

基于微流控显微荧光技术的藻密度检测方法研究

黄朋¹, 殷高方^{1,2}, 赵南京^{1,2,3}, 甘婷婷^{1,2}, 胡翔¹, 徐敏^{1,2}, 梁天泓^{1,2}, 贾仁庆¹, 张小玲^{1,4}

(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.安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230601)

摘要: 浮游藻类密度监测对水质状况诊断及藻华灾害预警具有重要意义。本文提出一种基于微流控-显微荧光技术的浮游藻细胞密度检测方法, 基于微流控技术实现样品快速定量进样, 利用共聚焦显微荧光结构实现藻细胞特征荧光信号的高信噪比采集, 并通过分析荧光峰信息实现浮游藻细胞计数。以杜氏盐藻、色球藻、隐藻和赤潮藻为测试对象, 结果表明在 $1.3 \times 10^6 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 密度范围内测量相对误差均小于 3.96%, 且准确率不受悬浮物、藻细胞种类以及尺寸的影响; 在 10% 允许误差下, 藻类密度检测上限可提升至 $5 \times 10^6 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$, 完全能够满足自然水体浮游藻细胞密度检测需求, 为水体藻细胞密度快速准确检测提供了新途径。

关键词: 浮游藻类; 显微荧光; 微流控; 藻细胞计数

1 引言

浮游藻类是水生态系统中重要的初级生产者^[1], 也是水体生态健康的指示剂^[2]。浮游藻类密度监测对水质状况诊断以及藻华灾害预警具有重要意义。

目前浮游藻细胞密度检测方法可分为直接法和间接法, 间接法主要包括分光光度法、高效液相色谱法以及荧光检测法等^[3], 这些方法都是通过对叶绿素 a 浓度的测量反演出藻细胞密度, 但国内外已有学者证明^{[4][5]}, 叶绿素 a 易受藻细胞生长状态、种类以及体积等因素的影响, 无法精准的反映藻细胞密度。直接法主要包括显微镜检法、库尔特计数法、流式影像法以及流式荧光细胞计数法等, 显微镜检法是通过人工的方式在显微镜下进行观察记录, 工作强度大, 效率低, 存在较大的人为影响因素, 误差较大^[6]。库尔特计数法是将悬浮藻溶液通过小孔, 在小孔两边设置电极, 检测藻细胞通过时电阻的变化进行粒径检测和计数, 该方法易受其他悬浮物的影响, 实际水体藻细胞计数测量准确率低^{[7][8]}。流式影像法通过对单个藻细胞图像的识别进行计数, 但自然水体中存在较多和藻细胞体积相近的杂质, 影响藻细胞

计数的准确性，同时限制于目前相机帧率的影响，无法实现藻细胞的快速计数。流式细胞荧光法通过激光诱导藻细胞产生荧光，检测微通道管中的单细胞荧光进行计数^{[9][10][11]}。这种方法工作效率高，具有快速准确的优点；但传统流式荧光法为提高检测的精准度，采用鞘液聚焦的进样方式保证单个细胞通过检测窗口^[12]，该方式首先需要对待测得悬浮液进行加压处理，然后通过喷嘴注入鞘液中，最后由加压的鞘液驱动藻细胞流经检测窗口，这就导致该进样结构非常复杂且需要消耗大量鞘液，同时流式细胞荧光法为获得多种参数，光路通常采用正交结构，该结构必须保证激发光路和荧光收集光路的垂直，使用前需要使用荧光小球进行繁琐对焦，无法适用于小型化的现场快速测量。

微流控芯片技术是近些年发展的新兴技术，通过在几平方厘米的芯片上构建微通道管道，实现进样、聚焦、分选等功能^[13]，该技术简化了流式荧光法的复杂进样结构，目前正在医药及生命科学领域上广泛应用。鉴于此，本文提出一种基于微流控-显微荧光技术的浮游藻细胞密度检测方法。利用藻细胞受激发射特征波段的叶绿素荧光，将微流控芯片和显微荧光检测技术结合，通过检测特定体积下单藻细胞荧光峰数量，实现浮游藻细胞密度快速精准检测。

2 检测原理与方法

设计的浮游藻类微流控显微荧光检测系统原理框图如图 1 所示，系统由进样模块、荧光激发模块、荧光检测模块组成。(1)进样模块采用步进电机对高精度注射泵的精准控制，实现样品的精确定量进样，主要由微流控芯片、高精度注射泵、样品池组成；(2)荧光激发模块采用落射式光路将激发光源聚焦在微流控通道表面，实现藻细胞荧光的高效激发，主要由 469nm 高亮单色 LD、激发光源驱动、二向色镜、物镜组成，其中激发光源驱动采用低压差线性稳压器和高速 MOS 管组合实现光强脉冲幅值频率连续可调；(3)荧光检测模块使用显微物镜配合特定波段的窄带滤光片，收集微通过管显微视野范围内藻细胞发射叶绿素荧光，使用光电倍增管和积分放大电路实现微弱荧光信号高信噪比采集，主要由 40 倍物镜、680nm 窄带滤光片、光电倍增管和积分放大电路组成。

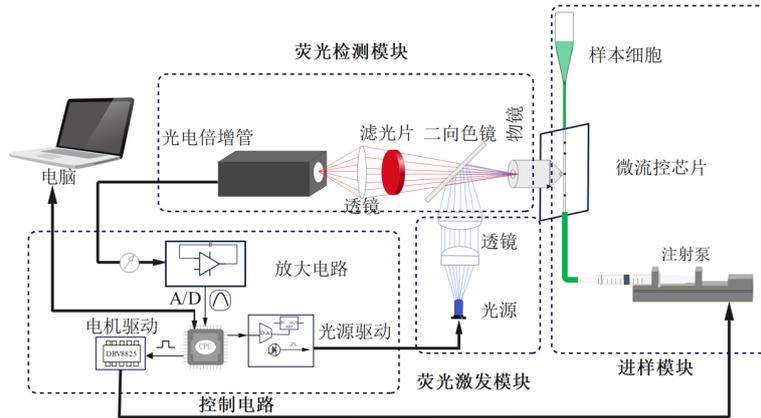


图 1 浮游藻类微流控显微荧光检测系统原理框图

Fig. 1 Schematic diagram of microfluidic microfluorescence planktonic algae counting system

该系统采用落射式显微光学结构，光源激发窗口和荧光收集窗口相同，均为物镜的显微视野。在注射泵推进下微流控管道中藻细胞匀速经过显微视野，细胞受激发射荧光，其强度取决于藻细胞所处位置处激发光强度和荧光收集效率，随所处位置变化而变化，具体过程如图 2 所示。首先，藻细胞进入显微视野边缘，荧光信号开始产生但较微弱；随着细胞流向显微视野中心，荧光信号强度逐渐上升，如图 2(A)；当藻细胞到达显微视野中心时，荧光信号强度达到峰值，如图 2(B)；当藻细胞经过中心直到离开显微视野，荧光信号逐渐减弱直到消失，如图 2(C)。由此可见，每个细胞流过显微视野均会对应出现一个荧光峰，因此通过记录特定体积样品的荧光峰数量即可计算出样品中藻细胞密度。

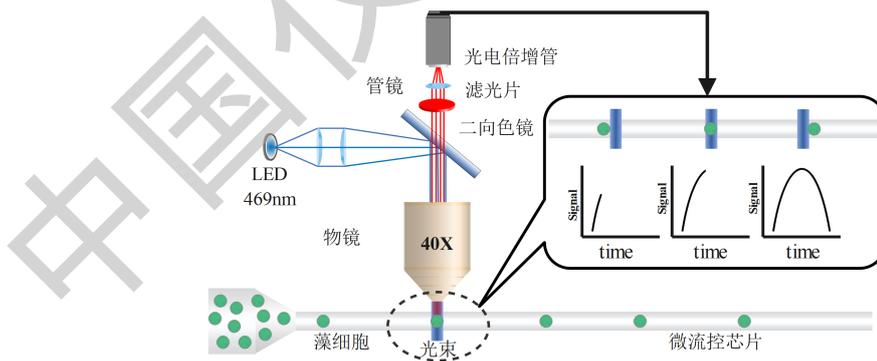


图 2 基于微流控-显微荧光技术的藻细胞密度检测方法示意图

Fig. 2 Schematic diagram of algal cell density detection method

3 分析与讨论

3.1 微流控显微荧光信号获取与分析

选取杜氏盐藻作为实验对象，将藻溶液进行 10、10、1000 倍的稀释获得高、中、低三种藻密度样品，取 100 μ l 稀释液利用图 1 所示流控显微荧光系统进行荧光信号检测，选取其中一段绘制荧光检测曲线，结果如图 4 所示。当藻细胞经过检测窗口时，产生明显荧光峰信号，其中密度样品测试中出现了双荧光峰；高密度样品测试中出现了荧光峰强度明显高过中低密度样品荧光的单峰。

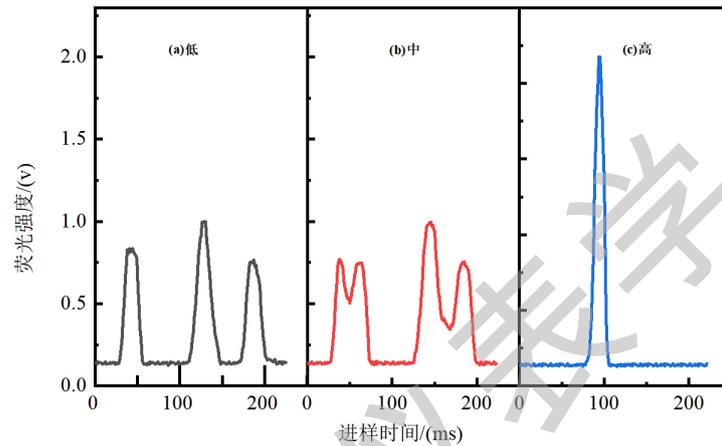


图 3 不同密度下藻细胞荧光检测峰图

Fig.3 Peak diagram of fluorescence detection of algal cells

对于中密度样品荧光双峰和高密度样品的强荧光单峰，推测为两个或多个藻细胞荧光叠加结果，为进一步分析荧光峰形成原因，利用 Lighttools 软件仿真单细胞和多个藻细胞经过显微视野产生荧光强度分布，如图 4 所示。

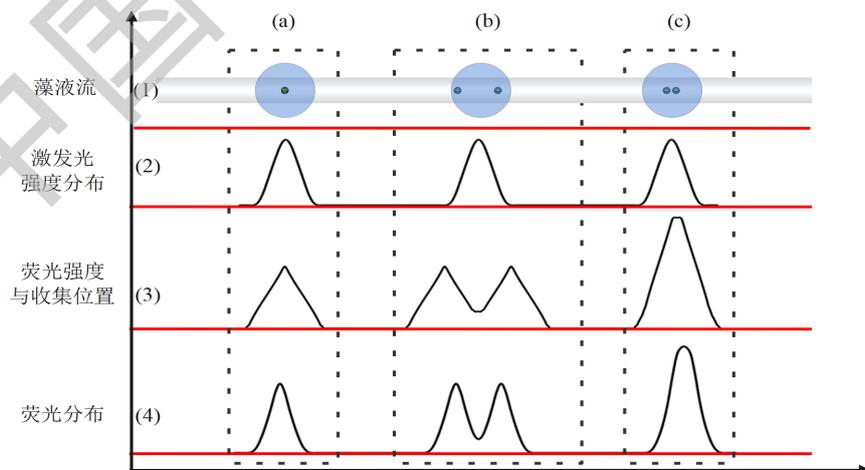


图 4 光学仿真图

Figure. 4 Optical simulation diagram

根据激发光 LED 发光特性和聚焦透镜参数，仿真获得激发光强从显微物镜视野边缘到中心激发光强分布如图 4(2)所示；藻类叶绿素荧光是细胞受激后发射荧光，因此藻细胞可视为均匀发光小球，藻细胞在显微视野范围内不同位置处荧光收集效率如图 2(3)所示；而荧光信号强度取决于细胞激发光强度和荧光收集效率，因此可计算出藻细胞流过显微视野产生荧光分布如图 4(4)。在此基础上，进一步仿真获得单细胞和多细胞流过显微物镜视野荧光强度三种变化情况：第一，单个藻细胞通过时，藻细胞从边缘到中心荧光强度逐渐变大，在中心时达到最大，形成单峰如图 4(a)，此时藻细胞计数精度最高；第二，当两个或多个距离较远藻细胞通过时，两个藻细胞的荧光峰部分重叠，出现双峰或多峰如图 4(b)，此时对多峰统计仍能保证藻细胞计数精度；第三，当两个或多个距离较近藻细胞通过时，两个藻细胞荧光峰重叠部分增加，导致双峰或多峰形成较强单峰如图 4(c)，此时藻细胞计数精度下降，结果偏低，对于此种情况，需要对样品进行稀释处理，以保证检测结果准确性。

3.2 藻密度检测准确性测试

从图 3(a-b)荧光信号检测及图 4(a-b)仿真结果可以看出，在一定密度范围内，本文提出藻细胞密度检测方法具有较高的精准度。为验证该方法准确性，选取杜氏盐藻溶液进行一定比例的稀释，分别采用显微镜检法、库尔特计数法和本文方法进行对比验证。每种方法计数 3 次并求平均值，然后换算成原藻溶液对应的藻密度，结果如表 1 所示。其中不同方法测试过程为：(1)显微镜检法：取 1ml 的杜氏盐藻溶液加入 10 μ l 的 Lugol 试剂，混合均匀，取 0.1ml 的藻溶液滴入浮游生物计数框中，采用 Nikon Ni-U 型荧光显微镜进行计数；(2)库尔特计数法：取 1ml 的杜氏盐藻溶液加入 200ml 的生理盐水中进行稀释，采用 Multisizer 4e 粒子分析仪测量适合杜氏盐藻粒径范围的藻个数；(3)微流控显微荧光法：取 1ml 的杜氏盐藻溶液进行 500 倍的稀释，取 100 μ l 稀释后的溶液，采用图 1 所示系统进行检测计数。

表 1 三种方法对比测试结果

Table 1 Comparison test results of the three methods

Detection method	1 st (cell·L ⁻¹)	2 nd (cell·L ⁻¹)	3 rd (cell·L ⁻¹)	AVG (cell·L ⁻¹)	RSD %	ARE %
Microscopic	1.752 \times 10 ⁸	1.545 \times 10 ⁸	1.677 \times 10 ⁸	1.658 \times 10 ⁸	6.30%	3.49%
Kurt counting	1.488 \times 10 ⁸	1.533 \times 10 ⁸	1.677 \times 10 ⁸	1.566 \times 10 ⁸	6.32%	2.14%
This system	1.650 \times 10 ⁸	1.550 \times 10 ⁸	1.600 \times 10 ⁸	1.600 \times 10 ⁸	3.12%	—

通过上表的检测结果可知,本文方法和显微镜检法、库尔特计数法的检测结果相对误差绝对值(ARE)均不超过 3.49%,同时该方法的相对标准偏差(RSD)为 3.12%,均优于其他方法,说明该方法检测低浓度的藻溶液具有较高的准确率和较好的稳定性。

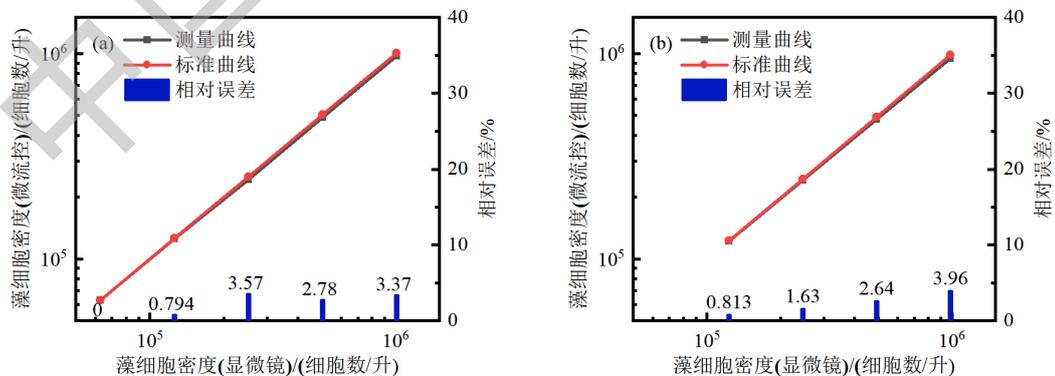
在此基础上,进一步研究藻类尺寸及种类在中低浓度时对检测准确精度影响。选取杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*)、色球藻 (*Chromococcus*)、隐藻 (*Cryptoalgae*) 以及赤潮易弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 四种藻类作为实验对象,这四种实验藻种细胞粒径差异较大,门类不同、叶绿素含量差异大。本实验藻种均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,具体信息如下表 2 所示

表 2 实验藻种信息

Table 2 Experimental algal species information

Algal	phylum	Algal cell width
<i>Dunaliella salina</i>	<i>Chlorophyta</i>	18-28um
<i>Cryptoalgae</i>	<i>Cryptophyta</i>	10-16um
<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Xanthophyta</i>	6-10um
<i>Chromococcus</i>	<i>Cyanophyta</i>	<5um

实验按照 2 倍比例逐步梯度稀释,以稀释到最低藻密度 $1.5 \times 10^5 \text{cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内为基准,获得 5 个杜氏盐藻、5 个隐藻、4 个色球藻、4 个赤潮易弯藻的不同密度梯度样品,利用微流控显微荧光系统以 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ 的进样速度,通过记录荧光峰信息计算获得各样品的藻细胞密度,每个样品测量 10 次取平均值,以显微镜检的藻细胞密度数作为标准,将镜检密度和该方法测量密度分别作为 X、Y 绘制点线图,同时绘制出相对误差绝对值,结果如图 5 所示。



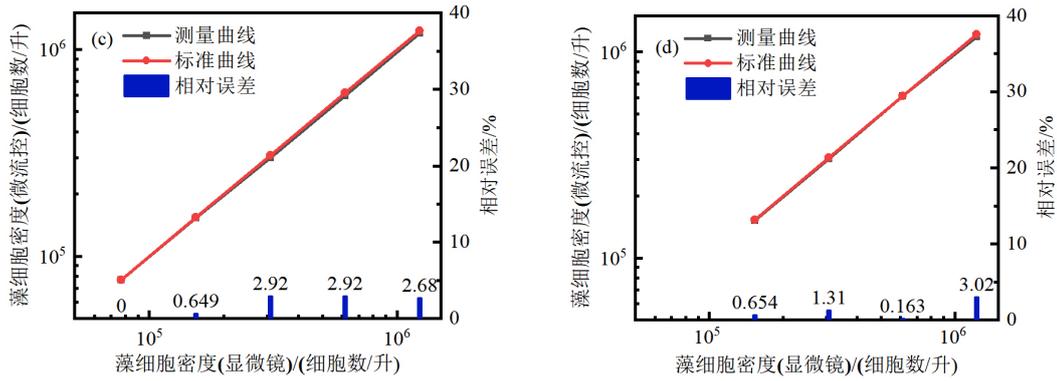


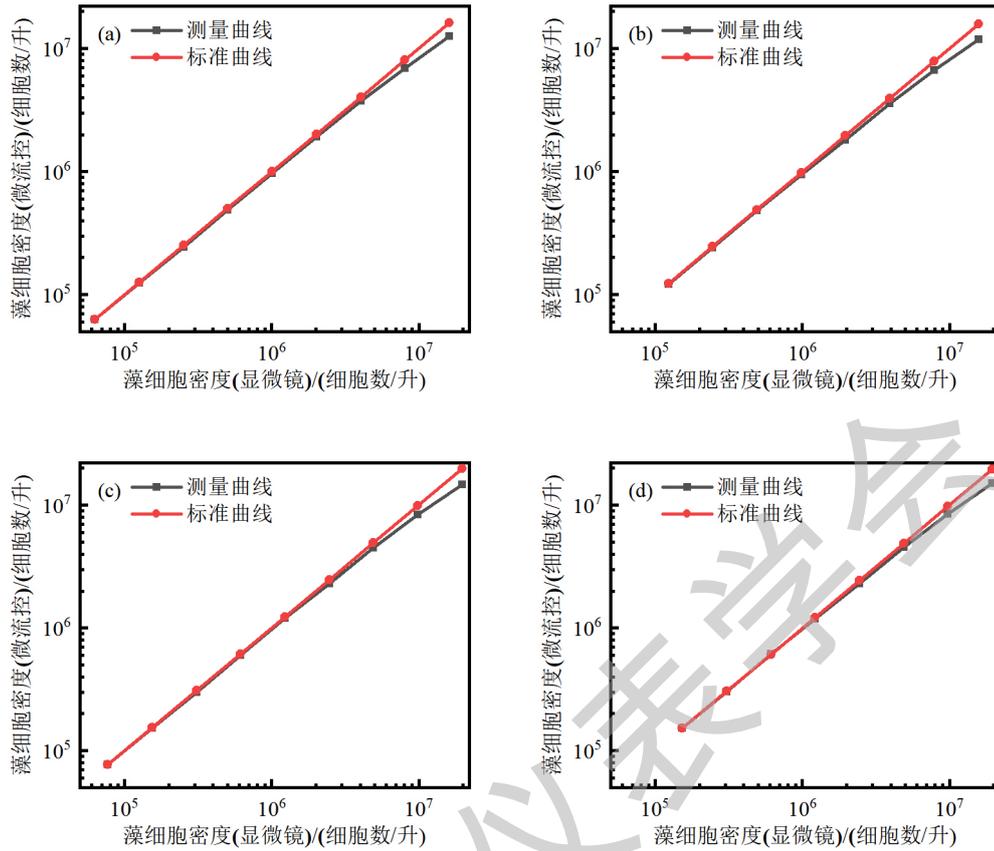
图 5 低密度下镜检藻细胞密度与微流控显微荧光检测密度对比。(a)杜氏盐藻；(b)赤潮异弯藻；(c)隐藻；(d)色球藻

Fig. 5 The density of algal cells under low density microscopy was compared with the density of microfluidic microfluorescence detection. (a) *Dunaliella salina*; (b) *Heterosigma akashiwo*; (c) *Cryptalgae*; (d) *Chromococcus*.

由图 5 可知，四种藻类样品检测结果和标准曲线均高度重合，相关系数 R^2 均大于 0.996，在 $1.3 \times 10^6 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内时不同种类的藻细胞相对误差绝对值均低于 3.96%，检测结果的准确度不受藻类尺寸、种类影响。

3.3 藻密度检测范围分析

从图 3(c) 荧光信号检测结果与图 4(c) 仿真结果可以看出，藻密度过高时，本文方法检测准确性会下降，检测结果偏低。为测试该方法的检测范围，在上述实验基础上进一步扩大四种藻类样品细胞密度范围：9 个密度梯度杜氏盐藻、最大密度 $1.612 \times 10^7 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ ；8 个密度梯度赤潮异弯藻，最大密度 $1.561 \times 10^7 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ ；9 个密度梯度隐藻、最大密度 $1.971 \times 10^7 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ ；8 个密度梯度色球藻、最大密度 $1.945 \times 10^7 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述样品检测结果如图 6 所示，从图中可以看出四种藻类在密度较低检测结果和标准曲线高度重合，但高密度样品的检测结果均出现不同程度偏低，藻密度越高检测误差越大。这与仿真分析结果相符，即随着藻类密度的增加，显微视野出现多个藻细胞（图 4(c)）几率增大、荧光峰重叠，导致藻细胞计数和密度检测结果偏低。



(a)杜氏盐藻；(b)赤潮异弯藻；(c)隐藻；(d)色球藻

图 6 高密度下镜检藻细胞密度与微流控显微荧光检测密度对比

Fig. 6 The density of algal cells under high density under microscopy was compared with the density of microfluidic fluorescence detection. (a) *Dunaliella salina*; (b) *Heterosigma akashiwo*; (c) *Cryptoalgae*; (d) *Chromococcus*.

进一步绘制四种藻检测结果的相对误差与藻密度散射图，如图 7 所示，可以看出四种藻的检测相对误差均随藻密度增加呈增加，变化趋势基本一致，也就是说本文方法检测结果准确性主要取决于样品的细胞密度，与藻细胞种类和尺寸无明显关系。在 10%允许误差范围内，四种藻类的藻密度检测上限均在 $5 \times 10^6 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右，这已经能够满足实际水体^[14]（水华暴发预警藻密度为 $2 \times 10^6 \text{Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ ）藻密度检测需求。

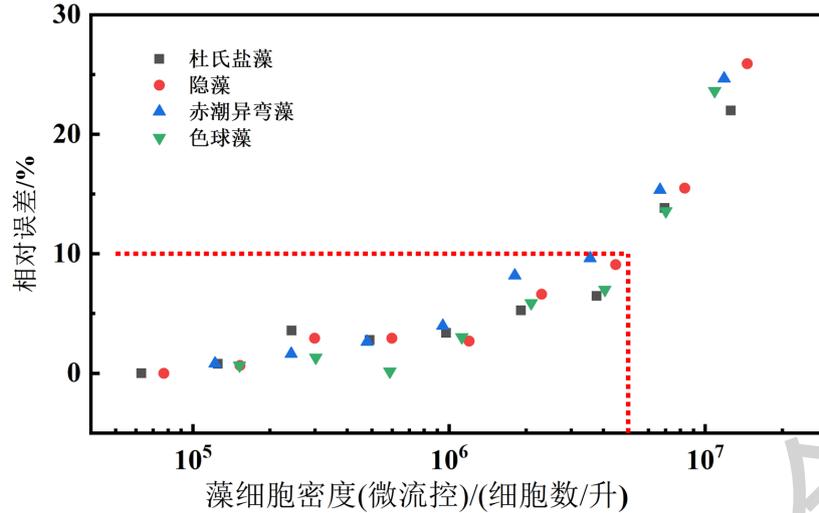


图 7 四种藻检测相对误差与细胞密度关系散点图

Fig. 7 Scatterplot of the relative error of four algal detections vs cell density

4 结论

由于浮游藻类个体小、数量庞大，悬浮物杂质等因素的存在，目前已有藻密度快速检测技术难以实现藻密度准确检测。本文提出一种基于微流控-显微荧光技术的浮游藻细胞密度检测方法，通过微流控技术实现样品快速进样，通过共聚焦显微荧光结构实现藻细胞特征荧光信号的高信噪比采集，通过检测荧光峰数量实现浮游藻细胞计数。对不同密度样品藻细胞荧光信号测量和光学仿真发现，该方法能够精准的测量中低密度藻细胞荧光信号，高密度时多个藻细胞的荧光峰高度重叠是测量误差的主要来源；在低密度下，计数结果与显微镜检法和库尔特计数法的相对误差均不超过 3.49%，对不同种类、粒径的藻细胞测试结果表明，该方法在 $1.3 \times 10^6 \text{ Cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 密度范围内测量相对误差均小于 3.96%，且准确率不受悬浮物、藻细胞种类、尺寸的影响；随着检测藻密度样品范围的扩大，测量误差呈现增加趋势，即该方法测量准确率和藻密度负相关，与仿真的结果相符，在 10% 允许误差范围内，将检测密度上限提高至 $5 \times 10^6 \text{ Cell} \cdot \text{L}^{-1}$ ，可满足实际水体藻密度检测需求。本文提出的微流控显微荧光技术，利用藻类特有的叶绿素荧光信息，有效克服了悬浮物干扰等优点，具有进样模块和光学结构简单的优势，是藻细胞密度快速准确检测的新途径。

参考文献:

- [1] Watson SB, Mccauley E, Downing JA. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography*, 1997,42(3):487-495.
- [2] Suikkanen S, Laamanen M, Huttunen M. Long-term changes in summer phytoplankton communities of the open northern Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2007, 71: 580-592.
- [3] 钱奎梅,刘霞,陈宇炜.淡水浮游植物计数与定量方法[J].湖泊科学,2015,27(05):767-775.
- [4] 任永霞,徐宁,段舜山.微藻叶绿素荧光值与传统生长指标的关联性研究[J].生态科学,2006(02):128-130.
- [5] 陈纬栋,王崇,胡晓芳,等.应用荧光分析技术检测蓝藻生物量[J].净水技术,2010,29(06):80-84.
- [6] 蔡琨,李娣,陈瑜,等.藻密度手工监测实验室间比对研究[J].环境监控与预警,2022,14(04):42-46+65.
- [7] 杨文志,王晓东,李橙.库尔特原理及其应用[J].工程研究-跨学科视野中的工程,2016,8(06):582-592.
- [8] 高林耿.基于库尔特原理的微流控微粒检测计数系统研究[D].上海:上海交通大学,2020:2-30.
- [9] 张利华,张经,晁敏.流式细胞术对微小型浮游植物识别初探[J].海洋科学,2002(03):60-65.
- [10] Premazzi G, Buonaccorsi G, Zilio P, Flow cytometry for algal studies, *Water Research*, 1989, 23(4):431-442,
- [11] Franklin N , Stauber J , Lim R. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental toxicology & chemistry* ,2010,20(1):160-170.
- [12] 魏熙胤,牛瑞芳.流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展[J].现代仪器,2006(04):8-11.
- [13] Ruey-Jen Yang, Lung-Ming Fu, Hui-Hsiung Hou. Review and perspectives on microfluidic flow cytometers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, Pages 26-45.
- [14] 李颖,施择,张榆霞,等.关于用藻密度对蓝藻水华程度进行分级评价的方法和运用[J].环境与可持续发展,2014,39(02):67-68.