

流式细胞术在富营养淡水湖泊微型浮游植物细胞中的应用

郭沛涌*, 朱荫湄

(浙江大学环境科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 应用流式细胞术(FCM)对一个富营养化淡水湖泊表、底层微型浮游植物细胞进行了初步研究。研究表明: 流式细胞术可快速、多参数区分3种不同类群微型浮游植物。微型浮游植物细胞在表、底层占50 μm 以下微型颗粒物数量比例分别为21.08%、17.87%, 在不同水层, 微型浮游植物的优势类群及数量也不同。流式细胞术大大提高了淡水微型浮游生物研究监测水平。

关键词: 流式细胞术; 富营养化; 微型浮游植物细胞

中图分类号: Q27 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-204-03

流式细胞术在生物医学领域有着广泛的应用, 现其应用领域在不断扩展, 如对水体微型生物、颗粒物的研究等^[1-5]。微型浮游植物通常以单细胞存在于水体中, 往往不需浓缩或超声波处理即可应用流式细胞术分析, 由于不同微型浮游植物类群大小和所含色素及其比例, 以及内部结构和理化性质不同, 分析不同参量可用来研究微型浮游植物的生态学基本特征。本研究应用流式细胞术对富营养化的杭州西湖少年宫水域中的微型浮游植物细胞进行初步研究, 探讨其垂直分布与数量变化特征, 为有关研究的深入进行提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

FACscan 流式细胞仪(美国 B-D 公司); 1000 μL 取液器(上海求精生化试剂仪器有限公司生产); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂生产); 多聚甲醛(天津化学试剂研究所); 25% 戊二醛溶液(上海五联化工厂)。

1.2 样品采集

水样于2003年1月采自富营养水体杭州西湖的少年宫水域。用1L有机玻璃采水器分别取表层、底层水样1L, 分装数支5ml取样管中, 每支取样管每毫升水样加0.1毫升10%多聚甲醛与0.5%戊二醛溶液的混合液, 在室温下放置15min, 放入液氮中冷冻保存直至分析。

1.3 实验方法

1.3.1 原理 微型浮游植物细胞含有自然荧光色素(叶绿素、藻红素等), 不同类群个体大小、所含色素及其比例各不相同。一般来说, 前向散射光(FSC)强度与细胞的大小有关, 侧向散射光(SSC)用来获取细胞内部精细结构和颗粒性质有关信息, 同时, SSC也与细胞大小有关。微型浮游植物细胞所含叶绿素、藻红蛋白在488nm激光照射下, 分别发出的红色和橙色荧光信号各被检测器FL3与FL2接收, 在两参数点图中微型浮游植物细胞不同的类群得以区分。

1.3.2 样品制备 在本实验中, 水体中的微型浮游植物看作单细胞, 不需浓缩或超声波处理即可进行分析。将保存的样品迅速解冻并用旋涡混合器混匀, 经50 μm 筛绢过滤, 移入样品管(FACscan流式细胞仪专用)待测, 取另一支样品管加入1000 μL 经Milli-Q系统处理的蒸馏水作为空白对照。

1.3.3 流速校正 FCM不记录被分析样品的体积, 只记录被分析样品的时间, 然而在细胞数量计算中, 精确的体积数值是必须的, 这需要对流速进行校正。校正方法参照文献^[6]如下:

精确量取1000 μL 蒸馏水移入样品管, 在电子天平称重; 将流速开关打至低速, 将样品管支持短

收稿日期: 2003-10-31; 修回日期: 2003-12-23

浙江省自然科学基金重大项目(ZE0108)、杭州市科技发展计划(2003134M56)资助。

* 通讯作者, E-mail: guopeiyong@sina.com

臂右移, 迅速插上样品管, 将支持短臂立即移至中心位置, 立刻开始计时; 50min 后, 将样品管支持短臂右移, 迅速取下样品管, 停止计时; 在电子天平称得剩余蒸馏水重量, 转换成体积, 由 $v = (V_i - V_f) / T$ ($v =$ 流速, $V_i =$ 初体积, $V_f =$ 终体积, $T =$ 进样时间) 计算得出流速。

1.3.4 样品分析 门限设于 FL3 通道, 调节电压值, 调整图形与位置为最佳, 待样品运行稳定, 开始测定(acquire), 测定 30s, 记录时间及测定的总个体数。

1.3.5 数据处理 有关数据由 Cellquest 软件进行处理分析。

2 结果与讨论

2.1 微型浮游植物细胞垂直分布

图 1 中 X 轴代表侧向散射光强度, Y 轴代表红荧光(叶绿素)强度。由图 1 可见, 在西湖少年宫水域表层微型浮游植物细胞可明显分为三个类群, R1 类群个体最小, 含较多叶绿素; R2 群个体较大, 含有大量的叶绿素; R3 类群个体最大, 仅含有少量叶绿素。图 2 为同一样品的不同二参数点图, X 轴仍代表侧向散射光强度, Y 轴代表橙荧光(藻红素)的强度。由图 2 可见, R1 类群个体最小, R3 类群个体最大。R1 类群不含藻红素, R2 类群含少量藻红素, R3 类群含略多藻红素。

综合图 1、2 可见, R1 个体最小, R2 类群个体较大, R3 类群个体最大。R1 类群含有较多叶绿

素但不含有藻红素; R2 类群既含大量叶绿素且含有少量藻红素; R3 类群含有少量叶绿素且含有略多藻红素。三个类群生命有机颗粒物通过各自的光合色素进行光合作用, 成为富营养水体初级生产力的重要贡献者。

由图 3、4 可见, 在西湖少年宫水域底层微型浮游植物细胞也可明显分为三个类群: R1 类群个体最小, 含有较多叶绿素但不含有藻红素; R2 类群个体较大, 既含大量叶绿素又含有少量藻红素; R3 类群个体最大, 含有少量叶绿素且含有略多藻红素。从图可见, 该水域底层微型浮游植物细胞类群与表层是一致的, 但各类群的细胞数量不同。

2.2 微型浮游植物细胞个体数量

个体数量是微型浮游植物重要生态学参数。每类群的个体数量可由下式计算^[6]:

$$C = [N / (T \times R)] \times (V_{\text{总}} / V_{\text{样品}})$$

式中: C 是各类群个体数量(个/ μL); N 是获得的个体数量; T 是获取时间(min); R 是样品流速($\mu\text{L}/\text{min}$); $V_{\text{总}}$ 是样品体积+附加体积(固定剂等) μL ; $V_{\text{样品}}$ 是样品体积(μL)。经计算有关数据得表 1。

从表 1 可见, 在杭州西湖少年宫水域微型浮游植物细胞在表、底层占 $50\mu\text{m}$ 以下微型颗粒物数量比例均不高, 分别为 21.08%、17.87%, 而无机颗粒物与非生命有机颗粒物分别占总微型颗粒物的 78.92% 和 82.13%。在不同水层, 微型浮游植物的优势类群及数量也不同。在表层, R1 类群占有优势, 占总颗粒物数量的 12.75%; 而 R2 类群最少, 仅占总颗粒数量的 3.43%。在底层, R3 数量最高, 占颗粒物总数的 8.84%; R2 占总颗粒物数量的 3.06%, 这可能与不同类群在不同水深对光的利用不同有关。尽管微型浮游植物细胞占总微型颗粒物的百分比底层要小于表层, 但是微型浮游植物细胞总的绝对数量底层却大于表层, 表层、底层微型浮游植物细胞数量分别为 0.328×10^8 个/L 和 0.590×10^8 个/L。

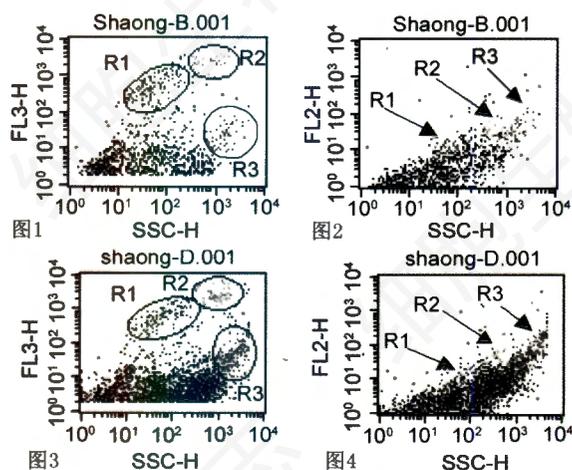


图 1 表层水体微型浮游植物细胞二参数(SSC-FL3)点图

图 2 表层水体微型浮游植物细胞二参数(SSC-FL2)点图

图 3 底层水体微型浮游植物细胞二参数(SSC-FL3)点图

图 4 底层水体微型浮游植物细胞二参数(SSC-FL2)点图

表 1 表、底层微型浮游植物细胞个体数量

层次	总颗粒数量 (个/L)	微型浮游 植物类群	相对比例 (%)	绝对数量 (个/L)
表层	1.558×10^8	R1	12.75	0.199×10^8
		R2	3.43	0.053×10^8
		R3	4.90	0.076×10^8
底层	3.300×10^8	R1	5.97	0.197×10^8
		R2	3.06	0.101×10^8
		R3	8.84	0.292×10^8

3 结语

浮游生物监测是淡水环境监测的基本内容之一,其中微型浮游植物细胞(包括超微型)不仅是水体生态系统的重要组成部分,且其生态过程又对水环境产生重要影响,它们在污染物的分布、迁移、转化中起重要作用,一些种类还可引发赤潮。长期以来,由于受技术限制,对微型浮游生物的研究十分困难。我们此次应用流式细胞术对一个富营养化的淡水湖泊微型浮游植物细胞初步研究发现该水域表、底层微型浮游植物可明显区分3个类群。在不同水层,微型浮游植物的优势类群及数量也不同。流式细胞术准确、快速、多参数的测量能力,使其对超微浮游生物在很短的时间尺度上进行动态分析成为可能,大大提高了微型浮游生物特别是有害种类的研究监测水平。

参 考 文 献

- [1] CHISHOLM S W, OLSON R J, ZETTER E R, *et al.* A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone [J]. *Nature*, 1988, **334**: 340 — 343.
- [2] VAULOT D, MARIE D, OLSON R J, *et al.* Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean [J]. *Science*, 1995, **268**: 1480 — 1482.
- [3] BLANCHOT J, ANDRE J M, NAVARETTE C, *et al.* Picophytoplankton in the equatorial Pacific: vertical distributions in the warm pool and in the high nutrient low chlorophyll conditions [J]. *Deep-Sea Research I*, 2001, **48**: 297 — 314.
- [4] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 流式细胞术在水体微型生物研究中的应用[J]. *生物物理学报*, 2002, **18**(3): 359 — 364.
- [5] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 水体微型颗粒的流式细胞术测定[J]. *分析测试学报*, 2002, **21**(4): 20 — 22.
- [6] MARIE D F, PARTENSKY F, VAULOT D, *et al.* Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples [M]. ROBINSON P S, *et al.* eds, *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999: 11.11-15.

Studies on Nanophytoplankton Cell Using Flow Cytometry (FCM) in a Eutrophic Lake

GUO Pei Yong*, ZHU Yin Mei

(*Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: Nanophytoplankton cell was preliminary studied by using flow cytometry (FCM) at surface and bottom layers in a eutrophic lake. Three populations could be rapidly discriminated and enumerated. Nanophytoplankton cell occupied the small part of total particles that were smaller than 50 μm . They represented 21.08% and 17.87% of total particles at surface and bottom layers respectively. FCM considerably improved the method of monitoring and studying on nanophytoplankton.

Key words: flow cytometry; eutrophication; nanophytoplankton cell

This work is support by the Key Project of National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (ZE0108), Scientific and Technological Development Project of Hangzhou City (2003134M56)

*Corresponding author, E-mail: guopeiyong@sina.com