几种保存方法对中华哲水蚤和强壮箭虫体型的影响

冯秋园1,2、孙晓霞1、任琳琳1,2

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东胶州湾海洋生态系统国家野外科学观测研究站, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:选取 5%的甲醛, -20℃冰冻和液氮为保存方法,以中国近海的 2 种优势浮游动物中华哲水蚤 (Calanus sinicus)和强壮箭虫(Sagitta crassa)为研究对象,以体长、体宽和面积为体型参数,研究了上述几种保存方法在 2 个月的时间内对浮游动物体型的影响。研究结果显示,对于中华哲水蚤,甲醛保存 2 个月后,体长下降为原始体长的 99.4%,体宽和面积都增加为 107%;冰冻和液氮保存 2 个月后,体长分别增加为原始体长的 101%和 106.8%,体宽下降为 90%和 81.6%,面积下降为 92.2%和 88.8%。对于强壮箭虫,在甲醛、冰冻和液氮 3 种保存条件下,保存 2 个月后体长有所下降,分别为原始体长的 92.8%,50.7%和 48.4%。体宽和面积有所增加,体宽分别变为原始体宽的 139.9%,159.4%和 263.8%,面积分别变为原始面积的 119%,97.8%和 107%。综合分析发现,胶质类浮游动物在冰冻和液氮保存条件下,身体变形严重,因此用 ZooScan测得的结果误差较大,相较而言,甲醛对胶质类浮游动物体型的影响较小;中华哲水蚤比强壮箭虫在各种保存条件下体型的变化要小;保存初期,浮游动物体型的变化幅度较大,后期趋于稳定;在 3 种保存条件下,中华哲水蚤和强壮箭虫体长的变化最稳定,其次是面积。对浮游动物的体型进行研究时,推荐使用甲醛保存条件下的体长或面积。

关键词: 胶州湾; 浮游动物; 保存方法; 体型参数

中图分类号: Q958.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)04-0020-07

doi: 10.11759/hykx20121212002

浮游动物是海洋生态系统的主要组成部分,是 联系作为初级生产者的浮游植物和上层大型游泳动 物的枢纽环节。由于浮游动物的个体较小,种类繁多, 很难在船上实现对活体的分类,计数,体型测量,生 物量测定等现场实验,因此通常先将浮游动物样品 通过一定的方法保存起来。现阶段,5%的甲醛,-20℃ 冰冻和液氮保存方法都是海洋浮游动物研究常用的 保存方法。

浮游动物的生物量是海洋生态学研究的一个重要内容,是研究海洋生态系统的基本参数^[1]。鉴于生物量直接测量的许多局限性^[2],目前国内外常采用体型-生物量的间接估算法^[1-9]进行海洋浮游动物生物量的估算。根据已有研究,不同的保存方法会对浮游动物的体型产生不同程度的影响,例如,Maria^[2]研究了4%甲醛对双刺纺锤水蚤的成体和幼体体长的影响。Yves 等^[10]研究了10%甲醛对水母类体型和生物量的影响。由于不同的浮游生物类群,不同的体型参数,在不同的保存方式下其变化存在很大的差异,因此研究各种保存方法浮游动物的体型影响,针对不同的浮游生物类群选取合适的保存方法和体型参

数,对于提高体型-生物量转换方法的精度非常必要。体长、体宽和面积是浮游动物重要的体型参数,受测量手段的限制,目前国际上使用较多的是浮游动物体长-生物量方程。随着图像等新型观测手段的发展和应用,面积等其他体型参数与生物量之间的转换关系也开始应用[11],但对于这些参数在不同保存方法下的变化规律研究很少。

1 材料和方法

1.1 样品采集和采样站位

2012 年 3 月在胶州湾进行采样,采样站位见图 1。使用浮游生物浅水 I 型网(网口直径 50 cm, 网长 145 cm, 网孔 500 μm)由底到表垂直拖网采集^[12],采

收稿日期: 2014-02-13; 修回日期: 2014-06-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2014CB441504); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA05030401); 国家海洋公益性行业科研专项(201005014)

冯秋园(1985-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事中国近海浮游动物的研究, E-mail: qyajs@163.com; 孙晓霞, 通信作者, 研究员, 博导, E-mail: xsun@qdio.ac.cn

到的鲜活样品置于冰桶中带回实验室处理。

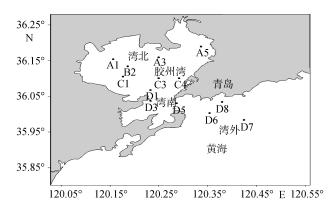


图 1 胶州湾采样站点 Fig.1 Sampling station

1.2 实验方法

每种保存方法分别设置 0、1、3、5、7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60d 共 15 个时间点,每个时间点设置 a, b 两个平行样。采集回来的样品立即进行挑选分类,挑取完整,健壮的活的个体,每个样本大约 15~20 个个体。挑选出的样品用 MgSO₄ 溶液进行麻醉^[13],用浮游动物扫描仪(ZooScan, 法国 Hydroptic 公司)进行扫描,利用 plankton Identifier 软件处理,得到体长,体宽等体型数据。将扫描后的样品全部回收,分别用 5%的甲醛溶液,—20 冰冻和液氮保存,在到达设定的时间点以后取出对应的样品再次进行扫描、计数、测量,用得到的体长和体宽等体型参数与新鲜样品扫描得到的体型参数作比,得到体长比、体宽比和面积比等数据,与保存时间做图,分析其变化。

1.3 数据处理

本文采用 ZooScan 对浮游动物样品进行自动扫描,快速得到浮游动物样品的分类,计数,测量数据。

在处理扫描得到的标准化图片过程中,将浮游生物个体近似为长椭球体(图 2),利用 ZooProcess 和 Plankton Identifer 软件,分割提取图片中的连续物体,提取的最小物体的等周长直径(Equivalent Circular



图 2 桡足类和毛颚类浮游动物近似椭球体示例 Fig.2 Examples of the best fitting ellipse of Copepods and Chaetognaths

Diameter, ECD)大于 0.3mm, 得到体长、体宽和面积 等体型参数[11]。

2 结果

2.1 中华哲水蚤在几种保存条件下的体型 变化

中华哲水蚤在 5%甲醛,-20°C 冰冻和液氮保存条件下的体型变化如图 3、图 4 和图 5 所示。体长在

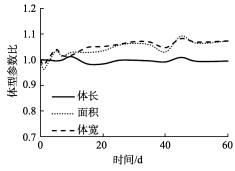


图 3 中华哲水蚤在甲醛保存 2 个月的条件下体长、体宽和面积的变化

Fig.3 Changes of length, width and area of *Calanus* sinicus preserved in 5% formalin

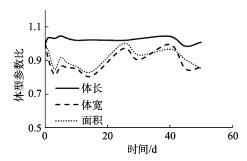


图 4 中华哲水蚤在-20℃保存 2 个月的条件下体长、体宽 和面积的变化

Fig.4 Changes of length, width and area of *Calanus sinicus* preserved in -20°C

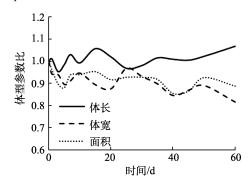


图 5 中华哲水蚤在液氮保存 2 个月的条件下体长、体宽和面积的变化

Fig.5 Changes of the length, width and area of *Calanus* sinicus preserved in liquid nitrogen

甲醛保存下呈现略下降的趋势,在冰冻和液氮保存条件下呈现略上升的趋势,但在这 3 种保存条件下,体长的变化都不大,几乎趋于稳定。体宽和面积在甲醛保存条件下略有上升,保存 2 个月后体宽为原始体宽的 107.4%,面积变为原始面积的 107.3%;在冰

冻和液氮保存条件下,体宽和面积有所下降,保存 2 个月后,体宽变为分别变为原始体宽的 91%和 81.6%,面积变为原始面积的 92.2%和 88.8%。

中华哲水蚤在甲醛、-20℃冰冻和液氮 3 种保存 条件下的体型变化情况见表 1。

表 1 中华哲水蚤在甲醛、-20℃冰冻和液氮 3 种保存条件下的体型变化

Tab.1 Body size changes of Calanus sinicus preserved in formalin, -20℃ and liquid nitrogen

项目		体型							
体型参数(%)	体长			体宽			面积		
保存时间(d)	1	7	60	1	7	60	1	7	60
5%甲醛	96.8	99.9	99.4	98	102	107	96.2	101	107
370中旺		↘, 稳定			1			1	
-20℃冰冻	103.6	103	101	91	85.8	90	95.7	88.8	92
-20 0 //// // // // // // // // // // // /		⊅ ,稳定			\checkmark			\checkmark	
液氮	101	103	106.8	94	91	81.6	96	93.9	88.8
/汉 炎[≯ ,稳定			>			7	

2.2 强壮箭虫在几种保存条件下的体型变化

强壮箭虫在 5%甲醛, -20℃冰冻和液氮保存条件下的体型变化如图 6、图 7 和图 8 所示。在甲醛保存条件下,体长先下降后趋于稳定,体宽和面积现先上升后逐渐趋于稳定, 2 个月后分别变为原始体型的 92.8%, 139.8%和 118.5%。在-20℃冰冻保存条件下,体长先下降后逐渐趋于稳定,体宽先上升后逐渐趋于稳定,面积先略上升后下降再趋于稳定, 2 个月后分别变为原始体型的 50.7%, 160%和 97.8%; 液氮保存条件下,体长先急剧下降后逐渐趋于稳定,体宽呈现出不断上升的趋势,面积先下降后上升再趋于稳定,保存 2 个月后,各体型分别变为原来的48.8%, 263.7%和 107%。

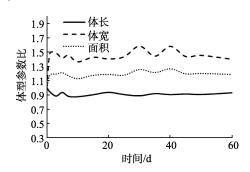


图 6 强壮箭虫在甲醛保存 2 个月的条件下体长、体宽和面积的变化

Fig. 6 Changes of the length, width and area of Sagitta crassa preserved in 5% formalin

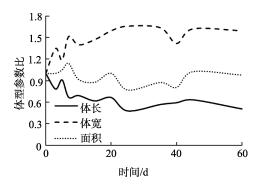


图 7 强壮箭虫在-20℃保存 2 个月的条件下体长、体宽 和面积的变化

Fig.7 Changes of the length, width and area of *Sagitta* crassa preserved in−20°C

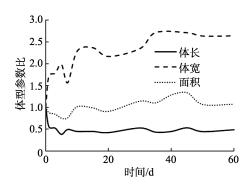


图 8 强壮箭虫在液氨保存 2 个月的条件下体长、体宽和面积的变化

Fig.8 Changes of the length, width and area of *Sagitta* crassa preserved in liquid nitrogen

比较强壮箭虫在甲醛、-20℃和液氮 3 种保存条件下的体型变化发现,体长在 3 种保存条件呈现出了先下降后趋于稳定的趋势,在-20℃和液氮保存条件下,体长下降相对剧烈,分别为原始体长的 50.7%和 48.8%。体宽在 3 种保存方法的保存初期都呈现出了一个上升的趋势,但是在保存的后期,体宽呈现出不同的变化趋势,在甲醛和冰冻保存条件下,体宽在最初的增长之后逐渐趋于稳定。在液氮保存条

件下,体宽呈现出一直上升的趋势,直到2个月实验结束的时候还没有出现稳定的趋势。面积的变化则相对复杂。综合分析发现,体长在保存过程中变化幅度较小,相对稳定,其次是面积,体宽则波动幅度较大,相对不稳定。甲醛相较于另2种保存方式对强壮箭虫的体型影响最小。

强壮箭虫在 5%甲醛、-20° 冰冻和液氮 3 种保存条件下的体型变化情况见表 2。

表 2 强壮箭虫在 5%甲醛、-20℃冰冻和液氮 3 种保存条件下的体型变化

Tab.2 Body size changes of Sagitta crassa preserved in 5% formalin, -20 and liquid nitrogen

项目			1	体型			
体型参数(%)	体长					面积	
保存时间(d)	7	60	7	60	7	60	
5%甲醛	97.9	92.8	145.4	139.9	117	119	
370中旺	↘,稳定		/	⊅,稳定		⊅ ,稳定	
-20℃冰冻	66.8	50.7	139.8	159.4	114	97.8	
-20 ()水床		↘, 稳定	/	才 ,稳定	7	', \	
冻气	49.4	48.8	156.6	263.8	76.1	107	
液氮		↘, 稳定		1	>	, 1	

2.3 统计分析

对 5%甲醛、-20°C冰冻和液氮 3 种保存方法对中华哲水蚤和强壮箭虫不同体型参数的影响用 spss 软件进行 t 检验,结果如表 3 所示。对于中华哲水蚤,甲醛与另 2 种保存方法,冰冻保存和液氮保存相比,对体长的影响存在显著性差异,而冰冻保存和液氮保存相比,对体长的影响无显著性差异。对于中华哲水蚤的体宽和面积这 2 个体型参数,3 种保存方法之间不存在显著性差异。对于强壮箭虫,甲醛与另外 2 种保存方法,冰冻保存和液氮保存相比,对体长、体宽和面积这 3 个体型参数的影响均存在显著性差异。冰冻保存和液氮保存相比,对强壮箭虫的体长和面积的影响不存在显著性差异,而对体宽的影响存在显著性差异。

用 spss 软件对同一种保存方法对中华哲水蚤和

强壮箭虫体型的影响进行 t 检验,结果如表 4 所示。对于体长这个体型参数,3 种保存方法对中华哲水蚤和强壮箭虫的影响均存在显著性差异,对于体宽和面积这 2 个体型参数,甲醛保存对中华哲水蚤和强壮箭虫的影响不存在显著性差异,而冰冻保存和液氮保存分别对中华哲水蚤和强壮箭虫的影响存在显著性差异。

由上述分析结果可以得出,不同的保存方法对 浮游动物的体型存在不同的影响,甲醛与冰冻和液 氮保存对浮游动物体型的影响差异显著,冰冻和液 氮保存相比,对浮游动物体型的影响差异性不显著, 推测甲醛保存是一种化学试剂保存,与冰冻和液氮 保存对浮游动物的作用机理不同,而冰冻和液氮保 存对浮游动物的作用机理相似,只是由于温度不同, 因此引起的作用程度不同。体长与另外 2 种体型参 数体宽和面积相比,在不同的保存条件下变化的差

表 3 5% 甲醛、-20℃、液氮 3 种不同保存方法对中华哲水蚤和强壮箭虫不同体型参数影响的统计分析

Tab.3 Biological statistics of changes of different body size parameters of Calanus sinicus and Sagitta crassa preserved in 5% formalin, −20°C and liquid nitrogen

保存方法 —	ť	长度		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	面积		
	C. sinicus	S.crassa	C. sinicus	S.crassa	C. sinicus	S.crassa	
甲醛-冰冻	0.041*	0.006*	0.056	0.006*	0.075	0.033*	
甲醛-液氮	0.003^{*}	0.003^{*}	0.139	0.001^{*}	0.663	0.004^*	
液氮-冰冻	0.206	0.118	0.293	0.000^*	0.182	0.071	

表 4 同一种保存方法对中华哲水蚤和强壮箭虫 2 种不同 浮游动物体型参数影响的统计分析

Tab.4 Biological statistics of changes of different body size parameters of different zooplankton (Calanus sinicus and Sagitta crassa) preserved in one same preservation

r				
保存	长度	宽度	面积	
方法	C. sinicus VS	C. sinicus VS	C. sinicus VS	
7374	S.crassa	S.crassa	S.crassa	
甲醛	0.002*	0.08	0.936	
冰冻	0.005^*	0.007^*	0.014^{*}	
液氮	0.027^*	0.000^*	0.000^*	

异性更显著。

而同一种保存方法对甲壳类的中华哲水蚤和胶质类的强壮箭虫体型的影响存在显著性差异。相较而言,甲醛保存较另外2种保存方法,冰冻和液氮保存对不同种浮游动物体型影响的差异性小,因此在浮游动物的体型测量实验中,相较于冰冻和液氮保存、推荐使用5%甲醛保存。

3 讨论

对于甲壳类生物中华哲水蚤而言, 各种保存方 法对体型变化的影响比较小,变化相对稳定。甲醛保 存下其体长略有下降,体宽和面积略有上升;冰冻 和液氮保存下体长略有增加, 体宽和面积有所下降, 但前者对体型的影响相对较小。比较分析发现,冰冻 和液氮保存条件下中华哲水蚤的体型变化趋势相同, 与甲醛保存下的变化趋势相反。因此推测,不论是 -20℃的冰冻条件还是-196℃条件下的液氮保存, 其 保存过程中导致中华哲水蚤产生生理生化反应的机 制可能是相同的、但两者在温度上的巨大差异、使 的作用程度有所不同、导致体型的变化程度有所不 同。已有的报道文献中、关于各种保存方法对浮游动 物的体型影响的研究并不多。已有的研究表明、甲醛 保存对桡足类浮游动物的体长的影响很小[14-15]。 Maria^[2]研究了 4%的甲醛溶液对双刺纺锤水蚤的成 体及幼体体长的影响,研究结果表明鲜活个体和保 存后个体其体长无明显差异, 与本文的研究结果相 似。这可能与甲壳类生物体表的几丁质外骨骼在保 存过程中几乎不受影响或是受到的影响相对较小有 关。综合分析发现甲醛较之于另 2 种保存方式对体 型的影响较小, 体长和面积在 3 种保存方式下变化 较小、几乎稳定、因此在利用体型估算中华哲水蚤 的生物量时,推荐使用甲醛保存下的体长和面积。

对于胶质类生物强壮箭虫而言, 在 3 种保存条 件下,体长先下降后趋于稳定。相较而言,液氮保存 对体长的影响大于冰冻大于 5%甲醛保存。对于体宽、 3 种保存方式都会导致体宽的增加, 体宽增加的幅度, 液氮大于-20℃冰冻大于甲醛保存。由于强壮箭虫属 于胶质类生物,体内水分含量相对较大,在保存过 程中,体型柔软,变形严重,出现翘尾现象,冰冻和 液氮保存下此现象尤其严重, 因此会导致在利用 ZooScan 测量其体型参数的过程中, 出现较大的误 差; 其次, 在用-20℃冰冻和液氮保存过程中, 要将 强壮箭虫其身体尽量伸展的平铺于筛绢上、否则在 保存后,强壮箭虫的身体会出现不同程度的扭曲, 不利于体型测量、在操作上比较复杂、不适合大批 量样品的保存, 而 5%的甲醛保存, 操作容易, 而且 强壮箭虫在保存后、身体较伸展、坚硬、不易变形。 最后, 从经济方面考虑, -20℃冰冻和液氮保存成本 远大于 5%甲醛保存。因此基于上面几个原因, 在对 强壮箭虫的体型进行分析时, 3 种保存方法中, 推荐 使用 5%的甲醛保存。体长、体宽和面积 3 个体型参数 中、体长和面积在保存过程中变化稳定、推荐使用。

通过本实验综合分析发现,不同的保存方法对 浮游动物的体型的影响不同、甲醛保存相较于另 2 种保存方法对体型的影响更小,甲壳类的中华哲水 蚤比胶质类的强壮箭虫其体型受保存的影响更小, 这与已发表的文章报道相似、如 Elbert 等研究了保 存的浮游动物样品其体积随时间的变化、结果表明 甲壳类浮游动物占优势的样品其体积下降较小, 毛颚 类浮游动物在保存过程中有非常明显的体积损失[16], 推测物体内的高含量水分是导致在保存过程中湿重 和体积损失较大的原因[11]。不同的体型参数在不同 保存条件下的变化也存在差异, 体长与另外 2 种体 型参数体宽和面积相比、在不同的保存条件下变化 的差异性更显著。体长和面积 2 个体型参数在保存 过程中变化相对稳定。同一种保存方法对不同种类 的浮游动物体型的影响存在差异。甲醛保存较另外 2 种保存方法,冰冻和液氮保存对不同种浮游动物体 型影响的差异性小。浮游动物在保存过程中、保存初 期体型变化剧烈, 之后逐渐趋于稳定。

本文采用图像自动分类识别技术,分析了 3 种不同的保存方式对中华哲水蚤和强壮箭虫的体长、体宽和面积 3 种不同体型参数的影响,为研究浮游动物的体型-生物量转换方程提供了校正因子,并为在大尺度范围内研究海洋生态系统的物质循环和能

量流动等相关问题提供了一定的理论支撑。

参考文献:

- [1] Louis A, Giguère J F, St-Pierre B B, et al. Can we estimate the true weight of zooplankton samples after chemical preservation? [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1989, 46: 522-527
- [2] Maria P. Effect of formalin preservation on the body length of copepods [J]. Proc Estonian Acad Sci Biol Ecol, 2007, 56(4): 326-331.
- [3] 左涛, 王克, 李超伦. 南黄海中华哲水蚤体长-干重的关系[J]. 水产学报, 2003, 27 (增刊), 103-105.
- [4] Steedman H F. Aldehydes-General and applied data on formaldehyde fixation and preservation of marine zooplankton [J]. Monograph on Oceangraphic Methodology, 1976, 4: 103-154.
- [5] Shin-ichi U Y E. Length-Weight relationships of important zooplankton from the Inland Sea of Japan [J]. Journal of the Oceanographical Society of Japan, 1982, 38: 149-158.
- [6] Keiichi K, Jotaro U. Length-Weight relationships of eight freshwater planktonic crustacean species in Japan [J]. Freshwater Biology, 1998, 39: 199-255.
- [7] Koichi A. Length-weight relationships and chemical content of the planktonic copepods in the cananeia lagoon estuarine system, Sao Paulo, Brazil [J].Plankton Biol. Ecol, 2001, 48(2): 121-127.
- [8] Cohen R E, Lough R G. Length-Weight relationships for several copepods dominant in the Georges

- Bank-Gulf of Maine Area [J]. Northw Atl Fish Sci, 1981, 2: 47-52.
- [9] Hillary M M. Mean individual dry weight and length-Weight regressions of some zooplankton of Lake Kariba [J]. Hydrobiologia, 1994, 272: 231-238.
- [10] Yves de Lafontaine, Leggett W C. Changes in size and weight of hydromedusae during formalin preservation[J]. Bulletin of Marine Science, 1989, 44(3); 1129-1137.
- [11] 毕永坤. 基于 ZooScan 技术的浮游动物体型参数和 生物量关系的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究 所, 2012, 1-64.
- [12] 孙松, 周克, 杨波, 等. 胶州湾浮游动物生态学研究 . 种类组成 [J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 1-7.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GBT 12763.6-2007 海洋调查规范-第 6 部分海洋生物调查[S].北京:中国标准版社,2007.
- [14] Dirk K, Osamu F, Harald R. Shrinkage and weight Loss of marine fish food organisms preserved in Formalin [J]. Bull Nansei Reg Fish Res Lab, 1982, 12: 13-18
- [15] Viitasalo M, Koski M, Pellikka K. Seasonal and long-term variations in the body size of planktonic copepods in the northern Baltic Sea [J]. Marine Biology, 1995, 123: 241-250.
- [16] Elbert H A, James R T. Plankton volume Loss with time of preservation [J]. California Cooperative Oceanic Fisheries Inverstigations, 1963, 9: 57-73.

The influence of several preservation methods on the body size of Calanus sinicus and Sagitta crassa

FENG Qiu-yuan^{1, 2}, SUN Xiao-xia¹, REN Lin-lin^{1, 2}

(1. Jiaozhou Bay Marine Ecosystem Research Station, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb., 13, 2014

Key words: Jiaozhou bay; zooplankton; preservation; shape parameter

Abstract: In this paper, Calanus sinicus and Sagitta crassa two dominant species in coastal waters of China, were used to study the changes of body size (length, width and area) after 2 months preservation using three preservation methods including 5% formaldehyde, -20°C freeze and liquid nitrogen. The results showed that for C. sinicus, the body length decreased 0.6%, and the body width increased 7% after preserved in formaldehyde for 2 months. The body length of C. sinicus preserved at −20°C and in liquid nitrogen increased 1% and 6.8%, and the body width decreased 9% and 18.4% respectively. For S. crassa, the body length decreased, the body width and the body area increased a bit after preserved for 2 months. The body length decreased 7.2%, 49.3% and 51.6%, and the body width increased 39.9%, 54.4% and 163.8%, and the body area became 119%, 97.8% and 107% of the original ones, respectively after preserved in formaldehyde, -20°C and liquid nitrogen for 2 months. The gelationous zooplankton became flexible, and deformed seriously when preserved at −20°C and in liquid nitrogen, so that there were big errors when the body size was measured by zooscan. Comparing to freeze and Liquid nitrogen, formaldehyde led to smaller changes of zooplankton's body size. The changes of body size of C.sinicus were smaller than that of S. crassa during the above three preservations. The body size changed dramatically at first, and then tended to stabilize. The body length changes of C. sinicus and S. crassa preserved in the above three ways were the smallest, followed by the area changes. Body length and area of zooplankton preserved in formaldehyde were recommended when the zooplankton body size were used after preservation.

(本文编辑: 梁德海)