

海洋浮游植物快速鉴定与监测技术

孙 军^{1,2,3}, 宋煜尧^{1,3}, 刘海娇^{1,3}

(1. 中国地质大学(武汉) 广州南沙地大滨海研究院, 广东 广州 511462;

2. 中国地质大学(武汉) 生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074;

3. 天津科技大学 印度洋生态系统研究中心, 天津 300457)

摘 要: 浮游植物因巨大的“蓝碳”潜力, 有助于国家实现“碳达峰”、“碳中和”目标, 是碳计量的重要研究对象。浮游植物种类繁多, 细胞结构、形态、丰度差异大, 与之关联的分类鉴定工作一直是学界研究重点及难点。高通量基因测序、微流控、高灵敏度等新型生物检测技术的研发是适应海洋浮游植物分类和快速监测需求的。通过综合分析浮游植物鉴定与监测的经典技术方法、快速鉴定与监测技术的发展动态和研究应用进展, 并使用 VOSviewer 对浮游植物的自动监测相关文献进行计量分析, 以期为浮游植物分类及生态等相关研究人员拓展研究思路、提升研究效率提供帮助。

关键词: 浮游植物; 分类; 快速监测技术; 显微镜技术; 流式细胞技术; 光谱分析; 文献计量分析

中图分类号: Q179.1

文献标志码: A

文章编号: 1671-6647(2022)04-0701-16

doi: 10.12362/j.issn.1671-6647.20220521001

引用格式: 孙军, 宋煜尧, 刘海娇. 海洋浮游植物快速鉴定与监测技术[J]. 海洋科学进展, 2022, 40(4): 701-716. SUN J, SONG Y Y, LIU H J. State-of-the-art rapid identification and monitoring techniques for Marine Phytoplankton[J]. Advances in Marine Science, 2022, 40(4): 701-716.

海洋浮游植物是营浮游生活的藻类, 一般为单细胞生物, 细胞粒径由 $0.6\ \mu\text{m}$ 到几毫米不等, 虽个体微小, 但种类繁多, 据不完全统计有 3 万多种。海洋浮游植物是海洋中最重要的初级生产者, 启动了海洋生态系统的食物链, 其生物量可以占到海洋所有生物颗粒物的 66.6% 以上, 以至于在一定程度上可以影响海洋光和热通量, 甚至水体动力过程, 从而响应和影响着全球气候变化。浮游植物构成了海洋“蓝色碳汇”的重要组成部分, 占全球初级生产水平的约 50%^[1-2], 通过吸收营养盐等调控海水的生源元素, 因此在全球的生物地球化学循环中发挥着重要作用。浮游植物这一活跃碳库不仅能影响调控全球气候变化^[3-4], 还有很高的经济价值, 如直接影响渔业资源等海洋生物资源分布^[5], 作为原材料越来越多地应用在现代生物技术、海洋药物、食品保健、生物饲料、建筑装饰等方面^[6-9]。其兴衰可形成“海洋绿洲”或“海洋荒漠”, 虽生长周期短, 但对环境变化能快速做出应答反应, 对整个海洋生态系统的影响作用甚巨。

浮游植物相关的调查研究是海洋生态调查和环境监测的常规任务。为满足日益增长的科学研究和海洋环境监测的需要, 发展浮游植物快速检测方法已成为近 20 a 来学界一直关注的焦点^[10-13]。浮游植物种类繁多, 主要包括硅藻、甲藻、蓝藻、金藻、绿藻和隐藻等, 分类体系庞杂。所有物种的分类基础是其遗传物质的差异, 即 DNA 编码差异, 基于此形成独立的分子分类系统学, 而形态分类则是基于这些 DNA 编码翻译后蛋白的诊断特征(保守特征)分类。在这 2 种基础分类的外延部分, 又延伸出其他的分类体系, 最常见的是化学物质分类, 如基于浮游植物的初级生产者特质, 围绕光合过程的有色素分类和光学分类。除了传统意义上基于个体生物阶元的自然分类外, 还可从应用的角度进行分类, 如依据诊断特征可量化的数量分

收稿日期: 2022-05-21

资助项目: 国家重点研发计划项目——渤海湾生态环境监测评估及污染控制技术研究(2019YFC1407800)

作者简介: 孙 军(1972—), 男, 教授, 博士, 博导, 主要从事生物海洋学方面研究. Email: phytoplankton@163.com

(高 峻 编辑)

类,如从浮游植物在生态系统中的功能不同进行归类,划分为不同功能群(硅质化、钙质化、产生 DMS、有毒、超微型等类群)和个体形态功能类群等^[13-14]。准确的浮游植物分类和鉴定是保障浮游植物研究和应用的先决条件,通过分析有关浮游植物识别、鉴定方法和技术的现状和前沿进展,以期为浮游植物相关科学研究或环境监测工作提供技术选择或技术融合的参考。

1 基于细胞形态的快速鉴定

浮游植物是一类具有高多样性的群体,细胞大小、形态、生物化学组成等特征差异极大,其分类学体系较为复杂^[15-16],浮游植物分类的多种技术方法得以不断完善和发展也是基于这些特征不断被细化和深入刻画。20 世纪以来,基于量化的分类特征出现了数量分类法(numerical taxonomy),使用计算机辅助鉴定技术被应用到海洋浮游植物分类中,发展了计算机分类检索表、神经网络等类型^[17]。基于此开发出的专门针对浮游植物分类鉴定的生物信息数据库,比较有名的如 AlgaeBase (<https://www.algaebase.org>)和 WoRMS (<https://www.marinespecies.org>),按照浮游植物生物分类单位以及形态特征实现索引,通过索引实现快捷对比,定种定名。中国学者创建的中国沿海常见浮游植物数据库,涵盖了物种分类、形态和生态信息等方面内容^[18-21]。特别是其中对赤潮生物样品不同角度的拍摄,获得了大量清晰的细胞形态特征图像集。

1.1 显微技术

光学显微镜是在生命科学和环境监测等领域应用最广的工具之一。影像系统不断提高的时空分辨率促进了光学显微镜在科学研究中的应用。更多包含新技术的显微镜应运而生,如明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、全息显微镜、荧光显微镜和拉曼显微镜等^[22]。荧光显微镜和共聚焦显微镜是应用最广的成像设备,如荧光显微镜可实现在大视场快速获取荧光标本,但不能提供光切片(形成虚拟光切片);而共聚焦显微镜可解决这一问题,但在实时成像应用中容易受到光漂白的强烈影响。光片荧光显微镜(Light Sheet Fluorescence Microscope, LSM)是一种有别于激光共聚焦显微镜的新型荧光显微镜,具备低光损伤、低光漂白且分辨率高等优点,并能快速实现活体细胞样本较高的时空连续性记录^[23-25]。胡金虎等^[26]对 LSM 进行优化后观测较大活体样品,实现了视场和分辨率的提升。近十几年来,超高分辨显微成像技术的发展克服了传统光学显微成像技术瓶颈式的“衍射极限”问题,其与各种显微技术的融合,促进了生命科学等相关领域的快速发展^[27-29]。

1.2 图像识别技术

浮游植物分类学家在对浮游植物样品进行分类鉴定时,主要观察浮游植物的形态特征,如大小、形状、结构等。依靠人眼的传统分类鉴定,对研究人员进行培训的过程费时费力,除需学习基础的藻类知识,还需要在观察大量图集的基础上,进行大量样品的实际分类鉴定练习。训练计算机进行图像识别的过程与其相似,根据不同的图像识别算法对大量图集进行分类训练。使用图像识别进行分类的难点与人工识别难点相似,如样品中可能存在沙砾等杂质干扰,相似的藻类的结构、粒径辨识难度大,同一藻类的不同发育时期和观察视角不同差异较大等;不同的是图像识别算法可以通过不断优化观测结果和真实物种的相似程度,最终得到物种丰度、大小及分布。

Pech-Pacheco 等应用图像捕捉处理对墨西哥 Todos Santos 湾的 5 种角藻进行自动识别,获得了较高的准确率(90% 以上)^[30];1998 年至 2001 年 ADIAC(Automatic Diatom Identification And Classification)项目通过图像识别技术,结合其基于硅藻细胞轮廓等形态结构构建的硅藻图像数据库,实现了部分淡水硅藻的自动识别和分类,其中多种硅藻的识别率达到了 90% 以上。中国早期的研究主要集中在浮游植物特征的提取方面,随着与国际交流的深入和计算机水平的发展,通过训练算法对海洋浮游植物进行图像识别逐渐成为热点研

究之一。

浮游植物图像自动识别可以分为获取图像和识别图像。在实验室的藻类分类鉴定中,常使用的方式有数字光学显微镜、成像流式细胞仪(Imaging Flow Cytometer, IFC)、数字全息显微技术等。传统的流式细胞仪无法获取细胞的形态及结构特征,而在其与显微成像技术结合后,可以对每个细胞进行成像,获得全面的浮游植物细胞数据,弥补了无法获取监测细胞图像的短板,圆满完成细胞计数、粒径计算、叶绿素荧光值测定等任务。该技术利用细胞自发荧光,无需染色标记^[31-34]。王雨等^[35]综述了流式细胞摄像系统(Flow Cytometer And Microscope, FlowCAM)在海洋浮游植物分类研究中的应用前景,指出直接识别自然水体中的浮游植物的准确度还待优化;孙军^[19]建立了基于 FlowCAM 的海洋浮游生物现场快速监测专家系统,建立了中国近海微、小型浮游生物图谱数据库,可实现快速图像检索;厦门大学的实验研究人员采用 FlowCAM 技术初步建立了福建南部海域赤潮生物图谱数据库,满足快速监测和鉴定部分赤潮生物及其他浮游植物的工作^[1]。近 5 a 来,研究人员致力于开发小型化、高分辨率、高灵敏度的流式细胞成像设备,部分满足了浮游植物现场监测需要^[36]。

成像流式细胞仪获得的图片是二维图像,为了获得更加完整的图像信息,研究人员尝试从二维图像转为三维全息图像。1966 年,美国科学家使用全息成像技术记录了水下浮游植物组织,并开发出第 1 个海底全息照相机^[37]。为了获得更好的拍摄效果,传统的光学全息成像逐渐迭代为数字全息成像,使用计算机处理更多的全方位特征。为了提升细节刻画效果,引入高分辨率的显微物镜发展为数字全息显微技术,实现了自动聚焦和图像融合^[38]。

不管是成像流式细胞仪拍摄的图片还是数字全息成像拍摄到的图像,都需要再进行特征处理才能完成图像分类工作。一般使用仪器配套的软件进行快捷处理。现在随着算法水平的提高,图像识别的精度和准度有了大幅提升,如作为图像模式识别重要环节的图像特征提取、图像降噪等。使用机器学习相关算法已发展到更复杂的深度学习算法,如贝叶斯算法、聚类树算法、支持向量机算法等结合图像特征对藻类进行识别。国内外学者已使用多种能提高图像识别能力的算法,Loke 等^[39]使用贝叶斯分类算法进行藻类识别,运用了新的轮廓特征,有较高的识别率;汪振兴等^[40]使用遗传算法和神经网络对部分赤潮藻类图像进行分类识别,对 3 种藻类做到了分类识别;王锐等^[41]结合主成分分析和支持向量机对胶州湾浮游生物活体图像进行分类识别,获得了较高的正确率;Lin 等^[42]使用支持向量机对藻类进行图像识别,与独立的分类器相比获得了更高的准确率。大多数研究集中在赤潮藻类分类鉴定的原因还要归结于赤潮带来的日益突出的生态环境问题。图像识别和显微技术应用对比三元图(图 1),表明图像识别有更广的适用范围和速度,但使用显微镜进行镜鉴比较依赖研究人员的经验。一位优秀的分类学家可以凭借专业资料和经验的积累实现对相关海域的浮游植物进行精确到物种的鉴定,但是无法快速完成。

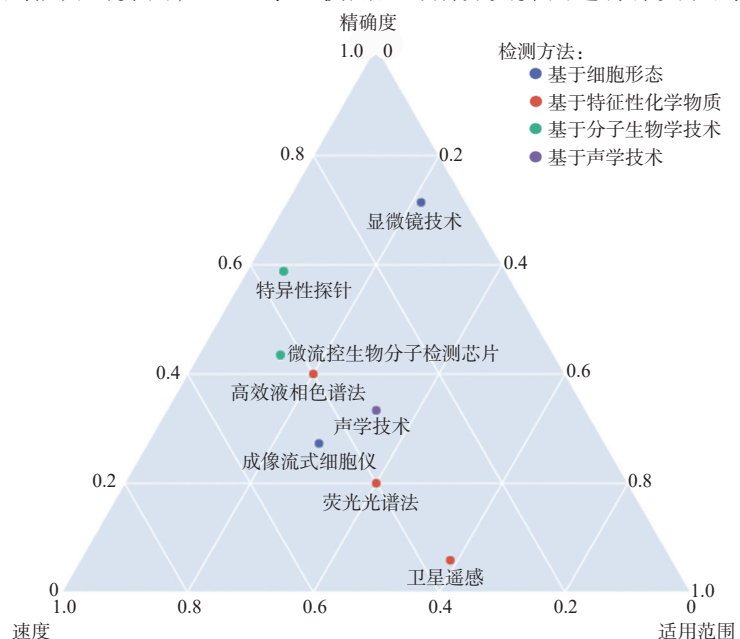


图 1 浮游植物分类鉴定方法适用性三元图

Fig. 1 Ternary diagram of the applicability of taxonomic identification methods for phytoplankton

2 基于特征性化学物质的快速鉴定

浮游植物是定义生态健康状态的重要标志性生物。处于污染生境中的浮游植物等水生生物可被视为检测化合物对环境健康状况的生物指示物,因此这些生物产生的特征性化学物质(生物标记物)能作为环境监测中的预警标志^[43]。特征性化学物质的应用最初是出现在药理/毒理学领域,之后被应用到环境评估/监测领域。低等生物的生物标记物中的分子、色素、脂肪酸、脂类和酚类等识别,是评估生态系统健康状况和人为影响程度的良好指标。其中色素和脂肪酸是浮游植物中应用最广泛的生物标记物^[44]。甾醇作为化学分类生物标记物与脂肪酸联用或将促进浮游植物分类。由于脂肪酸对较高营养级生物有巨大的营养价值,因此被用作营养标记,为深入了解深海和底栖食物网的消费者饮食结构提供线索^[45-46]。基于脂肪酸的贝叶斯混合模型已成功用于浮游植物群落结构研究^[47]。

2.1 高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

使用高效液相色谱法测算浮游植物的色素比值及组成可实现对浮游植物的分类鉴定。随着对藻类特征色素的深入研究,研究人员发现不同种类的浮游植物具有不同的特征色素比值,并可据此确定浮游植物丰度^[48]。1984年Wright等^[49]最早使用高效液相色谱法分析浮游植物的光合色素,给出了44种色素的洗脱顺序。焦念志等^[50]使用高效液相色谱法在东海检测到原绿球藻的特征色素,初步确认了原绿球藻的存在。陈纪新等^[51]在分析东海及南海北部的浮游植物的特征光合色素和色素组成时使用了高效液相色谱法,但仍需结合其他浮游植物分类的分析方法。色谱开发软件的发展有助于HPLC色素分析方法获得更高的色素分辨率和更理想的分离效果,增加了其普适性^[4],如CHEMTAX软件是Mackey和Higgins开发的化学分类软件,通过优化每一类浮游植物色素比值矩阵,定量确定浮游植物群落组成^[52]。陈纪新等^[51]、Furuya等^[53]分别使用该软件分析了浮游植物的群落组成和丰度等特征。高效液相色谱仪操作复杂,对浮游植物的分类只能精确到大的类群水平、精度不高、准确度差,这些局限性限制了该方法的应用,但在浮游植物低丰度海区的鉴定工作中可以获取一些稀有类群可能存在的信息,可作为浮游植物分类的一个补充。

2.2 荧光光谱法

荧光光谱法以测定浮游植物叶绿素含量为基础,因浮游植物的非主要色素、能量传递、色素组成特征等都会影响浮游植物的荧光光谱特性,研究人员根据不同的荧光光谱对藻类进行分类。由于其成本较低、便于现场监测、能快速分析大量浮游植物样品的特点,在海洋浮游植物群落鉴定中有广泛应用。Beutler等利用5个激发波长(450、525、570、590、610 nm)的浮游植物叶绿素激发荧光光谱,实现了浮游植物群落门水平上的快速分类鉴定(硅藻、甲藻作为混合藻分类)。并基于此项技术研制出了BBE藻类分析仪,用于测定实验室浮游植物样品以及现场测量海水样品,同时对浮游植物群落进行快速便捷的定性定量分析^[54]。由于中国海域硅藻和甲藻的生物量较大,且包含多种赤潮藻类,赤潮藻类的细分是我国的重要研究方向。李林川等开发了一套海洋赤潮生物荧光实时采集系统,并基于LabVIEW开发了相应系统软件,能有效地预测赤潮爆发的可能^[55]。卢璐等利用四阶导数光谱法对部分硅藻、甲藻混合样品的叶绿素荧光激发光谱进行处理,消除干扰,提高了对硅藻和甲藻的识别能力^[56]。随着三维荧光法的开发,获得了更丰富的信息,在海洋浮游植物分类鉴定的研究中对浮游植物进行更细的划分,张前前等建立了浮游植物的标准荧光光谱谱库^[57]。段亚丽等对实验室培养的52种浮游植物的三维荧光光谱进行小波分解,提取识别特征谱,完成门水平上的识别和部分赤潮种属水平上的识别^[58]。在这一研究中,化学计量学方法以及深度学习方法^[59]也发挥重要作用。在三维荧光光谱谱图的基础上,应用步骤分类思想,可以实现浮游植物物种水平的精细分类。如李鸿羽等^[12]通过多元统计分析,应用三维荧光逐层分类方法,实现了中国近海26种常见硅藻、甲藻的高准确率识别,该方法可以应用到现场海水浮游植物种类的快速监测。

2.3 吸收光谱法

吸收光谱法与荧光光谱法相似, 起决定光谱特征作用的是非主要色素的影响。其原理是基于浮游植物对可见光的吸收光谱, 具有仪器操作简单, 成本较低等优点。随着化学计量学的发展, 吸收光谱与数学方法结合能够更好地提取出特征光谱^[60]。研究人员尝试使用逐步判别分析、主成分分析、神经网络^[61]、多层感知器模型^[62]等多种方法对海洋浮游植物吸收光谱进行定性定量的处理和分析。不论是通过各种方法反演出特征色素的绝对浓度和相对比例, 还是从吸收光谱中更准确地提取特征光谱, 都是浮游植物正确分类鉴定的依据, 虽然不能提高浮游植物分类的精确度, 但提高了计算细胞丰度的准确度, 在赤潮藻的分类鉴定中有重要作用。

2.4 卫星遥感

卫星遥感技术的发展弥补了传统航次调查无法进行的大范围的长期连续性观测的劣势, 降低了出海调查的人力物力等成本。在快速获取理化参数的同时, 还具有监测功能, 如监测到高叶绿素值区, 更早地发现赤潮现象。1978 年, 美国发射了世界上第一颗海洋卫星, 尽管在轨寿命仅 3 个月, 但其观测效率和观测方式极大地拓展了研究人员的视野^[63]。不同浮游植物类群的遥感信号有不同的光谱特征, 研究人员综合遥感信号和航次现场调查, 提出了 PHYSAT 算法, 通过原位测量大量的光合色素数据与离水辐射率建立经验关系, 使用遥感数据中 5 个可见光波段的离水辐射率区分优势浮游植物^[64]。在使用遥感研究浮游植物的过程中, 仅获取 Chl *a* 浓度无法满足深入探究浮游植物的种群组成的特征数据, 因此使用浮游植物类群遥感反演方法提高精度十分必要。赵海阳等使用多种方法(波段组合法——基于奇异值分解的 XGBoost 回归法)进行浮游植物类群遥感反演研究, 建立了硅藻 Chl *a* 浓度反演模型^[65]。多种基于化学生标的方法适用于不同场景, 高效液相色谱法是主流的叶绿素测量工具, 荧光光谱通过特征提取可以获得更高的准确度, 卫星遥感适用于大范围的业务化的监测。光学仪器可以搭载在多种平台, 研究人员可以根据需要进行大尺度的生态调查, 分类鉴定应用的区分见图 1。

3 基于分子生物学技术的快速鉴定

部分浮游植物的形态学特征较为相似, 使用显微镜难以分辨。随着分子生物学的发展, 研究人员可以通过特异的功能基因, 如核糖体基因、增殖细胞核抗原基因等, 分析基因序列, 区分难以用形态特征进行观测的浮游植物类群。目前分子生物学技术已被广泛应用于浮游植物物种鉴定、系统发生、生态功能、代谢机理研究等方面。不同物种水平上的遗传多样性的研究无需进行分离和培养, 主要基于分子标记和核酸序列(如桑格测序、新一代测序技术、焦磷酸测序、连接测序、合成测序等)^[66-68], 经历了从同工酶电泳、限制性片段长度多态性(RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、DNA 单链构象多态性(SSCP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、探针技术到微流控等发展历程^[69]。

3.1 特异性探针

核糖体中的 18S、5.8S、28S rDNA 序列结构保守, 是属水平上应用较多的分子指标; 而 rDNA 基因的內转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)序列为高变区域, 序列变化与进化距离相适应, 通过该分子指标进行属下种间水平的研究^[70]。Medlin 等^[71]根据 4 株骨条藻(*Skeletonema*)基因测序结果进行分析, 发现了 1 株新种(*Skeletonema. pseudocostatum*)。陈月琴和曾陇梅^[72]使用 RELP 分析等方法进行亚历山大属的研究, 分析链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium. tamarens*)的 ITS 区。Alexander 等^[73]测量马尾藻海西北部研究点 12 a(1991—2004 年)的浮游植物样品的 16S rRNA 基因序列, 确定长时间尺

度上的物种分布模式和浮游植物的演替情况,并建立了春季藻华模型,揭示了产生藻华的驱动条件。

定量 PCR 属于核酸分子探针技术, Humbert 等^[74]论述了使用 PCR 技术识别和量化有毒浮游植物物种及其毒素的可行性,借助不断增加的微生物序列数据的数据库,对部分物种可以鉴定到种。目前在浮游植物的研究过程中使用新的实时荧光定量 PCR 监测的方法,通过使用荧光染料或荧光标记的分子探针实时检测扩增产物实现对目标的定量检测^[70]。Yuan 等^[75]使用荧光定量 PCR 技术对东海常见的 3 种赤潮藻进行检测和定量分析,并与镜鉴结果进行对比,发现检测效果基本一致,证明荧光定量 PCR 技术能够做到精确定量。

DNA 探针技术在海洋浮游植物检测中应用广泛,分子探针可用于区分物种特异性 RNA 和 DNA 序列,以快速识别引起有害藻华的物种^[76]。对目标藻类进行特异性探针杂交可实现快速鉴定,如荧光原位杂交技术已成功用于浮游植物种群时空分布和赤潮监测^[77-80]。特异性探针还包括“三明治”杂交(Sandwich Hybridization Assay)和微阵列(Mirco)等^[81]。“三明治”杂交法使用 2 个探针,分别用生物素和荧光素标记,直接检测 rRNA 基因的表达量。ZHEN 等将该方法与核酸酶保护法结合,对有害藻华进行定量分析,具有一定的可靠性和准确性^[82]。免疫检测技术源于生物体对非自身物质会产生免疫反应,有毒藻类的相关研究的基础是用抗体识别其细胞表面的特异性抗原,利用特异性的抗体实现快速鉴定。但在自然水体中存在某些微生物可能与抗体发生非特异性免疫交叉反应,导致进行定量分析时出现偏差^[83]。

探针等技术大多只能进行单一赤潮物种的监测。末端限制性片段多态性(T-RFLP)、克隆文库技术、高通量测序技术也广泛应用于环境生物多样性中^[84]。近年来,基于大视场荧光显微镜出现一种新兴核酸检测技术,即数字聚合酶链式反应(dPCR),基于单分子目标基因扩增实现绝对定量;相比传统图像拼接技术,dPCR 结合神经网络系统,大大提高了检测效率^[85-87]。现在已发展出可同时实现多物种监测的分子技术,如多重聚合酶链式反应(multiplex PCR, qPCR)、基因芯片、大规模并行测序、抗体芯片、多重等温扩增等,这已成为环境生态中分子监测技术的新趋势^[88]。此外,以靶向或非靶向 RNA 或蛋白质的方法表征浮游植物群落结构功能多样性的技术也有很大进展,通过数据解释的不断深入而提升^[68]。这些都可以辅助浮游植物分类学家进行更精确准确地鉴定。

3.2 微流控生物分子检测芯片(Microfluidic Biochemical Detection Chip)

微流控芯片又名“芯片实验室”(Lab On a Chip, LOC),在单一的微芯片中集成了一系列的生物和化学操作,促进了细胞组学到化学工程等众多领域发展。LOC 设备的核心是含有众多可处理样品的微通道,微通道的横截面大小从几十微米到上百微米不等,能检测小体积的液体,通常为 10^{-9} 到 10^{-18} L^[89]。微流控生物化学检测系统可同步捕获单细胞的 DNA 和 RNA 用于基因组的生物信息分析^[90-91]。Zheng 等^[92]应用了一套可通过感知海水中浮游植物运动能力快速实现高通量污染物毒性评价的微流控芯片设备。同样根据浮游植物细胞的运动状态, Song 等^[93]应用微流控芯片进行了活体细胞的电动监测和分离,以此评估了压舱水中浮游植物的存活率。Hou 等^[94]研发了一套由微流控芯片、定制荧光影像平台和智能手机组成的监测设备,当活体藻细胞通过芯片的激光照明区所激发的叶绿素荧光可实时显示在手机端,手机端的算法可检测并量化藻细胞个数和大小,该方法能够区分活体和死亡藻细胞。

微流控光学技术(Optofluidics)结合了微流体处理和光学高灵敏度检测的优势^[95-97],主要包括 2 种方式:芯片外和芯片内。前者基于微流控芯片与外部光学元件连通,测量灵敏度较高,缺点是光学与流体微通道的校准较为复杂,且芯片的便携性差。而后者则基于完全集成在微流控平台中的光学元件,保证了设备的简洁性和便携性,不同元件的组合较为稳定。微流控光学的发展促进了 LOC 对单细胞及其他生物样本的培养、分析和操纵^[98]。检测微流控生物样本依赖于光学影像,但传统影像必须将微流控通道置于标准台式光学显微镜,降低了使用灵活性。近年来的集成光学元件或无透镜成像方法可实现光学成像技术在 LOC 的应用,如明视野显微镜、全息显微镜、相差显微镜、荧光显微镜等。总而言之,芯片实验室的优点包括①设备小巧,减少了试剂、溶剂和样本用量;②工艺集成处理降低了成本以及样品污染的风险;③微流控

系统能够自动进样, 光流控平台和高通量技术的结合, 大大增加了自动化、简洁性和便携性, 实现了样品的快速、批量处理。因此 LOC 通过光学和流体元件的集成工艺, 可突破标准显微镜的局限性, 这种至少一个光学组件集成的 LOC 设备, 又被称为“显微镜芯片”(Microscopes On Chip, MOC)^[99-100]。通过光流控手段进行单细胞基因组 (Single-cell Genomics, SCG) 扩增是目前较新颖的技术, 可实现细胞的可视化和分选, 进而从小体积细胞悬浮液得到基因组序列。Landry 等^[101]应用光流控单细胞基因组扩增在马尾藻海西北部获得了浮游生物细胞基因组序列, 能有效地检索不同的单细胞基因组。分子领域追求准确性, 所以都能实现较好的精确度。在实际应用中, 特异性探针可能会受到环境的影响, 而微流控芯片有快速、灵敏、高通量和低成本优势和广泛的适用性, 在应用场景的适用性见图 1。

4 基于声学信号的快速鉴定

水声技术常用于渔业资源中对大型鱼类的探测, 主要用于鱼群评估和行为监测, 在监测浮游动物的数量和分布时经常使用。研究人员利用声学遥感和声音传播的变化发现海洋中的生命和物体, 应用声学物理的方法探索未知的海洋, Simmonds 和 Macleaman、Medwin 分别研究了一种水声技术, 用于原位估计海洋生物量^[102-103]。

2010 年, Bok 等、Kim 等提出了使用高频超声实时监测赤潮物种的方法, 使用声学向后散射信号对赤潮藻进行估计。因为生物体体积小, 需要用到非常高的频率, 这要求声学系统必须能够检测到非常低的后向散射压力水平。在原位调查中, 浮游动物、船舶形成的湍流等都会对测量结果产生影响, 故对于异常信号的处理尤为重要。在近 10 a 的研究中 Kim 等开发了使用超声波的赤潮生物声学传感系统, 并在实验室及野外条件下进行测试, 验证了利用高频超声测量赤潮物种向后散射信号的可行性, 发现该信号随着细胞数量的增加而增加^[104-105]。Hofmann 和 Peeters^[106]在德国安默湖使用 3 种不同频率的声学反向散射设备 (614 kHz、2 MHz、6 MHz) 进行原位探测并进行侦听, 测试在存在其他浮游生物的情况下蓝藻的分布情况。结果表明在藻类共生的情况下, 仅依靠声学测量可能相当困难, 但和光学原位技术相结合, 可能区分不同物种。2019 年在韩国近海的 2 种赤潮物种声学特性的研究中, Kim 等发现物种接收声信号与细胞丰度成正比^[107]。

声学特性的相关研究为今后的赤潮监测提供了新的方法, 如能快速确定赤潮种的丰度水平, 在赤潮的初期阶段就能完成预警监测。对于其他散射源的辨识和其产生干扰的清除, 是该技术提升的方向, 与其他原位技术结合的新发展也让人拭目以待。这些技术今后应用于海洋浮游生物分布、悬浮颗粒探测等方向的前景可期^[104]。

5 利用 VOSviewer 软件对浮游植物快速监测文献进行计量分析

VOSviewer 软件近年来常用于文献计量分析, 其可视化图像直观效果好, 便于多参数特征组合, 可以把握文献中的关键内容以距离解构出相互关系^[108], 不同关键字之间的距离决定其相似程度, 颜色决定聚类类别, 大小表示出现频次, 连线的粗细则表示两者之间关联程度。为了探究浮游植物快速监测研究的现状, 选择 VOSviewer 软件进行文献计量分析工作, 结果可更好地掌握研究现状和发展规律, 为未来研究方向提供参考。

5.1 研究现状

在 Web of Science 核心数据库中进行检索, 检索式使用“phytoplankton and rapid and (detection or monitoring)”, 最终得到 616 篇有效文献(图 2)。浮游植物的快速监测技术论文见刊始于 20 世纪 90 年代, 发表文章呈现波动上升的趋势, 近 4 a 达到较高水平, 2018 年和 2021 年发文量超过 50 篇, 是 1999 年的 5 倍。

这表明浮游植物分类鉴定技术有了长足的发展,更多的研究人员在追求更快、更准确的多种技术融合实践中探索。

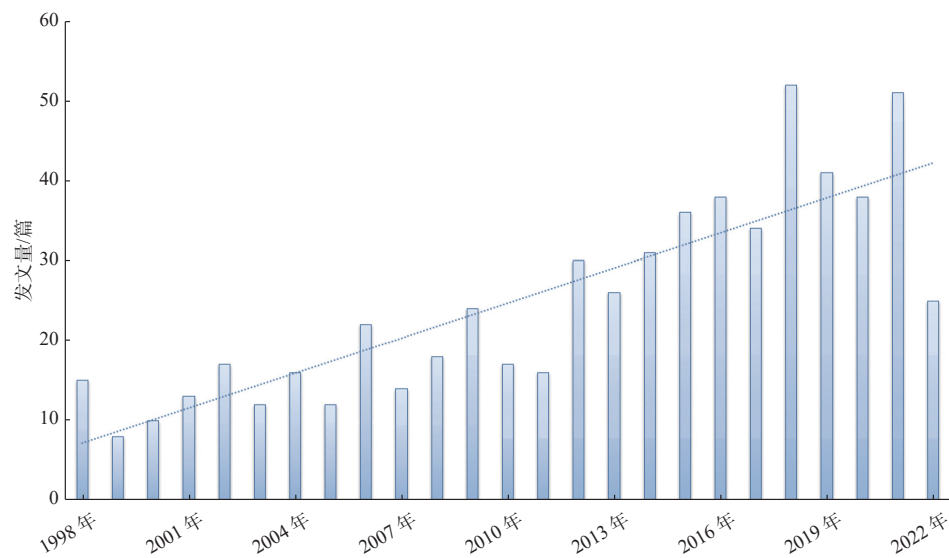


图 2 浮游植物快速监测研究文献数量年际变化

Fig. 2 Interannual variation in the literature on rapid phytoplankton monitoring studies

统计发现发文较多的机构包括法国国家科学研究中心、中国科学院、加州福尼亚大学等,其中中国科学院和法国国家科学研究中心分别发文 36 篇,并列第一位(图 3)。科研机构和研究型大学之间的合作促进了双方科研水平的共同发展。



图 3 浮游植物快速监测研究发表文章数量前 10 的机构

Fig. 3 Top 10 institutions for rapid phytoplankton monitoring studies

分析工作表明,美国、加拿大与欧洲国家有较多数量的文献贡献、工作开展时间早,彼此之间合作紧密。国际间交流主要以欧美为主,欧洲内部又有区分。聚类一表示与美国有深入交流的国家,聚类二和聚类三则分别表示与德国和英国各国有更多交汇(图 4)。中国对于浮游植物快速监测的研究起步较晚,但后来居上,学术上与美国保持密切联系,并保持良好的文献产出。文献计量分析揭示在实际应用中,为了实现更准确的分类鉴定,研究人员在实践中对多种鉴定技术的灵活使用趋于成熟。随着多学科交叉、前沿科学的规模扩增,应加强国际的合作,从多种角度、全方位拓展快速检测的应用领域。

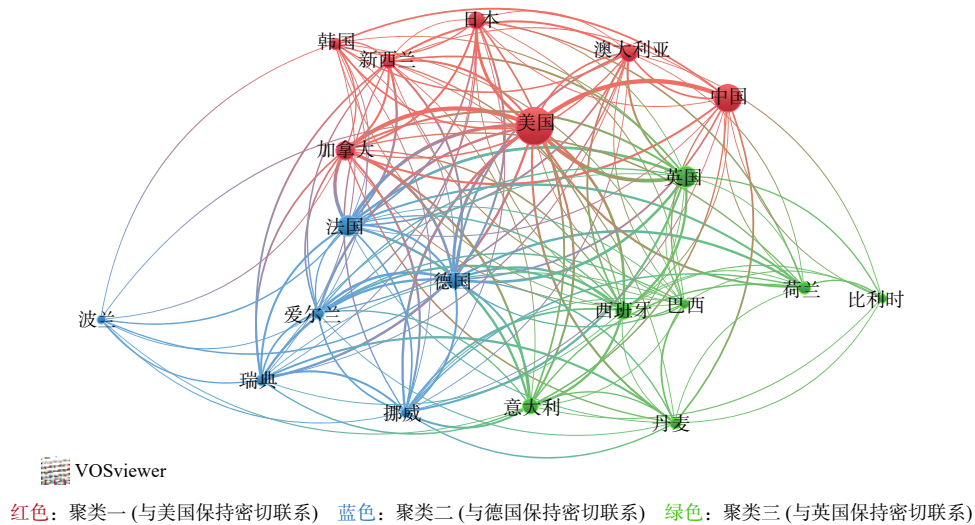


图 4 浮游植物快速监测研究作者合作图

Fig. 4 Phytoplankton rapid monitoring study author collaboration chart

5.2 研究主题

将符合条件的 616 篇文献记录导入至 VOSviewer 软件中并提取出关键词, 选取出现频次 ≥ 15 的关键词, 同时去掉重复项、普通词和与检索项相同的关键词, 最终得到有效关键词共计 37 个, 生成文献计量图见图 5。

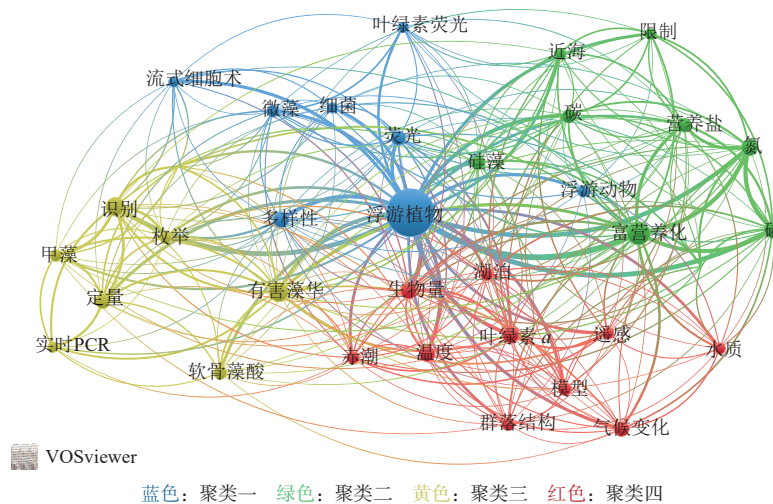


图 5 浮游植物快速监测研究关键字分布图

Fig. 5 Phytoplankton rapid monitoring research keyword distribution map

统计分析表明, 文献关键字聚类为 4 类: 聚类一使用“流式细胞术、荧光法等识别方式”, 主要识别微藻和部分蓝藻; 聚类二“在完成快速监测的同时, 对赤潮频发的沿岸海域的环境进行相关性的分析”; 聚类三主要包括“具有毒性的藻类的鉴定, 借助特异性化学物质和分子生物手段完成对赤潮藻的快速鉴定”, 例如: 软骨藻酸(Domoic acid)等; 聚类四“使用遥感建立模型, 大范围地监测硅藻和蓝藻赤潮”。总体来看大部分研究围绕赤潮物种展开。

从聚类分析中可以发现, 主流的浮游植物快速监测研究集中在浮游植物的化学性质和分子组成上, 与传统人工鉴定的方法比较, 优点在于可快速地进行定性及定量的研究; 缺点在于成本较高, 易受环境影响。

人工鉴定的缺点是培养鉴定人员时间长，鉴定同一批样品的时间与鉴定者熟练度和样品数量相关，且时间跨度大。616 篇文献中关于图像识别浮游植物的文章较少，而随着计算机硬件速度和算法水平的提高，以及图像识别领域算法的更新，其在藻类识别领域有较大的发展空间。然而，对图像识别进行训练需要大量的图集，收集工作也非常耗时，而且图像识别过程仍然受限于光照等环境方面的影响，不易达成预期效果。

6 结论和展望

浮游植物的分类鉴定从使用显微镜进行观察到利用高通量的生物检测技术经历了长期快速的发展。目前对于大量样品的处理趋向于快速化、精确化。随着显微镜的发展，依据形态学进行分类的显微镜观测将会得到更加清晰的图像，同时流式细胞仪的出现可以快速地处理大批细胞样品，能够快速计数，并得到相关的形态特征。基于细胞物理和化学特性的光学方法，通过记录不同方向的散射光完成浮游植物细胞计数，这在超微型浮游植物的鉴定中起到重要作用^[109]，图像识别技术的整合，是技术交融的产物和技术拓展的方向(表 1)。

表 1 基于细胞形态的检测方法对比
Table 1 Comparison of cell morphology-based assays

鉴定方法	优点	缺点
显微镜监测	可精确到物种，经济实惠，有丰富的历史资料	依赖个人经验，会遗失小细胞，样品量小，无法实时监测
成像流式细胞仪	快速处理大量样品，能监测超微型浮游植物，通过算法可以精确到物种	仪器价格昂贵，需要多学科交融

基于化学指标的浮游植物的特征色素，可同时得到光谱或色谱特征，也可将这两者结合同时获得细胞类群和生物量的数据。与船载雷达甚至卫星遥感结合，可以得到更大尺度的光谱信息，实现原位监测。而为了提升原位监测的精确度等，水下生物图像采集、声波等方式都在进行探索性尝试(表 2)。期待未来产生更加快捷精确的方法进行原位监测。

表 2 基于特征性化学物质的检测方法对比
Table 2 Comparison of detection methods based on characteristic chemical substances

鉴定方法	优点	缺点
高效液相色谱法	应用广泛，可自动化检测	无法精确到物种，前处理繁琐
荧光光谱法	成本低，易用性强，便于使用	无法精确到物种
吸收光谱法	成本较低，易用性强	受环境影响大，无法精确到物种
卫星遥感	数据量大，可实时观察记录	无法精确到物种

从外部到内部，基于细胞遗传物质的分子鉴定手段可以实现更高的精度，弥补了形态学上相似物种难以区分的不足，在物种进化方面的探讨同样出色，不断发展的分子生物技术能够在有效地降低成本的同时提供更精细的数据内容(表 3)。

表 3 基于分子生物学的检测方法对比
Table 3 Comparison of detection methods based on molecular biology

鉴定方法	优点	缺点
特异性探针	数据库庞大，能进行定性定量分析	部分方法易受环境影响产生偏差
微流控生物分子检测芯片	快速、灵敏、便捷、稳定、成本低	研究较少，还处于发展阶段

文献计量学的检索代表了主流的研究方向和研究内容,其中创造性的研究可能被忽视。大数据时代要求科研人员掌握更强的数据处理能力。文献中快速检测方法所获得的数据,都可借助机器学习、深度学习等方式进行分析,获得更多的组合特征信息,有助于提高分类研究的精度和速度。在物种鉴定的应用场景中可以根据实际需要和现有条件进行联动,使不同技术能发挥出优势并互相补充。各种技术方法存在优缺点,将各原理的方法有效地结合到一起是未来技术发展趋势,以实现更快速、准确、高效的监测。

今后的浮游植物快速监测技术会是应用综合的观测和监测技术,结合不断创新性的技术,结合大数据的综合分析及日新月异的应用需求寻找到未来研究新的方向和突破口,甚至是开拓出新的技术领域。

参考文献 (References):

- [1] PTACNIK R, SOLIMINI A G, ANDERSEN T, et al. Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(13): 5134-5138.
- [2] 孙军. 海洋浮游植物与生物碳汇[J]. *生态学报*, 2011, 31(18): 5372-5378. SUN J. Marine phytoplankton and biological carbon sink[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(18): 5372-5378.
- [3] 焦念志. 海洋固碳与储碳——并论微型生物在其中的重要作用[J]. *中国科学:地球科学*, 2012, 42(10): 1473-1486. JIAO N Z. Carbon fixation and sequestration in the ocean, with special reference to the microbial carbon pump[J]. *Scientia Sinica Terrae*, 2012, 42(10): 1473-1486.
- [4] 张传伦, 孙军, 刘纪化, 等. 海洋微生物碳泵理论的发展与展望[J]. *中国科学:地球科学*, 2019, 49(12): 1933-1944. ZHANG C L, SUN J, LIU J H, et al. Advances in microbial carbon pump and prospects for its future research[J]. *Scientia Sinica Terrae*, 2019, 49(12): 1933-1944.
- [5] ZINKE L. The colours of carbon[J]. *Nature Reviews: Earth & Environment*, 2020(1): 141.
- [6] JESTER B W, ZHAO H, GEWE M, et al. Development of spirulina for the manufacture and oral delivery of protein therapeutics[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 956-964.
- [7] 高亚辉, 杨军霞, 骆巧琦, 等. 海洋浮游植物自动分析和识别技术[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(S2): 40-45. GAO Y H, YANG J X, LUO Q Q, et al. Automatic identification and analysis techniques of marine phytoplankton[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 40-45.
- [8] 高亚辉. 海洋微藻分类生态及生物活性物质研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2001, 40(2): 566-573. GAO Y H. Studies on taxonomy, ecology and bioactive products of marine microalgae[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2001, 40(2): 566-573.
- [9] 杨哲斌. 硅藻土在建筑装饰工程或家庭装修中的应用现状[J]. *中国建材科技*, 2014, 23(2): 18-20. YANG Z B. About diatomite in architectural engineering or home decoration[J]. *China Building Materials Science and Technology*, 2014, 23(2): 18-20.
- [10] 张前前, 王修林, 祝陈坚. 赤潮浮游植物种类和数量分析的研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2004, 23(1): 73-76. ZHANG Q Q, WANG X L, ZHU C J. Research progress on species and analytical methods of phytoplankton in red tide[J]. *Marine Environmental Science*, 2004, 23(1): 73-76.
- [11] LI J P, XU Z N. Simultaneous dual-color light sheet fluorescence imaging flow cytometry for high-throughput marine phytoplankton analysis[J]. *Optics Express*, 2017, 25(12): 13602-13616.
- [12] 李鸿羽, 张前前, 王修林, 等. 海洋浮游植物三维荧光光谱的逐层分类方法研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2012, 42(Z2): 117-125. LI H Y, ZHANG Q Q, WANG X L, et al. Tiered classification approach for three-dimensional fluorescent fingerprints of marine phytoplankton[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(Z2): 117-125.
- [13] 杨文, 朱津永, 陆开宏, 等. 淡水浮游植物功能类群分类法的提出、发展及应用[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(6): 1833-1840. YANG W, ZHU J Y, LU K H, et al. The establishment, development and application of classification approach of freshwater phytoplankton based on the functional group: a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(6): 1833-1840.
- [14] 田永强. 淡水浮游植物功能类群划分方法及其生态学应用研究进展(综述)[J]. *亚热带植物科学*, 2015, 44(4): 349-354. TIAN Y Q. Ecological application of classification approach of freshwater phytoplankton based on functional group[J]. *Subtropical Plant Science*, 2015, 44(4): 349-354.
- [15] 孙军, 刘东艳. 中国海区常见浮游植物种名更改初步意见[J]. *海洋与湖泊*, 2002, 33(3): 271-286. SUN J, LIU D Y. The preliminary notion on nomenclature of common phytoplankton in China Seas waters[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(3): 271-286.
- [16] 孙军, 靳少非. 中国近海今生态石藻物种多样性初步研究[J]. *生物多样性*, 2011, 19(6): 787-797. SUN J, JIN S F. Species diversity of living *coccolithophores* in Chinese sea waters[J]. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 787-797.
- [17] 刘伟. 计算机辅助鉴定技术在海洋浮游植物分类鉴定中的应用[J]. *科技信息*, 2008, 277(29): 31-32. LIU W. Application of computer assistant identification technic in marine phytoplankton identification[J]. *Science & Technology Information*, 2008, 277(29): 31-32.
- [18] HE P S, JIANG X H, SU T F, et al. Computer graphics identification combining convolutional and recurrent neural networks[J]. *IEEE Sig-*

- nal Processing Letters, 2018, 25(9): 1369-1373.
- [19] 孙军. 海洋微、小型浮游生物快速现场监测专家系统[J]. 中国科技成果, 2010, 11(15): 14. SUN J. Expert system for rapid in situ monitoring of marine micro and nannoplankton[J]. China Science and Technology Achievements, 2010, 11(15): 14.
- [20] 高华, 梁君荣, 高亚辉, 等. 我国沿海常见浮游植物检索数据库的建立[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(S1): 230-233. GAO H, LIANG J R, GAO Y H, et al. Construction of a database of common marine phytoplankton in coastal waters of China[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(S1): 230-233.
- [21] 周杰, 黄兵. 计算机辅助专家系统在动物分类鉴定中的应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(B12): 24-28. ZHOU J, HUANG B. Application of computer assistant expert system in biology identification[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2006, 24(B12): 24-28.
- [22] MERTZ J. Introduction to optical microscopy[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2019: 185-236.
- [23] PAMPALONI F, CHANG B J, STELZER E H K. Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues[J]. Cell and Tissue Research, 2015, 360(1): 129-141.
- [24] LIM J, LEE H K, YU W M, et al. Light sheet fluorescence microscopy (LSFM): past, present and future[J]. Analyst, 2014, 139(19): 4758-4768.
- [25] 陈炫亦, 李绍军, 陈卫民, 等. 光片荧光显微镜特点及其应用[J]. 生物技术进展, 2021, 11(2): 136-147. CHEN X Y, LI S J, CHEN W M, et al. Characters of light-sheet fluorescence microscope and its application[J]. Current Biotechnology, 2021, 11(2): 136-147.
- [26] 胡金虎, 林丹樱, 张炜, 等. 结合虚拟单像素成像解卷积的双边照明光片荧光显微技术[J]. 物理学报, 2022, 71(2): 363-369. HU J H, LIN D Y, ZHANG W, et al. Dual-sided illumination light-sheet fluorescence microscopy with virtual single-pixel imaging deconvolution[J]. Acta Physica Sinica, 2022, 71(2): 363-369.
- [27] KAFIAN H, LALENEJAD M, MORADI-MEHR S, et al. Light-sheet fluorescence microscopy with scanning non-diffracting beams[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 8501-8512.
- [28] 林丹樱, 屈军乐. 超分辨率成像及超分辨关联显微技术研究进展[J]. 物理学报, 2017, 66(14): 244-268. LIN D Y, QU J L. Recent progress on super-resolution imaging and correlative super-resolution microscopy[J]. Acta Physica Sinica, 2017, 66(14): 2446-268.
- [29] 李文文, 王中阳. 基于量子关联的超分辨荧光显微技术研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(10): 158-172. LI W W, WANG Z Y. Research progress of super-resolution fluorescence microscopy based on quantum correlation[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(10): 158-172.
- [30] PECH-PACHECO J L, ALVAREZ-BORREGO J, et al. Optical-digital system applied to the identification of five phytoplankton species[J]. Marine Biology, 1998, 132: 357-365.
- [31] MAHJOUBFAR A, CHEN C, NIAZI K R, et al. Label-free high-throughput imaging flow cytometry[M]. Bellingham: SPIE, 2014: 8.
- [32] CHEN C L, MAHJOUBFAR A, HUANG A, et al. Hyper-dimensional analysis for label-free high-throughput imaging flow cytometry [C]//2014 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) - Laser Science to Photonic Applications, 2014: 1-2.
- [33] İŞİL Ç, DEHAAN K, GÖRÖCS Z, et al. Phenotypic analysis of microalgae populations using label-free imaging flow cytometry and deep learning[J]. ACS Photonics, 2021, 8(4): 1232-1242.
- [34] DONG K, FENG Y, JACOBS K M, et al. Label-free classification of cultured cells through diffraction imaging[J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(6): 1717-1726.
- [35] 王雨, 林茂, 林更铭, 等. 流式影像术在海洋浮游植物分类研究中的应用[J]. 海洋科学进展, 2010, 28(2): 266-274. WANG Y, LIN M, LIN G M, et al. Application of flow cytometry and microscopy (FlowCAM) in marine phytoplankton taxonomic studies[J]. Advances in Marine Science, 2010, 28(2): 266-274.
- [36] 赵晶晶, 尤政. 微流体流式细胞仪的关键技术[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2018, 58(11): 953-960. ZHAO J J, YOU Z. Key techniques in microfluidic flow cytometers[J]. Journal of Tsinghua University (Science and Technology), 2018, 58(11): 953-960.
- [37] KNOX C. Holographic microscopy as a technique for recording dynamic microscopic subjects[J]. Science, 1966, 153(3739): 989-990.
- [38] TANG M, LIU C, WANG X P. Autofocusing and image fusion for multi-focus plankton imaging by digital holographic microscopy[J]. Applied Optics, 2020, 59(2): 333-345.
- [39] LOKE R E, DU BUF J, BAYER M M, et al. Diatom classification in ecological applications[J]. Pattern Recognition, 2004, 37(6): 1283-1285.
- [40] 汪振兴, 余焱, 姜建国. 赤潮藻类图像自动识别的研究[J]. 海洋环境科学, 2007, 26(1): 42-44. WANG Z X, SHE Y, JIANG J G. Study on automatic recognition for harmful algae images[J]. Marine Environmental Science, 2007, 26(1): 42-44.
- [41] 王锐, 于新生, 唐颖, 等. 图像自动识别技术在海洋浮游生物分析中的应用[J]. 海洋科学, 2007, 31(10): 61-66. WANG N, YU X S, TANG Y, et al. Applications of automatic image identification for marine plankton analysis[J]. Marine Sciences, 2007, 31(10): 61-66.
- [42] KANG L, GONG Y H, YANG C H, et al. Marine phytoplankton recognition using hybrid classification methods[C]//2010 4th International

- Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2010: 1-5.
- [43] LOMARTIRE S, MARQUES J C, GONÇALVES A M M. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems[J]. *Ecological Indicators*, 2021, 122: 1-9.
- [44] TAIPALE S J, HILTUNEN M, VUORIO K, et al. Suitability of phytosterols alongside fatty acids as chemotaxonomic biomarkers for phytoplankton[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1-16.
- [45] DALSGAARD J, JOHN M S, KATTNER G, et al. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment[J]. *Advanced Marine Biology*, 2003, 46: 225-340.
- [46] KELLY J P, SCHEIBLING R E. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs[J]. *Marine Ecology Progress*, 2011, 446: 1-22.
- [47] DIJKMAN N A, BOSCHER H T S, MIDDELBURG J J, et al. Group-specific primary production based on stable-isotope labeling of phospholipid-derived fatty acids[J]. *Limnology and Oceanography, Methods*, 2009, 7(8): 612-625.
- [48] 邓春梅, 姚鹏, 刘淑霞, 等. 海洋浮游藻色素分析和化学分类研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(4): 91-98, 104. DENG C M, YAO P, LIU S X, et al. Advances in pigment analysis and chemotaxonomy of marine phytoplankton[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(4): 91-98, 104.
- [49] WRIGHT S W, SHEARER J D. Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton[J]. *Journal of Chromatography A*, 1984, 294: 281-295.
- [50] 焦念志, 杨燕辉. 中国海原绿球藻研究[J]. *科学通报*, 2002, 47(7): 485-491. JIAO N Z, YANG Y H. Studies on *Prochlorococcus* from China Sea[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(7): 485-491.
- [51] 陈纪新, 黄邦钦, 刘媛, 等. 应用特征光合色素研究东海和南海北部浮游植物的群落结构[J]. *地球科学进展*, 2006, 21(7): 738-746. CHEN J X, HUANG B Q, LIU Y, et al. Phytoplankton community structure in the transects across East China Sea and northern South China Sea determined by analysis of HPLC photosynthetic pigment signatures[J]. *Advances in Earth Science*, 2006, 21(7): 738-746.
- [52] MACKEY M D, HIGGINS H M. CHEMTAX-a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 144: 265-283.
- [53] FURUYA K, HAYASHI M, YABUSHITA Y, et al. Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures[J]. *Topical Studies in Oceanography*, 2003, 50: 367-387.
- [54] BEUTLER M, WILTSHIRE K H, MEYER B, et al. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 72: 39-53.
- [55] 李林川, 王博亮, 谢杰镇, 等. 基于LabVIEW的海洋赤潮生物荧光实时采集系统[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(4): 547-549. LI L C, WANG B L, XIE J Z, et al. A LabVIEW based real time algae fluorescence capture system[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(4): 547-549.
- [56] 卢璐, 苏荣国, 王修林, 等. 基于四阶导数的浮游植物叶绿素荧光激发光谱特征研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(11): 2307-2312. LU L, SU R G, WANG X L, et al. Study on the characters of phytoplankton chlorophyll fluorescence excitation spectra based on fourth-derivative[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(11): 2307-2312.
- [57] 张前前, 类淑河, 王修林, 等. 浮游植物活体三维荧光光谱分类判别方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, 24(10): 1227-1229. ZHANG Q Q, LEI S H, WANG X L, et al. Research on discrimination of 3d fluorescence spectra of phytoplanktons[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(10): 1227-1229.
- [58] 段亚丽, 苏荣国, 石晓勇, 等. 基于小波高频分量的浮游植物活体荧光识别技术研究[J]. *中国激光*, 2012, 39(7): 220-230. DUAN Y L, SU R G, SHI X Y, et al. Differentiation of phytoplankton populations by *in vivo* fluorescence based on high-frequency component of wavelet[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2012, 39(7): 220-230.
- [59] 马伟华, 刘珑龙, 张建民. 基于径向基函数网络的浮游植物活体三维荧光光谱分类[J]. *计算机辅助工程*, 2006, 15(3): 66-71. MA W H, LIU L L, ZHANG J M. 3D Fluorescence spectra classification of phytoplankton based on radial basis function networks[J]. *Computer Aided Engineering*, 2006, 15(3): 66-71.
- [60] 褚小立, 许育鹏, 陆婉珍. 用于近红外光谱分析的化学计量学方法研究与应用进展[J]. *分析化学*, 36, 5: 702-709. CHU X L, XU Y P, LU W Z. Research and application progress of chemometrics methods in near infrared spectroscopic analysis[J]. 2008, 36, 5: 702-709.
- [61] 刘雪峰, 张亭禄. 由粒子吸收光谱提取浮游植物吸收光谱的人工神经网络方法[J]. *海洋技术*, 2006, 25(3): 45-50. LIU X F, ZHANG T L. An artificial neural network method for extraction of phytoplankton absorption spectra from total particulate absorption spectra[J]. *Ocean Technology*, 2006, 25(3): 45-50.
- [62] 周雯, 曹文熙, 王桂芬, 等. 用多层感知器模型由吸收光谱反演浮游植物色素[J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(2): 46-51. ZHOU W, CAO W X, WANG G F, et al. Retrieval of pigment concentrations from the absorption spectra of phytoplankton by multilayered perceptrons[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(2): 46-51.
- [63] 陈戈, 杨杰, 张本涛, 等. 新一代海洋科学卫星的思考与展望[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(10): 110-117. CHEN G, YANG J,

- ZHANG B T, et al. Thoughts and prospects on the new generation of marine science satellites[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(10): 110-117.
- [64] ALVAIN S, MOULIN C, DANDONNEAU Y, et al. Remote sensing of phytoplankton groups in case 1 waters from global SeaWiFS imagery[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2005, 52(11): 1989-2004.
- [65] 赵海阳, 沈芳, 孙雪融, 等. 中国东部海域浮游植物类群遥感反演研究[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 153-168. ZHAO H Y, SHEN F, SUN X R, et al. Remote sensing retrieval of phytoplankton group in the eastern China Seas[J]. *Haiyang Xuebao*, 2022, 44(4): 153-168.
- [66] FRAZÃO B, SILVA A. Molecular tools for phytoplankton monitoring samples[J]. *bioRxiv*, 2018: 1-17.
- [67] KAPLAN-LEVY R N, ALSTER-GLOUKHOVSKI A, BENYAMINI Y, et al. Lake Kinneret phytoplankton: integrating classical and molecular taxonomy[J]. *Hydrobiologia*, 2016, 764: 283-302.
- [68] JOHNSON Z I, MARTINY A C. Techniques for quantifying phytoplankton biodiversity[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7(1): 299-324.
- [69] DE BRUIN A, IBELINGS B W, VAN DONK E. Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics[J]. *Hydrobiologia*, 2003, 491: 47-63.
- [70] 于志刚, 米铁柱, 姚鹏, 等. 赤潮藻鉴定与定量检测方法进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 1067-1076. YU Z G, MI T Z, YAO P, et al. Advances in identification and quantification of harmful algae[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 1067-1076.
- [71] MEDLIN L K, ELWOOD H J, STICKEL S, et al. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): Evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*[J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27(4): 514-524.
- [72] 陈月琴, 曾晓梅. 南海赤潮有毒甲藻链状-塔马亚历山大藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 1999, 21(3): 106-112. CHEN Y Q, ZENG L M. Molecular identification of red tide toxic *Alexandrium tamarense*-*Alexandrium catenella* from the South China Sea[J]. *Haiyang Xuebao*, 1999, 21(3): 106-112.
- [73] ALEXANDER H T, ELIF D H, KEVIN L V, et al. Phytoplankton distribution patterns in the northwestern Sargasso Sea revealed by small subunit rRNA genes from plastids[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(3): 481-492.
- [74] HUMBERT J F, QUIBLIER C, GUGGER M. Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(5): 1723-1732.
- [75] YUAN J, MI T Z, YU Z G, et al. Development of a rapid detection and quantification method of karenia mikimotoi by real-time quantitative PCR[J]. *Harmful Algae*, 2012, 17(5): 83-91.
- [76] RICHARD R H, KIRKPATRICK G J. Innovative techniques for harmful algal toxin analysis[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(1): 107-114.
- [77] GROBEN R, MEDLIN L. *In situ* hybridization of phytoplankton using fluorescently labeled rRNA probes[M]. Pittsburgh: Academic Press, 2005: 299-310.
- [78] 李秀芹, 于志刚, 米铁柱, 等. 核酸探针技术及其在海洋浮游植物检测中的应用[J]. 海洋科学, 2009, 33(3): 87-92. LI X Q, YU Z G, MI T Z, et al. Oligonucleotide probes and their application for the detection of phytoplankton[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(3): 87-92.
- [79] 侯建军, 李家园, 朱伟, 等. 基于 DNA 探针和 FISH 技术对两种有害浮游植物的检测研究[J]. 湖北师范学院学报(自然科学版), 2014, 34(1): 87-92. HOU J J, LI J Y, ZHU Y, et al. Identification of two species of harmful phytoplankton using fluorescence *in situ* hybridization and DNA probes[J]. *Journal of Hubei Normal University (Natural Science)*, 2014, 34(1): 87-92.
- [80] 陈纪新, 黄邦钦, 李少菁. 海洋微型浮游植物分子生态学研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(S2): 32-39. CHEN J X, HUANG B Q, LI S J. The review of molecular ecology research on marine nano and pico-phytoplankton[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 32-39.
- [81] ANTONELLA P, LUCA G. The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(10): 6851-6862.
- [82] ZHEN Y, MI T Z, YU Z G. Detection of several harmful algal species by sandwich hybridization integrated with a nuclease protection assay[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(5): 651-657.
- [83] 殷安齐, 李洪武, 刘志媛, 等. SYBR Green实时荧光定量PCR检测利玛原甲藻的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(12): 2147-2152. YIN A Q, LI H W, LIU Z Y, et al. SYBR green real-time fluorescence quantitative PCR detection of *Prorocentrum lima*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(12): 2147-2152.
- [84] LEE S R, OAK J H, CHUNG I K, et al. Effective molecular examination of eukaryotic plankton species diversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP, and sequencing[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(6): 699-707.
- [85] 王子程, 郑继红, 万新军, 等. 应用于dPCR的大视场荧光显微检测系统的设计[J]. 光学技术, 2021, 47(1): 1-5. WANG Z C, ZHENG J H, WAN X J, et al. Design of fluorescence microscopy detection system with wide field of view for dPCR[J]. *Optical Technique*, 2021, 47(1): 1-5.
- [86] 刘津, 刘二龙, 谢力, 等. 数字聚合酶链式反应技术在食品安全检测领域的研究应用进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 275-280. LIU J, LIU E L,

- XIE L, et al. Progress in research and application of digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in food safety detection[J]. *Food Science*, 2016, 37(17): 275-280.
- [87] 尹居鑫, 夏丽萍, 邹哲宇, 等. 多重数字聚合酶链式反应技术及其应用[J]. *分析化学*, 2022, 50(1): 25-38. YIN J X, XIA L P, ZOU Z Y, et al. Multiplex digital polymerase chain reaction technology and its application[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 50(1): 25-38.
- [88] FU H Y, ZHANG C Y, WANG Y Y, et al. Advances in multiplex molecular detection technologies for harmful algae[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29: 43745-43757.
- [89] WHITESIDES G M. The origins and the future of microfluidics[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [90] HAN L, ZI X Y, GARMIRE L X, et al. Co-detection and sequencing of genes and transcripts from the same single cells facilitated by a microfluidics platform[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 1-9.
- [91] LU Y, XUE Q, EISELE M R, et al. Highly multiplexed profiling of single-cell effector functions reveals deep functional heterogeneity in response to pathogenic ligands[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(7): E607-E615.
- [92] ZHENG G X, LI Y J, QI L L, et al. Marine phytoplankton motility sensor integrated into a microfluidic chip for high-throughput pollutant toxicity assessment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 84(1/2): 147-154.
- [93] SONG Y X, LI Z, FENG A R, et al. Electrokinetic detection and separation of living algae in a microfluidic chip: implication for ship's ballast water analysis[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(18): 22853-22863.
- [94] HOU T, CHANG H, JIANG H L, et al. Smartphone based microfluidic lab-on-chip device for real-time detection, counting and sizing of living algae[J]. *Measurement*, 2022, 187: 1-9.
- [95] PSALTIS D, QUAKE S R, YANG C H. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 381-386.
- [96] MONAT C, DOMACHUK P, EGGLETON B J. Integrated optofluidics: a new river of light[J]. *Nature Photonics*, 2007, 1(2): 106-114.
- [97] FAN X D, WHITE I M, SHOPOVA S I, et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 620(1/2): 8-26.
- [98] PAIE P, VAZQUEZ R M, OSELLAME R M, et al. Microfluidic based optical microscopes on chip[J]. *Cytometry Part A*, 2018, 93(10): 987-996.
- [99] WU J G, ZHENG G A, LEE L M. Optical imaging techniques in microfluidics and their applications[J]. *Lab on A Chip*, 2012, 12(19): 3566-3575.
- [100] ZHAO Y, STRATTON Z S, GUO F, et al. Optofluidic imaging: now and beyond[J]. *Lab on A Chip*, 2013, 13(1): 17-24.
- [101] LANDRY Z C, VERGIN K, MANNENBACH C, et al. Optofluidic single-cell genome amplification of sub-micron bacteria in the ocean subsurface[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1-14.
- [102] SIMMONDS J E, MACLENNAN D N. Fisheries acoustics: theory and practice: Second edition[M]. Oxford, England: Blackwell Publishing, 2005: 20-69.
- [103] MEDWIN H, CLAY C S. Fundamentals of acoustical oceanography[M]. Pittsburgh: Academic Press, 1998: 17-69.
- [104] BOK T H, PAENG D G, KIM E, et al. Ultrasound backscattered power from *Cochlodinium polykrikoides*, the main red tide species in the Southern Sea of Korea[J]. *Journal of Plankton Research*, 2010, 32(4): 503-514.
- [105] KIM E, LEE H, NA J Y, et al. 5-MHz acoustic-backscatter measurements of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2010, 67(8): 1759-1765.
- [106] HOFMANN H, PEETES F. In-situ optical and acoustical measurements of the buoyant cyanobacterium *P. Rubescens*: spatial and temporal distribution patterns[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 1-10.
- [107] KIM H, DONHUUG K, WON J S, et al. High-frequency acoustic backscattering characteristics for acoustic detection of the red tide species *Akashiwo sanguinea* and *Alexandrium affine*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(4): 1268-1276.
- [108] 张力, 赵星, 叶鹰. 信息可视化软件CiteSpace与VOSviewer的应用比较[J]. *信息资源管理学报*, 2011, 1(1): 97-100. ZHANG L, ZHAO X, YE Y. Application comparison of information visualization software CiteSpace and VOSviewer[J]. *Journal of information Resources Management*, 2011, 1(1): 97-100.
- [109] 焦念志, 杨燕辉. 四类海洋超微型浮游生物的同时监测[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 506-511. JIAO N Z, YANG Y H. Simultaneous monitoring of autotrophic picoplankton and heterotrophic bacteria[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(5): 506-511.

State-of-the-Art Rapid Identification and Monitoring Techniques for Marine Phytoplankton

SUN Jun^{1,2,3}, SONG Yu-yao^{1,3}, LIU Hai-jiao^{1,3}

(1. *Institute for Advanced Marine Research, China University of Geosciences, Guangzhou 511462, China;*

2. *State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China;*

3. *Research Centre for Indian Ocean Ecosystem, Tianjin University of Sciences and Technology, Tianjin 300457, China*)

Abstract: Marine phytoplankton, as the most important primary producer, as the potential huge "blue carbon" of marine phytoplankton, it takes as the key parameters for carbon calculation, and can help on achieving the goals of the whole country's "carbon peak" and "carbon neutrality". Phytoplankton species vary greatly in cell structure, morphology and its abundance, thus the identification for marine phytoplankton has always been a hard and key task for the related studies. The requirements for innovation and development of the high-throughput gene sequencing, microfluidics, and high-sensitivity bioassay techniques on identification and rapid monitoring of marine phytoplankton become urgent and nonsubstitutable. Through a comprehensive analysis of the classical technical methods of phytoplankton identification and monitoring, the development of rapid identification and monitoring techniques and the progress of research applications, and a bibliometric analysis of the literature related to automatic phytoplankton monitoring using VOSviewer, we aim to provide help to researchers related to phytoplankton taxonomy and ecology to expand their research ideas and improve their research efficiency.

Key words: phytoplankton; classification; rapid monitoring technology; microscopy technology; flow cytometry; spectral analysis; bibliometric analysis

Received: May 21, 2022