

适合海洋微藻活体染色的方法评价

王 帅^{1,2}, 张 波³, 赵昔龙^{1,2}, 程明娇⁴,
曹 为^{1,2}, 徐希媛^{1,2}, 郑 立^{1,2,5*}

(1. 海洋活性物质与现代分析技术国家海洋局重点实验室, 山东 青岛 266061;

2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;

3. 河北海事局, 河北 秦皇岛 066006; 4. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

5. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071)

摘 要: 为了评估一种快速简单用以确定海洋微藻细胞活性的技术, 针对船舶压载水中常见的 3 个门类中 11 种 10~50 μm 单细胞微藻用中性红(NR)、5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CMFDA)、荧光素二乙酸酯(FDA)三种染料进行染色, 通过光镜和荧光显微镜对染色结果进行测定。结果表明, NR(中性红)是检测本实验中全部海洋微藻藻株细胞活性的最佳染料, 染色最佳浓度为 1/10 000, 染色时间为 30 min; 5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CMFDA)、荧光素二乙酸酯(FDA)和双荧光染色对海洋微藻藻株活细胞着色时间短, 染色效果明显, 但其应用具有局限性, 适用于检测本实验中甲藻门(塔玛亚历山大藻、链状亚历山大藻、微小原甲藻、利玛原甲藻、东海原甲藻、米氏凯伦藻)和绿藻门(青岛大扁藻和杜氏盐藻)的活性, 染色最佳浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ FDA+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CMFDA, 染色时间为 10 min, 但不适用于检测硅藻门的细胞活性。因此, 中性红更适合检测船舶压载水中微藻活细胞, 根据光镜下微藻细胞着色情况而判断细胞活性。

关键词: 海洋微藻; 活体着色; 中性红; 5-氯甲基荧光素二乙酸酯; 荧光素二乙酸酯; 船舶压载水

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2018)02-0321-10

doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2018.02.017

船舶压载水是造成外来海洋生物物种传播的最主要途径^[1-2], 每年约有 100 亿 t 的压载水随着船舶在全球转移^[3]。压载水造成的外来物种入侵对海洋环境的危害已经被全球环境基金组织(Global Environment Facility, GEF)确认为危害海洋的四大威胁之一^[4-6]。为了解决压载水造成的入侵物种问题, 国际海事组织(International Maritime Organization, IMO)先后于 2004 年和 2008 年通过了《控制和管理船舶压载水和沉积物国际公约(D-2)》和《压载水管理系统认可导则(G8)》。该公约和导则要求对压载水进行管理, 规定了压载水排出时必须满足的标准。然而在实际应用中, 海洋微藻的细胞活性检测方法还存在评估准确性的问题。海洋微藻是船舶压载水检测中的重要检测指标, 海洋微藻入侵已在世界范围内造成了巨大的经济及环境损失, 因此对船舶压载水中海洋微藻进行现场快速准确的检测具有重要的意义和应用前景。

目前, 微藻细胞活性的检测方法主要有 3 类: 第 1 类是测定微藻的生物量, 通过测定细胞密度或叶绿素 *a* 的变化来检测细胞活性^[7], 由于叶绿素 *a* 在藻类死亡两周后仍能检测到^[8-9], 因此该方法很难准确判断死

收稿日期: 2018-01-24

资助项目: 国家重点研发计划项目——我国近海典型外来生物入侵灾害风险防控技术和装备研发(2017YFC1404604); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目——微塑料对海洋硅藻光合作用的影响及分子机制初探(2017Q09); 国家自然科学基金委员会-山东省人民政府海洋科学研究中心联合基金项目——海洋生态与环境科学(U1606404); 国家自然科学基金项目——海洋玫瑰杆菌群体感应及其退出机制对藻菌关系的调节(41776176); 山东省自然科学基金项目——基于“三重定量分析”的环境因子对有毒甲藻生长和产生麻痹性贝毒(PSTs)的影响(ZR2015PD003)

作者简介: 王 帅(1983-), 女, 山东济南人, 助理研究员, 博士, 主要从事微藻生理生化方面研究. E-mail: wangshuai@fio.org.cn

*** 通讯作者:** 郑 立(1976-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 博士, 主要从事海洋微生物方面研究. E-mail: zhengli@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

活细胞的个数;第 2 类是非染色的测定,通过 CDA 法用胰蛋白酶对死亡细胞进行去除,活细胞是完整的,可以计数^[10-11];第 3 类方法是通过细胞染色来直接判别细胞个体的活性状况,可使用荧光或非荧光染色剂,通过染色后活细胞和死亡细胞在显微镜下的不同颜色来进行检测^[9,12-14]。

目前,有关荧光和非荧光染色检测微藻细胞活性的应用报道较少,已有研究仅针对个别微藻进行了中性红^[13,15]或对自然水体中微藻的荧光染色方法进行了研究^[3,8,16],并未对相关荧光与非荧光染色方法进行比较。为建立一种简便、快捷和可靠的海洋微藻的细胞活性检测方法,本文对船舶压载水中常见的 3 个门类的 11 种微藻活细胞用 3 种染色染料(中性红(Neutral Red, NR)、5-氯甲基荧光素二乙酸酯(5-Chloromethylfluorescein Diacetate, CMFDA)、荧光素二乙酸酯(Fluorescein Diacetate, FDA))进行了染色检测对比,研究不同染色剂的染色条件和染色效果。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

实验所用三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、小新月菱形藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*)、青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica var. tsingtaoensis*)、杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)、链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*) 11 株单细胞微藻藻种均为国家海洋局第一海洋研究所生态中心微藻种质库保存。海洋微藻培养采用 f/2 培养基^[17]配方,培养条件:温度分别设定为(20±1)℃,光照强度 100 μmol/(m²·s),光暗周期比 12 h:12 h,待进入指数生长期开始实验。

1.2 染色剂的配制

CMFDA(Invitrogen)储存液:取 50 μg CMFDA 溶于 430 μL 的二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为 250 μmol/L 的 CMFDA 储存液;FDA(Invitrogen)储存液:取 100 mg FDA 溶于 5 mL 的二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为 50 mmol/L 的 FDA 准备液,取 20 μL FDA 准备液,溶于 980 μL 的二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为 1 mmol/L 的 FDA 储存液;中性红储存液:取 1 g 中性红溶于 100 mL 超纯水中,配制成浓度为 1%的中性红储存液,用滤膜过滤。所有染色储存液均在 4℃下避光保存,试剂需用现配。

根据预实验结果,染色时将中性红、CMFDA、FDA 和 CMFDA+FDA 染料分别加入到样品溶液中,每种染料设定了 3 个染色浓度梯度,如表 1 所示,每个梯度设置 3 个平行组。

表 1 不同染色方法的染色浓度
Table 1 The different dyes concentration for each staining method

染色方法	染色浓度		
中性红	1/2 000	1/10 000	1/50 000
FDA	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L
CMFDA	2.5 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L
FDA (5 μmol/L)+CMFDA	2.5 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L
CMFDA (2.5 μmol/L)+FDA	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L

1.3 细胞染色与镜检

用血球计数板法测定微藻细胞密度,取 1 mL 细胞密度约为 1×10⁴个/mL 的藻液于离心管中,加入非

荧光试剂中性红,振荡混匀后于 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 分别染色(10,30,60 min),用倒置荧光显微镜(Nikon ECLIPSE TE2000-U)进行明场检测。分别加入荧光试剂 FDA,CMFDA,FDA+CMFDA 中,先加入 FDA,振荡混合均匀后再加入荧光试剂 CMFDA,振荡混匀后于 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 分别避光染色(10,30,60 min),用倒置荧光显微镜(Nikon ECLIPSE TE2000-U)进行检测,在蓝色光下 CMFDA 和 FDA 最大激发光波长为 495 nm(465~495 nm),发射光波长为 505 nm。对照组:将样品在 $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,作为死亡细胞染色检测。活的微藻细胞会被中性红染成红色和被荧光试剂染色发出绿色荧光,而死亡藻细胞不会被中性红染色和不会有荧光。

1.4 染色率计算

微藻细胞密度采用 0.1 mL 浮游植物计数框进行计数,计算公式:

中性红染色:根据明场下全视野中着色藻细胞数(B)与未着色藻细胞数(A)计算藻细胞的染色效率(r)为

$$r = B / (A + B) \times 100\%。 \quad (1)$$

荧光染色:根据明场视野中藻细胞数(C)与荧光场视野中发荧光藻细胞数(D),计算藻细胞的染色效率(r)为

$$r = D / (C + D) \times 100\%。 \quad (2)$$

1.5 统计分析

利用 SPSS11.5 软件将染色试剂对 11 种海洋微藻染色浓度和染色时间进行多重比较分析。

2 结果与讨论

2.1 中性红染色

中性红是一种毒性较低的水溶性碱性染料,具有易于溶解在脂类物质中的特性,微藻细胞表面的质膜含有丰富的卵磷脂和胆固醇,因此在染色中,碱性染料较为适用^[18]。在动物细胞中,中性红滞留在溶酶体内不被洗脱,在植物细胞中,中性红则积聚在细胞质或液泡内。活体染色时,中性红可将液泡染成红色,死亡细胞不变色。中性红作为一种廉价、简便、无毒的染色方法,现已被广泛应用于压载水大于 50 μm 的生物的人工计数生物活性的测定^[18-19]。

中性红在光镜下很容易计数着色微藻细胞,但非荧光染色剂浓度对藻细胞染色存在较大影响,通常浓度太低会造成染色效果不好,而高浓度可能影响微藻细胞活性。研究结果表明,低浓度中性红的毒性对细胞活性影响不大^[15,20]。为了解中性红浓度对染色效果的影响,将 1% 中性红储存液稀释为 1/2 000,1/10 000 和 1/50 000 三个浓度对处于指数生长期的海洋微藻进行染色实验。实验结果表明,中性红对不同门类、个体大小和 pH 值(7.28~8.89)范围的海洋微藻均具有很好的染色效果(图 1),死亡的海洋微藻未被中性红染色(图 2)。多重比较和染色效率结果(表 2 和表 3)表明,染色最适浓度为 1/10 000,最佳染色时间为 30 min,1/2 000 和 1/10 000 两种浓度之间无显著差异,染色时间 30 和 60 min 之间无显著差异。这与 Ehara 等^[13]在中性红吸光值 0.2(A_{455})条件下对绿藻(*Micrasterias pinnatifida*)进行活体染色研究的最佳染色时间(30 min)一致。但与有些研究结果有所差异,例如,Zetsche 等^[3]和 Luz 等^[21]的研究结果也表明,对于所检测的 7 种海洋硅藻、3 种海洋甲藻和 2 种淡水绿藻来说,中性红的染色效果最好,其染色浓度为 1/50 000,比本实验最适浓度(1/10 000)低,但是染色时间(2 h)更长。王珂等^[15]进行了中性红检测淡水蓝藻铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)活性的研究,结果表明,染色最佳浓度为 1/5 000,最佳染色时间为 15 min,染色率达到 98% 以上。这种差异可能是由于微藻的种类、盐度或生长时期等不同引起的。

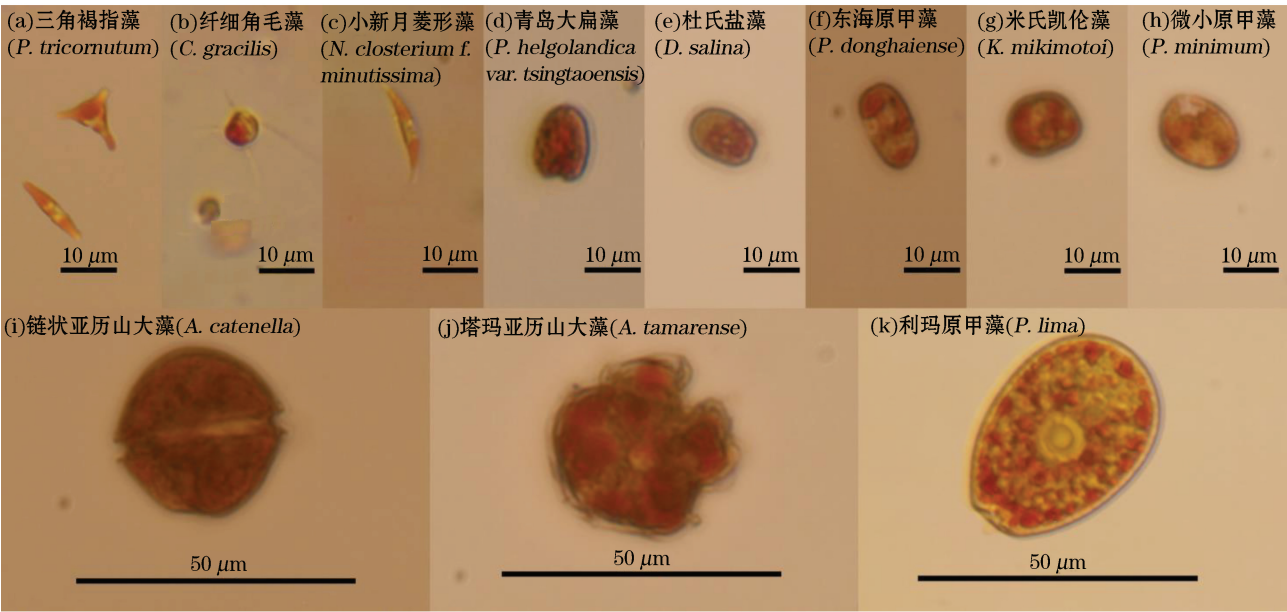


图 1 中性红对 11 株海洋微藻活体细胞的染色效果
Fig.1 The staining effect of 11 strains of living microalgae by neutral red

表 2 中性红浓度和染色时间对 11 种海洋微藻染色效率影响的多重比较结果
Table 2 The SNK multiple comparison test results of the neutral red concentration and staining time in 11 strains of marine microalgae

藻种名称	中性红浓度	染色时间/min
三角褐指藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^b	10 ^a 30 ^b 60 ^b
纤细角毛藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
小新月菱形藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^b	10 ^a 30 ^b 60 ^b
青岛大扁藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^b	10 ^a 30 ^b 60 ^b
杜氏盐藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^b	10 ^a 30 ^b 60 ^b
东海原甲藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
米氏凯伦藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
微小原甲藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
链状亚历山大藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
塔玛亚历山大藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b
利玛原甲藻	1/2000 ^a 1/10000 ^a 1/50000 ^a	10 ^a 30 ^b 60 ^b

注:多重比较结果按升序排列,即 a<b;相同上标字母表示组间平均值无显著差异(P<0.05)

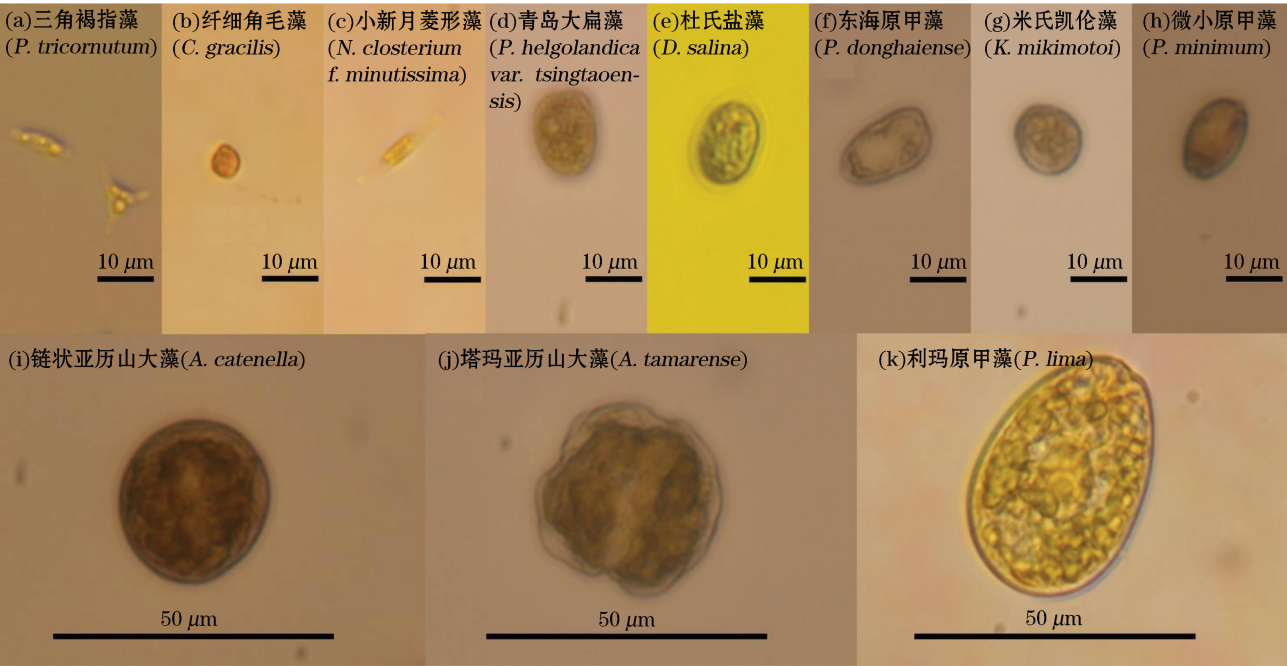


图 2 中性红对 11 株海洋微藻死亡细胞的染色效果
Fig.2 The staining effect of 11 strains of dead microalgae by neutral red

表 3 不同浓度中性红染色 30 min 对 11 种海洋微藻的染色效率 (%)
Table 3 The staining efficiency of neutral red in 11 strains of marine microalgae(%)

藻种名称	染色浓度			死细胞
	1/2 000	1/10 000	1/50 000	
三角褐指藻	98.74±2.54	99.31±1.75	91.23±1.78	0
纤细角毛藻	95.44±0.77	98.94±0.08	91.92±0.58	0
小新月菱形藻	99.16±1.63	99.59±0.03	92.46±2.01	0
青岛大扁藻	97.65±1.80	99.93±1.56	78.38±1.98	0
杜氏盐藻	97.82±1.65	98.72±1.32	85.68±1.14	0
东海原甲藻	98.30±0.73	99.12±0.87	97.15±2.05	0
米氏凯伦藻	98.91±0.78	99.58±0.44	97.97±1.26	0
微小原甲藻	98.36±1.23	98.73±0.90	94.71±1.73	0
链状亚历山大藻	99.10±1.58	99.65±1.66	98.47±1.27	0
塔玛亚历山大藻	98.94±1.51	99.39±1.40	97.58±1.13	0
利玛原甲藻	99.78±0.77	99.87±0.57	98.99±0.81	0

2.2 FDA-CMFDA 单荧光和双荧光染色

荧光素二乙酸酯(FDA)染色法是 Rotman 和 Papermaser^[22]提出的,FDA 本身不发荧光,但该染料可被活细胞中的非特异性酯酶分解产生荧光物质,从而使细胞发荧光。死亡细胞或活性较差的细胞中由于非特异性酯酶活性差,因此无荧光或荧光较暗。该方法可用于鉴定细胞活性,具有价格低廉、操作简单和荧光信号较强等优点,因此被应用于植物和蓝藻研究^[23]。CMFDA 是 FDA 的氯甲基衍生物,同样具细胞膜渗透

性,无色,不具有荧光发光性。当通过被动运输穿透细胞膜进入活细胞后,CMFDA 中的亲脂性基团可被胞浆内非特异性酯酶水解,生成 5-氯甲基荧光素(5-chloromethylfluorescein);5-氯甲基荧光素可发出绿色荧光,因带电荷而不能自由穿透细胞膜,并利用自身氯甲基与细胞内蛋白和多肽中的谷胱甘肽在谷胱甘肽巯基转移酶作用下生成加合物,能完好地保留在胞内。经 CMFDA 标记的细胞,荧光非常稳定,与 FDA 相比,具有较长时间的细胞内信号保留特点。图 3 分别为 3 种海洋硅藻、2 种海洋绿藻和 6 种海洋甲藻在荧光场和明场下的照片,由图 3 可以看出,荧光染料充满整个单细胞微藻,使藻细胞整体呈绿色荧光。多重比较和染色效率结果(表 4 和表 5)表明,染色最适浓度为 FDA (5 $\mu\text{mol/L}$) + CMFDA (2.5 $\mu\text{mol/L}$),染色时间为 10 min,染色浓度和染色时间的增加对染色效果无显著性差异。溶于二甲基亚砜(DMSO)的 FDA 和 CMFDA 的单荧光与双荧光染色法对海洋微藻细胞没有抑制效应,一些运动型微藻,例如链状亚历山大藻、塔玛亚历山大藻、微小原甲藻、东海原甲藻、杜氏盐藻以及青岛大扁藻在荧光着色后,仍然游动。根据微藻所发出的荧光,不仅可以计算细胞数量,而且可以清楚观察微藻的细胞形态。

三角褐指藻(*P. tricornutum*)、纤细角毛藻(*C. gracilis*)和小新月菱形藻(*N. closterium f. minutissima*)三种海洋硅藻未被 2 种荧光染料染色(图 3a-3c),2 种海洋绿藻和 6 种海洋甲藻染色效果明显(图 3d-3k),该结果与 Peperzak 和 Brussaard^[16]通过流式细胞仪采用不同染料对 40 株微藻的检测结果一致。陈熙等^[24]指出 pH 的变化可能会影响 FDA 对细胞活性测定结果的准确性。本实验研究结果表明,未被 FDA 和 CMFDA 荧光染色的 3 种硅藻(三角褐指藻、纤细角毛藻和小新月菱形藻)的培养液 pH 值分别为 8.18、8.29 和 8.59,介于可被荧光染色的微藻 pH 值的范围内(7.28~8.89),因此可以推断影响 FDA 和 CMFDA 对微藻的染色因素与 pH 值无关,而可能与藻种类别、叶绿素的质量浓度或微藻中酯酶的活性有关。

表 4 不同浓度荧光染料和染色时间对 11 种海洋微藻染色效率影响的多重比较结果

Table 4 The SNK multiple comparison test results on the concentration of Fluorescein diacetate (FDA) and 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) and staining time in 11 strains of marine microalgae

藻种名称	染色方式				染色时间
	FDA	CMFDA	FDA (5 $\mu\text{mol/L}$) + CMFDA	CMFDA (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + FDA	
三角褐指藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
纤细角毛藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
小新月菱形藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
青岛大扁藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
杜氏盐藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
东海原甲藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
米氏凯伦藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
微小原甲藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
链状亚历山大藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
塔玛亚历山大藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a
利玛原甲藻	5 ^a 10 ^a 20 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	2.5 ^a 5 ^a 10 ^a	5 ^a 10 ^a 20 ^a	10 ^a 30 ^a 60 ^a

注:多重比较结果按升序排列,即 a<b;相同上标字母表示组间平均值无显著差异($P<0.05$)

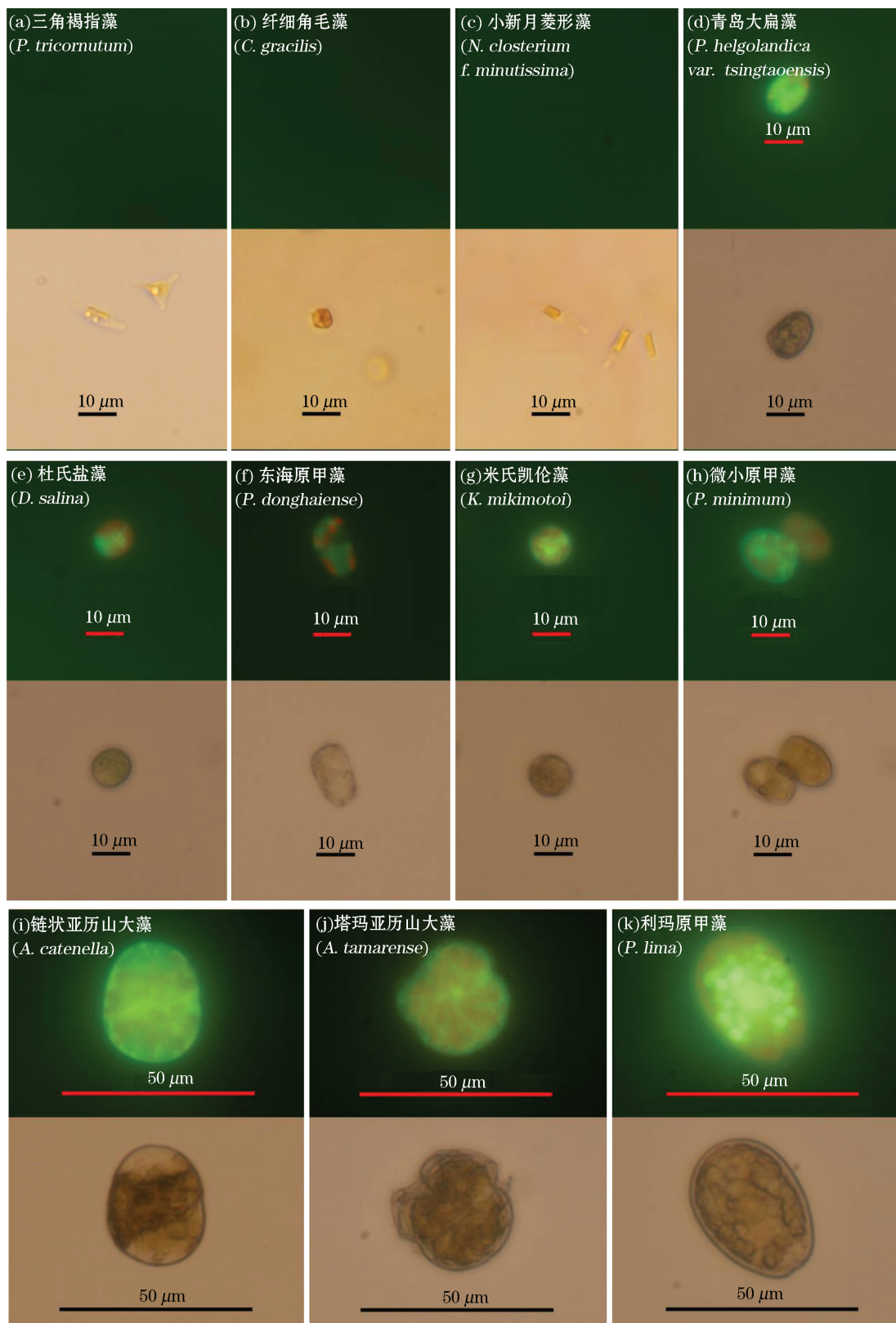


图 3 FDA 和 CMFDA 对 11 株海洋微藻活体细胞的染色效果

Fig.3 The staining effect of 11 strains of microalgae by Fluorescein diacetate (FDA) and 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)

表 5 不同浓度荧光染料染色 10 min 对 11 种海洋微藻的染色效率 (%)

Table 5 The staining efficiency 11 strains of marine microalgae by Fluorescein diacetate (FDA) and 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) (%)

藻种名称	染色方式				死细胞
	FDA	CMFDA	FDA (5 $\mu\text{mol/L}$) +CMFDA	CMFDA (2.5 $\mu\text{mol/L}$) +FDA	
三角褐指藻	0	0	0	0	0
纤细角毛藻	0	0	0	0	0
小新月菱形藻	0	0	0	0	0
青岛大扁藻	95.90 $\pm$ 2.36	95.28 $\pm$ 1.83	98.79 $\pm$ 3.01	97.91 $\pm$ 1.39	0
杜氏盐藻	96.89 $\pm$ 1.31	97.63 $\pm$ 0.98	98.57 $\pm$ 1.57	95.28 $\pm$ 2.12	0
东海原甲藻	97.22 $\pm$ 2.73	98.25 $\pm$ 2.39	99.84 $\pm$ 1.50	97.41 $\pm$ 0.98	0
米氏凯伦藻	98.31 $\pm$ 1.29	98.42 $\pm$ 1.31	99.94 $\pm$ 2.00	97.21 $\pm$ 1.25	0
微小原甲藻	98.15 $\pm$ 2.65	97.15 $\pm$ 1.44	98.20 $\pm$ 0.75	98.51 $\pm$ 1.82	0
链状亚历山大藻	99.13 $\pm$ 1.09	99.79 $\pm$ 2.26	99.17 $\pm$ 1.65	98.49 $\pm$ 2.76	0
塔玛亚历山大藻	98.56 $\pm$ 2.04	98.16 $\pm$ 1.85	99.47 $\pm$ 1.88	98.41 $\pm$ 1.75	0
利玛原甲藻	99.82 $\pm$ 3.07	99.92 $\pm$ 2.64	99.15 $\pm$ 0.85	98.29 $\pm$ 1.79	0

3 结 论

本文利用中性红(NR)、5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CMFDA)、荧光素二乙酸酯(FDA)三种染料对船舶压载水中常见的三个门类中 11 种 10~50 μm 单细胞微藻进行了细胞活性检测,得出以下结论:

1)中性红是测定本实验中提供的全部海洋微藻藻株(10~50 μm)细胞活性的最佳染料,染色效果明显,染色最佳浓度为 1/10 000,染色时间为 30 min。因此可以在压载水处理过程中应用中性红检测 10~50 μm 的海洋硅藻门、甲藻门和绿藻门的微藻细胞活性。

2)采用 FDA 和 CMFDA 检测微藻细胞(10~50 μm)的活性,实际是对微藻细胞膜的完整性及胞内酯酶活性的检测,在荧光显微镜下发出绿色荧光的单细胞微藻具有微藻细胞活性,其中对甲藻门和绿藻门微藻种类具有染色时间短,染色效果明显的特点,染色最佳浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ FDA+2.5 $\mu\text{mol/L}$ CMFDA,染色时间为 10 min。单荧光染料染色与双荧光染料染色无显著差异性。由于海洋硅藻门的微藻不能被荧光染料染色,因此可以在压载水处理过程中应用 FDA 和 CMFDA 检测 10~50 μm 的海洋甲藻门和绿藻门的微藻细胞活性。

参考文献(References):

- [1] NIIMI A J. Role of container vessels in the introduction of exotic species[J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 49: 778-782.
- [2] RUIZ G M, RAWLINGS T K, DOBBS F C, et al. Global spread of microorganisms by ships[J]. Nature, 2000, 408(6808): 49-50.
- [3] ZETSCH E, MEYSMAN F J R. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton[J]. Journal of Plankton Research, 2012, 34(6): 493-509.
- [4] ROY S, PARENTEAU M, CASAS-MONROY O, et al. Coastal ship traffic: a significant introduction vector for potentially harmful dinoflagellates in eastern Canada[J]. Canada Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2012, 69: 627-644.
- [5] VELDHUIS M J W, FUHR F, BOON J P, et al. Treatment of ballast water: how to test a system with a modular concept? [J]. Environmental Technology, 2006, 27(8): 909-921.

- [6] PIMENTEL D, ZUNIGA R, MORRISON D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States[J]. *Ecological Economics*, 2005, 52(3): 273-288.
- [7] BENINGER P G, VALDIZAN A, COGNIE B, et al. Wanted: alive and not dead: functioning diatom status is a quality cue for the suspension-feeder *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Plankton Research*, 2008, 30(6): 689-697.
- [8] 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.
- [9] 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*, 2007, 352(12): 17-26.
- [10] LASTERNAS S, AGUSTI S, DUARTE C M. Phyto- and bacterioplankton abundance and viability and their relationship with phosphorus across the Mediterranean Sea[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 175-191.
- [11] LIABRES M, AGUSTI S. Effects of ultraviolet radiation on growth, cell death and the standing stock of Antarctic phytoplankton[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2010, 59(2): 151-160.
- [12] BUTTINO I, SANTO M D E, IANORA A, et al. Rapid assessment of copepod (*Calanus helgolandicus*) embryo viability using fluorescent probes[J]. *Marine Biology*, 2004, 145(2): 393-399.
- [13] EHARA M, NOGUCHI T, UEDA K. Uptake of neutral red by the vacuoles of a green alga, *Micrasterias pinnatifida*[J]. *Plant and cell physiology*, 1996, 37(6): 734-741.
- [14] YANG H Y. Application of fluorescence microscopy in contemporary studies of plant cell biology[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1986, 4(1): 79-90. 杨弘远. 荧光显微术在当代植物细胞生物学研究中的应用[J]. *武汉植物学研究*, 1986, 4(1): 79-90.
- [15] WANG K, LIANG W Y, WANG J L. The study on neutral red staining of *Microcystis aeruginosa*[J]. 王珂, 梁文艳, 王金丽. 铜绿微囊藻中性红染色研究[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 30(10): 20-22. 环境科学与技术, 2007, 30(10): 20-22.
- [16] PEPERZAK L, BRUSSAARD C P. Flow cytometry applicability of fluorescent vitality probes on phytolankton[J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47(3): 692-702.
- [17] GUILLARD R R, RYTHER J H. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* (Hustedt.) and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962(8): 229-239.
- [18] WRIGHT D A, GENSEMER R W, MITCHELMORE C L, et al. Shipboard trials of an ozone-based ballast water treatment system[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(9): 1571-1583.
- [19] ELLIOTT D T, TANG K W. Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2009(7): 585-594.
- [20] TANG K W, FREUND C S, SCHWEITZER C L. Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes[J]. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2006(68): 499-508.
- [21] LUZ D S D, SILVA D G D, SOUZA M M, et al. Efficiency of neutral red, evans blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*[J]. *Phycological Research*, 2016, 64(1): 56-60.
- [22] 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.
- [23] CHEN L B, LIANG W Y, QU J H, et al. The viability determination of Cyanobacteria by double staining with fluorescein diacetate and propidium iodide[J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 24(5): 554-557. 谌丽斌, 梁文艳, 曲久辉, 等. FDA-PI 双色荧光法检测蓝藻细胞活性的研究[J]. *环境化学*, 2005, 24(5): 554-557.
- [24] CHEN X, YANG X Y, FANG L H, et al. Fluorescein diacetate microplate assay in cell viability detection[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2016, 38(6): 710-714. 陈熙, 杨秀颖, 方莲花, 等. 荧光素二乙酸酯荧光微孔板法在细胞活力测定中的应用[J]. *中国医学科学院学报*, 2016, 38(6): 710-714.

Evaluation of Staining Methods Suitable for Detection of Viability of Marine Microalgae

WANG Shuai^{1,2}, ZHANG Bo³, ZHAO Xi-long^{1,2}, CHENG Ming-jiao⁴,
CAO Wei^{1,2}, XU Xi-yuan^{1,2}, ZHENG Li^{1,2,5}

(1. Key Laboratory for Marine Bioactive Substances and Modern Analytical Technology, SOA, Qingdao 266061, China;

2. The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;

3. HeBei Maritime Bureau, Qinhuangdao 066006, China;

4. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

5. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract: To evaluate a rapid and simple technique for determining viability of 11 strains of marine microalgae (10~50 μm) in the ballast water, three staining dyes (Neutral Red (NR), Fluorescein Diacetate (FDA) and 5-Chloromethylfluorescein Diacetate (CMFDA)) were applied to the living cells and heat killed cells of microalgae. The result showed that NR was the best dye for determining the living cells of all marine microalgae species tested in the study. The optimum staining concentration was 1/10 000, and the staining time was 30 min. CMFDA, FDA and CMFDA + FDA were also available with short staining time, obvious staining effect, but limited application in this study, only suitable for cells of *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*, *Dunaliella salina*, *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi*, *Prorocentrum minimum*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense*, and *Prorocentrum lima*. The optimum staining concentration was FDA (5 $\mu\text{mol/L}$) + CMFDA (2.5 $\mu\text{mol/L}$), and the staining time was 10 min. Based on the results, NR staining method is more suitable for detecting the microalgae cell viability in ballast water.

Key words: marine microalgae; viable staining; neutral red; 5-chloromethylfluorescein diacetate; fluorescein diacetate; ballast water

Received: January 24, 2018