

# 光学学报

## 基于叶绿素荧光动力学的压载水活体藻细胞数表征参数选择研究

华卉<sup>1,2,3</sup>, 殷高方<sup>1,3\*</sup>, 赵南京<sup>1,3\*\*</sup>, 甘婷婷<sup>1,3</sup>, 陈敏<sup>1,2,3</sup>,  
王璐<sup>1,2,3</sup>, 齐培龙<sup>1,2,3</sup>, 王翔<sup>1,2,3</sup>, 张小玲<sup>4</sup>, 方丽<sup>1,3</sup>,  
杨瑞芳<sup>1,3</sup>, 董鸣<sup>1,2,3</sup>, 陈志浩<sup>1,2,3</sup>, 贾仁庆<sup>1,2,3</sup>, 丁志超<sup>1,2,3</sup>, 刘建国<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所, 中国科学院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

<sup>2</sup>中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

<sup>3</sup>安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

<sup>4</sup>安徽大学物质科学与信息技术研究院 安徽 合肥 230601

**摘要** 叶绿素荧光动力学过程与藻类光合作用过程密切相关, 叶绿素荧光动力学法是探测活体藻类细胞的天然工具。与常用的压载水荧光素染色-显微镜检活体藻细胞计数相比, 叶绿素荧光动力学法具有测量快速、灵敏度高、无需前处理等特点。海洋船舶压载水中存在大量死亡藻细胞和有色溶解有机物(CDOM), 荧光背景复杂, 因此, 获得不受荧光背景影响且能够准确表征活体藻细胞数的光合荧光参数, 是叶绿素荧光动力学法直接测量压载水活体藻细胞数的关键。本文以死细胞和 CDOM 溶液模拟压载水的复杂荧光背景, 以二氯苯基二甲脲(DCMU)胁迫条件模拟实际应用, 研究了不同荧光背景下  $F_m$ 、 $F_0$ 、[RCII] 和  $F_v$  等多个光合荧光参数与活体藻细胞数之间的关系。结果表明:  $F_m$ 、 $F_0$ 、[RCII] 对活体藻细胞数的表征都不同程度地受死细胞数和 CDOM 浓度的影响, 仅有  $F_v$  不受荧光背景的影响, 相对标准偏差小于 5%; 在不同稀释液稀释活体藻细胞溶液实验中,  $F_v$  与活体藻细胞数均具有良好的线性相关性, 相关系数  $R^2$  可达 0.98 以上; 在 DCMU 胁迫作用下, 有且仅有  $F_v$  与活体藻细胞数呈良好的正相关性, 相关系数为 0.986。本研究结果证明了光合荧光参数  $F_v$  不受荧光背景干扰, 是表征压载水中活体藻细胞数的最佳光合荧光参数。

**关键词** 生物光学; 压载水; 活体藻细胞数; 光合荧光参数;  $F_v$ ; 叶绿素荧光动力学

中图分类号 X832

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202141.0617001

## Study on Selecting Characterization Parameters of Viable Algae Cells Number in Ballast Water Based on Chlorophyll Fluorescence Kinetics

Hua Hui<sup>1,2,3</sup>, Yin Gaofang<sup>1,3\*</sup>, Zhao Nanjing<sup>1,3\*\*</sup>, Gan Tingting<sup>1,3</sup>, Chen Min<sup>1,2,3</sup>,  
Wang Lu<sup>1,2,3</sup>, Qi Peilong<sup>1,2,3</sup>, Wang Xiang<sup>1,2,3</sup>, Zhang Xiaoling<sup>4</sup>, Fang Li<sup>1,3</sup>,  
Yang Ruifang<sup>1,3</sup>, Dong Ming<sup>1,2,3</sup>, Chen Zhihao<sup>1,2,3</sup>, Jia Renqing<sup>1,2,3</sup>,  
Ding Zhichao<sup>1,2,3</sup>, Liu Jianguo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

<sup>2</sup>University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

收稿日期: 2020-09-02; 修回日期: 2020-11-03; 录用日期: 2020-11-11

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1400600)、国家自然科学基金(61875207, 61805254)、安徽省杰出青年科学基金(1908085J23)、安徽省科技重大专项(202003a07020007)

\* E-mail: gfyin@aiofm.ac.cn; \*\* E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn

<sup>3</sup> Anhui Provincial Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Hefei, Anhui 230031, China;

<sup>4</sup> Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China

**Abstract** Chlorophyll fluorescence kinetics is closely related to the algae photosynthesis and is a natural tool to detect viable algae cells. Compared with the common method of combining fluorescein staining in ballast water with the microscopic examination of viable algae cells number, chlorophyll fluorescence kinetics has the characteristics of rapid measurement, high sensitivity, and no need for pretreatment. However, there are a large number of dead algae cells and colored dissolved organic matter (CDOM) in marine ballast water, and the fluorescence background is complex. Therefore, obtaining the photosynthetic fluorescence parameters that are not affected by the fluorescence background and can accurately characterize the viable algae cells number is the key to directly measuring the viable algae cells number in ballast water through chlorophyll fluorescence kinetics. In this paper, with the dead cells and CDOM solution simulating the complex fluorescence background of ballast water and the 3-(3c, 4-(dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (DCMU) stress condition simulating the practical application, the relationship of various photosynthetic fluorescence parameters such as  $F_m$ ,  $F_0$ , [RCII], and  $F_v$  with the viable algae cells number was investigated at different fluorescence backgrounds. The results show that  $F_m$ ,  $F_0$ , and [RCII] are all affected by the dead cells number and the CDOM concentration to varying degrees, and only  $F_v$  is not affected by the fluorescence background, with a relative standard deviation being less than 5%. In an experiment of diluting the solution of viable algae cells with different diluents,  $F_v$  and the viable cells number have a good linear correlation, with the correlation coefficient  $R^2$  above 0.98. Under the stress of DCMU, only  $F_v$  displays an excellent positive correlation with the viable algae cells number, and the correlation coefficient is 0.986. These results demonstrate that  $F_v$  is not disturbed by the fluorescence background and is the best photosynthetic fluorescence parameter to characterize the number of viable algae cells in ballast water.

**Key words** biotechnology; ballast water; viable algae cells number; photosynthetic fluorescence parameters;  $F_v$ ; chlorophyll fluorescence kinetics

**OCIS codes** 170.1420; 170.2520; 120.1880; 260.2510

## 1 引 言

船舶压载水是有害水生生物和病原体等外来物种传播最主要的介质之一<sup>[1]</sup>。为减少压载水排放造成的外来物种入侵,国际海事组织(IMO)于2004年制定了《国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约》,该公约中的D-2准则<sup>[2]</sup>规定小于 $50\ \mu\text{m}$ 且大于 $10\ \mu\text{m}$ 的存活水生生物的准许排放浓度为小于 $10\ \text{mL}^{-1}$ ,而在这个细胞尺寸范围内的优势物种为浮游藻类<sup>[3]</sup>。目前,国内压载水活体藻细胞数检测的主要方法为显微镜观察法,但该方法需要对压载水进行采样,再对样品进行复杂的前处理才可进行后续实验室镜检分析,耗时耗力,且会造成船舶延误等,因此急需一种对压载水中活体藻细胞数进行原位快速在线分析的有效方法。

叶绿素a是藻细胞的重要色素之一,大量的研究<sup>[4-5]</sup>证明叶绿素a的浓度与生物量具有正相关关系。早期常用萃取出的叶绿素a的浓度来表征藻类生物量,但这种检测方法繁琐且存在较大误差。而后,荧光光谱法的问世使得无需提取叶绿素a便可直接快速地测量其浓度从而估算出生物量。但是,叶绿素a分子在死亡细胞内保持完整的时间长达两周<sup>[6-7]</sup>,所以利用叶绿素a分析法监测压载水中活体

藻细胞数会受环境中荧光背景的严重影响,使得监测结果往往比实际值偏高,且监测结果不稳定<sup>[8]</sup>。叶绿素荧光动力学方法<sup>[5]</sup>是近些年发展起来的新方法,该方法就是将藻液暗适应数分钟后进行饱和脉冲光诱导,在此过程中,叶绿素荧光强度先快速上升而后缓慢下降。而这一过程与藻类活体细胞的光合作用密切相关,因此,利用荧光动力学曲线可以快速无损地获取初始荧光强度 $F_0$ 、最大荧光强度 $F_m$ 、可变荧光强度 $F_v$ 、光化学产量 $F_v/F_m$ 等多种光合荧光参数<sup>[9]</sup>。First等<sup>[5]</sup>率先利用基于荧光动力学曲线得到的光合荧光参数 $F_0$ 来表征叶绿素a的浓度,用 $F_v/F_m$ 来表征生物活性,从而实现了压载水中活体藻细胞数的监测。该方法可以快速估计样品中叶绿素a的浓度以及生物体的整体生理状态,因此Stehouwer等<sup>[10]</sup>和国际海事组织(IMO)<sup>[11]</sup>建议将可变荧光测定法作为评估压载水的工具。但由于不同藻种之间的 $F_v/F_m$ 存在很大差异<sup>[12]</sup>,而且水中营养物质匮乏会引起 $F_v/F_m$ 值的波动<sup>[13]</sup>,因此该方法选用的光合荧光参数 $F_v/F_m$ 不一定适用于表征压载水中活体藻细胞数。而且,压载水的成分复杂,含有有色可溶性有机物(CDOM),游离态叶绿素以及叶绿素未分解的死细胞等会产生干扰活体藻细胞测量的背景荧光干扰物质,

这些干扰物质是否会影响到,以及如何影响光合荧光参数表征压载水中活体藻细胞数的,还尚待研究。

本文以杜氏盐藻为研究对象,通过设置不同浓度的死细胞来模拟压载水中高浓度死细胞荧光环境,并通过设置不同浓度的 CDOM 溶液来模拟压载水中的其他背景荧光环境,从而观察光合荧光参数  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  和 [RCII] 是否受复杂背景荧光的影响。此外,本文还在二氯苯基二甲脲 (DCMU) 胁迫条件下,验证了光合荧光参数  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  和 [RCII] 对活体藻细胞数表征的有效性。观察不同实验条件下样品中各光合荧光参数的变化规律,筛选可有效表征压载水中活体藻细胞数的光合荧光参数,可为发展压载水活体藻细胞数叶绿素荧光动力学在线监测技术提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 藻种的选择与培养

本实验所用藻种均为购于上海光语生物科技有

限公司的杜氏盐藻 (GY-H13 *Dunaliella salina*), 用 F/2 培养基进行接种。杜氏盐藻为海洋绿藻,在合适的培养条件下长势良好,适合实验室培养与研究。细胞尺寸为  $12 \sim 13 \mu\text{m}$ , 满足国际海事组织 D-2 排放准则中监测的浮游藻类的尺寸。将接种后的藻液置于 MQD-S3R 型恒温摇床培养箱中进行扩大培养,藻样的培养条件如下:光源为白色冷荧光灯管,设置温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 转速为  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 光照强度为  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光暗时间比为 12 h:12 h。保证藻液培养 3 d, 以达到高活性状态<sup>[14]</sup>。实验前,将藻液暗适应 10 min。

### 2.2 光合荧光参数的获取

通过 Fast Repetition Rate fluorometer (FRRf) 测得不同实验条件下光强为 0 时的  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  和功能吸收截面  $\sigma_{\text{PSII}}$ , 然后利用公式  $[\text{RCII}] \propto F_0 / \sigma_{\text{PSII}}$ <sup>[15]</sup> 计算得到 [RCII]。光合荧光参数如表 1 所示。

表 1 FRRf 测得的光合荧光参数

Table 1 Photosynthetic fluorescence parameters acquired by FRRf

Parameter	Measurement or derivation	Physiological significance
$F_m$	At the asymptote of a single turnover (ST) pulse	Maximum yields of chlorophyll a fluorescence measured after dark adaptation
$F_0$	Extrapolation to $t=0$ from a single turnover (ST) pulse	Minimum yields of chlorophyll a fluorescence measured after dark adaptation
$F_v$	$F_m - F_0$	Variable fluorescence
$\sigma_{\text{PSII}}$	Fluorescence kinetic curve (the rate of the fluorescence rise is proportional to the functional absorption cross section of PSII ( $\sigma_{\text{PSII}}$ ))	Functional absorption cross section for PSII
[RCII]	$F_0 / \sigma_{\text{PSII}}$	Effective photosynthetic reaction center concentration

### 2.3 活体藻细胞数的测量

荧光素二乙酸酯 (FDA) 和 5-氯甲基荧光素二乙酸酯 (CMFDA) 都是膜渗透性染料,本身无荧光,但它们一旦进入到活体细胞内,非特异性酯酶就会裂解染色剂的分子,从而产生不可渗透的荧光产物,在蓝光激发下可观察到绿色荧光。由于 FDA 和 CMFDA 具有相似的发射光谱,因此可以同时使用以增强活体细胞所发出的绿色荧光的稳定性<sup>[16]</sup>。

配制 FDA 储存液:取 0.1 g FDA 粉末溶于 5 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中,配制成浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA 准备液;取 20  $\mu\text{L}$  FDA 准备液,将其溶于 980  $\mu\text{L}$  DMSO 中,配制成浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA 储存液<sup>[17]</sup>。

配制 CMFDA 储存液:取 50  $\mu\text{g}$  CMFDA 溶于 430  $\mu\text{L}$  DMSO 中,配制成浓度为  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

的 CMFDA 储存液<sup>[17]</sup>。

取 1 mL 杜氏盐藻样品,向其中加入 5  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA 和 10  $\mu\text{L}$  浓度为  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 CMFDA,混合均匀,最终工作浓度分别为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[16]</sup>,避光染色 10 min。使用 0.1 mL 浮游生物计数框、正置荧光显微镜 (Nikon Ni-U) 进行计数。

### 2.4 CDOM 溶液的获取

CDOM 溶液来自实验室培养 2 个月以上的藻类混合液的过滤液。使用 0.2  $\mu\text{m}$  混合纤维脂膜进行过滤,过滤两次,以确保所有藻细胞均被滤除。

## 3 结果与讨论

### 3.1 死细胞荧光干扰下光合荧光参数测量结果分析

为了研究压载水舱中含有的大量死亡藻类细胞

是否会对光合荧光参数定量活体藻细胞数有影响, 本文通过配制不同浓度的死细胞液来模拟压载水舱环境。将藻液于 50 °C 水浴加热 30 min, 得到死细胞液。用海水将死细胞液稀释成 5 个浓度梯度(2、4、8、16、32 倍稀释)且体积相同的死细胞样品, 然后将死细胞样品分别加入到活体藻细胞数相同的 5 个杜氏盐藻样品中, 另设置一个加入相同体积海水的对照样, 观察  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  及 [RCII] 数值的变化。结果如图 1 所示,  $F_m$ 、 $F_0$  以及 [RCII] 都随着死细胞数的增多而呈上升趋势, 有且仅有  $F_v$  不受死细胞的干扰, 稳定在 2.25~2.75 之间。  $F_m$ 、 $F_0$ 、[RCII] 数值的相对标准偏差分别为 135.58%、47.89% 和 48.07%, 而  $F_v$  的相对标准偏差为 4.83%, 说明  $F_v$  的数值基本不随死细胞数的变化而变化, 而  $F_m$ 、 $F_0$ 、[RCII] 数值波动较大。

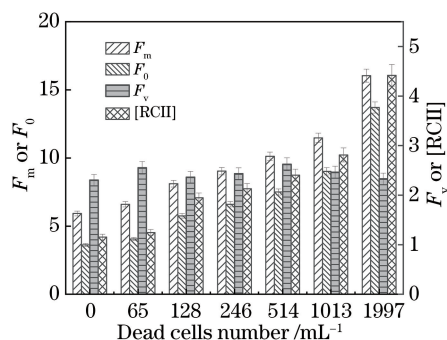


图 1 光合荧光参数随死细胞数增加的变化趋势图  
Fig. 1 Change trend of photosynthetic fluorescence parameters with the increase of dead cells number

### 3.2 CDOM 荧光干扰下光合荧光参数测量结果分析

压载水中 CDOM 等荧光物质的含量极高<sup>[18]</sup>, 本文通过控制藻滤液的浓度来模拟压载水中 CDOM 浓度的变化, 通过观察光合荧光参数的变化来判断光合荧光参数是否受 CDOM 浓度的影响。柳先平等<sup>[19]</sup>发现当 CDOM 的质量浓度低于  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 可以用水溶液的荧光峰强度 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/410 \text{ nm}$ ) 表示 CDOM 浓度。据此, 本文采用 F-7000 荧光分光光度计测定藻滤液的荧光强度, 进而计算得到藻滤液的 CDOM 浓度。将用海水稀释的 5 个浓度梯度且体积相同的 CDOM 溶液样品加入到活体藻细胞数相同的 5 个杜氏盐藻样品中, 同样设置一个对照样并加入体积相同的海水。结果如图 2 所示,  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 都随着 CDOM 浓度的升高而呈上升趋势, 有且仅有  $F_v$  不受 CDOM 浓度升高的影响, 保持在 1.6 附近。  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 的相对标准偏差分别为 26.01%、37.86%

和 37.06%, 而  $F_v$  的相对标准偏差为 1.84%, 这说明  $F_v$  的波动范围最小, 不受 CDOM 浓度的影响, 而  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 的波动幅度较大, 受 CDOM 浓度的影响比较显著。

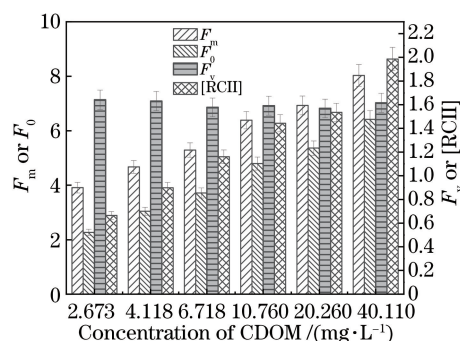


图 2 光合荧光参数随 CDOM 浓度上升的变化趋势图  
Fig. 2 Change trend of photosynthetic fluorescence parameters with the increase of CDOM concentration

### 3.3 不同稀释液下光合荧光参数对活体藻细胞数的定量结果分析

为了探究在压载水舱的复杂荧光环境下, 光合荧光参数能否准确定量活体藻细胞数, 本文用随机浓度的死细胞液、CDOM 溶液以及二者的随机混合液来稀释活体藻细胞原液, 观察活体藻细胞数呈梯度减小的情况下, 哪个光合荧光参数能够精准定量活体藻细胞数。

分别以死细胞液、CDOM 溶液以及二者随机混合液为稀释液将杜氏盐藻活细胞原液按比例进行稀释, 稀释倍数分别为 0、2、4、8、16, 同样设置一组以海水为稀释液的对照组。结果表明: 在背景干扰为零的情况下,  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  和 [RCII] 都随活体藻细胞数的减少而下降, 如图 3(a)、(b)、(d) 所示; 与用海水稀释的杜氏盐藻样品的  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 数值相比, 用死细胞液和 CDOM 溶液稀释的杜氏盐藻样品的  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 数值都显著上升, 且  $F_m$  和  $F_0$  随着活体藻细胞数减少而呈现上升趋势。如图 3(c) 所示, 无论用何种溶液稀释,  $F_v$  不受死细胞和 CDOM 等荧光物质的影响, 始终保持着随活体藻细胞数梯度减小而下降的趋势。

由图 4 所示的  $T$  检验结果可以看出: 无论用何种溶液稀释得到的  $F_v$  值与用海水稀释得到的  $F_v$  的值之间不存在显著性差异,  $P$  值均大于 0.05; 而采用含有背景荧光的稀释液稀释的样品的  $F_m$ 、 $F_0$ 、[RCII] 与采用海水稀释得到的相应值之间存在显著性差异,  $P$  值均小于 0.05。

由表 2 所示的相关性分析可知: 当用海水稀释

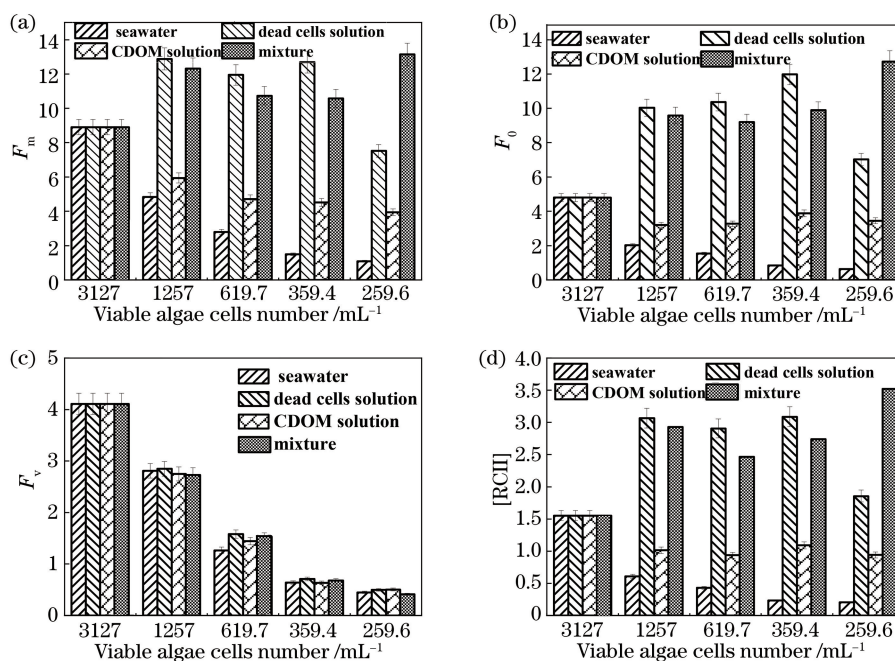
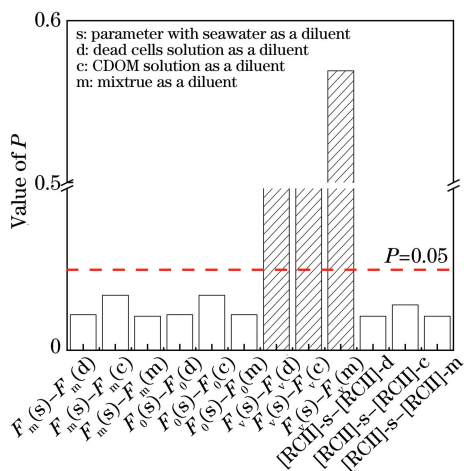


图 3 不同稀释液稀释下光合荧光参数随活体藻细胞数的变化图。(a)  $F_m$ ; (b)  $F_0$ ; (c)  $F_v$ ; (d) [RCII]

Fig. 3 Changes of photosynthetic fluorescence parameters with viable algae cells number in different diluents.

(a)  $F_m$ ; (b)  $F_0$ ; (c)  $F_v$ ; (d) [RCII]



Photosynthetic fluorescence parameter

图 4 海水稀释样品与荧光背景干扰液稀释样品同一光合荧光参数之间的 T 检验结果

Fig. 4 T-test results between the same type photosynthetic fluorescence parameters with seawater as a diluent and those with other fluorescence interference solution as a diluent

时,所有光合荧光参数都与活体藻细胞数有着良好的相关性,能够定量活体藻细胞数,甚至,  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 对活体藻细胞数的定量更优于  $F_v$  对活体藻细胞数的定量;但当样品中存在大量死细胞和 CDOM 时,只有  $F_v$  和活体藻细胞数呈现出良好的正相关,能够定量活体藻细胞数。定量结果如图 5 所示,除去箭头指向的点以外,  $F_v$  与活体藻细胞数

之间的线性关系稳定,线性关系式为  $y = 0.002x - 0.102 (R^2 = 0.983)$ ,而  $F_m$ 、 $F_0$  以及 [RCII] 均因受死细胞和 CDOM 的影响而与活体藻细胞数无明显的线性关系。不同稀释液对线性关系式的影响不大,  $F_v$  能够精准定量活体藻细胞数。考虑到箭头指向点后,  $F_v$  与活体藻细胞数之间的线性关系不稳定,这是包装效应导致的<sup>[20]</sup>。包装效应会增加 PSII 荧光产生的光子在离开细胞之前的吸收,从而使得光合荧光参数的测量值相应降低。

表 2 海水稀释样品与混合液稀释样品的光合荧光参数与活体藻细胞数的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between the photosynthetic fluorescence parameters and viable algae cells number in diluted seawater and mixture

Fluorescence parameter	Correlation coefficient (diluted seawater)	Correlation coefficient (mixture)
$F_m$	0.989**	-0.692
$F_0$	0.995**	-0.914**
$F_v$	0.955*	0.955**
[RCII]	0.997*	-0.845

Note: \*\* represents  $p < 0.01$ , \* represents  $p < 0.05$ .

### 3.4 在 DCMU 胁迫作用下光合荧光参数随活体藻细胞数的变化规律

为了进一步验证光合荧光参数对活体藻细胞数

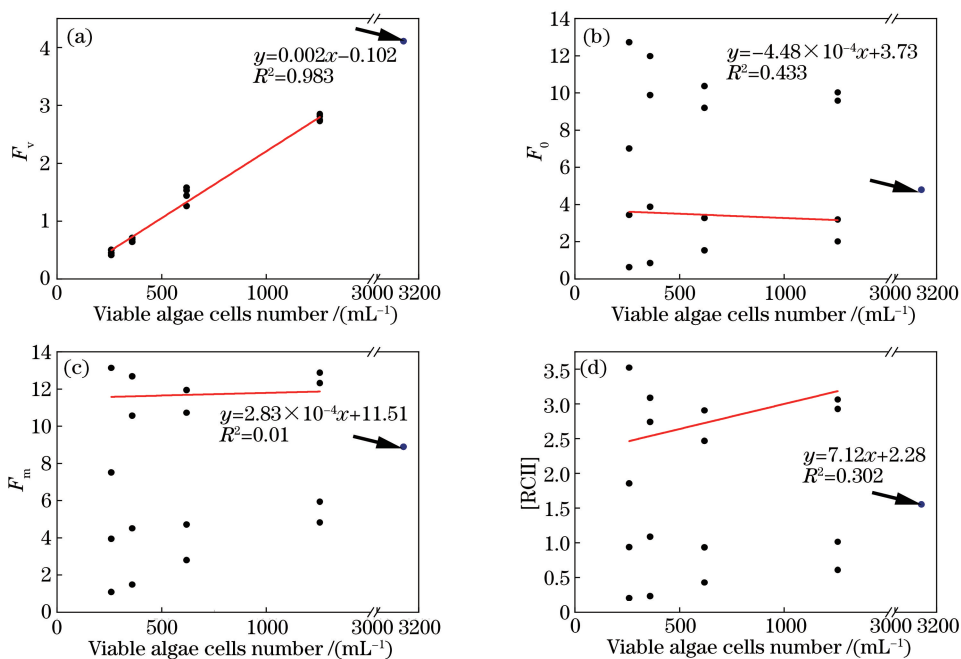


图 5 光合荧光参数对活体藻细胞数的定量关系图。(a)  $F_v$ ; (b)  $F_0$ ; (c)  $F_m$ ; (d) [RCII]

Fig. 5 Quantitative relationship of photosynthetic fluorescence parameters to viable algae cells number.

(a)  $F_v$ ; (b)  $F_0$ ; (c)  $F_m$ ; (d) [RCII]

的表征,在 6 个 25 mL 杜氏盐藻原液样品中分别加入 1 mL 质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 50  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DCMU 样品,并配制对照样(加入 1 mL 海水),静置 10 min 后测量其光合荧光参数。由图 6 可以

看出,随着 DCMU 浓度增大,活体藻细胞数减少,  $F_v$  随着活体藻细胞数的减少而降低,而其他参数则随着活体藻细胞数的减少而增大,有且仅有  $F_v$  与活体藻细胞数呈现出相同的变化趋势。

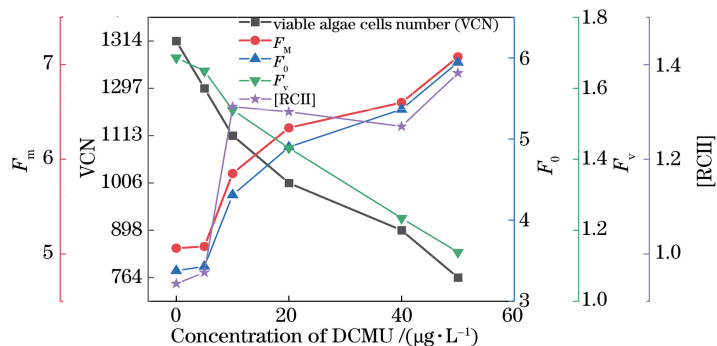


图 6 DCMU 胁迫状态下光合荧光参数和活体藻细胞数的变化趋势图

Fig. 6 Trend diagram of photosynthetic fluorescence parameters and viable algae cells number under DCMU stress

如表 3 所示,  $F_v$  与活体藻细胞数有很强的正相关性,而其他参数则与活体藻细胞数呈现出负相关性。  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 出现反常(随着活体藻细胞数的减少而增大)的原因是当 PSII 抑制剂(DCMU)不可逆地阻断一小部分反应中心时,随着荧光强度的增加,能量被重定向到另一个反应中心,并且能量直接重发射的概率增加,导致  $F_m$  和  $F_0$  增大<sup>[21]</sup>。同时,DCMU 阻断了一小部分反应中心导致  $\sigma_{\text{PSII}}$  下降,而  $F_0$  上升,所以 [RCII] 也随着荧光强度的增加而增大。

表 3 在 DCMU 胁迫作用下光合荧光参数与活体藻细胞数的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between photosynthetic fluorescence parameters and viable algae cells number under the stress of DCMU

Parameter	Correlation coefficient
$F_m$	-0.997**
$F_0$	-0.999**
$F_v$	0.986**
[RCII]	-0.888*

Note: \*\* represents  $p < 0.01$ , \* represents  $p < 0.05$ .

## 4 结 论

压载水中的活体浮游藻类未达标排放会增加外来物种入侵的风险,危害海洋生态。为了不影响船舶的正常航行,亟需一种压载水中活体藻细胞数快速检测的方法。传统的显微镜检法需要复杂的前处理,耗时耗力且不能原位测量。与传统的荧光染色-显微镜检活体藻细胞数计数方法相比,叶绿素荧光动力学方法具有测量快速、灵敏度高、无需样品前处理以及能够实现现场快速测量等特点。但叶绿素荧光动力学方法测得的光合荧光参数众多,光合荧光参数  $F_m$ 、 $F_0$ 、 $F_v$  和 [RCII] 在压载水的复杂荧光背景下能否不受影响而精准地定量活体藻细胞数为本文讨论的内容。本文的研究结果表明,在活体藻细胞数不变且死细胞数和 CDOM 浓度呈梯度变化的情况下,  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 均随死细胞数和 CDOM 浓度的增加而增大,而  $F_v$  则保持稳定,基本不受死细胞数与 CDOM 浓度变化的影响。而且,在死细胞荧光和 CDOM 荧光的干扰下,  $F_v$  的相对标准偏差仅分别为 4.83% 和 1.84%,  $F_m$ 、 $F_0$  和 [RCII] 的相对标准偏差均是  $F_v$  的数十倍。对于同一批培养的单一藻种来说,无论背景荧光环境如何变化,  $F_v$  与活体藻细胞数的线性关系式都保持稳定 ( $y = 0.002x - 0.102, R^2 = 0.983$ )。

上述结果说明  $F_v$  是表征压载水中活体藻细胞数的最佳光合荧光参数。本文在 DCMU 胁迫条件下对上述结果进行了验证,结果表明,有且仅有  $F_v$  随活体藻细胞数的减少而下降,且二者间的相关系数为 0.986。本研究为叶绿素荧光动力学应用在压载水活体藻细胞数监测方面提供了重要参考,而藻种、藻的尺寸等是否会影响以及如何影响  $F_v$  对活体藻细胞数定量的,并且  $F_v$  对活体藻细胞数的定量分析是否能满足 D-2 准则的检测下限,都将是后续研究的重点。

## 参 考 文 献

- [1] Drake L A. Review of "Global maritime transport and ballast water management" by M. David and S. Gollasch, eds. [J]. *Biological Invasions*, 2015, 17 (10): 3063-3065.
- [2] International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments [EB/OL]. [2020-09-02]. [http://www.imo.org/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Control-and-](http://www.imo.org/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Control-and-Management-of-Ships'-Ballast-Water-and-Sediments-(BWM).aspx)
- [3] de Castro M C T, Veldhuis M J W. Temporal changes in phytoplankton biomass and cellular properties; implications for the IMO ballast water convention[J]. *Environmental Technology*, 2019, 40 (11): 1455-1466.
- [4] Du S L, Huang S L, Zang C J, et al. Correlation research between the indicators of phytoplankton standing stock I: chlorophyll a and biomass [J]. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2011, 22(1): 40-44.  
杜胜蓝, 黄岁樑, 臧常娟, 等. 浮游植物现存量表征指标间相关性研究 I: 叶绿素 a 与生物量[J]. *水资源与水工程学报*, 2011, 22(1): 40-44.
- [5] First M R, Robbins-Wamsley S H, Riley S C, et al. Assessment of variable fluorescence fluorometry as an approach for rapidly detecting living photoautotrophs in ballast water[J]. *Journal of Sea Research*, 2018, 133: 53-59.
- [6] Garvey M, Moriceau B, Passow U. Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 352: 17-26.
- [7] Mayzaud P, Razouls S. Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod: importance of feeding history and digestive acclimation [J]. *Limnology and Oceanography*, 1992, 37 (2): 393-404.
- [8] de Castro M C T, Veldhuis M J W, Fileman T W, et al. Different approaches and limitations for testing phytoplankton viability in natural assemblies and treated ballast water [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 137: 172-179.
- [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 [J]. *海洋科学*, 2007, 31(1): 71-76.
- [10] Stehouwer P P, Fuhr F, Veldhuis M. A novel approach to determine ballast water vitality and viability after treatment [EB/OL]. [2020-09-02]. [https://www.researchgate.net/publication/274590914\\_A\\_novel\\_approach\\_to\\_determine\\_ballast\\_water\\_vitality\\_and\\_viability\\_after\\_treatment](https://www.researchgate.net/publication/274590914_A_novel_approach_to_determine_ballast_water_vitality_and_viability_after_treatment).
- [11] International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments. [2020-09-02]. <http://globallast.imo.org/wp->

- content/uploads/2015/01/BWM. 2-Circ. 42. pdfAccessed 13 Aug 2015.
- [12] Kruskopf M, Flynn K J. Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate [J]. *The New Phytologist*, 2006, 169 (3): 525-536.
- [13] Kolber Z, Zehr J, Falkowski P. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II [J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(3): 923-929.
- [14] Dao L H T, Beardall J. Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity [J]. *Algal Research*, 2016, 16: 150-159.
- [15] Chen S, Yin G F, Zhao N J, et al. Analysis of phytoplankton concentration of functional reaction centers based on fluorescence dynamics parameters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(6): 0630004.  
陈双, 殷高方, 赵南京, 等. 基于荧光动力学参数的浮游植物有效光合反应中心浓度分析 [J]. *光学学报*, 2018, 38(6): 0630004.
- [16] Steinberg M K, Lemieux E J, Drake L A. Determining the viability of marine protists using a combination of vital, fluorescent stains [J]. *Marine Biology*, 2011, 158(6): 1431-1437.
- [17] Wang S, Zhang B, Zhao X L, et al. Evaluation of staining methods suitable for detection of viability of marine microalgae [J]. *Advances in Marine Science*, 2018, 36(2): 321-330.  
王帅, 张波, 赵昔龙, 等. 适合海洋微藻活体染色的方法评价 [J]. *海洋科学进展*, 2018, 36(2): 321-330.
- [18] Coble P, Hu C M, Gould R, et al. Colored dissolved organic matter in the coastal ocean: an optical tool for coastal zone environmental assessment and management [J]. *Oceanography*, 2004, 17(2): 50-59.
- [19] Liu X P, Li L, Dai J F, et al. Determination of chromophoric dissolved organic matter in water from different sources [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(10): 2083-2087.  
柳先平, 李磊, 戴金凤, 等. 不同水体中有色可溶性有机物质荧光光谱定量分析研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(10): 2083-2087.
- [20] Berner T, Dubinsky Z, Wyman K, et al. Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella Tertiolecta* (chlorophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1989, 25(1): 70-78.
- [21] Beaulieu M, Cabana H, Huot Y. Adverse effects of atrazine, DCMU and metolachlor on phytoplankton cultures and communities at environmentally relevant concentrations using Fast Repetition Rate Fluorescence [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 712: 136239.