1.Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632,P.R.China;

2.Kaiping Dashahe Water Supply Company, Kaiping 529300,P.R.China;

3.Guangdong Center for Control and Prevention of Reservoir Cyanobacterial Blooms, Guangzhou 510632,P.R.China)

Abstract: Eutrophication of water bodies is a worldwide environmental problem, and assessing eutrophication status supports efforts to prevent and remediate eutrophication. Chlorophyll-a is an important indicator of water quality and used to indicate the degree of eutrophication and to monitor harmful algal blooms (HABs). Extraction of chlorophyll-a from the algae sample is time-consuming and often incomplete, and is the most problematic step in chlorophyll-a analysis. The objective of this study was to increase the chlorophyll-a extraction efficiency by liquid nitrogen freeze-thaw pretreatment. Single-factor and orthogonal experiments were carried out to optimize the extraction efficiency of chlorophyll-a in pure cultured *Chlorella pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa*. Each step was considered: the quick freeze time, the number of freeze-thaw cycles, and the extraction time. Furthermore, we compared the chlorophyll-a concentrations determined in *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa* cultures, and in field samples, using the liquid nitrogen freeze-thaw method (M1) and other four methods: two spectrophotometric methods (M2, M3), a repeated freeze-thaw method (M4) and the acetone/grinding method (M5). The optimal conditions for pretreatment with liquid nitrogen were found to be as follows: quick freeze for 30 s, use four freeze-thaw cycles, and extract with 90% acetone for 4 h. Under these conditions, the relative standard deviations of chlorophyll-a concentration in the *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa* cultures were 0.57% and 2.25%, and the coefficients of variation were 0.46% and 1.84%. The liquid nitrogen freeze-thaw pretreatment increased chlorophyll-a extraction efficiency (>93%), and decreased the relative deviation and analysis time. Compared to M2, M3, M4 and M5, respectively, pretreatment of algae cultures increased extraction efficiency 5.2%, 3.1%, 3.0% and 8.4%, and those of field samples by 8.0%, 1.7%, 7.4% and 11.3%. The liquid nitrogen freeze-thaw pretreatment significantly increased the extraction efficiency of chlorophyll-a, shortened analysis time and can be used in the determination of chlorophyll-a concentration in different water bodies.

Key words: liquid nitrogen freeze-thaw extraction; chlorophyll-a; phytoplankton; orthogonal experiment