

# 光学学报

## 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

王璐<sup>1,2,3</sup>, 殷高方<sup>1,3\*</sup>, 赵南京<sup>1,3\*\*</sup>, 甘婷婷<sup>1,2,3</sup>, 元培龙<sup>1,2,3</sup>, 丁志超<sup>1,2,3</sup>, 华卉<sup>1,2,3</sup>,  
陈敏<sup>1,2,3</sup>, 马明俊<sup>1,3</sup>, 杨瑞芳<sup>1,3</sup>, 方丽<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

**摘要** 可变荧光量与藻类活体细胞数有良好的相关性,然而在浮游藻类种类、尺寸及生长周期等条件不同的情况下,藻类单细胞的可变荧光量存在明显差异,直接利用可变荧光强度计算藻类活体细胞数将存在很大误差。因此,提出了一种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。根据子样本细胞数的分布形状与可变荧光量一致的特点,利用可变荧光量的分布形状直接计算样品中藻类活体细胞数。研究表明,在浮游藻类单细胞的可变荧光量变化 44 倍的条件下,基于可变荧光统计学分析方法计算的活体藻细胞密度与显微镜的镜检结果基本一致,两者线性拟合的相关系数在 0.93 以上,相对误差绝对值的平均值在 5.98%~16.94%之间,说明所提方法基本解决了藻类单细胞的可变荧光量对活体藻细胞计数结果的影响。

**关键词** 生物技术; 藻类; 活体细胞数; 可变荧光; 随机抽样; 统计分布

中图分类号 X832

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202242.0617001

## Analytical Method of Viable Algae Cells in Water Based on Variable Fluorescence Statistical Distribution

Wang Lu<sup>1,2,3</sup>, Yin Gaofang<sup>1,3\*</sup>, Zhao Nanjing<sup>1,3\*\*</sup>, Gan Tingting<sup>1,2,3</sup>, Qi Peilong<sup>1,2,3</sup>,  
Ding Zhichao<sup>1,2,3</sup>, Hua Hui<sup>1,2,3</sup>, Chen Min<sup>1,2,3</sup>, Ma Mingjun<sup>1,3</sup>, Yang Ruifang<sup>1,3</sup>, Fang Li<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optic 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;

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

**Abstract** There is a good correlation between the amount of variable fluorescence and the number of viable algae cells. However, under the conditions of different species, size, and growth cycle of phytoplankton, there is a significant difference in the amount of variable fluorescence of single algae cell, so there will be a big error in calculating the number of viable algae cells by using variable fluorescence intensity directly. Therefore, an analytical method of viable algae cells in water based on variable fluorescence statistical distribution is proposed. According to the characteristic that the distribution shape of the number of cells in the subsample is consistent with the variable fluorescence amount, the distribution shape of the variable fluorescence amount is used to directly calculate the number of viable algal cells in the sample. The results show that under the condition that the variable fluorescence

收稿日期: 2021-08-31; 修回日期: 2021-09-25; 录用日期: 2021-10-08

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC3200100)、安徽省科技重大专项(202003a07020007)、国家自然科学基金(61875207,61805254)、安徽省杰出青年科学基金(1908085J23)、中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(Y93H3g1251)

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

amount of single cell of phytoplankton changes 44 times, the cell density of viable algae cells calculated by the variable fluorescence statistical analysis method is basically consistent with the microscopic results. The correlation coefficient of linear fitting between them is above 0.93, and the average absolute value of relative error is between 5.98% and 16.94%. The results show that the proposed method basically solves the effect of variable fluorescence of algae single cell on the counting results of viable algae cells.

**Key words** biotechnology; algae; viable cell number; variable fluorescence; random sampling; statistical distribution

## 1 引言

海洋船舶压载水是世界上最大的非本土物种转移载体之一<sup>[1]</sup>。大规模的海洋生物移动会导致生物入侵事件频发,这破坏了沿海生态系统,造成了生态和经济方面的巨大损失<sup>[2]</sup>。为了减少压载水排放所造成的外来物种入侵,国际海事组织在 2004 年通过了“国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约”,其中 D-2 条例规定了船舶排放的压载水中活生物体密度的上限,该公约要求船舶排放的压载水中尺寸小于 50  $\mu\text{m}$  且大于 10  $\mu\text{m}$  的活生物体的密度小于 10  $\text{mL}^{-1}$ <sup>[3]</sup>。已有研究表明,尺寸在 10~50  $\mu\text{m}$  之间的浮游生物中的优势物种为浮游藻类<sup>[4]</sup>,因此活体藻细胞密度的检测对控制压载水达标排放来说至关重要。

当前,对于压载水中活体浮游藻类的检测,通常有“精细型”和“指示性”两种分析方法。“精细型”分析方法通常比较耗时,而且需要专业的技术人员以及昂贵的设备,如显微镜分析仪和流式细胞仪等<sup>[5]</sup>。“指示性”方法依靠各种指标来评估样品中活生物体的数量,不需要复杂的前处理,可实现原位快速测量,实际应用更加广泛,其包括检测细胞能量的三磷酸腺苷(ATP)方法、检测酶活性的荧光素二乙酸酯(FDA)方法以及叶绿素荧光法。但是这些方法只能在特殊的临界情况下或者通过曲线定标校准方式来估算活体生物量,测量结果往往不够精准<sup>[5]</sup>。

其中,叶绿素荧光法依赖于浮游植物的光合作用,几乎不需要对样品进行处理,适用于快速估算浮游植物的生物量,已被证明是适用于压载水合规性检测的方法<sup>[6]</sup>,该方法通过光诱导藻类所释放的叶绿素荧光动力学信号强度来检测活体细胞数。已有研究提出,由叶绿素荧光诱导动力学曲线解析得到的可变荧光不受背景荧光的干扰,其可以精准定量活体细胞数<sup>[7]</sup>,与藻类活体细胞数有良好的相关性<sup>[8]</sup>,这是表征藻类活体细胞数的有效参数。

当前,可变荧光法利用可变荧光强度与活体细胞数的线性关系来反演藻类活体细胞数<sup>[9]</sup>,测量结

果的准确性取决于单细胞可变荧光(SCVF)量。然而已有研究表明,不同藻类细胞的 SCVF 量取决于细胞中叶绿素含量。尺寸在 10~50  $\mu\text{m}$  之间的藻细胞的细胞体积可使 SCVF 量提高 125 倍,光适应可使 SCVF 量提高 5 倍,养分限制可使 SCVF 量提高 5 倍,因此藻类细胞的 SCVF 量受藻的种类、尺寸和生长周期的影响显著,这是可变荧光法估算藻类活体细胞数的主要误差来源<sup>[5]</sup>。因此可变荧光法准确定量测量藻类活体细胞数的前提是对每个样品的 SCVF 量进行标定,这为实际压载水中藻类活体细胞数的检测带来很大挑战。

鉴于此,本文提出一种基于可变荧光统计学分布的藻类活体细胞数分析方法。利用统计分布中子样本细胞数的分布形状与可变荧光量一致的特点,将统计分布法与可变荧光法结合,实现了藻类活体细胞数的定量分析,基本解决了藻类细胞的 SCVF 量对细胞计数结果的影响。将不同藻类种类、细胞尺寸以及生长周期的分析结果与显微镜检法测得的结果进行对比,验证该方法的有效性和准确性。

## 2 数学模型构建

测量得到的可变荧光量  $F_v$  由样本中的藻类活体细胞数和 SCVF 量共同决定,仅有可变荧光量难以准确计算藻类活体细胞数。生物统计学通过获取统计信息为生物现象的定量研究提供科学依据,而可变荧光分布可以提供比可变荧光量更多的信息。将统计分布法与可变荧光法结合,有望解决 SCVF 量的高度变化对叶绿素荧光法用于水体藻类活体细胞计数的影响,从而达到提高计数精度的目的。

### 2.1 细胞数及可变荧光分布

泊松分布在生物学中有着广泛的应用,当考察的对象数较多、事件为随机发生且发生概率较小时,均可应用泊松分布来分析<sup>[10]</sup>。文献[11]指出,若压载水样品中的浮游藻类为随机分布,样本中单个藻细胞出现的概率与样本体积成正比,且两个及两个以上的藻细胞在一个很小的体积内出现的概率忽略不计,则从均匀压载水样品随机抽样得到的子样本

中,藻类活体细胞数将服从泊松分布。

泊松分布可以用方差等于均值的正态分布来近似<sup>[12]</sup>,故可以认为子样本中的藻类活体细胞数服从一个方差等于均值的正态分布。由于随机抽样得到的子样本  $F_v$  值等于子样本细胞数乘以子样本 SCVF 均值,在子样本 SCVF 均值一致的前提下,子样本  $F_v$  值必然服从正态分布,且分布形状与子样本细胞数的分布形状一致,所以子样本细胞数均值的分布形状与其细胞数或  $F_v$  值的分布形状一一对应,因此可以通过子样本  $F_v$  值的分布形状直接求出样品中的藻类活体细胞数,而且计算结果不受藻类 SCVF 量的影响。上述推导成立的前提条件:从

均匀样品随机抽样得到的子样本中,藻细胞的 SCVF 均值一致,均匀纯种藻类必然满足。

为了验证上述分析方法的有效性,使用 MATLAB 拟合了不同活体藻细胞密度、不同 SCVF 量下随机抽样的子样本细胞数以及  $F_v$  值,绘制了子样本细胞数以及  $F_v$  的分布形状图,如图 1 所示,横坐标  $T_1$  或  $T_2$  为子样本细胞数或  $F_v$  相对于其均值的倍数。由图 1 可见:子样本细胞数的分布形状与子样本  $F_v$  值一致;当样品细胞密度不变时,SCVF 量的变化不会影响子样本  $F_v$  值的分布形状;随着样品细胞密度的增加,子样本细胞数的均值逐渐增加,此时子样本  $F_v$  值的分布形状越陡峭。

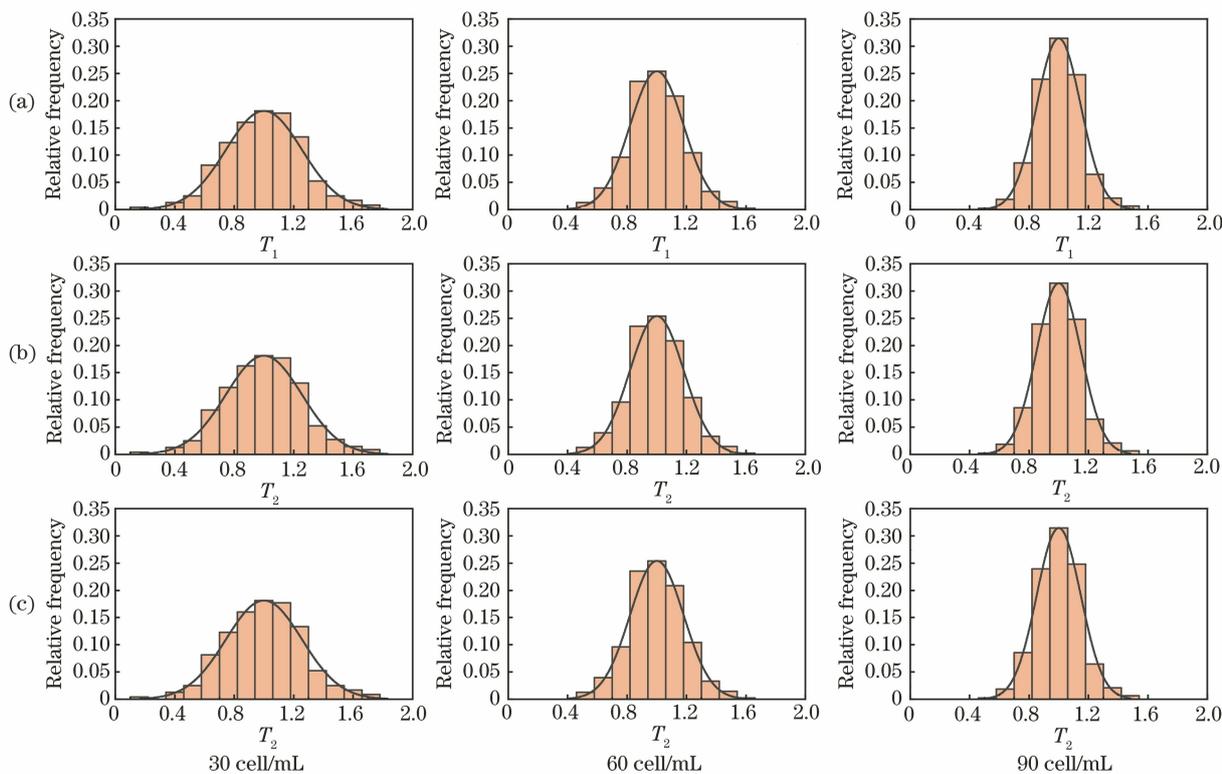


图 1 不同细胞密度下细胞数以及  $F_v$  值的分布形状。(a)细胞数的分布形状;  
(b) SCVF 为 0.001,  $F_v$  值的分布形状;(c) SCVF 为 0.010,  $F_v$  值的分布形状

Fig. 1 Distribution shape of cell number and  $F_v$  value under different cell density. (a) Distribution shape of cell number; (b) SCVF is 0.001, distribution shape of  $F_v$  value; (c) SCVF is 0.010, distribution shape of  $F_v$  value

## 2.2 构建数学模型

随机抽样得到的子样本中,活体藻细胞数的均值记为  $u$ ,因 2.1 节子样本中的活体藻细胞数服从泊松分布,即近似为方差等于均值的正态分布  $N(u, u)$ 。因为子样本中的藻细胞 SCVF 均值一致,记为  $s$ ,则子样本  $F_v$  值服从正态分布  $N(s \times u, s^2 \times u)$ ,因此可以得到随机抽取子样本  $F_v$  值分布的概率密度函数,表达式为

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi u}} \exp\left[-\frac{(x - su)^2}{2s^2 u}\right] \quad (1)$$

为了构建子样本  $F_v$  值与样品活体藻细胞密度的关系,对子样本  $F_v$  值进行统计分布。以子样本  $F_v$  值的均值  $su$  作为区间中心,选择区间增量系数  $a$  来确定中心区间范围( $su - asu, su + asu$ ),区间大小为  $2asu$ ,将统计得到子样本  $F_v$  值出现在中心区间的频率  $B$  作为分布参数,如图 2 所示,中心区间频率  $B$  就是子样本  $F_v$  值分布图的中心区间高度。

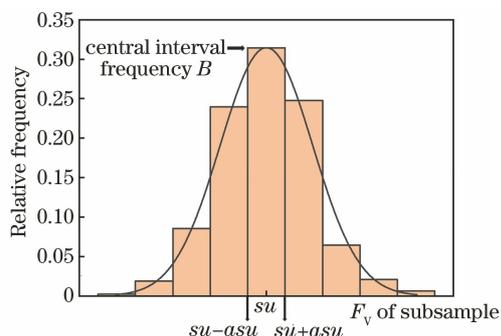


图 2 随机抽样子样本  $F_v$  值的分布形状

Fig. 2 Distribution shape of  $F_v$  value of random sample

使用子样本  $F_v$  值分布的概率密度函数求积分,计算  $F_v$  值出现在中心区间的概率,该值等于中心区间频率  $B$ ,表达式为

$$B = \int_{su-asu}^{su+asu} \frac{1}{s\sqrt{2\pi}u} \exp\left[-\frac{(x-su)^2}{2s^2u}\right] dx. \quad (2)$$

根据正态分布的性质对(2)式进行化简,并替换积分变量  $t = \frac{x}{s\sqrt{2u}}$ ,可以得到

$$B = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{\sqrt{u}}{\sqrt{2}}} \exp(-t^2) dt. \quad (3)$$

由(3)式可以看出,参数  $s$  在化简过程中被约分,所以由子样本  $F_v$  值求解样品中的活体藻细胞数不受样品 SCVF 量的影响。子样本  $F_v$  值的中心区间频率等于子样本  $F_v$  值的中心区间概率,将  $B$  值代入(3)式就可以解出子样本中活体藻细胞数的均值  $u$ 。子样本体积记为  $v$ ,样品中的活体藻细胞密度为  $u/v$ 。其中,区间增量系数  $a$  的取值范围为  $0 \sim 1$ ,不同  $a$  值有不同的优势细胞密度范围。当样品细胞密度在该密度范围内时,方法的计算精度较高;当  $a$  值越小时,优势细胞密度范围越大,且可处理的密度上限越高。根据压载水中的活体藻细胞密度范围,在后续实验数据处理中, $a$  值定为 0.06。

### 3 材料和方法

为了验证可变荧光统计分析法检测不同种类、尺寸和生长周期的藻类活体细胞数的有效性和准确性,实验过程中选择尺寸相差较大且属于不同门类的藻种,通过培养不同天数使藻细胞处于不同生长周期。对于每一个藻液样品,通过稀释可以得到一系列密度梯度样品,对染色显微镜检查得到的密度与可变荧光统计分析法计算得到的密度进行对比,通过两者线性拟合的程度以及相对误差来评价可变荧光统计分析法的准确性。

### 3.1 藻种选择和培养

选用椭圆形多甲藻、杜氏盐藻、威式海链藻、利玛原甲藻和海洋小球藻 5 种藻类作为实验对象,这 5 种海洋藻类的尺寸差异大,藻种门类不同,因此 SCVF 量相差大,故适用于验证所提方法在不同种类、尺寸的样品中的有效性。在杜氏盐藻扩大培养后的第 3,6,8,12,15,18,23,28,33,40 天进行实验,通过改变藻液的扩大培养时间,使藻细胞处于不同生长周期,用来验证可变荧光法在不同生长周期的样品中的有效性。

海洋小球藻、杜氏盐藻和利玛原甲藻采用 F/2 培养基进行接种,威式海链藻采用 F/2+Si 培养基进行接种,椭圆形多甲藻采用 119 培养基进行接种。将接种后的藻液置于 MQD-S3R 型恒温摇床培养箱进行扩大培养,采用的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 r/min,光照强度为  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光暗时间为 12 h。

### 3.2 藻类活体细胞数的获取

活性染料 FDA 和 5-氯甲基荧光素二乙酸酯 (CMFDA) 可用作活细胞示踪剂,活体细胞经染色后可发出绿色荧光,死亡细胞则不会发出荧光。取 1 mL 的藻液样品加入 5  $\mu\text{L}$  的 FDA (浓度为 1 mmol/L) 和 10  $\mu\text{L}$  的 CMFDA (浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ ) 中并混合均匀,避光染色 10 min<sup>[13]</sup>。取染色后的藻液样品并滴入清洁干燥的 0.1 mL 浮游生物计数框中,将其正置于 Nikon Ni-U 型荧光显微镜下进行计数。

使用浮游生物计数框进行藻细胞的计数,由于藻液密度过低而无法计数,所以对高密度样品 ( $2 \times 10^5$  cell/mL 左右) 进行多次稀释得到低密度样品 (5~350 cell/mL),通过高密度样品的镜检密度和稀释倍数求出低密度样品的镜检密度。

### 3.3 可变荧光 $F_v$ 数据集的获取

为了得到满足可变荧光统计分析法需求的可变荧光  $F_v$  数据集,搭建了均匀样品随机抽样的藻类可变荧光测量实验系统,如图 3 所示,该实验系统由均匀随机抽样系统和可变荧光测量系统构成,其中 PMT 为光电倍增管,MPU 为微处理器,LD 为激光二极管,VGA 为增益可调放大器,G2 为增益调整电路。均匀随机抽样系统中,样品池安装了搅拌装置,这可以保证样品的均匀性。抽样装置通过蠕动泵从样品池中抽取样品并输送到测量窗口进行可变荧光的测量,测量完成后返回样品池。确定好样品的抽取速度和测量窗口的体积(子样本体积),可以保证

合适的抽样比以及足够的样品交换率,从而完成对藻液样品的均匀随机抽样。可变荧光测量系统中,使用荧光测量技术得到子样本的荧光动力学曲线,

从荧光动力学曲线中反演出子样本可变荧光量  $F_v$ ,对所有子样本进行荧光测量可以得到子样本可变荧光  $F_v$  数据集。

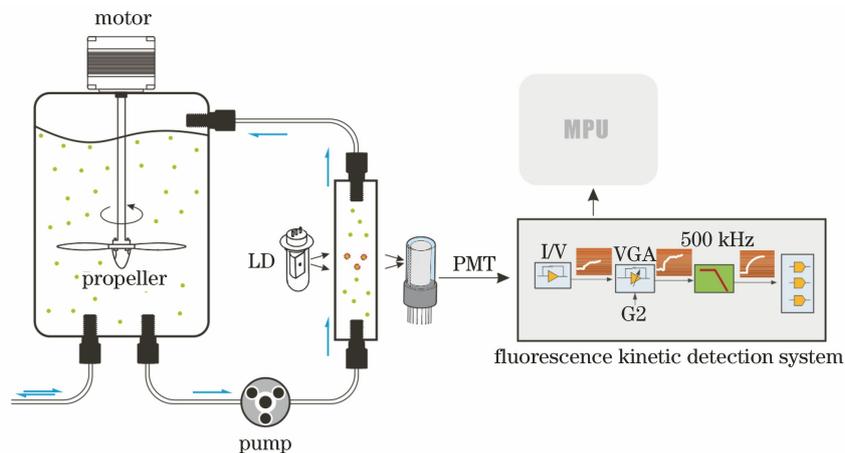


图 3 均匀样品随机抽样的藻类可变荧光测量实验系统示意图

Fig. 3 Schematic of algae variable fluorescence measurement experimental system for random sampling of uniform samples

## 4 结果与讨论

### 4.1 不同种类及细胞尺寸的藻类活体细胞数的检测

将椭圆形多甲藻、杜氏盐藻、威式海链藻、利玛原甲藻和海洋小球藻接种后扩大培养一段时间(14~18天),再进行不同种类、细胞尺寸的活体藻细胞数

的检测实验。将这些藻类的藻液稀释为一系列密度梯度样品,利用显微镜检方法得到镜检活体藻细胞密度,再利用搭建的实验系统测量得到一系列样品的子样本  $F_v$  均值,由此得到 5 种藻类样品子样本  $F_v$  均值与样品镜检活体藻细胞密度的线性关系 ( $R_2$ ),通过线性关系的斜率来表征样品藻细胞 SCVF 量,如图 4 所示。

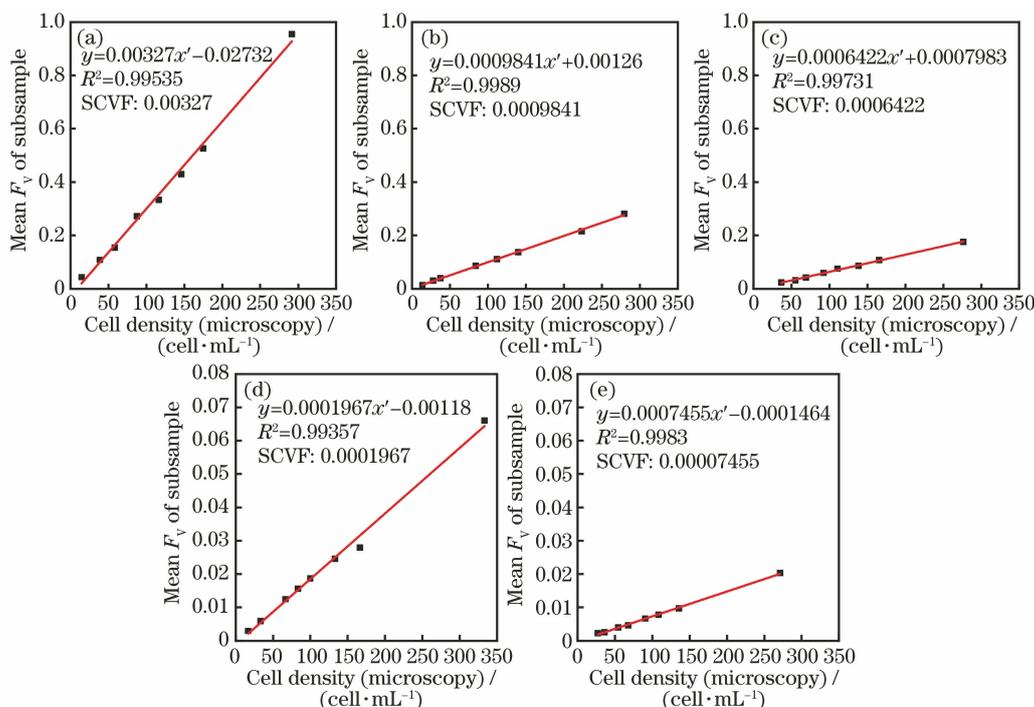


图 4 子样本  $F_v$  均值随活体藻细胞密度的变化曲线。(a) 椭圆形多甲藻;(b) 杜氏盐藻;(c) 威式海链藻;(d) 利玛原甲藻;(e) 海洋小球藻

Fig. 4 Variation curves of mean  $F_v$  of subsamples with viable algae cell density. (a) *Peridinium umbonatum var. inaequale*; (b) *Dunaliella salina*; (c) *Thalassiosira weissflogii*; (d) *Prorocentrum lima*; (e) *Chlorella sp.*

由图 4 可知, 椭圆形多甲藻、杜氏盐藻、威式海链藻、利玛原甲藻和海洋小球藻样品的 SCVF 值分别为 0.0032700、0.0009840、0.0006420、0.0001970 和 0.0000746, 差异较大, 其中椭圆形多甲藻的 SCVF 值最大, 海洋小球藻的 SCVF 值最小, 差异高达 44 倍。在显微镜检的过程中观察到 5 种藻类细胞的大小差距较大, 按照细胞尺寸从大到小进行排序。顺序: 椭圆形多甲藻(甲藻), 长约为 25  $\mu\text{m}$ , 宽约为 20  $\mu\text{m}$ ; 杜氏盐藻(绿藻), 长约为 15  $\mu\text{m}$ , 宽约为 8  $\mu\text{m}$ ; 威式海

链藻(硅藻), 直径约为 9  $\mu\text{m}$ ; 利玛原甲藻(甲藻), 直径约为 5  $\mu\text{m}$ ; 海洋小球藻(绿藻), 直径约为 3  $\mu\text{m}$ 。由此可见不同藻种的藻细胞尺寸差异较大, 藻细胞尺寸越大, SCVF 值越大, 且 SCVF 值并不是只与细胞尺寸相关, 还与色素构成和光合效率等相关。

将实验系统测得的子样本  $F_v$  数据集进行预处理, 然后代入可变荧光统计分析法中可以计算得到活体藻细胞密度。将镜检密度与计算密度分别作为 X、Y 轴以绘制散点图, 线性拟合结果如图 5 所示。

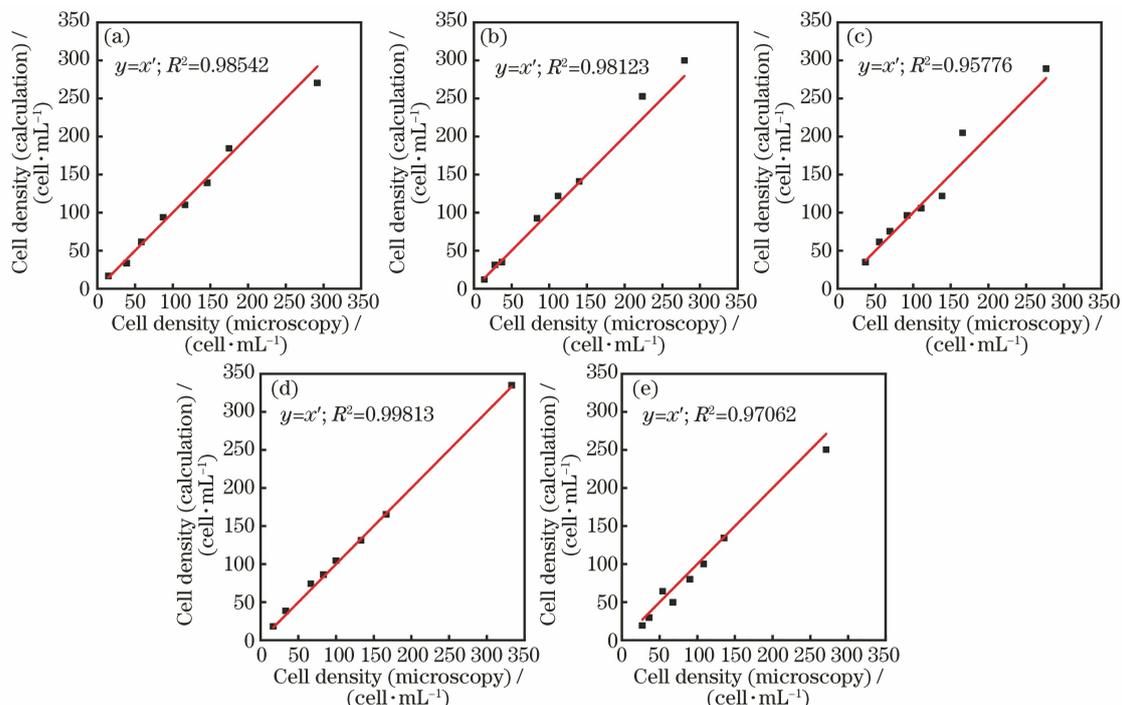


图 5 镜检活体藻细胞密度与统计分析法计算活体藻细胞密度的对比。(a)椭圆形多甲藻;(b)杜氏盐藻;(c)威式海链藻;(d)利玛原甲藻;(e)海洋小球藻

Fig. 5 Comparison of viable algal cell density between microscopic examination and statistical analysis method. (a) *Peridinium umbonatum* var. *inaequale*; (b) *Dunaliella salina*; (c) *Thalassiosira weissflogii*; (d) *Prorocentrum lima*; (e) *Chlorella* sp.

如图 5 所示, 5 种藻类样品的计算密度与镜检密度的线性拟合相关系数  $R^2$  分别为 0.9854、0.9812、0.9578、0.9981 和 0.9706, 均在 0.95 以上。由表 1 所示, 5 种藻类样品的计算密度与镜检密度的相对误差绝对值的平均值在 5%~15% 之间, 说明可变荧光统计分析法计算样品中的活体藻细胞密度可行且有效, 并且由于藻类种类和细胞大小不同而造成 SCVF 值存在差异, 但这不会影响可变荧光统计分析法计算样品中的活体藻细胞密度。

#### 4.2 不同生长周期的藻类活体细胞数的检测

在杜氏盐藻扩大培养第 3, 6, 8, 12, 15, 18, 23, 28, 33, 40 天后进行活体藻细胞数的检测实验, 不同生长周期下杜氏盐藻样品的子样本  $F_v$  均值与镜检

活体藻细胞密度的关系如图 6 所示。

表 1 5 种藻类样品的计算密度与镜检密度的相对误差绝对值的平均值

Table 1 Average value of absolute value of relative error between calculated density and microscopic density of 5 kinds of algae samples

Species	Average value of absolute value of relative error / %
<i>Peridinium umbonatum</i> var. <i>inaequale</i>	7.90
<i>Dunaliella salina</i>	9.11
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	9.27
<i>Prorocentrum lima</i>	5.98
<i>Chlorella</i> sp.	14.89

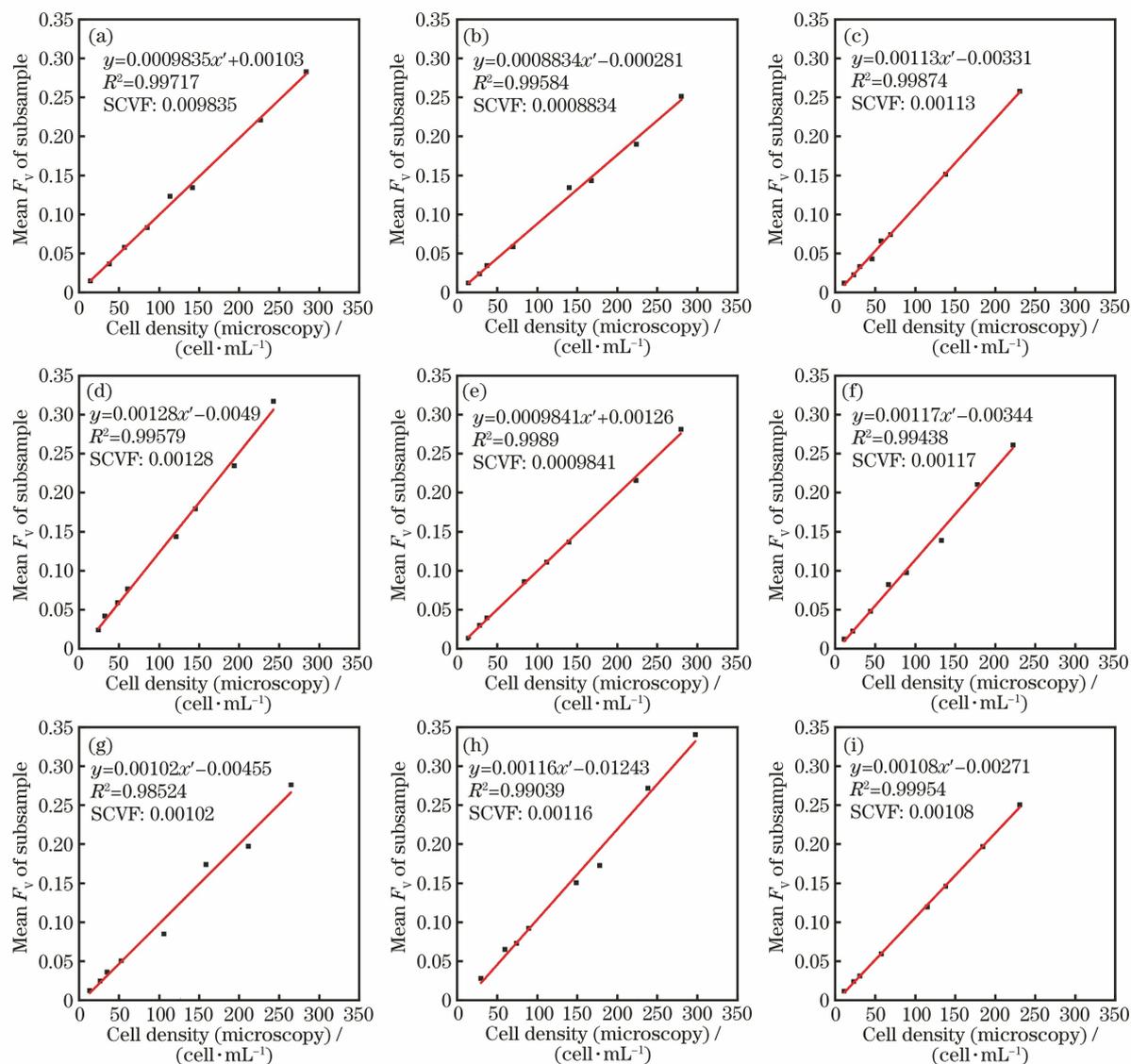


图 6 不同扩大培养天数下子样本  $F_v$  均值随活体藻细胞密度的变化曲线。(a) 3 天;(b) 6 天;(c) 9 天;  
(d) 12 天;(e) 15 天;(f) 18 天;(g) 23 天;(h) 28 天;(i) 33 天

Fig. 6 Variation curves of mean  $F_v$  of subsamples with viable algae cell density under different extended culture days.

(a) 3 days; (b) 6 days; (c) 9 days; (d) 12 days; (e) 15 days; (f) 18 days; (g) 23 days; (h) 28 days; (i) 33 days

如图 6 所示,当杜氏盐藻处于不同生长周期时,藻液样品的 SCVF 值存在差异,其中培养 12 天后的 SCVF 值最大,培养 6 天后的 SCVF 值最小,差异达到 1.45 倍。由图 7 可见:当杜氏盐藻培养液中的活体藻细胞密度增长缓慢时,培养液中藻细胞的 SCVF 值呈增加趋势,如培养第 6~12 天和 15~18 天;当杜氏盐藻培养液中的活体藻细胞密度快速增长时,培养液中藻细胞的 SCVF 值呈减小趋势,如培养第 3~6 天、12~15 天和 28~33 天。杜氏盐藻以无性繁殖为主,藻体在运动中纵裂为二,分裂期藻体较小。在活体藻细胞密度快速增长的期间,藻细胞的平均尺寸可能会减小,这会导致藻细胞的

SCVF 值呈减小趋势。在活体藻细胞密度缓慢增长的期间,杜氏盐藻细胞处于生长状态,藻细胞的平均尺寸增大,这会导致藻细胞的 SCVF 值呈增加趋势。

不同培养天数下,杜氏盐藻镜检的活体藻细胞密度与统计分析法计算的活体藻细胞密度的线性拟合结果如图 8 所示。

由图 8 可知,不同培养天数下,杜氏盐藻镜检的活体藻细胞密度与统计分析法计算的活体藻细胞密度的线性拟合相关系数  $R^2$  分别为 0.9824、0.9874、0.9929、0.9865、0.9812、0.9318、0.9797、0.9712 和 0.9897,均大于 0.93。如表 2 所示,不同培养天数下,

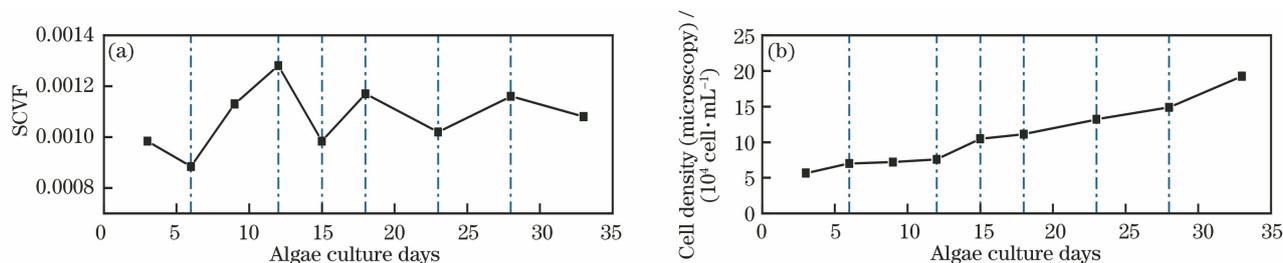


图 7 藻细胞的 SCVF 和细胞密度与培养天数的关系。(a) SCVF;(b)细胞密度

Fig. 7 Relationship between SCVF and cell density of algal cells, and culture days. (a) SCVF; (b) cell density

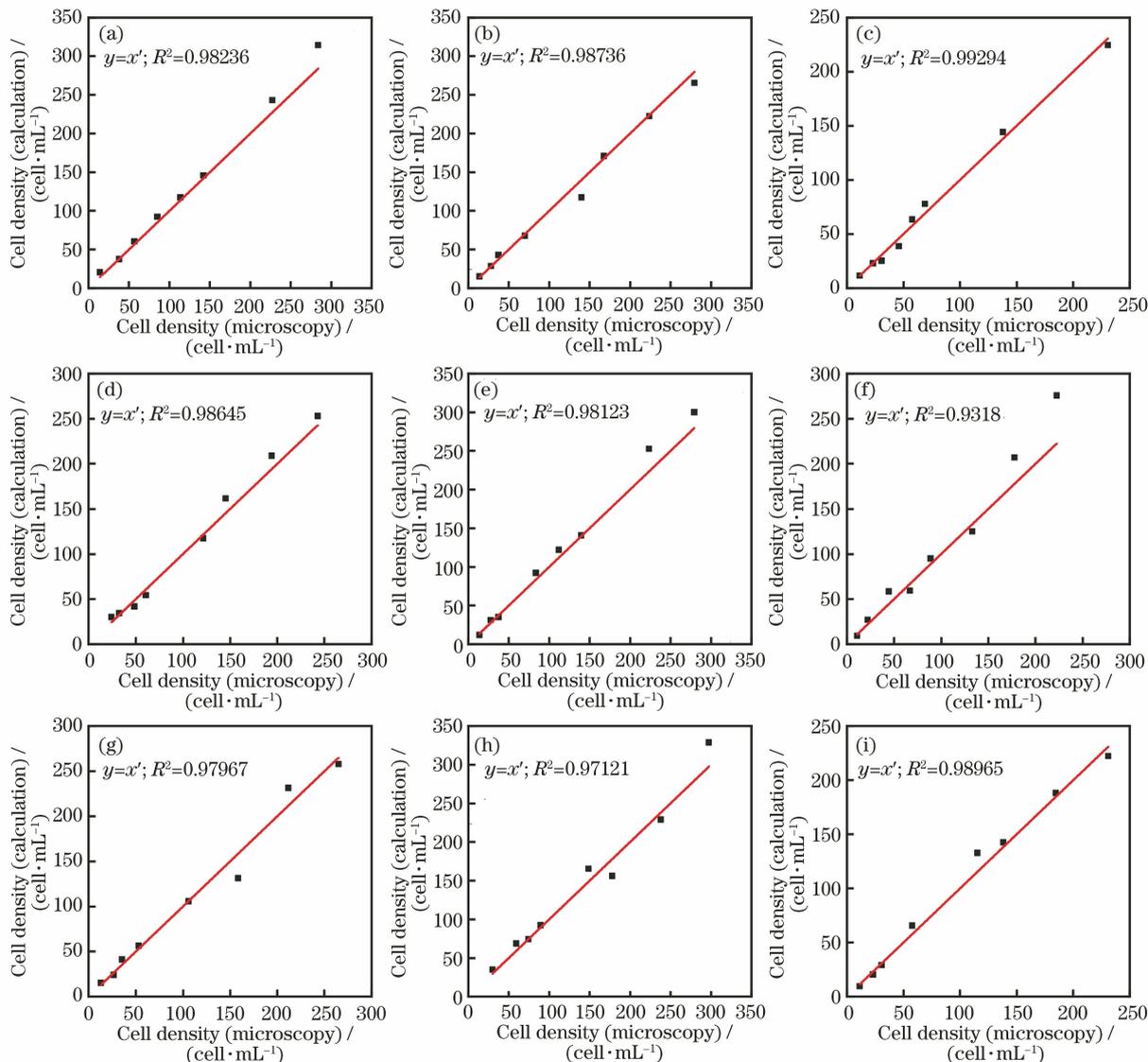


图 8 不同扩大培养天数下镜检活体藻细胞密度与统计分析法计算活体藻细胞密度的对比。(a) 3 天;(b) 6 天;(c) 9 天;(d) 12 天;(e) 15 天;(f) 18 天;(g) 23 天;(h) 28 天;(i) 33 天

Fig. 8 Comparison between microscopic observation and statistical analysis of viable algae cell density under different extended culture days. (a) 3 days; (b) 6 days; (c) 9 days; (d) 12 days; (e) 15 days; (f) 18 days; (g) 23 days; (h) 28 days; (i) 33 days

杜氏盐藻的计算密度与镜检结果的相对误差绝对值的平均值在 6%~17%之间,说明可变荧光统计分析

法计算样品中的活体藻细胞密度可行且有效,并且由于藻类处于不同生长周期而造成 SCVF 值存在差异,

但这不会影响可变荧光统计分析法计算样品中的活体藻细胞密度。在 SCVF 变化高达 44 倍的条件

下,两者线性拟合的相关系数  $R^2$  均在 0.93 以上,且相对误差绝对值的平均值均在 5.98%~16.94%之间。

表 2 不同培养天数下计算密度与镜检密度的相对误差绝对值的平均值

Table 2 Average value of absolute value of relative error of calculated density with respect to microscopic density under different culture days

Algae culture days	3	6	9	12	15	18	23	28	33
Average value of absolute value of relative error /%	10.56	6.55	8.09	9.81	9.11	16.94	9.55	9.27	8.94

## 5 结 论

叶绿素荧光法是压载水合规性检测的方法之一,其中  $F_v$  与藻类活体细胞数有良好的相关性。但实验结果表明,藻细胞的种类、尺寸和生长周期都会导致藻细胞的 SCVF 值高度变化,生长周期的不同会造成 SCVF 值差异达 1.45 倍,细胞尺寸的差异会造成 SCVF 值差异达 44 倍,这限制了可变荧光法测量藻类活体细胞数的应用。本研究利用均匀样品随机抽样的子样本细胞数的分布形状与可变荧光量一致的特点,研究构建了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。在不同种类、尺寸和生长周期下对藻类活体细胞数进行检测。实验结果表明:该方法计算的活体藻细胞密度与显微镜的镜检结果基本一致;在 SCVF 变化高达 44 倍的条件,两者线性拟合的相关系数  $R^2$  均在 0.93 以上,且相对误差绝对值的平均值均在 5.98%~16.94%之间,基本解决了藻细胞的 SCVF 值高度变化对细胞计数的影响,能够在无需定标的情况下准确检测不同种类、尺寸和生长周期的藻类活体细胞数,这为压载水藻类活体细胞在现场的快速计数提供了一种新的分析方法。目前,本课题组正对不同种类的藻细胞进行混合。初步研究发现:当混合藻液(杜氏盐藻和威式海链藻混合)中藻细胞的 SCVF 量差异较小时,该分析方法依旧适用;但当混合藻液(杜氏盐藻和海洋小球藻混合)中藻细胞的 SCVF 量差异过大时,该分析方法计算出的活体藻细胞密度与大细胞密度相近,此时会出现大细胞淹没小细胞的现象,针对这个问题正开展深入的实验研究工作。

## 参 考 文 献

- [1] Soler-Figueroa B M, Fontaine D N, Carney K J, et al. Characteristics of global port phytoplankton and implications for current ballast water regulations [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 155: 111165.
- [2] Bax N, Williamson A, Aguero M, et al. Marine

invasive alien species: a threat to global biodiversity [J]. *Marine Policy*, 2003, 27(4): 313-323.

- [3] 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%20Ballast-Water-and-Sediments-\(BWM\).aspx](https://www.imo.org/en/About/Conventions/Pages/International-Convention-for-the-Control-and-Management-of-Ships%20Ballast-Water-and-Sediments-(BWM).aspx).
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Byllaardt J V, 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.
- [7] 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.  
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.
- [8] 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.
- [9] Bernd K, Kornmueller A. Method and apparatus for detection of living phytoplankton cells in water: US20120208264 [P/OL]. 2012-08-16 [2021-08-30]. <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=201208264&KC=&FT=E>.

- [10] Zhuang J, Lin Q Y. The application of Poisson distribution in biology[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 16(5): 655-658.  
庄军, 林奇英. 泊松分布在生物学中的应用[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5): 655-658.
- [11] Miller A W, Frazier M, Smith G E, et al. Enumerating sparse organisms in ships' ballast water: why counting to 10 is not so easy [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8): 3539-3546.
- [12] Yu Y. A discussion of the relations among binomial distribution, Poisson distribution and normal distribution [J]. *Enterprise Science and Technology & Development*, 2008(20): 108-110.  
于洋. 浅析二项分布、泊松分布和正态分布之间的关系[J]. *企业科技与发展*, 2008(20): 108-110.
- [13] 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.