

基于可变荧光统计分析法的混合藻类活体细胞数定量实验研究

王璐^{1,2,3}, 殷高方^{1,3*}, 赵南京^{1,3**}, 甘婷婷^{1,2,3}, 亓培龙^{1,2,3}, 丁志超^{1,2,3}, 王颀^{1,2,3}, 马明俊^{1,3}, 杨瑞芳^{1,3}, 方丽^{1,3}, 胡丽⁴, 张小玲⁵

¹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;

²中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

⁴合肥师范学院物理与材料工程学院, 安徽 合肥 230061;

⁵安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230601

摘要 以混合藻类为研究对象, 研究组成混合样品藻种的单细胞可变荧光量(SCVF)差异对可变荧光统计分析法准确性的影响。研究表明: 当两种藻种的 SCVF 比值不大于 5.3 时, 该分析方法依旧适用, 测量结果与显微镜检测结果的相对误差绝对值的均值不大于 17%; 当两种藻种的 SCVF 比值大于 8 时, 测量结果与显微镜检测结果存在较大差异, 且高 SCVF 藻细胞占比达到一定比例时, 可变荧光统计分析法的测量结果仅反映了混合样品中高 SCVF 藻细胞数。针对 SCVF 差异大的混合藻类, 将过滤分离方法与可变荧光统计分析法相结合, 利用合适孔径的金属滤网过滤混合样品, 将过滤前后测量的样品活体藻细胞密度之和作为测量结果。实验结果表明, 该方法可将相对误差绝对值均值由 58.4% 降至 5.5%, 有效解决了组成混合样品藻种的 SCVF 差异对细胞数定量的影响, 实现混合藻类活体细胞数的准确定量。

关键词 海洋光学; 压载水; 活体藻细胞数; 可变荧光; 混合藻类

中图分类号 X832

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.2401003

Quantitatively Experimental Study on Number of Viable Cells in Mixed Algae Based on Variable Fluorescence Statistical Analysis

Wang Lu^{1,2,3}, Yin Gaofang^{1,3*}, Zhao Nanjing^{1,3**}, Gan Tingting^{1,2,3}, Qi Peilong^{1,2,3},
Ding Zhichao^{1,2,3}, Wang Xie^{1,2,3}, Ma Mingjun^{1,3}, Yang Ruifang^{1,3}, Fang Li^{1,3}, Hu Li⁴,
Zhang Xiaoling⁵

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

²University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China;

³Key Laboratory of Environmental Optical Monitoring Technology of Anhui Province, Hefei 230031, Anhui, China;

⁴School of Physics and Materials Engineering, Hefei Normal University, Hefei 230061, Anhui, China;

⁵Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract This paper takes mixed algae as the research object to study the influence of single cell variable fluorescence (SCVF) differences of algal species in mixed samples on the accuracy of variable fluorescence statistical analysis. The research results show that when the SCVF ratio of two algae is no more than 5.3, the analysis is still applicable, and the mean absolute value of the relative errors between measurement results and microscopic examination results is no more

收稿日期: 2022-04-27; 修回日期: 2022-05-25; 录用日期: 2022-06-13

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC3200100)、安徽省科技重大专项(202003a07020007, 202203a07020002)、国家自然科学基金(61875207, 61805254, 62005001)、中国科学院环境光学与技术重点实验室开放基金(2005OP173065-2021-08)、光电探测科学与技术安徽高校联合重点实验室(2020GDTC04)、深圳市可持续发展科技专项(KCXFZ20201221173007020)

通信作者: *gfyin@aiofm.ac.cn; **njzhao@aiofm.ac.cn

than 17%. When the SCVF ratio of two algae is higher than 8, the measurement results are quite different from the microscopic examination results. In addition, when high SCVF algal cells account for a large proportion, the measurement results of variable fluorescence statistical analysis only reflect the number of high SCVF algal cells in the mixed samples. As a result, for the mixed algae with large differences in SCVF, the paper combines a filtration separation method with the variable fluorescence statistical analysis method. The mixed samples are filtered by a metal filter screen with suitable pore size, and the density sum of measured viable algal cells before and after filtration is taken as experimental result. The results show that the proposed method can greatly reduce the mean absolute value of the relative error from 58.4% to 5.5%, effectively mitigate the influence of the SCVF difference of algal species in mixed samples on the quantitative analysis of cell number, and accurately quantify viable cells in mixed algae.

Key words oceanic optics; ballast water; number of viable algal cells; variable fluorescence; mixed algae

1 引言

海洋船舶压载水作为转移外来物种的媒介,是导致生物入侵的重要因素之一,破坏了沿海生态环境,造成了经济方面的损失^[1-3]。国际海事组织(IMO)于2004年通过了《国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约》^[4],旨在减少压载水排放带来的危害,公约明确规定船舶排放的每毫升压载水中尺寸为10~50 μm的活生物体数量不能大于10。在自然界中,尺寸为10~50 μm的水生生物往往以浮游藻类为主^[5-6],因此活体藻细胞数是压载水达标排放的重要指标。由于压载水排放标准以活生物体数量作为指标,所以检测方法应在短时间内得到结果,且检测时间过长也会造成商业损失,因此活体藻细胞数检测方法需要满足现场快速检测的要求。

显微镜分析与活体染色剂结合是藻类活体细胞数检测常用的标准方法^[7],但该方法需要复杂的前处理和专业的技术人员,并且设备昂贵。叶绿素荧光法通过光诱导藻类释放的叶绿素荧光动力学信号强度来检测活体藻细胞数,具有非破坏性、实时、快速的优点,适用于压载水中浮游植物生物量的检测^[8-9]。有研究表明,光合荧光参数中可变荧光 F_v 仅由活体藻细胞贡献,不受压载水环境中复杂的背景荧光干扰,可以有效表征藻类活体细胞数^[9-10]。然而,受藻的种类、细胞尺寸以及生长周期的影响,藻细胞单个细胞可变荧光量(SCVF)具有高度变化性^[7,11-12],因此不同藻类转换可变荧光强度为藻类活体细胞数的转换系数存在差异^[12],即使测量得到相同的荧光强度,也会产生不同的计数结果。

先前研究提出了一种基于可变荧光统计学分布的藻类活体细胞密度分析方法(以下简称可变荧光统计法),将统计分布的方法与可变荧光法相结合,通过可变荧光分布参数定量分析藻类活体细胞数^[13]。可变荧光分布参数——中心区间频度 B 与子样本藻类活体细胞数均值 u 的关系^[13]满足

$$B = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{a\sqrt{\pi}}{\sqrt{2}}} \exp(-t^2) dt, \quad (1)$$

式中: t 为积分变量; a 为区间增量系数。可变荧光统计法突破了可变荧光强度定量藻类活体细胞数对定标步骤的依赖,解决了藻类SCVF高度变化对细胞

数定量结果的影响。针对不同种类、尺寸以及生长周期纯种藻类的实验结果表明,该方法的测量结果与显微镜的检测结果相近,可以准确定量纯种藻类活体细胞数。

可变荧光统计法的前提条件是“对均匀样品随机抽样得到的子样本中藻细胞SCVF均值一致”^[13]。先前的研究表明,生长周期不同造成的藻种间的SCVF比值达1.45,因此纯种藻类样品中藻细胞SCVF差异小,必然满足该前提条件;然而,藻类种类和细胞尺寸等因素造成的藻种间SCVF比值达44倍,因此混合藻类样品中藻细胞SCVF差异大,对混合藻类样品随机抽样得到的子样本中藻细胞SCVF均值可能存在差异,不满足可变荧光统计法的前提条件。

本文以混合藻类为研究对象,通过不同藻种混合得到混合藻类样品,研究组成混合样品藻种的SCVF差异对该检测方法确定混合藻类活体细胞数精度的影响;提出将过滤分离与可变荧光统计法相结合的混合藻类活体细胞数准确定量检测方法,并进行实验验证。

2 材料和方法

选择10种藻类进行扩大培养,通过不同藻种的混合得到混合样品,组成混合样品藻种的SCVF差异程度不同。对比混合样品活体藻细胞密度的镜检结果与可变荧光统计法测量结果,通过相对误差以及线性拟合程度评价该方法对混合藻类活体细胞数的定量精度。

2.1 藻种选择和培养

选用杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、栅藻(*Scenedesmus Meyen*)、羊角月牙藻(*Selenastrum bibrainum*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、海洋小球藻(*Chlorella sp.*)、椭圆形多甲藻(*Peridinium umbonatum*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、强壮前沟藻(*Amphidinium carterae Hulburt*)、利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)共10种藻类为实验对象,藻种信息如表1所示。这10种藻类SCVF大小差异大,不同藻种混合得到的混合藻类样品适用于研究组成混合样品藻种的SCVF差异对混合藻类活体细胞数定量精度的影响。所有藻类放置于恒温摇床培养箱

(MQD-S3R, 武汉瑞华仪器设备有限公司) 中进行扩大培养。

表 1 实验使用的藻种信息

Table 1 Information of algal species used in experiment

Phylum	Species	Water area	Culture medium
Chlorophyta	<i>Dunaliella salina</i>	Ocean	F/2
	<i>Scenedesmus Meyen</i>	Freshwater	BG11
	<i>Selenastrum bibrainum</i>	Freshwater	BG11
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Freshwater	BG11
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Freshwater	BG11
	<i>Chlorella sp.</i>	Ocean	F/2
Pyrrophyta	<i>Peridinium umbonatum</i>	Freshwater	119
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Ocean	F/2
	<i>Amphidinium carterae Hulburt</i>	Ocean	F/2
	<i>Prorocentrum lima</i>	Ocean	F/2

2.2 活体藻细胞密度测量

荧光素二乙酸酯(FDA)和5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CMFDA)具有相似的发射光谱,可以将它们组

合起来,对藻细胞进行染色,以区分细胞死活^[14-15]。在 1 mL 藻类样品中加入 5 μL 的浓度为 1 mmol/L 的 FDA 和 10 μL 的浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 CMFDA,避光染色 10 min^[16]。将染色后的藻类样品滴入浮游生物计数框,正置于荧光显微镜(Nikon Ni-U)下进行活体藻细胞计数。

2.3 可变荧光 F_v 数据集获取

通过水体藻类活体细胞可变荧光测量实验装置测量可变荧光 F_v 数据集,如图 1 所示。图 1 中 LD 为激光二极管, PMT 为光电倍增管, MPU 为微处理器, VGA 为增益可调放大器, G2 为增益调整电路。实验装置通过蠕动泵抽取藻类样品进入样品池,样品池的搅拌装置可以保证藻类样品的均匀性。通过步进电机与活塞组合的方式对样品池中的样品进行随机抽样,步进电机通过步进的方式带动样品分次进入测量窗口,活塞每次移动距离大于可变荧光测量窗口宽度,实现待测样品的更新。使用 FRR(Fast Repetition Rate) 荧光测量技术测量当前测量窗口中子样本的可变荧光 F_v , LD 的光强范围在 19000~27000 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间,以荧光饱和参数 E_0 作为参考标准进行自适应优化^[17]。通过多次抽样以及荧光测量,得到子样本 F_v 数据集。

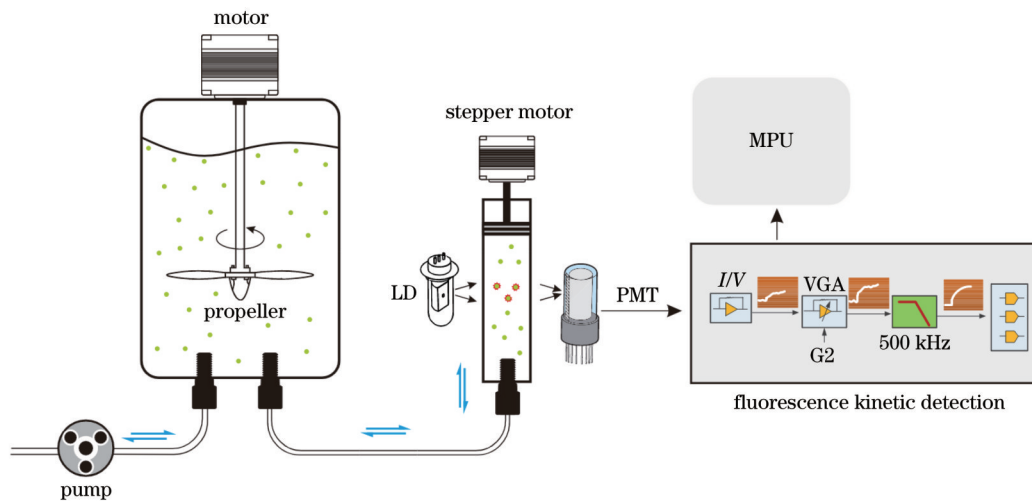


图 1 水体藻类活体细胞可变荧光测量实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental device for variable fluorescence measurement of viable algal cells in water

3 结果与讨论

3.1 混合藻类活体细胞定量精度影响因素分析

将椭圆形多甲藻、杜氏盐藻、赤潮异弯藻、强壮前沟藻、栅藻、利玛原甲藻、羊角月牙藻、海洋小球藻和椭圆小球藻两两混合得到混合藻类样品,进行活体藻细胞定量实验,探究 SCVF 差异对可变荧光统计分析法定量混合藻类活体细胞数精度的影响。通过控制两种藻细胞的混合比例,得到混合比例呈梯度变化的混合样品。用组成混合样品的两种藻类的纯种样品子样本 F_v 均值与其镜检活体藻细胞密度的比值表征两种藻类 SCVF 水平,得到组成混合样品藻种间的 SCVF 比值分别为 1.6、2.1、2.6、5.3、8.4、9.4 和 28.6,如表 2

所示。

将混合样品子样本 F_v 数据集用于可变荧光统计分析法,得到混合样品,测量活体藻细胞密度。混合藻类样品镜检细胞密度与测量细胞密度的关系如图 2 所示,相对误差绝对值的均值如表 2 所示。

如图 2(a)~(d)和表 2 所示,组成混合样品的藻种间的 SCVF 比值不大于 5.3 的 4 组混合样品的细胞密度测量值与镜检细胞密度相近,相对误差绝对值的平均值在 7%~17% 之间。由图 2(e)~(g)和表 2 所示,对于组成混合样品的藻种间的 SCVF 比值大于 8 的 3 组混合样品,测量的细胞密度明显低于镜检细胞密度,相对误差绝对值的平均值均在 47% 以上;并且随着混合样品中高 SCVF 藻细胞数占比的增加,测量的细胞

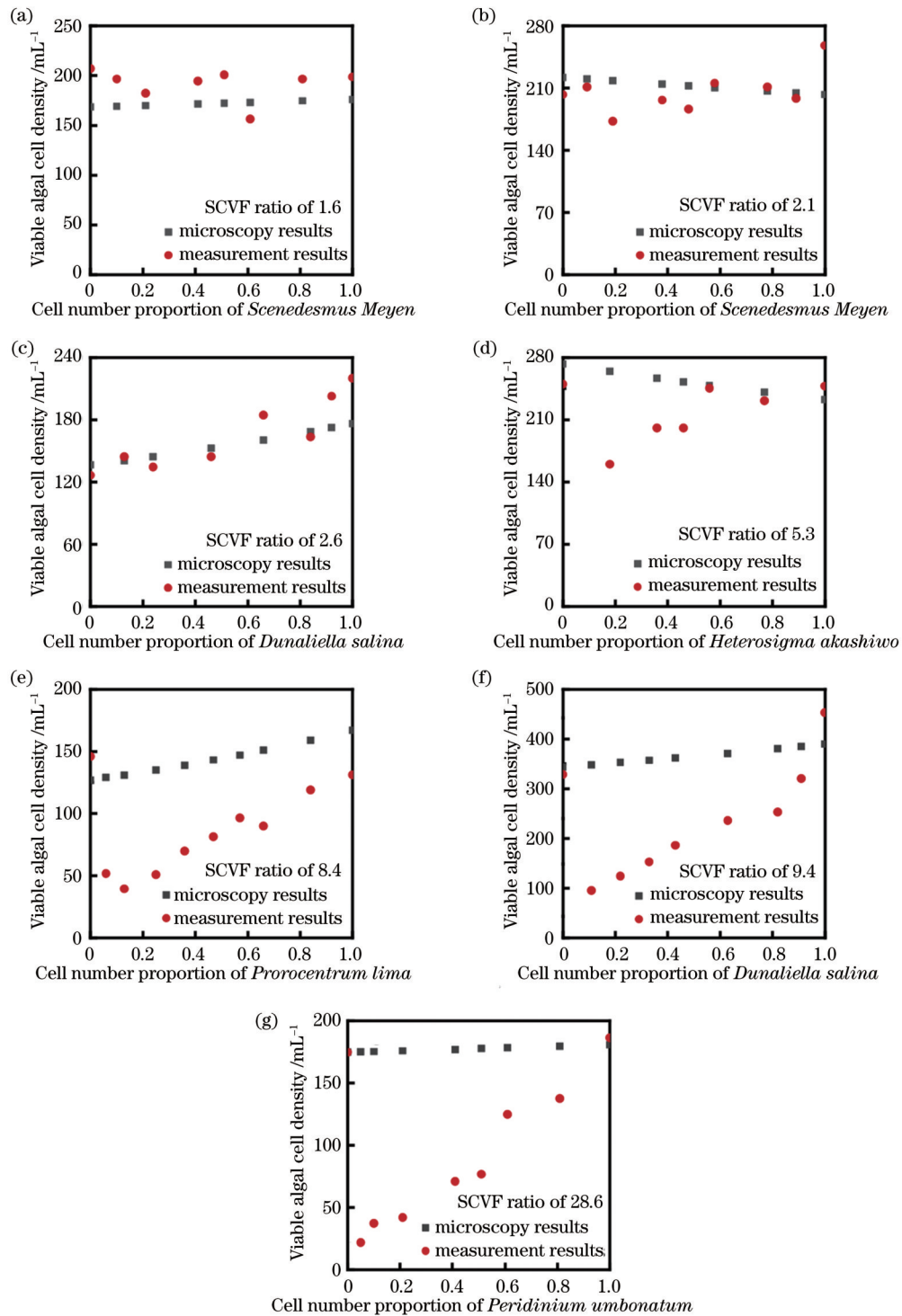


图 2 7 种混合藻类样品镜检活体藻细胞密度与测量的活体藻细胞密度对比图。(a)羊角月牙藻和栅藻;(b)羊角月牙藻和椭圆小球藻;(c)杜氏盐藻和强壮前沟藻;(d)赤潮异弯藻和利玛原甲藻;(e)椭圆形多甲藻和栅藻;(f)杜氏盐藻和海洋小球藻;(g)椭圆形多甲藻和羊角月牙藻

Fig. 2 Comparison of viable algal cell density obtained by microscopic examination and measurement for seven mixed algal samples. (a) *Selenastrum bibrainum* and *Scenedesmus Meyen*; (b) *Selenastrum bibrainum* and *Chlorella ellipsoidea*; (c) *Dunaliella salina* and *Amphidinium carterae* Hulburt; (d) *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum lima*; (e) *Peridinium umbonatum* and *Scenedesmus Meyen*; (f) *Dunaliella salina* and *Chlorella sp.*; (g) *Peridinium umbonatum* and *Selenastrum bibrainum*

密度和镜检细胞密度之间的差异逐渐变小。以上实验现象说明:组成混合样品藻种间的 SCVF 比值不大于 5.3 时,几乎不影响可变荧光统计分析法的测量精度,

可变荧光统计分析法可以准确定量混合藻类活体细胞数,测量结果与镜检结果一致;组成混合样品藻种间的 SCVF 比值大于 8 时,可变荧光统计分析法无法准确定

表 2 测量得到的 7 种混合藻类样品的细胞密度与镜检细胞密度相对误差绝对值的平均值

Table 2 Average of relative error absolute values of measured cell density with respect to microscopic cell density of seven mixed algae samples

Algal species composition of mixed samples	SCVF ratio of algae that make up mixed sample	Mean of absolute value of relative error / %
<i>Selenastrum bibraianum</i> and <i>Scenedesmus Meyen</i>	1.6	12
<i>Selenastrum bibraianum</i> and <i>Chlorella ellipsoidea</i>	2.1	7
<i>Dunaliella salina</i> and <i>Amphidinium carterae</i> Hulburt	2.6	8
<i>Heterosigma akashiwo</i> and <i>Prorocentrum lima</i>	5.3	17
<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Scenedesmus Meyen</i>	8.4	48
<i>Dunaliella salina</i> and <i>Chlorella sp.</i>	9.4	47
<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Selenastrum bibraianum</i>	28.6	59

量混合藻类活体细胞数,测量结果明显低于镜检结果。

进一步研究藻种间的 SCVF 比值大于 8 时,混合样品的细胞密度测量值与混合样品中高 SCVF 藻细胞密度的关系。藻种间的 SCVF 比值大于 8 的混合藻类样品的细胞密度测量值与样品中高 SCVF 藻细胞镜检密度对比图如图 3 所示,随着高 SCVF 细胞占比的增大,测量细胞密度与混合样品中高 SCVF 藻细胞镜检密度逐渐逼近。椭圆形多甲藻与栅藻、杜氏盐藻与海洋小球藻、椭圆形多甲藻与羊角月牙藻混合样品分别在

SCVF 细胞数占比达到 0.47、0.43 和 0.21 后,细胞密度测量值与混合样品中高 SCVF 藻细胞镜检密度趋于一致,两者相对误差绝对值不大于 22%,如表 3 所示。这说明当组成混合样品藻种间的 SCVF 比值大于 8,且混合样品中高 SCVF 藻细胞占比达到一定比例时,可变荧光统计分析法的测量结果仅反映样品中高 SCVF 藻细胞密度;且组成混合样品的两种藻细胞的 SCVF 差异越大,出现这种情况的高 SCVF 藻细胞数占比阈值就越低。

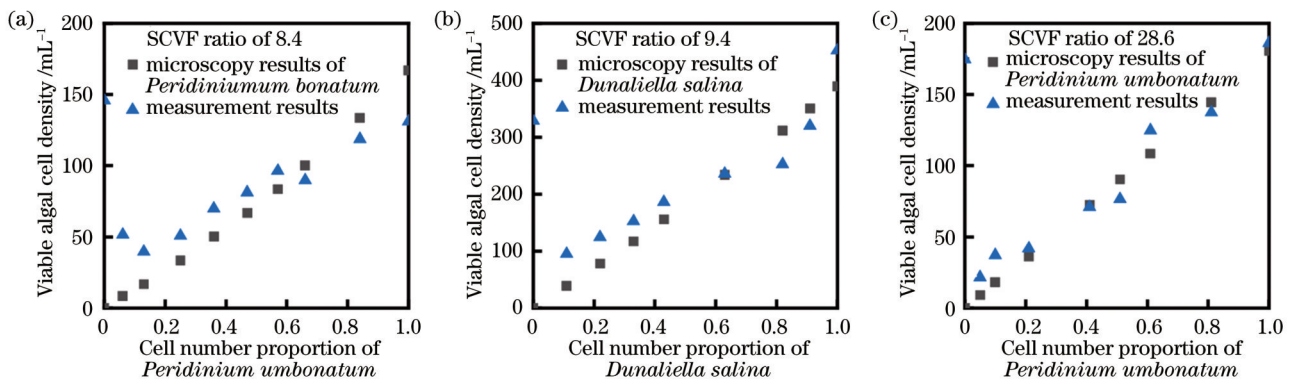


图 3 混合样品镜检高 SCVF 藻细胞密度与测量的藻细胞密度的对比图。(a) 椭圆形多甲藻与栅藻混合;(b) 杜氏盐藻与海洋小球藻混合;(c) 椭圆形多甲藻与羊角月牙藻混合

Fig. 3 Comparison of microscopic cell density of high SCVF algae and measured cell density in mixed algal samples. (a) *Peridinium umbonatum* and *Scenedesmus Meyen*; (b) *Dunaliella salina* and *Chlorella sp.*; (c) *Peridinium umbonatum* and *Selenastrum bibraianum*

3.2 基于过滤分离的混合藻类活体细胞数定量研究

组成混合样品藻种间的 SCVF 比值大于 8 时,可变荧光统计分析法确定的混合藻类活体细胞数存在较大误差,但对于这类混合藻类样品,当混合样品中高 SCVF 藻细胞占比达到一定比例时,可变荧光统计分析法可以不受样品中低 SCVF 藻细胞的影响,可精确

定量样品中高 SCVF 藻细胞数。藻细胞 SCVF 通常与细胞尺寸成正比,尺寸越大的藻细胞 SCVF 值越高^[18]。因此,按照细胞尺寸大小分离混合样品中藻细胞,可以达到分离高、低 SCVF 藻细胞的目的,使用合适孔径的金属滤网对混合藻类样品进行过滤,过滤后的混合样品只含有低 SCVF 藻细胞。可变荧光分析法得到过滤

表 3 混合样品高 SCVF 藻细胞镜检密度与测量的藻细胞密度的相对误差绝对值

Table 3 Relative error absolute values of microscopic cell density of high SCVF algae with respect to measured cell density in mixed algal sample

Mixed algal sample	Parameter	Value									
<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Scenedesmus Meyen</i> (SCVF ratio of 8.4)	Cell number proportion of <i>Peridinium umbonatum</i>	0	0.06	0.13	0.25	0.36	0.47	0.57	0.66	0.84	1.00
	Relative error absolute value / %	—	519	137	52	39	22	15	10	11	21
<i>Dunaliella salina</i> and <i>Chlorella sp.</i> (SCVF ratio of 9.4)	Cell number proportion of <i>Dunaliella salina</i>	0	0.11	0.22	0.33	0.43	0.63	0.82	0.91	1.00	
	Relative error absolute value / %	—	144	60	31	20	1	19	9	16	
<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Selenastrum bibraianum</i> (SCVF ratio of 28.6)	Cell number proportion of <i>Peridinium umbonatum</i>	0	0.05	0.10	0.21	0.41	0.51	0.61	0.81	1.00	
	Relative error absolute value / %	—	139	106	16	2	15	15	5	3	

前混合样品的测量结果为混合样品中高 SCVF 藻细胞密度,而过滤后的样品仅含有低 SCVF 藻细胞,可变荧光统计分析法的测量结果为混合样品中低 SCVF 细胞密度。将可变荧光统计分析法对过滤前、后样品的测量结果之和作为混合样品活体藻细胞密度测量值,该方法简称为过滤分离法。

以混合藻类样品为实验对象,采用不同孔径的金属滤网过滤样品,开展了基于过滤分离的混合藻类活体细胞数定量实验。将椭圆形多甲藻、羊角月牙藻和蛋

白核小球藻两两混合,得到 4 组混合藻类样品,组成混合样品的两类藻类的 SCVF 比值如表 4 所示。其中将混合样品 A、B 中蛋白核小球藻分别扩大培养了 22 d 和 3 d,导致蛋白核小球藻 SCVF 不同,因此混合样品中藻种间 SCVF 比值有所不同。将 4 组混合藻类样品分别按照不同的稀释比例稀释,得到细胞密度呈梯度变化的混合样品。先测量过滤前样品的子样本 F₀ 数据集,使用金属滤网过滤掉混合样品中高 SCVF 藻细胞后,再次通过测量得到滤后样品的子样本 F₁ 数据集。

表 4 4 组混合藻类样品的藻种组成及藻种间 SCVF 比值

Table 4 Algal species composition and SCVF ratio of four groups of mixed algal samples

Sample label	Algal species composition of mixed samples	SCVF ratio of algae that make up mixed sample	Filter aperture / μm
A	<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (cultivating for 22 d)	39.8	5
B	<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (cultivating for 3 d)	67.5	5
C	<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Selenastrum bibraianum</i>	27.0	8
D	<i>Peridinium umbonatum</i> and <i>Selenastrum bibraianum</i>	31.0	5

过滤分离法与可变荧光统计分析法相结合后,混合藻类样品测量结果为过滤前、后样品藻细胞密度测量值之和。采用过滤分离法前、后可变荧光统计分析法的测量结果与镜检结果的对比图如图 4 所示,采用过滤分离法前的测量结果与镜检结果差异较大,采用过滤分离法后两者接近;相对误差绝对值均值如表 5 所示,采用过滤分离法可将相对误差绝对值均值由 58.4% 降为 5.5%,提高了混合藻类活体细胞数定量精度。镜检藻细胞密度与采用过滤分离法后测量的藻细胞密度的相对误差绝对值均值对比图如图 5 所示,线性拟合相关系数 R^2 分别为 0.94662、0.95721、0.96033 和 0.96513,均大于 0.94,说明将过滤分离方法与可变荧光统计分析法相结合,可以准确定量混合样品活体藻细胞数。综上所述,对于 SCVF 差异大的

混合藻类样品,将过滤分离方法与可变荧光统计分析法结合,可准确确定混合藻类活体细胞的数量。

4 结 论

可变荧光统计分析法已经实现了纯种藻类活体细胞数的准确定量,但混合藻类样品中藻细胞 SCVF 差异大,不能满足运用该方法的前提条件,即子样本藻细胞 SCVF 均值一致。因此该方法确定的混合藻类活体细胞数存在较大误差。组成混合样品藻种的 SCVF 差异对可变荧光统计分析法确定混合藻类活体细胞数的影响,以及提高混合藻类活体细胞数定量精度的方法为本文研究的重点。本文的研究结果表明:组成混合样品藻种的 SCVF 差异是可变荧光统计分析法确定混合藻类活体细胞数的主要影响因素;当藻种间的

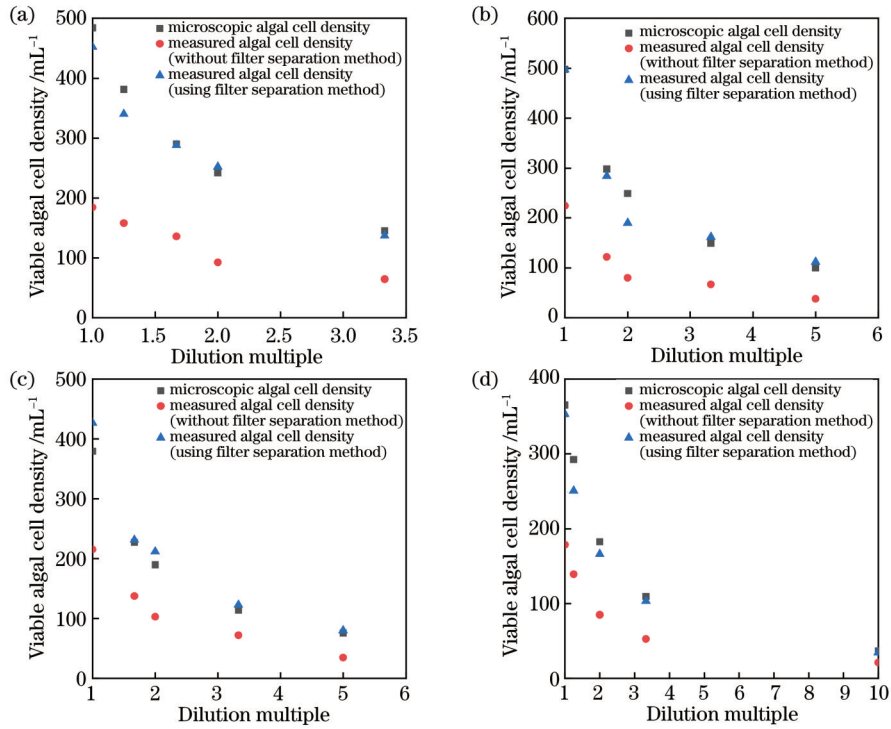


图 4 采用过滤分离法前、后的测量结果与镜检结果的对比图。(a)混合样品 A;(b)混合样品 B;(c)混合样品 C;(d)混合样品 D
 Fig. 4 Comparison of measurement results without and using filter separation method and microscopic results. (a) Mixed sample A; (b) mixed sample B; (c) mixed sample C; (d) mixed sample D

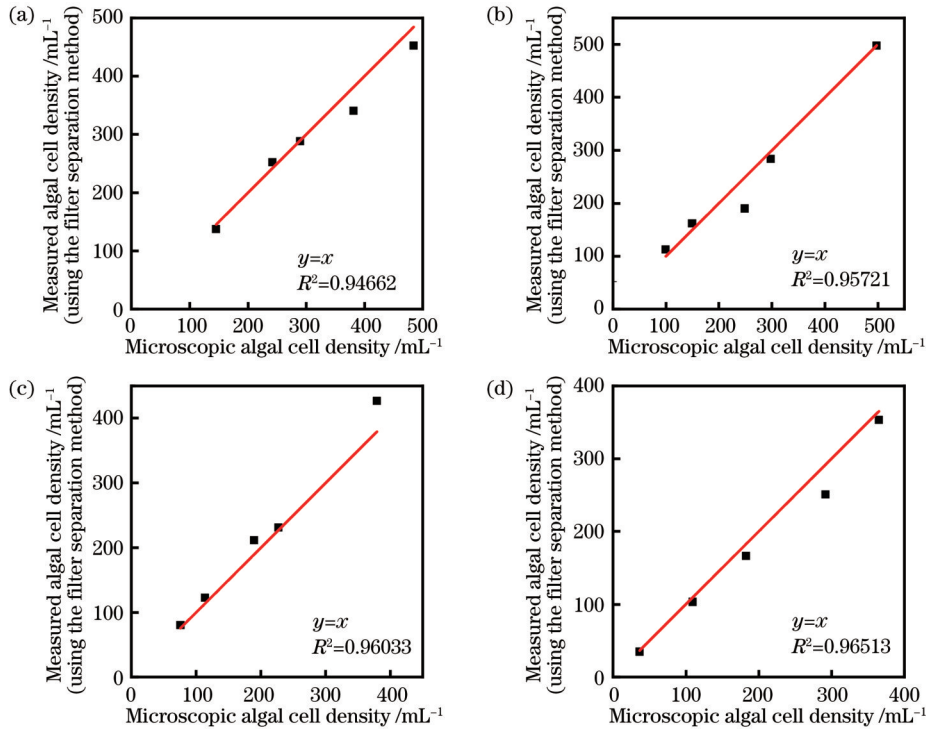


图 5 镜检藻细胞密度与采用过滤法后测量的藻细胞密度对比图。(a)混合样品 A;(b)混合样品 B;(c)混合样品 C;(d)混合样品 D
 Fig. 5 Comparison of microscopic algal cell density and measured algal cell density using filtration separation method. (a) Mixed sample A; (b) mixed sample B; (c) mixed sample C; (d) mixed sample D

SCVF 比值不大于 5.3 时,可变荧光统计分析法可以准确定量混合藻类活体细胞数,测量的活体藻细胞密度与镜检活体藻细胞密度的相对误差绝对值的均值不

大于 17%;当藻种间的 SCVF 比值大于 8 时,可变荧光统计分析法的测量结果明显低于镜检结果,相对误差绝对值的平均值均在 47% 以上;并且当高 SCVF 藻细

表 5 采用过滤分离法前后的测量结果与镜检藻细胞密度的相对误差绝对值均值

Table 5 Mean of relative error absolute values of measured algal cell density before and after using filtration separation method with respect to microscopic algal cell density unit: %

Sample label	Result without filter separation method	Result using filter separation method
A	58.4	5.5
B	60.0	10.0
C	43.8	8.0
D	50.0	7.4

胞占比达到一定比例时,可变荧光统计分析法的测量结果仅反映混合样品中高 SCVF 藻细胞数。针对藻种间的 SCVF 比值大于 8 的混合藻类样品,提出将过滤分离方法与可变荧光分析法相结合的方法,实现了混合藻类活体细胞的准确定量,采用过滤分离方法后的测量结果与镜检结果的线性拟合相关系数 R^2 在 0.94 以上,最大可将两者的相对误差绝对值均值由 58.4% 降低到 5.5%。本文的研究结果为可变荧光分析法在实际水体活体藻细胞数定量中的应用提供参考。目前,过滤分离方法利用藻种间的 SCVF 比值大于 8 且高 SCVF 藻细胞占比达一定比例时的测量结果仅反映混合样品中高 SCVF 藻细胞密度的特点,将过滤前样品测量细胞密度作为样品中高 SCVF 藻细胞密度,当混合样品中高 SCVF 藻细胞占比很低时,测量结果可能存在误差。针对这个问题,研究更好的过滤分离装置,将高 SCVF 藻细胞与低 SCVF 藻细胞完全分离,单独测量高、低 SCVF 藻细胞的可变荧光分布,可以更好地提高定量精度。对于多种藻类混杂的混合样品,可以考虑多级过滤分离装置,使得 SCVF 相近的藻类处于同一级,单独测量各级藻细胞可变荧光分布,从而计算出各级藻细胞的活体细胞数。

参 考 文 献

- [1] Davidson I C, Minton M S, Carney K J, et al. Pioneering patterns of ballast treatment in the emerging era of marine vector management[J]. *Marine Policy*, 2017, 78: 158-162.
- [2] Wang Z J, Countryman A M, Corbett J J, et al. Economic and environmental impacts of ballast water management on small island developing states and least developed countries[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 301: 113779.
- [3] Miller A W, Ruiz G M. Arctic shipping and marine invaders[J]. *Nature Climate Change*, 2014, 4(6): 413-416.
- [4] International Maritime Organization. International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments (BWM)[EB/OL]. (2017-09-08) [2021-08-30]. <https://www.imo.org/en/About/Conventions/Pages/International-Convention-for-the->

Control-and-Management-of-Ships% 27-Ballast-Water-and-Sediments-(BWM).aspx.

- [5] Sayinli B, Dong Y J, Park Y, et al. Recent progress and challenges facing ballast water treatment: a review[J]. *Chemosphere*, 2022, 291: 132776.
- [6] 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.
- [7] Holmstrup M E, Haecky P, Blackburn N. Preliminary verification studies of the motility and fluorescence assay (MFA) for ballast water quality monitoring[J]. *Journal of Sea Research*, 2020, 159: 101889.
- [8] Vanden Byllaardt J, Adams J K, Casas-Monroy O, et al. Examination of an indicative tool for rapidly estimating viable organism abundance in ballast water[J]. *Journal of Sea Research*, 2018, 133: 29-35.
- [9] Patil J S, Anil A C. Simulation experiments to elucidate variable fluorescence as a potential proxy for bulk microalgal viability from natural water, sediments and biofilms: implication in ships ballast water management [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 222: 242-249.
- [10] 华卉, 殷高方, 赵南京, 等. 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[J]. *光学学报*, 2021, 41(6): 0617001.
Hua H, Yin G F, Zhao N J, et al. Study on selecting characterization parameters of viable algae cells number in ballast water based on chlorophyll fluorescence kinetics [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(6): 0617001.
- [11] Rousso B Z, Bertone E, Stewart R, et al. Chlorophyll and phycocyanin *in situ* fluorescence in mixed cyanobacterial species assemblages: effects of morphology, cell size and growth phase[J]. *Water Research*, 2022, 212: 118127.
- [12] Bradie J, Broeg K, Gianoli C, et al. A shipboard comparison of analytic methods for ballast water compliance monitoring[J]. *Journal of Sea Research*, 2018, 133: 11-19.
- [13] 王璐, 殷高方, 赵南京, 等. 基于可变荧光统计学分布的水体藻类活体细胞数分析方法[J]. *光学学报*, 2022, 42(6): 0617001.
Wang L, Yin G F, Zhao N J, et al. Analytical method of viable algae cells in water based on variable fluorescence statistical distribution[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(6): 0617001.
- [14] Akram A C, Noman S, Moniri-Javid R, et al. Development of an automated ballast water treatment verification system utilizing fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of treatment efficacy[J]. *Water Research*, 2015, 70: 404-413.
- [15] Rotman B, Papermaster B W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 55(1): 134-141.
- [16] 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.
- 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.
- [17] 王翔, 殷高方, 赵南京, 等. 基于 TPLIF 技术的光合荧光参数快速准确测量的激发光强自适应方法[J]. *光学学报*, 2020, 40(24): 2412001.
- Wang X, Yin G F, Zhao N J, et al. Adaptive method of excitation light intensity based on TPLIF technology for fast and accurate measurement of photosynthetic fluorescence parameters[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(24): 2412001.
- [18] Brient L, Lengronne M, Bertrand E, et al. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies[J]. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 2008, 10(2): 248-255.