

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.08.007

分光光度法与显微计数法 测定微小绿藻生物量的比较研究^①

涂 波, 曹 敏, 黄 茜, 杨晓红

南方山地园艺学教育部重点实验室/西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 使用紫外—可见分光光度计对 6 株绿藻的培养液进行 600~800 nm 的波长扫描, 在 685 nm 处获得一个单纯显著的特征吸收峰。将 6 株微小绿藻藻液分别稀释成 5 个梯度, 同步进行血球计数板显微计数和紫外—可见分光光度计 OD₆₈₅ 值测定。稀释藻液的分光光度法拟合曲线 $R^2 \geq 0.990$, 显微计数法拟合曲线 $R^2 \geq 0.940$, OD₆₈₅ 计数 R^2 在 0.914 与 0.989 之间; 同步培养 6 株绿藻 25 d, 从第 6 d 开始, 每天 650~700 nm 扫描藻液测量 OD, 确认吸收峰是否会发生偏移, 并同步测定藻液细胞浓度和藻液 OD₆₈₅ 值, 比较拟合结果。纯种验证试验中, 单纯特征吸收峰均在 685 nm 处再现。OD₆₈₅ 显微计数散点拟合 R^2 在 0.780 与 0.970 之间, 误差较大的 2 个藻株是蹄形藻和针形纤维藻; 将 6 株藻培养 20 d 的藻液混合, 并稀释成浓度梯度, 测量 OD₆₈₅ 与显微计数, 混合藻液 OD₆₈₅ 计数 $R^2 = 0.972$ 。混合藻种验证试验显示出 OD₆₈₅ 计数对纯种和混合藻种都有着良好的精确度。试验证明, 微小绿藻在 600~800 nm 波段的最大特征吸收峰稳定地发生在 685 nm 处。OD₆₈₅ 值能够准确反映藻液中纯种或混合微小绿藻的生物量或生物量的变化, 精确度和稳定性高于血球计数板显微计数。

关键词: 微小绿藻; 生物量; 显微计数; 光谱计数; 特征吸收峰

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)8-0044-07

微藻的理论研究和生产实际常常需要知道微藻的准确生物量, 但因个体微小、裸眼看不见和数量巨大, 微藻生物量准确定量难度大, 费时费力, 成了研究工作和生产实际中亟待解决的难题之一。近年来, 光谱学方法^[1-2]表现出良好的前景, 其中, 分光光度法因其简便、快捷, 广泛运用于多种物质^[3-4]与生物量等的定量测定。

波长的选择是分光光度法测量过程中最关键的因素。对一些绿藻藻体用 200~800 nm 的吸收光谱扫描^[5-6], 藻类吸收峰的分布可分为 3 个波段区: 200~400 nm 的紫外光区, 400~600 nm 的蓝光区和 600~800 nm 的红光区。紫外光区的吸收峰主要是在 290 nm 附近出现, 峰值特别高, 主要由藻体中的蛋白质引起。由于藻蛋白因藻类生长时间的不同变化很大, 故一般不采用该波长用于藻类生物量的测量^[7]; 蓝光区的吸收峰较多, 有叶绿素、类胡萝卜素等色素的吸收峰, 同时也是比浊法的检测波长范围(450~600 nm)^[8]。由于此区间各色素吸收峰相距较近, 容易相互干扰或常交叉重叠^[6], 有时甚至不能得到明显的吸收峰, 因此这一波长区间对藻胞液进行的比浊法或者色素测量获得的数据不能排除其它非微藻粒子的影响以及微藻形状差异、细胞色素差异引入的误差, 精确度显然会受到影响; 600~800 nm 主要是叶绿素的红区吸收范围, 其中叶绿素 a 在 670~680 nm 有显著地吸收峰, 叶绿素 b 在 650 nm 有一吸收肩峰^[6, 9-10]。选取 600~800 nm 的波长作为光谱扫描范围, 理论上克服了其它波段测量结果精准性的不足。为此, 本试验以 6 个微

① 收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 重庆市科委项目(CSTC, 2011AB1028)基金资助。

作者简介: 涂 波(1988-), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物方面研究。

通信作者: 杨晓红, 教授, 博士生导师。

小绿藻为试材,开展血球计数板显微计数法与红光区色素吸收峰法的比较研究,探寻、验证二种方法间可能存在着的正向偶联关系,为分光光度法快速、简便、准确的确定纯种微小绿藻生物量提供理论支撑.

1 材料与方法

1.1 试验材料

以从重庆市缙云山黛湖中分离纯化的 6 株绿藻为试材:四尾栅藻(*Scenedesmus quadricanda*)、卷曲纤维藻(*Ankistrodesmus convolutus*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、蹄形藻(*Kirchneriella sp.*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)、针形纤维藻(*Ankistrodesmus acicularis*),分别编号为 m1-m6.

1.2 试验方法

1.2.1 样品预处理

使用实验室保藏的纯化藻种接种到 100 mL BBM^[11]液体培养基中,27 ℃,光照强度 4 000 lx,光暗比 1:1,培养约两周.藻液 5 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,藻泥加一定量蒸馏水,重悬,使最终藻细胞密度达到 10⁶~10⁷ 个/mL,备用.

1.2.2 分光光度法标准曲线测定

使用紫外可见分光光度计(UV-1000,上海天美),以蒸馏水为空白.选择 600~800 nm 波长范围,对样品进行波长扫描,以最大吸收峰对应的波长为测定波长.使用备用的藻液和蒸馏水,按照 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0(藻液 mL/总体积 mL)分别配制 6 个浓度的藻液各 3 mL,混匀后以浓度为 0 的藻液为空白,测定溶液 OD,每个样做 3 个平行.

1.2.3 同步显微计数

使用血球计数板对分光光度法中配制的藻液进行显微计数.记录右上、右下、左下、左上、中间 5 个中号方块中的单胞藻或藻胞群体数目,记为 a_1,a_2,a_3,a_4,a_5 .微藻粒子浓度计算公式为:

$$M(\text{个/mL})=(a_1+a_2+a_3+a_4+a_5)/80\times400\times10\,000^{[12]}$$

1.2.4 显微计数与分光光度法的线性拟合分析

将上述分光光度法测得的数据与显微计数获得的数据分别绘制成散点图,分析其线性拟合情况.

1.2.5 验证试验

1.2.5.1 纯种藻株的验证试验

将保存在 BBM 平板培养基上的 6 株藻胞群分别取一接种环至 1 mL 无菌水中,稀释均匀后,分别取 300 μL 接种到 150 mL BBM 液体培养基中,每个藻株 3 个平行.27 ℃,光照 4 000 lx,光暗比 12:12 (hrs/hrs),每日摇动 3 次.

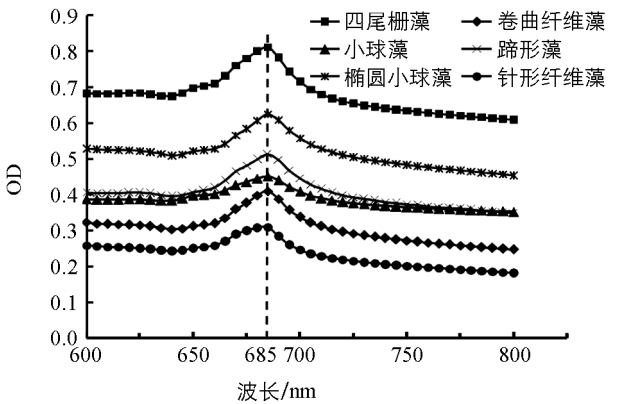
从培养的第 6 d 起至第 25 d(共 20 d),每日取 3 mL 培养液 650~700 nm 扫描其吸收峰,并对该藻液立即进行显微计数.以 OD₆₈₅ 为横坐标、微藻粒子浓度 D(个/mL)为纵坐标,观察线性拟合情况.

1.2.5.2 混合藻种的验证试验

上述接种和培养方法将 6 株绿藻培养 20 d,藻液和蒸馏水按照 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 (藻液 mL/总体积 mL)分别配制 6 个浓度的藻液各 3 mL,混匀后以浓度为 0 的藻液为空白,测定溶液 OD,每个样做 3 个平行.

1.2.6 数据处理

图表制作及数据处理使用 Excel 2007.



垂直虚线示 685 nm 处有最大吸收峰.

图 1 6 株绿藻波长扫描结果

2 结果与分析

2.1 6 株微藻光谱扫描最大吸收峰确定

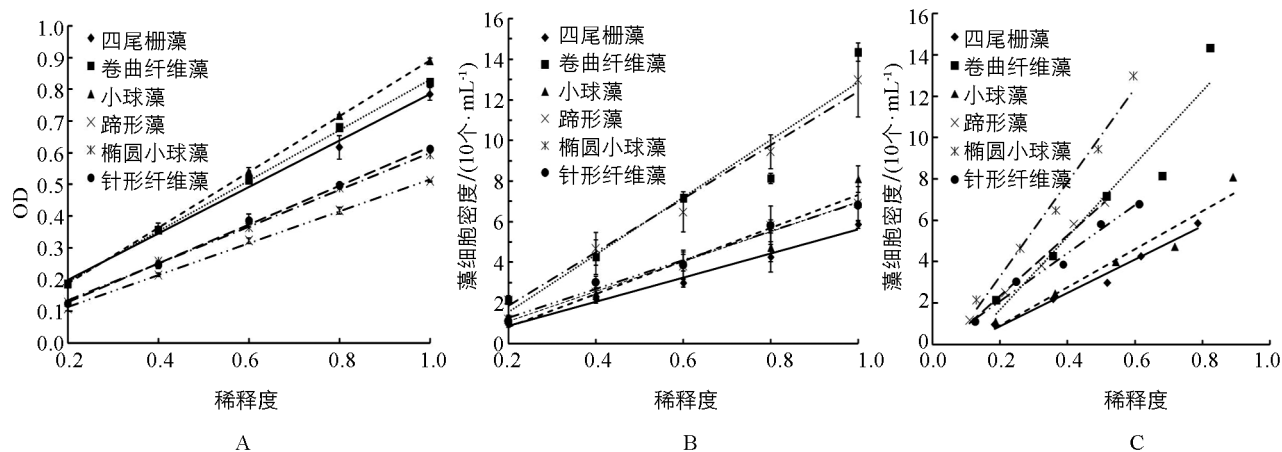
对实验室已经纯化培养的 6 株绿藻按照表 1 设计要求配置成标准浓度藻胞液后, 各自进行波长扫描, 分别观察这 6 株藻胞液的最大吸收峰。结果如图 1 所示, 所有供试绿藻的最大吸收峰均在 685 nm 出现, 为叶绿素 a 的红区吸收峰, 与大多数报道的 670~680 nm 的吸收峰略微红移; 650 nm 有一肩峰为叶绿素 b 的红区吸收峰, 与大多数报道一致^[6-8]。由于 650 nm 处的肩峰不易识别, 685 nm 处波峰显著, 易于识别, 因此, 685 nm 波长是红区最适宜的比色波长, 后续试验都选用这个波长开展研究。

2.2 6 株微藻分光光度法标准曲线制定

按浓度梯度稀释后, 以稀释度为横坐标, OD_{685} 为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性拟合, 获得 6 株微藻的标准曲线, 6 条曲线几乎都是直线, 只是斜率有差异而已(图 2A)。它们的 R^2 值高于 0.993, 表明这 6 株藻在 685 nm 波长下测定出的 OD 与藻液稀释度有着良好的线性关系。所以 685 nm 波长为发射波长测定的 OD 值能够较为准确地反映出藻液生物量的变化。

2.3 显微计数法标准曲线

使用血球计数板显微计数方法对配制藻胞液的微藻粒子密度进行测量, 以稀释度为横坐标, 微藻粒子密度为纵坐标, 获得 6 株微藻显微计数的标准曲线如图 2B 所示。显微计数标准曲线的 $R^2=0.928\sim0.992$, 且它们的误差线大多长于分光光度法标准曲线。所以总体而言显微计数的精度和稳定性小于分光光度法。



A. 分光光度法标准曲线: $OD_{685m1}=0.732x+0.052$, $R_{m1}^2=0.993$; $OD_{685m2}=0.797x+0.034$, $R_{m2}^2=0.999$; $OD_{685m3}=0.881x+0.011$, $R_{m3}^2=1.000$; $OD_{685m4}=0.502x+0.013$, $R_{m4}^2=0.998$; $OD_{685m5}=0.580x+0.019$, $R_{m5}^2=0.998$; $OD_{685m6}=0.613x+0.006$, $R_{m6}^2=0.998$.

B. 显微计数法标准曲线: $D_{m1}=6\times10^6x-30333$, $R_{m1}^2=0.987$; $D_{m2}=1\times10^7x-1\times10^6$, $R_{m2}^2=0.928$; $D_{m3}=8\times10^6x-80000$, $R_{m3}^2=0.942$; $D_{m4}=7\times10^6x-36833$, $R_{m4}^2=0.992$; $D_{m5}=1\times10^7x-76666$, $R_{m5}^2=0.986$; $D_{m6}=7\times10^6x-13333$, $R_{m6}^2=0.984$.

C. 配制藻胞液 OD_{685} 值与显微计数的线性正向偶联: $D_{m1}=8\times10^6OD_{685}-69580$, $R_{m1}^2=0.977$; $D_{m2}=2\times10^7OD_{685}-2\times10^6$, $R_{m2}^2=0.914$; $D_{m3}=9\times10^6OD_{685}-90030$, $R_{m3}^2=0.940$; $D_{m4}=1\times10^7OD_{685}-56063$, $R_{m4}^2=0.989$; $D_{m5}=2\times10^7OD_{685}-1\times10^6$, $R_{m5}^2=0.982$; $D_{m6}=1\times10^7OD_{685}-19616$, $R_{m6}^2=0.979$.

图 2 6 株微藻粒子 OD_{685} 值、显微计数的标准曲线及其偶联拟合

2.4 配制藻胞液 OD_{685} 值与显微计数的线性偶联拟合

在实际应用中常常用显微计数的方法确定藻胞密度和表达培养液中藻细胞的生物量, 然而, 显微计数在样本数量巨大时, 测量既费工又费时。因此期望用更经济有效的方法进行生物量测量。从图 2 的 A 和 B 可以看出, 相同微藻粒子稀释度的显微计数拟合直线与 OD_{685} 值的拟合直线的斜率非常接近, 它们之间应可能存在正向的线性拟合关系。于是, 以配制藻液 OD_{685} 值为横坐标, 显微计数所得微藻粒子浓度为纵坐标, 在图 2C 中做线性偶联拟合, 拟合结果与预期十分吻合, 二者间的 R^2 值高于 0.900, 显著线性正相关。结果表明, 微藻粒子的 OD_{685} 值能够反映藻液中的藻胞密度或生物量。

2.5 OD₆₈₅ 值与显微计数线性拟合的验证试验

2.5.1 纯种藻株验证试验

上述试验是基于同一时间、相同生理状态、不同密度的藻胞为试材进行的试验, 尽管微藻粒子密度与 OD₆₈₅ 值显著线性正偶联, 但是, 这种正偶联现象是否能在微藻粒子培养过程中重复出现, 仍然需要作进一步的试验研究. 为了验证藻胞在培养生长过程中红光区的最大光谱吸收峰是否仍在 685 nm 处, OD₆₈₅ 值与微藻密度是否也线性相关, 本试验以连续培养 25 d 的藻液为测试对象, 从培养的第 6 d 开始, 每天坚持在同一时间参照前述方法检测藻液的红光区最大吸收峰、OD₆₈₅ 值以及显微计数, 共测量 20 d. 结果表明: 不同培养时间、不同生理状态的微小绿藻的光谱扫描结果与前述试验结果一致, 均在 685 nm 处有最大吸收峰(图 3), OD₆₈₅ 值与显微计数密度值间的线性拟合结果相关性好, 其中 4 个藻株的 R^2 值高于 0.940, 2 个藻株的 R^2 值在 0.780~0.880 之间(表 1). 进一步证明红光区 OD₆₈₅ 值能够用来反映微藻粒子在培养过程中的真实生物量的变化.

表 1 OD₆₈₅ 计数验证试验曲线拟合结果

藻 种	拟 合 公 式	R^2
四尾栅藻	$D_{m1}=8\times10^6\text{ OD}_{685}+47\ 590$	0.958
卷曲纤维藻	$D_{m2}=2\times10^7\text{ OD}_{685}+45\ 105$	0.942
小球藻	$D_{m3}=7\times10^6\text{ OD}_{685}+16\ 499$	0.941
蹄形藻	$D_{m4}=1\times10^7\text{ OD}_{685}+39\ 716$	0.887
椭圆小球藻	$D_{m5}=2\times10^7\text{ OD}_{685}+60\ 566$	0.970
针形纤维藻	$D_{m6}=1\times10^7\text{ OD}_{685}-78\ 310$	0.781
混合藻(6 个种)	$D_{\text{mix}}=3\times10^6\text{ OD}_{685}-10\ 361$	0.972

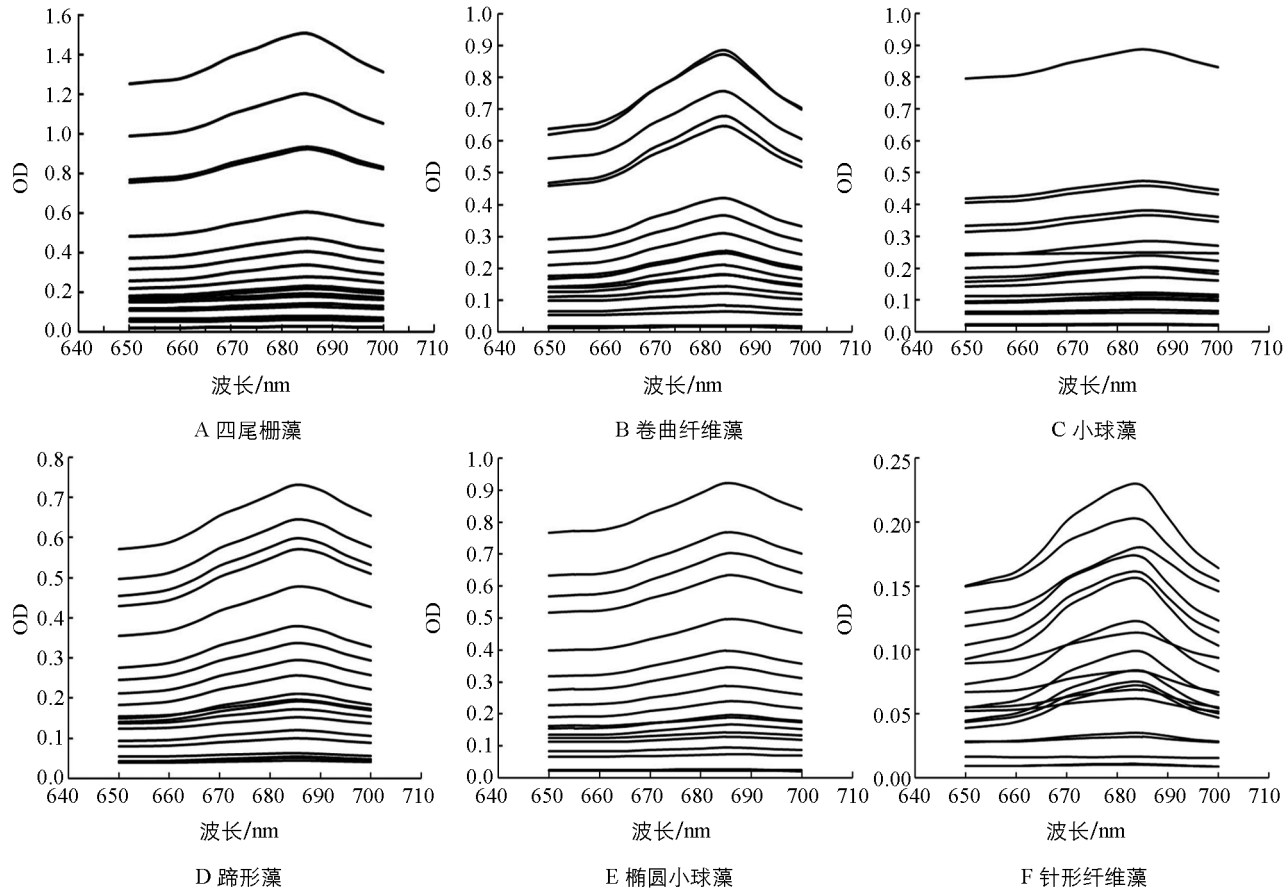


图 3 培养 6 d 后藻液每天的光谱吸收峰扫描(培养 25 d)

2.5.2 混合藻种验证试验

本研究寄希望于寻找通用于微小绿藻生物量测量的方法,自然水域或人工培养过程中水样常常会包含多种绿藻,因此进行了混合藻种的验证试验.所培养的6种绿藻培养到20 d时按同样体积比例混合,配制成浓度梯度,分别测量各浓度梯度下的 OD_{685} 和总藻胞浓度.结果显示其 $R^2=0.972$ (表1),显示出较好的线性相关度,证明了使用 OD_{685} 计数可以相对准确地反映出混合藻液中的微小绿藻的细胞数目.

3 讨论

3.1 微小绿藻在685 nm处具有特征吸收峰

文献中使用的波长因藻种不同而有较大的差异,即使是同一藻种也不尽相同.如:崔妍等测量原壳小球藻使用440 nm^[5];Huesemann M等测量5株海水绿藻生物量使用570 nm^[13];左明等测量小球藻生物量使用640 nm^[14].图1和图3证明了这6株绿藻600~800 nm的最大吸收峰始终在685 nm.680 nm附近是叶绿素a的红区吸收峰,绿藻中的叶绿素含量相较其他藻类多,故而其吸收峰比较大.在验证试验中,6个藻株的20 d定时连续光谱扫描图上,高度一致地在685 nm处有最大吸收峰(图3).这些研究结果充分证明:使用685 nm波长作为发射波测定6株微藻粒子生物量的变化具有良好的精确度,能够准确反映出培养液中藻细胞生物量的变化.

另外,供试藻株分别隶属于绿藻4个不同的属,形态上有单胞藻(小球藻)也有群体(栅藻、蹄形藻)藻,有球形的(小球藻)也有细长的(纤维藻),有胶质鞘的(蹄形藻)也无胶质鞘(栅藻、小球藻等),有较细小的(纤维藻)也有相对较大的(小球藻、栅藻),这些微藻粒子形态基本上代表了微小绿藻的体态,形态上的巨大差异并不影响它们在685 nm处都具有最大的吸收峰的特征.因此,笔者认为:685 nm处的OD值是准确反映微小绿藻生物量变化的特征值,685 nm处的吸收峰是微小绿藻特征吸收峰.

3.2 分光光度法与显微计数法在测量配制藻液生物量中的准确性分析

目前藻类生物量的测定方法多很,但主要分为两大类,一种是直接测定藻细胞数目或质量等物理参数来表示生物量,如:干重法、比浊法、显微计数法、细胞体积计算法等^[15-16];另一种是测定藻细胞中的理化指标来表示生物量,如:测定叶绿素含量、ATP含量、TOC等^[17-19].从经济、简便、快速的角度来看,直接测量藻液OD和显微计数是相对优良的方法,但这两种方法从上述试验结果看来精确度不完全一样.

图2B反映稀释藻液的显微计数拟合结果的 R^2 在0.920~0.990均有分布.由于藻体大小、形状、群体组合、繁殖方式、计数者计数习惯等因素的不同,会带来较大的误差.例如纤维藻类比较长,位于计数区域边界上的藻细胞是否计入结果、分裂后尚未完全分开的多细胞群体是否计为多个细胞等因素受计数者本身判断会带来一定误差.如:蔡卓平等对3株微藻(三角褐指藻、亚心形扁藻、海洋小球藻)进行计数,其拟合曲线 $R^2>0.990$ ^[20];而李士虎等对小新月菱形藻计数其拟合曲线为0.885^[21].对比分光光度法和显微计数法的误差线,前者的波动性明显小于后者.可见由于不同藻种形态上的巨大差异和计数者的不同,显微计数的结果有一定的差异;藻胞群体的发育情况也直接制约了以细胞数目表示整体生物量的准确度.

3.3 OD_{685} 计数在测量培养藻液生物量中的误差来源分析

纯种验证试验中,6株绿藻培养了25 d,前5 d的藻培养液吸收峰几乎没有多大的变化,从第6 d开始,出现显著的最大吸收峰.此后每天定时波长扫描检测,结果发现,在不同培养时间内,6株绿藻的最大吸收峰波长未发生改变,仍在685 nm处,与前面用配制藻液进行的光谱测量结果一致,表明685 nm处的吸收峰就是微小绿藻的特征吸收峰(图3).

将6株藻的纯种验证试验 OD_{685} 计数和配制藻液的显微计数、 OD_{685} 计数的拟合曲线 R^2 数值进行对比,分别计算每种藻上述3项拟合曲线的 R^2 的标准差 σ .四尾栅藻($\sigma_{m1}=0.015$)、卷曲纤维藻($\sigma_{m2}=0.014$)、小球藻($\sigma_{m3}=0.001$)、椭圆小球藻($\sigma_{m5}=0.008$)4个藻株的相对标准差低于2%,具有很高的精确性和方法稳定性,其中四尾栅藻($R^2\geq 0.950$)、小球藻($R^2\geq 0.940$)、椭圆小球藻($R^2\geq 0.970$)3株藻分光光度法结果与显微计数的测量结果几乎一致,精度高.而蹄形藻($\sigma_{m4}=0.060$)、针形纤维藻($\sigma_{m6}=0.116$)的相对标准差分别为6.3%,12.7%,出现了较大的偏移.分析主要有两个原因:其一,显微计数法本身的精度受限制.因为针形纤维藻很细长,进入观察视野框线上的藻胞因体态和位置的原因不一定被计入统计范围,也就是

说如果观察视野框上这样的藻胞多的话,以显微计数为基础制定的标准曲线与真实数据间会产生较大的误差;其二,由藻种本身的生长特性与计数方法所致误差.从图 3 可明显发现,培养相同的时间,针形纤维藻藻液 OD 远低于其他藻种.因为溶液中粒子浓度越低,使用取样统计再进行换算求总量的方法误差将越大.而分光光度法则是测量容积中所有的叶绿素 a,没有信息丢失,与真实数据间没有误差或误差小得多.

混合藻种的验证试验中 $R^2=0.972$,这一结果与单个纯种绿藻的验证试验一致性好,显示 OD₆₈₅ 计数有着良好的精度.

当然 OD₆₈₅ 进行计数还存在一定的偏差,但偏差多数源于显微计数,克服这个偏差技术是做得到的,只要通过更深入细致地研究工作,就能为单个种或混合种绿藻找到一个经验值,从而对藻种的对应数据进行修正.

4 结 论

微小绿藻在 685 nm 处有特征吸收峰,OD₆₈₅ 值能够精确地反映微小绿藻的生物量或生物量的的变化.使用血球计数板进行显微计数本身有一定的精确度,但受到较多因素的影响.两种方法都较便捷、经济、高效,但是分光光度法精确度高于显微计数法.

参考文献:

- [1] STEHFEST K, TOEPEL J, WILHELM C. The Application of Micro-FTIR Spectroscopy to Analyze Nutrient Stress-Related Changes in Biomass Composition of Phytoplankton Algae [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(7): 717-726.
- [2] TSAI-YUN LEE, MIKIO TSUZUKI, TOSHIFUMI TAKEUCHI. Quantitative Determination of Cyanobacteria in Mixed Phytoplankton Assemblages by an in Vivo Fluorimetric Method [J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 302(1): 81-87.
- [3] 刘 飒,刘绍璞,谢锂纱,等. 刚果红分光光度法测定链霉素 [J]. 西南大学学报:自然科学版,2008,30(9): 53-56.
- [4] 江珊珊,刘忠芳,刘绍璞. 高锰酸钾褪色分光光度法测定白藜芦醇 [J]. 西南大学学报:自然科学版,2009,31(3): 67-70.
- [5] 崔 妍,李美芽,施春雷,等. 原壳小球藻生物量快速测定方法的对比研究 [J]. 食品科学,2012,33(2): 253-57.
- [6] 周百成,郑舜琴,曾呈奎. 几种绿藻、褐藻和红藻的吸收光谱的比较研究 [J]. 植物学报,1974,16(2): 146-155.
- [7] 杨 震,童家明,唐学玺,等. 海洋单细胞藻对紫外吸收的比较研究 [J]. 海洋通报,1999,18(5): 93-96.
- [8] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2002: 151.
- [9] 赵巧华,秦伯强. 藻类的光谱吸收特征及其混合藻吸收系数的分离 [J]. 环境科学学报,2008,28(2): 313-318.
- [10] 吕旭阳,张 雯,杨 阳,等. 分光光度法测定小球藻数量的方法研究 [J]. 安徽农业科学,2009,37(23): 11104-11105.
- [11] BOLD H C. The Morphology of Chlamydomonas Chlamydogama sp. Nov [J]. Torrey Botanical Society, 1949, 76(2): 101-8.
- [12] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程 [M]. 北京:北京大学出版社,1999: 97-99.
- [13] HUESEMANN M, BARTHA R, HAUSMANN T S, et al. An Innovative AApproach for Screening Marine Microalgae for Maximum Flue Gas CO₂ Biofixation Potential[C]. Proceedings of the Second Annual Conference on Carbon Sequestration, Alexandria, VA. 2003.
- [14] 左 明,王长海. 微量元素对转植酸酶基因小球藻生长的影响 [J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版,2010,23(2): 116-122.
- [15] Hillebrand H, Dürselen C D, Kirschtel D, et al. Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae [J]. Journal of Phycology, 1999, 35(2): 403-424.
- [16] 孙 军,刘东艳,钱树本. 浮游植物生物量研究 I. 浮游植物生物量细胞体积转化法 [J]. 海洋学报,1999,21(2): 75-85.
- [17] GREGOR J, MARŠÁLEK B. Freshwater Phytoplankton Quantification by Chlorophyll a: a Comparative Study of in Vitro, in Vivo and in Situ Methods [J]. Water Research, 2004, 38(3): 517-522.
- [18] 王 宪,李文权,王尊本. 分析藻类 ATP 估算生物量 [J]. 厦门大学学报:自然科学版,1993,32(1): 121-124.

[19] 沈萍萍,王朝晖,齐雨藻,等. 光密度法测定微藻生物量 [J]. 暨南大学学报: 自然科学版与医学版, 2001, 22(3): 115—119.

[20] 蔡卓平,短舜山,朱红惠. 光密度法与计数法测定 3 种能源微藻细胞生长的相关性及其验证(英文) [J]. 南方农业学报, 2012, 43(10): 1480—1484.

[21] 李士虎,朱明. 分光光度法测定单胞藻数量初步研究 [J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2001, 10(Z1): 8—9.

Methodological Comparison Between Spectrophotometry and Microscopic Counting in Measuring Biomass of Micro-Green Algae

TU Bo, CAO Min, HUANG Qian, YANG Xiao-hong

Key Laboratory of Horticulture for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education /
School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: UV-Vis spectrophotometer was used to scan the culture solution of 6 strains of green algae between 600 nm and 800 nm of wavelength. The micro-green algae were diluted into 5 concentration gradients. A special single characteristic peak appeared at 685 nm of wave length in all the 6 strains. Concentration and OD value of the algae liquors were measured separately with a hemacytometer under microscope and with a UV-Vis spectrophotometer scanned at 685 nm at the same time. The linear fit degree for the two methods was very high. To further verify the above results, the 6 strains of algae were synchronously cultivated for 25 days. From the 6th day, the algae solutions were scanned every day between wavelength 650—700 nm in order to further confirm whether the characteristic absorption peaks would offset or not. The concentration and OD₆₈₅ value of the algae solutions were synchronously measured every day. The linear fit results of the verification test and the compound algae solutions linear fit results were compared. The 6 strains of algae were also cultivated 20 days in liquid medium. Then they were mixed all in the same volume and diluted into 5 concentration gradients. The concentration and OD₆₈₅ value of the mixed algae solutions were also measured. Again, the special single characteristic absorption peak appeared at 685 nm. R^2 of the algae solutions linear fit were ≥ 0.990 . R^2 of microscopic counting scatter linear fit were ≥ 0.940 . OD₆₈₅ counting R^2 was between 0.914 and 0.989. After cultivating 25 days, the absorption peak of microgreen algae also appeared at 685 nm and R^2 was from 0.780 to 0.970. The mixed algae solution linear fit R^2 was 0.972. All the data above clarified that OD₆₈₅ value could accurately present the biomass or the biomass change of micro-green algae with $R^2 > 0.990$, and that spectrophotometry is more accurate and stable than microscopic counting.

Key words: micro-green algae; biomass; microscopic counting; spectral counting; characteristic absorption peak

责任编辑 欧 宾

