

污染水体中蓝藻叶绿素的光谱特征分析

赵志敏^{1,2}, 洪小芹¹, 李 鹏¹, 金小东¹

1. 南京航空航天大学理学院, 江苏 南京 210016

2. CSIRO Materials Science and Engineering, 37 Graham Road, Highett, VIC 3190, Australia

摘 要 水体受污染富营养化导致蓝藻等浮游植物快速生长, 给环境带来很大的危害, 以蓝藻为例, 采用纯净水和蓝藻生长的湖水培养蓝藻, 使用 95 % 的乙醇等时间萃取其中的蓝藻叶绿素, 测量分析了不同含量的蓝藻叶绿素吸收光谱特征。研究表明, 叶绿素吸收峰处于 279.5, 436.0, 664.5 nm, 其中 279.5 nm 处的吸光度不能用于表征叶绿素的含量, 而 436.0 和 664.5 nm 处吸光度与叶绿素含量均有较好的线性关系, 采用两者吸光度差值表征叶绿素含量能够提高测量精度。并研究为检测水体中浮游植物叶绿素含量进而反映水体污染情况提供了实验手段和理论研究依据。

关键词 水污染; 蓝藻; 吸收光谱; 叶绿素

中图分类号: O433; Q949.2 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)06-1596-04

引 言

富营养化是中国湖泊普遍面临的重要环境问题, 对湖泊藻类生长及蓝藻的爆发具有重要的影响, 与之有关的研究已成为近年的研究热点。测量水体中藻类叶绿素浓度以获得水体中藻类的浓度, 是环保部门监测水质状况的重要指标之一^[1-3]。本文以蓝藻为研究对象, 研究受污染水体中蓝藻叶绿素的浓度从而确定受污染水体中蓝藻的浓度, 为水质监测提供理论依据。蓝藻叶绿素的测定方法主要有分光光度法和荧光法^[4-6], 本文采用分光光度法即通过吸收光谱测量而测定叶绿素的浓度。分光光度法是光谱分析采用的一种有效方法, 主要应用在有机物定性分析、单组分定量分析、混合物定量分析、平衡常数的测定、络合物结合比的测定, 在无机物方面用于矿物、半导体、天然产物和化合物等方面研究。另外, 在生物大分子测序研究、生物活性小分子分析、生物药物分析等方面都有广泛应用。目前, 派生和出现了许多新的方法与技术, 比如双波长光度法、导数光谱法、相干光谱法等, 极大地提高了紫外-可见光吸收光谱的选择性、灵敏度和自动化程度, 拓宽了应用领域, 并已取得了诸多研究成果^[7-20]。

本文研究采用纯净水和蓝藻生长的湖水培养蓝藻, 使用 95 % 的乙醇等时间萃取其中的蓝藻叶绿素, 利用紫外-可见分光光度计测试不同含量的蓝藻叶绿素吸收光谱。根据叶

绿素吸收光谱特征分析吸光度与叶绿素含量的关系, 进而反映水体中蓝藻的浓度, 判断水体受污染状况。

1 理论分析

光的吸收是光波通过介质后光强衰减的现象。在一定波长范围内, 物质吸收不随波长而变, 这种吸收称为一般吸收; 反之, 随波长而变的吸收称之为选择吸收。任一介质对光的吸收都是由这两种吸收组成的。紫外和可见光的吸收光谱实质是在电磁辐射的作用下, 多原子的价电子发生跃迁而产生的分子吸收光谱, 又称为电子光谱。显然, 物质吸收电磁辐射的本领与物质分子的能级结构有关。对同一种物质, 激发态能级与基态能级的能量差越大, 则吸收越小。而吸收分光光度法正是基于不同分子结构的各种物质, 对电磁辐射显示选择吸收这种特性建立起来的^[21, 22]。

光的吸收服从光吸收定律(Beer-Lambert 定律)

$$I = I_0 10^{-c \cdot l} \quad (1)$$

式中, I_0 为入射光强, I 为透射光强, ϵ 为样品摩尔消光系数, l 为光通过样品的厚度, c 为样品的摩尔浓度。可见, 液体的吸收与液体的浓度有关。将(1)式中的 c 转换为质量浓度, 则

$$I = I_0 10^{-c' \cdot l} \quad (2)$$

式中, ϵ' 为吸收系数, c' 为样品的质量浓度。将上式取对数, 得

收稿日期: 2009-08-10, 修订日期: 2009-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(10172043)和国际合作项目(BZ2008060)资助

作者简介: 赵志敏, 女, 1955年生, 南京航空航天大学理学院教授 e-mail: zhaozhimin@nuaa.edu.cn

$$\lg I_0/I = cl = A \quad (3)$$

式中, A 为样品的吸光度, 可见, 吸光度与样品的吸光系数及浓度 c 成正比。

吸收定律是一个有限定律。在高浓度时, 液体中吸收分子之间的平均距离缩小到一定程度, 邻近分子彼此的电荷分布都会受到相互的影响, 这种影响能改变它们对特定辐射的吸收能力。相互影响的程度取决于液体的浓度, 这种现象的存在致使吸光度与浓度之间的线性关系发生偏差。所以, 只有在样品液体的浓度较低时, (3) 式才能够精确地测量液体浓度。在实验测量过程中, 可以按照一定的比例将高浓度的样品稀释成低浓度的样品再进行测量。

2 实验研究

实验采用的样品分为两批。

第一批样品: 取等量的蓝藻分别在室内于纯净水中培养两天和一天, 与在湖泊中自然生长的蓝藻对比, 然后用乙醇法(95%的乙醇)萃取其中等量的蓝藻分别得叶绿素样品, 标号为 1-1, 1-2, 1-3。

第二批样品: 于湖泊中取一定量的蓝藻萃取得叶绿素溶液, 然后用 95% 的乙醇稀释成不同浓度的叶绿素-乙醇溶液, 样品标号及浓度见表 1。

Table 1 Concentration of different samples

样品标号	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
浓度/(mg · L ⁻¹)	8	4	2	1	0.5

样品吸收光谱测量仪器采用 UV3600 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

3 实验结果与分析

采用 UV3600 紫外-可见分光光度计检测各样品吸收光谱。图 1 是样品 1-1, 1-2, 1-3 的吸收光谱图测量结果; 图 2 是样品 2-2, 2-3, 2-4 的吸收光谱图测量。各图的横坐标表示光波长, 纵坐标表示吸光度。

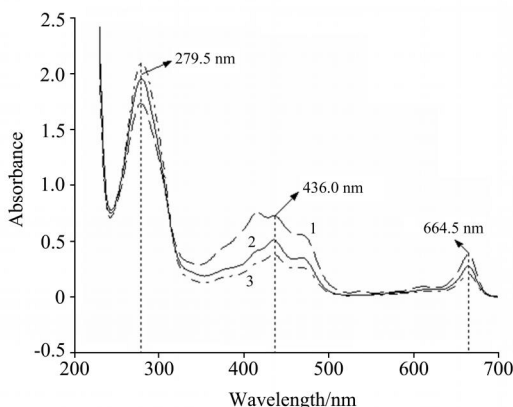


Fig 1 Absorption spectrum of sample 1-1, 1-2 and 1-3

1: Sample 1-1; 2: Sample 1-2; 3: Sample 1-3

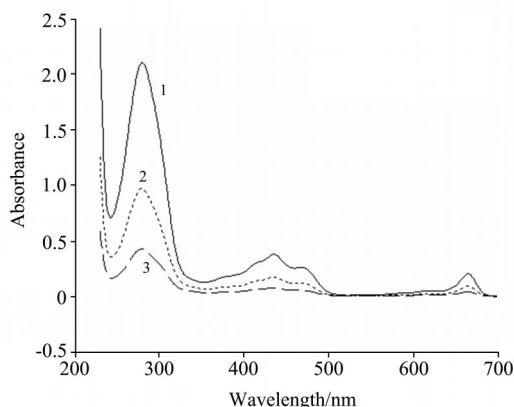


Fig 2 Absorption spectrum of sample 2-2, 2-3 and 2-4

1: Sample 2-2; 2: Sample 2-3; 3: Sample 2-4

由图 1 和图 2 可以看出, 叶绿素吸收光谱在 279.5, 436.0, 664.5 nm 处各有一个吸收峰值, 且在这 3 个吸收峰处吸收强度依次呈减弱趋势。根据图 2, 随着叶绿素浓度的降低, 各吸收峰处的峰值均减小, 但图 1 并未表现这种趋势。图 1 中, 由于在室内培养的蓝藻更易萃取出叶绿素, 所以样品 1-1, 1-2, 1-3 的浓度是依次减小的, 在 436.0 和 664.5 nm 处, 样品的吸收随浓度的减小而减小, 但在 279.5 nm 处, 样品的吸收却随浓度的减小而呈增大的趋势, 所以, 279.5 nm 处的峰值变化并不能表征叶绿素浓度的变化。

图 3 和图 4 分别是第二批样品在 436.0 和 664.5 nm 附近区域的吸收光谱图。

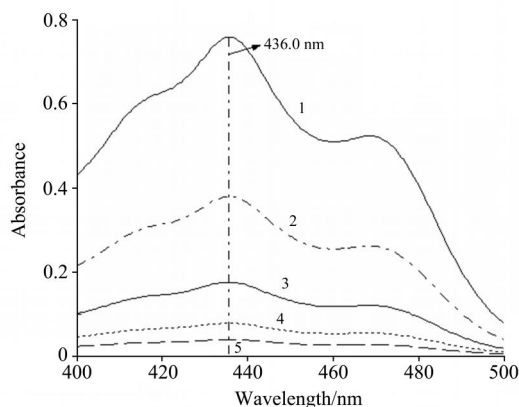


Fig 3 Absorption spectrum of second group of sample (between 400 and 500 nm)

1: Sample 2-1; 2: Sample 2-2;

3: Sample 2-3; 4: Sample 2-4; 5: Sample 2-5

根据图 3 和图 4, 可以看出样品的吸光度随叶绿素浓度的减小呈下降趋势, 分别分析 436.0 和 664.5 nm 处的吸光度随溶液浓度变化关系, 得到图 5 所示关系曲线。

图 5 中, 第 1 条曲线(最上面的 1 条, 其他依此类推)和第 2 条曲线分别为 436.0 和 664.5 nm 处吸光度与溶液浓度的线性拟合曲线, 可见, 吸光度与溶液的浓度有很好的线性关系, 通过测量溶液的吸光度能够计算出溶液的浓度; 第 3 条曲线是 436.0 nm 处吸光度和 664.5 nm 处吸光度的差值

与溶液浓度的线性拟合曲线。第 3 条曲线与第 1 和第 2 条曲线相比,有更好的线性度,这表明,采用两吸收峰处的吸光度的差值可以有效表征叶绿素的浓度并且能够提高测量精度。

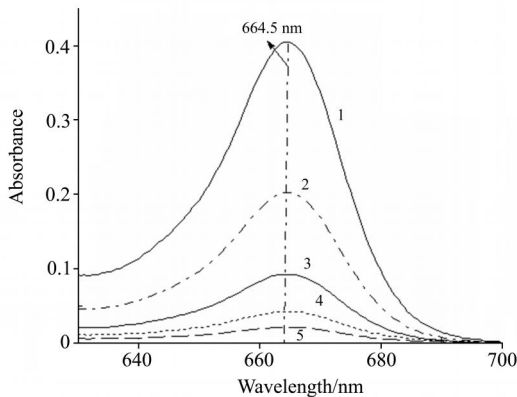


Fig 4 Absorption spectrum of second group of sample (between 630 and 700 nm)

1: Sample 2-1; 2: Sample 2-2;
3: Sample 2-3; 4: Sample 2-4; 5: Sample 2-5

4 结 论

本文以污染水体中的蓝藻为例,采用纯净水和湖水培养蓝藻,用 95% 的乙醇等时间萃取其中的蓝藻的叶绿素,利用紫外-可见分光光度计测量不同浓度的蓝藻叶绿素的吸收光谱,并分析蓝藻叶绿素的吸收光谱的特征。在吸收峰

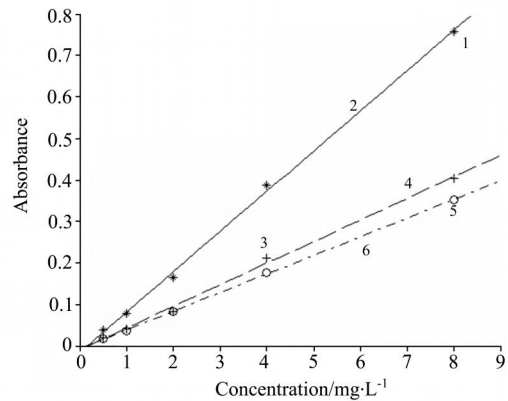


Fig 5 Relationship between absorbency and concentration

1: 436.0 nm ; 2: $A_1 = kc(436.0 \text{ nm})$; 3: 664.5 nm ;
4: $A_2 = kc(664.5 \text{ nm})$; 5: $A_1 - A_2$; 6: Curve = $A_1 - A_2$

436.0 nm 和 664.5 nm 处吸光度与叶绿素浓度均有较好的线性关系,通过测量吸收峰处的吸光度能够表征叶绿素的浓度,进而计算出水体中蓝藻的含量。而且, 436.0 nm 和 664.5 nm 处吸光度的差值与叶绿素的浓度有更好的线性度,采用两者吸光度差值来表征叶绿素浓度能够提高测量的精度。本文研究为估算水体中叶绿素浓度从而计算水体中蓝藻的含量提供了一种新的研究方法,为检测水质和治理蓝藻污染提供了依据。本文的研究方法适用于检测水体中浮游植物的叶绿素的浓度从而反映水体的污染情况,为水质监测提供了实验手段和依据。

参 考 文 献

- [1] HE Jun-hua, CHENG Yong-jin, ZHANG Hao(贺俊华,程永进,张 昊). Optics & Optoelectronic Technology(光学与光电子技术), 2007, 5(5): 16.
- [2] MA Rong-hua, DAI Jin-fang(马荣华,戴锦芳). Journal of Remote Sensing(遥感学报), 2005, 9(1): 78.
- [3] Iluz D, Yacobi Y Z, Gitelson A. Int. J. Remote Sensing, 2003, 24(5): 1157.
- [4] Michael Schagerl, Gabriela K ünzl. Biologia, 2007, 62(3): 270.
- [5] LI Zhen-guo, LU Jun, WANG Guo-xiang, et al(李振国,卢 军,王国祥,等). Environmental Monitoring in China(中国环境监测), 2006, 22(2): 21.
- [6] TANG Yao-ji, YOU Wen-wei, CHEN Ying, et al(唐尧基,游文玮,陈 莹,等). Analytical Instrument(分析仪器), 2004, (3): 24.
- [7] ZHAO Zhi-min, XIN Yu-jun, WANG Le-xin, et al(赵志敏,辛玉军,王乐新,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(1): 138.
- [8] ZHU Wei-hua, ZHAO Zhi-min, GUO Xin, et al(朱卫华,赵志敏,郭 昕). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(4): 1004.
- [9] WANG Le-xin, ZHAO Zhi-min, XIN Yu-jun, et al(王乐新,赵志敏,辛玉军,等). Applied Laser(应用激光), 2007, 27(4): 333.
- [10] ZHU Wei-hua, ZHAO Zhi-min, GUO Xin, et al(朱卫华,赵志敏,郭 昕,等). Journal of Life Sciences, 2008, 2(1): 62.
- [11] Millership J S, Parker C, Donnelly D. Il Farmaco, 2005, 60(4): 333.
- [12] Bebawy Lories I, Abbas Samah S, Fattah Laila A, et al. Il Farmaco, 2005, 60(10): 859.
- [13] Wortmann A C, Froehlich P E, Pinto R B, et al. Spectroscopy, 2007, 21(3): 161.
- [14] Lababpour Abdolmajid, Lee Choul-Gyun. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(2): 104.
- [15] Stauffer Mark T, Hunter Leland J, Troncone Steven K. Spectroscopy Letters, 2007, 40(3): 429.
- [16] Wu Nan, Zhu Yongqiang, Browns, et al. Lab. Chip, 1009, 9(23): 3391.
- [17] Chawla H M, Mrig Sarika. Journal of Analytical Chemistry, 2009, 64(6): 585.
- [18] CHEN Ting, HUANG Zhi-yong, DAI Yu-lan, et al(陈 婷,黄志勇,戴玉兰,等). Journal of Chinese Institute of Food Science and

- Technology(中国食品学报), 2008, 8(6): 149.
- [19] Thongboonkerd Visith, Songtawee Napat, Kanlaya Rattiyaporn, et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(4): 964.
- [20] WANG Tianhu, ZHAO Zhimin, ZHANG Lin, et al. Journal of Molecular Structure, 2009, 937(1-3): 65.
- [21] CHEN Guo-zhen(陈国珍). Ultraviolet Visible Spectrophotometry, Volume 1(紫外-可见分光光度法, 上册). Beijing: Atomic Energy Press(北京: 原子能出版社), 1983. 42.
- [22] LU Dong-yu, CUI Xin-tu, HUANG Jing-rong, et al(卢东昱, 崔新图, 黄镜荣, 等). College Physics(大学物理), 2006, 25(1): 50.

Spectral Analysis of Cyanobacteria Chlorophyll in Polluted Water

ZHAO Zhi-min^{1,2}, HONG Xiao-qin¹, LI Peng¹, JIN Xiao-dong¹

1. College of Science, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

2. CSIRO Materials Science and Engineering, 37 Graham Road, Highett, VIC 3190, Australia

Abstract The polluted water with abundant nourishment cause phytoplankton, such as cyanobacteria, to grow rapidly, which brings great harm to environment. In the present paper, the absorption spectrum of cyanobacteria was measured and analyzed in order to estimate the content of the chlorophyll accurately. The same amount of cyanobacteria was separately cultured in pure water and lake water for different time. The chlorophyll was extracted from the cyanobacteria for the same time by 95% of ethanol. Then the ethanol extract was tested by ultraviolet visible spectrometry. The results show that the absorption spectrum of the chlorophyll has three absorption peaks at 279.5, 436.0 and 664.5 nm respectively. However, the absorbency at 279.5 nm cannot reflect the content of the chlorophyll. The absorbencies at 436.0 and 664.5 nm have linear relationship with the content of chlorophyll. Moreover, the dispersion between the absorbency at 436.0 nm and the absorbency at 664.5 nm can reflect the content of chlorophyll more accurately. The research provides the experimental and theoretical basis for the highly accurate detection of the water quality.

Keywords Water pollution; Cyanobacteria; Absorption spectrum; Chlorophyll

(Received Aug. 10, 2009; accepted Nov. 12, 2009)