

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

梁兴飞 郭宗楼

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029)

OPTIMIZATION OF THE METHOD ON DETERMINATION OF PHYTOPLANKTON CHLOROPHYLL *a* BY USING ULTRASOUND-ASSISTED HOT-ETHANOL EXTRACTION

LIANG Xing-Fei and GUO Zong-Lou

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

关键词: 超声辅助; 热乙醇; 叶绿素 *a*; 方法优化

Key words: Ultrasound-assisted; Hot-ethanol; Chlorophyll *a*; Method optimization

中图分类号: Q-31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)04-0856-06

浮游植物长期以来一直被作为水质的指标生物,而浮游植物的种群生物量(Phytoplankton biomass)是水生生态系统的一个重要指标^[1]。叶绿素 *a* 存在于所有浮游植物体内,占细胞干重的 1%—2%,因此浮游植物叶绿素 *a* 含量成为浮游植物生物量的重要指标而被广泛应用^[2]。目前,浮游植物叶绿素 *a* 的测定方法主要有高效液相色谱法、荧光光度计法和分光光度计法。高效液相色谱法由于操作繁琐,不适于样品的快速检测^[3—7]。而荧光光度计法虽然能够较为快速测量叶绿素 *a* 的含量,但是由于一些降解产物可对光谱产生干扰因而会造成误差^[8—10]。分光光度计法由于操作简单、准确可靠等优点成为了目前最普遍的测定浮游植物叶绿素 *a* 的方法^[11,12]。分光光度计法又分为多色法和单色法,多色法由于测量数据较多,误差大,已经很少使用,目前大多采用的是以丙酮、乙醇等作为萃取溶剂的单色法,丙酮法应用较早,目前国际上仍在广泛使用。近年来,从萃取效果、安全等考虑,逐渐采用乙醇作为萃取溶剂来测定叶绿素 *a* 的含量,并有研究对热乙醇法的误差进行了探讨及比较了与丙酮法的差异^[13,14],而关于热乙醇法的各个因素对提取叶绿素 *a* 的影响尚未报道。研究证实由于超声波具有强大的机械传质作用以及空化作用等系列效应,使得细胞快速破碎,有利于溶剂浸

入细胞而可以提高目标成分的提取率^[15,16]。因此,本研究采用超声波细胞粉碎仪破碎细胞,用单因素试验和正交试验确定热乙醇提取浮游植物叶绿素 *a* 方法中各因素的影响并选择最佳条件,在此基础上对该方法的精密度进行评价。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和鱼害微囊藻(*Microcystis ichthyoblabe* Kutz)(购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库),培养基为 BG11 培养基,光照强度为 2500 lx,温度为 30°C,光暗周期为 14h:10h,对数生长期的藻液为实验材料。

1.2 测定原理

在天然水体中,浮游植物中不仅存在着具有光合活性的叶绿素 *a*,而且存在着没有光合活性的脱镁叶绿素 *a*,因此应用叶绿素 *a* 作为浮游植物生产量的主要指标时,必须将叶绿素 *a* 与脱镁叶绿素 *a* 区分开来。

叶绿素 *a* 经酸化处理后,镁原子被氢原子取代,叶绿素 *a* 降解为脱镁叶绿素 *a*。脱镁叶绿素 *a* 与等量的叶绿素 *a* 相比,在 665 nm 波长下,具有较低的消光系数(1.0/1.7),故可用酸化的方法,测定叶绿素前后光密度的

收稿日期: 2009-08-03; 修订日期: 2010-04-12

基金项目: 水体污染控制与治理国家科技重大专项(2008ZX07421-001)资助

作者简介: 梁兴飞(1983—),男,汉族,山西省晋中人;硕士研究生;主要从事生物控藻技术研究。E-mail: liangxingfei922@163.com

通讯作者: 郭宗楼, E-mail: zlguo@zju.edu.cn

变化。如果天然水体中脱镁叶绿素相对含量较高, 酸化处理后光密度的变化就较小; 反之, 脱镁叶绿素的相对含量越低, 酸化处理后光密度的变化就越大^[17]。根据这个原理, 选用合适的计算公式, 就可以计算出叶绿素 *a* 与脱镁叶绿素 *a* 的含量。

测定过程中, 凡参与计算的各光密度值都应减去 750 nm 处的光密度值, 以消除悬浮物质的干扰。首先测定酸化前和酸化后的光密度 E_{665b} 和 E_{665a} (酸化前测定的光密度值用 D_{665b} 、 D_{750b} 表示, 酸化后测定的光密度值用 D_{665a} 、 D_{750a} 表示)。

$$E_{665b} = D_{665b} - D_{750b}$$

$$E_{665a} = D_{665a} - D_{750a}$$

根据 Lorenzen 公式^[18]计算单位样品中叶绿素 *a* 含量:

$$\text{叶绿素 } a(\mu\text{g/L}) = \frac{A \times K \times (E_{665b} - E_{665a}) \times V}{V \times L} \quad (1)$$

其中, A ——不同萃取溶剂中叶绿素 *a* 的比吸光系数

K ——常数, 为纯叶绿素 *a* 酸化前的光密度与酸化前后的光密度变化的比值

v ——提取液体积 (mL)

V ——样品的体积 (L)

L ——比色杯光程长度 (cm)

1.3 超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 *a*

取对数生长期生长的铜绿微囊藻藻液 10 mL 过 0.45 μm 的混合纤维素膜, 将带藻细胞的膜冷冻过夜, 取出后迅速用 8 mL 热乙醇于热水浴中萃取 2min, 将萃取液超声破碎 5—20min 后, 于暗处静置 2—6h, 离心 (5000 r/min, 4°C) 5min 后取上清液 3.5 mL 置于比色皿中, 于 665 nm 和 750 nm 处测吸光值, 然后滴加 200 μL 的 1 mol/L 盐酸酸化, 5min 后于波长 665 nm 和 750 nm 处再测吸光值。采用热乙醇为萃取溶剂, $A=11.5$, $K=2.43$, 比色皿光程为 1 cm, 则公式(1)可简化为:

$$\text{叶绿素 } a(\mu\text{g/L}) = \frac{27.9 \times (E_{665b} - E_{665a}) \times V}{V} \quad (2)$$

1.4 单因素试验

由于叶绿素 *a* 在萃取 2—6h 内稳定, 超过 6h 则慢慢降解, 故单因素实验中的萃取时间为 4h。研究表明藻类的细胞壁在超声频率为 20 kHz、功率为 40 W 时极容易破碎^[19], 故本试验中采用的超声频率为 20 kHz、功率为 40 W。

试验因素 1: 超声时间分别为 1、3、5、10、15、20min, 乙醇浓度为 80%, 萃取温度 80°C。

试验因素 2: 萃取温度分别为 60°C、65°C、70°C、75°C、80°C, 超声时间为 10min, 乙醇浓度为 80%。

试验因素 3: 乙醇浓度分别为 50%、60%、70%、80%、90%, 超声时间 10min, 萃取温度 80°C。

1.5 超声辅助热乙醇提取法的正交优化试验

为了确定超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 *a* 的最佳条件, 根据单因素实验的结果, 选择对提取叶绿素含量 *a* 有意义的水平做正交试验, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以萃取温度、萃取时间、乙醇浓度、超声时间 4 个因素, 选择三个水平进行试验, 实验方案 (表 1)。

1.6 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 *a* 方法评价

由正交优化试验得出超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 *a* 的最佳条件, 对该方法进行精密度实验, 取同一藻液进行 5 次分析, 并计算结果的标准偏差, 以评价该方法的精密度。

1.7 丙酮提取法测定叶绿素 *a*

取藻液 10 mL (与超声辅助热乙醇提取法采用的藻液为同一批) 过 0.45 μm 的混合纤维素膜, 将膜剪碎后在研钵中加入 8 mL 90% 丙酮研磨, 定量转移到刻度试管中并加入 90% 丙酮使终体积为 8 mL, 于暗处静置萃取 12h, 离心 (5000 r/min, 4°C) 5min 后取上清液 3.5 mL 于波长 665 nm 和 750 nm 处测吸光值, 然后加入 200 μL 的 1 mol/L 盐酸酸化, 5min 后于波长 665 nm 和 750 nm 处再测吸光值。采用丙酮为萃取溶剂, $A=11.2$, $K=2.43$, 比色皿光程为 1 cm, 则公式(1)可简化为:

$$\text{叶绿素 } a(\mu\text{g/L}) = \frac{27.3 \times (E_{665b} - E_{665a}) \times V}{V} \quad (3)$$

2 结 果

2.1 单因素试验

超声时间对叶绿素 *a* 提取的影响 图 1 表明, 在 1—10min 内, 随着超声时间的延长, 藻细胞逐渐被破碎, 叶绿素 *a* 充分溶出, 叶绿素 *a* 含量逐渐增加。超声 10min 后, 叶绿素 *a* 含量达到最大值, 含量为 282.72 $\mu\text{g/L}$, 超过 15min, 叶绿素 *a* 含量开始降低。

表 1 因素水平表
Tab. 1 Factor level chart

水平 Level	萃取温度 A(°C)	萃取时间 B(h)	乙醇浓度 C(%)	超声时间 D(min)
1	70	2	70	5
2	75	4	80	10
3	80	6	90	15

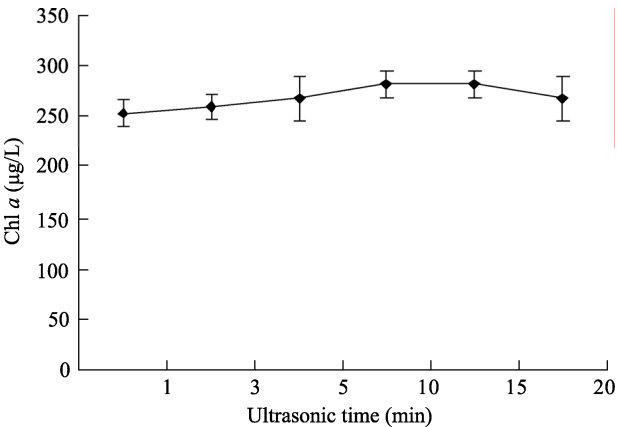


图 1 超声时间对叶绿素 *a* 提取的影响
Fig. 1 Effects of ultrasonic time on extraction of chlorophyll *a*

萃取温度对叶绿素 *a* 提取的影响 图 2 表明, 随着萃取温度的升高, 叶绿素 *a* 的含量总体呈现上升趋势, 超过 65℃ 则上升趋势变缓, 在 75℃ 时叶绿素 *a* 含量最大达到 260.40 μg/L, 之后略有下降。

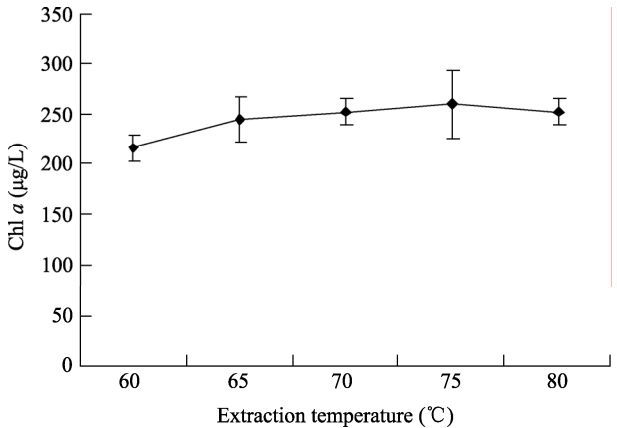


图 2 萃取温度对叶绿素 *a* 提取的影响
Fig. 2 Effects of extraction temperature on extraction of chlorophyll *a*

乙醇浓度对叶绿素 *a* 提取的影响 图 3 表明, 乙醇浓度对叶绿素 *a* 含量影响很大。随着乙醇浓度的升高, 叶绿素 *a* 含量也逐渐升高, 且当乙醇浓度超过 60% 时, 叶绿素 *a* 含量明显增加。当乙醇浓度达到 90% 时, 叶绿素 *a* 含量达 282.72 μg/L。

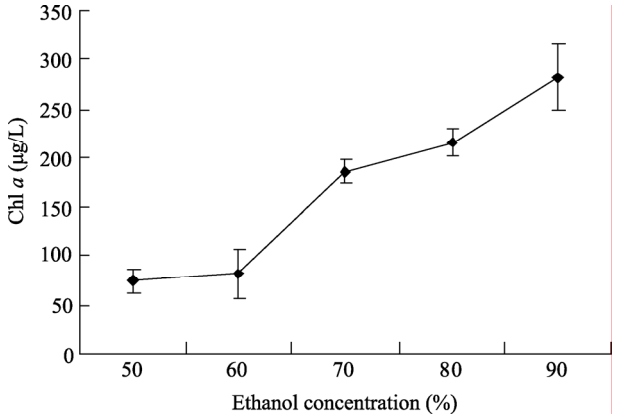


图 3 乙醇浓度对叶绿素 *a* 提取的影响
Fig. 3 Effects of ethanol concentration on extraction of chlorophyll *a*

2.2 超声辅助热乙醇提取法的正交优化试验

根据单因素实验的结果, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以萃取温度、萃取时间、乙醇浓度、超声时间 4 个因素、选择三个水平进行试验, 试验结果(表 2)。

由表 2 极差分析可知, 对于叶绿素 *a* 的提取, 影响因素的主次是 $C>A>D>B$ 。乙醇浓度是主要因素, 萃取温度是居中因素, 超声时间和萃取时间是次要因素, 最优组合为 $A_3B_1C_3D_2$ 。对实验结果进行方差分析、*F* 检验(表 3)。

由表 3 方差分析可以看出, 超声时间因素的偏差平方和之比为 $37.00>F_{0.05}(2,2)=19.00$, 为显著因素, 萃取温度和乙醇浓度影响因素的偏差平方和之比都大于 $F_{0.01}(2,2)=99.00$, 为极显著因素, 而萃取时间则影响不显著。

表 2 正交试验结果
Tab. 2 Results of orthogonal test

序号 Number	A	B	C	D	叶绿素含量 Chl a (μg/L)
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	96.72
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	156.24
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	200.88
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	163.68
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	178.56
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	126.48
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	267.84
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	178.56
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	193.44
K ₁	151.28	176.08	133.92	156.24	
K ₂	156.24	171.12	171.12	183.52	
K ₃	213.28	173.60	215.76	181.04	
R	62.00	4.96	81.84	27.28	

表 3 方差分析表
Tab. 3 Results of variance analysis

方差来源 Variance source	偏差平方和 Square deviation	自由度 Free degree	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	显著性 Significance
A	7122.16	2	193.00	* *
B	36.90	2	1.00	
C	10074.36	2	273.00	* *
D	1365.39	2	37.00	*
误差 Error	36.90			

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

2.3 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 *a* 方法评价

由正交优化试验得出超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 *a* 的最佳条件为: 萃取温度 80℃, 萃取时间 2h, 乙醇浓度 90%, 超声时间 10min。取同一藻液进行 5 次分析, 计算出叶绿素 *a* 含量的标准偏差为 0.00998, 表明该方法具有较高的精密性。

2.4 与丙酮提取法的比较

分别用超声辅助热乙醇提取法和丙酮提取法对实验室纯培养铜绿微囊藻藻液、鱼害微囊藻液(培养一周)以及采自太湖的藻样进行叶绿素 *a* 含量的测定, 对结果进行比较(图 4)。

如图 4 所示, 对于同一类的样品, 超声辅助热乙醇提取法测定的叶绿素 *a* 含量明显高于丙酮提取法的含量, 且前者的 SD 值均小于后者, 表明前者测定结果准确, 而且具有更高的萃取效率。

3 讨论

超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 *a* 含量的单因素实验表明, 叶绿素 *a* 的提取受到许多因素的影响。其中乙醇浓度对叶绿素 *a* 的提取影响非常显著, 在所采取的条件

件下, 乙醇浓度越高, 越容易引起细胞溶胀, 使得叶绿素 *a* 溶出, 因而叶绿素 *a* 含量越高。而温度对叶绿素 *a* 的提取影响也很大, 本实验表明, 随着温度的升高, 叶绿素 *a* 的含量逐渐增大, 但是温度过高, 很容易破坏叶绿素 *a*, 使得溶剂中叶绿素 *a* 含量下降。研究表明藻类的细胞壁在超声频率为 20 kHz, 功率为 40 W 时极容易破碎^[19], 且随着超声时间延长, 藻细胞被充分破碎, 叶绿素 *a* 逐渐溶出, 超声 10min 后, 用血球计数板进行显微计数发现, 藻细胞破碎比例达到 98.3%, 此时叶绿素 *a* 含量达到最大值。超过 15min 后, 叶绿素 *a* 含量降低, 这是由于超声时间过长造成提取液局部温度上升, 叶绿素开始降解。超声辅助热乙醇提取法的正交优化试验表明, 影响叶绿素 *a* 提取的因素主次顺序是: 乙醇浓度>萃取温度>超声时间>萃取时间, 通过极差分析和方差分析, 结果都显示出乙醇浓度是主要因素, 萃取温度是居中因素, 超声时间和萃取时间是次要因素, 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 *a* 的最佳方法为: 温度 80℃, 萃取时间 2h, 乙醇浓度 90%, 超声时间 10min。对该方法进行精密度实验表明, 超声辅助热乙醇提取法具有较高的精密性。

本实验分别用超声辅助热乙醇提取法和丙酮提取法对三种藻样进行叶绿素 *a* 含量的测定, 对结果进行比较。

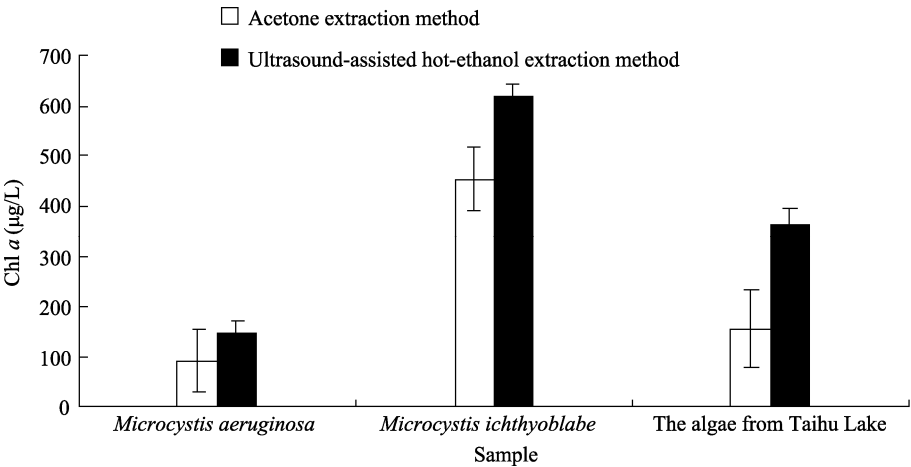


图 4 超声辅助热乙醇提取法和丙酮提取法测定结果的比较

Fig. 4 The comparison of results between the ultrasound-assisted hot-ethanol extraction method and acetone extraction method

对于同一类的样品,超声辅助热乙醇提取法测定的叶绿素 *a* 含量明显高于丙酮提取法的含量,而对太湖藻样来说两者差别更大,这很可能是由于太湖藻样中藻的种类的不同造成^[20—22]。与丙酮提取法相比,超声辅助热乙醇提取法效率高,误差小,而且乙醇对人体健康的影响远远小于丙酮,所以该法是一种更准确、安全的测定浮游植物叶绿素 *a* 的方法。

参考文献:

- [1] Jin X C, Tu Q Y. Research criterion of eutrophication lakes [M]. Beijing: Chinese Environmental Science Publishing Company. 1990, 268—270 [金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范. 北京: 中国环境科学出版社. 1990, 268—270]
- [2] Yang C G, Song X H, Sun B Y. Comparison of simple methods for extraction and measurement of phytoplanktonic Chlorophyll-*a* [J]. *Marine Science*, 2007, **37**(1): 6—9 [杨彩根, 宋学宏, 孙丙耀. 浮游植物叶绿素 *a* 含量简易测定方法的比较. 海洋科学, 2007, **37**(1): 6—9]
- [3] Wu Z B, Zhang B Z, Zhang L P, *et al.* High performance liquid chromatography detection of chlorophyll *a*, β -carotene, pheophorbide *a* [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, **34**(9): 1359 [吴振斌, 张兵之, 张丽萍, 等. 叶绿素-*a*、 β -胡萝卜素及脱镁叶绿素-*a* 的高效液相色谱检测. 分析化学, 2006, **34**(9): 1359]
- [4] Dai R J, Tong B, Huang C, *et al.* Determination of Chlorophylls in Drinking Water by HPLC [J]. *Transactions of Beijing Institute of Technology*, 2006, **26**(1): 87—89 [戴荣继, 佟斌, 黄春, 等. HPLC 测定饮用水中藻类叶绿素含量. 北京理工大学学报, 2006, **26**(1): 87—89]
- [5] Yoshida E, Nakamura A, Watanabe T. Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a* and naphthoquinones in photosystem I of red algae: existence of two menaquinone-4 molecules in photosystem I of *Cyanidium caldarium* [J]. *Analytical Sciences*, 2003, **19**(7): 1001—1005
- [6] Nakamura A, Akai M, Yoshida E, *et al.* Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a* and phylloquinone in Photosystem I of oxygenic photosynthetic organisms. Universal existence of one chlorophyll *a* molecule in Photosystem I [J]. *Eur. J. Biochem*, 2003, **270**: 2446—2458
- [7] Edelenbos M, Christensen L P, Grevsen K. HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(10): 4768—4774
- [8] Gibb S W, Cummings D G, Irigoien X, *et al.* Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the Northeastern Atlantic [J]. *Deep-Sea Research II*, 2001, **48**: 795—823
- [9] Liang Y, Feng L X, Yin C L, *et al.* Current status and prospect of chlorophyll fluorescence technique in the study of responses of microalgae to environmental stress [J]. *Marine Sciences*, 2007, **31**(1): 71—76 [梁英, 冯力霞, 尹翠玲, 等. 叶绿素荧光技术在微藻环境胁迫研究中的应用现状及前景. 海洋科学, 2007, **31**(1): 71—76]
- [10] Yin C L, Liang Y, Zhang Q F. Effects of different P concentrations on the growth and Chlorophyll Fluorescence of *Dunaliella salina* and *Chaetoceros gracilis* [J]. *Fisheries Science*, 2007, **26**(3): 154—159 [尹翠玲, 梁英, 张秋丰. 磷浓度对盐生杜氏藻和纤细角毛藻叶绿素荧光特性及生长的影响. 水产科学, 2007, **26**(3): 154—159]
- [11] Li Z G, Lu J, Wang G X, *et al.* Comparison of Measurement of Phytoplankton Chlorophyll *a* Concentration by Spectrophotometry [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2006, **22**(2): 21—23 [李振国, 卢军, 王国祥, 等. 分光光度法测定浮游植物叶绿素 *a* 的比较研究. 中国环境监测, 2006, **22**(2): 21—23]
- [12] Feng J, Li Y B, Zhu Q. Comparison of methods for phytoplankton chlorophyll-*a* concentration measurement [J]. *Ecology and Environment*, 2008, **17**(2): 524—527 [冯菁, 李艳波, 朱擎. 浮游植物叶绿素 *a* 测定方法比较. 生态科学, 2008, **17**(2): 524—527]
- [13] Chen Y W, Gao X Y. Comparison of determination of extraction of phytoplankton chlorophyll-*a* [J]. *Lake Sciences*, 2000, **12**(2): 185—188 [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. 湖泊科学, 2000, **12**(2): 185—188]
- [14] Chen Y W, Chen K N, Hu Y H. Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-*a* concentration analysis using hot-ethanol extraction method [J]. *Lake Sciences*, 2006, **18**(5): 550—552 [陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 *a* 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨. 湖泊科学, 2006, **18**(5): 550—552]
- [15] Yi K C, Yue P X, Wang J X, *et al.* Study on ultrasonic wave dynamic countercurrent extraction equipment and extraction experiment [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2007, **38**(12): 109—112, 128 [易克传, 岳鹏翔, 王继先, 等. 超声波强化逆流提取机及提取试验. 农业机械学报, 2007, **38**(12): 109—112, 128]
- [16] Gao Z P, Yue T L, Yuan Y H, *et al.* Technology optimization on extracting pomegranate seed oil using organic solvent assisted by ultrasound [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2008, **39**(5): 77—80 [高振鹏, 岳田利, 袁亚宏, 等. 超声波强化有机溶剂提取石榴籽油的工艺优化. 农业机械学报, 2008, **39**(5): 77—80]
- [17] Wang J, Wang J. The method for the determination of chlo-

- rophyll and phaeopigments in phytoplankton [J]. *Wuhan Botanical Research*, 1984, **2**(2): 321—328 [王建, 王骥. 浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法. 武汉植物学研究, 1984, **2**(2): 321—328]
- [18] Lorenzen C J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: Spectrophotometric equations [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1967, **12**: 343—346
- [19] Ding Y, Pu Y P, Yin L H, *et al.* Parameters optimization of ultrasound algae removal technology and bloom removal study in Taihu Lake [J]. *Journal of Southeast University*, 2009, **39**(2): 354—358 [丁暘, 浦跃朴, 尹立红, 等. 超声除藻的参数优化及其在太湖除藻中的应用. 东南大学学报, 2009, **39**(2): 354—358]
- [20] Qian K M, Chen Y W, Song X L. Long-term development of phytoplankton dominant species related to eutrophication in Lake Taihu [J]. *Ecological Science*, 2008, **27**(2): 65—70 [钱奎梅, 陈宇炜, 宋晓兰. 太湖浮游植物优势种长期演化与富营养化进程的关系. 生态科学, 2008, **27**(2): 65—70]
- [21] Song X L, Liu Z W, Pan H K, *et al.* Phytoplankton community structure in Meiliang Bay and Lake Wuli of Lake Taihu [J]. *Lake Sciences*, 2007, **19**(6): 643—651 [宋晓兰, 刘正文, 潘宏凯, 等. 太湖梅梁湾与五里湖浮游植物群落的比较. 湖泊科学, 2007, **19**(6): 643—651]
- [22] Zhou J, Zeng C, Wang L L, *et al.* Study on characteristic of algae growth in Tai lake based on nonlinear dynamic analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 931—936 [周婕, 曾诚, 王玲玲, 等. 太湖蓝藻生长特征的非线性动力学分析. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 931—936]