

流式细胞计在海洋浮游植物研究中的应用*

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY (FCM) TO STUDY OF MARINE PHYTOPLANKTON

晁敏 张利华 张经

(华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

中图分类号 Q337 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)04-0018-05

传统的显微镜技术是浮游植物鉴定的重要手段,至今仍是浮游生物学家们进行研究观测的必备工具,但当研究较小的微型藻类(nanophytoplankton, < 20 μm)及微微型藻类(picophytoplankton, < 2 μm)时,常规显微镜则存在困难,如水体中光合性的细菌必需染色才能通过荧光显微镜观测,而且,当研究涉及时间、空间尺度时,牵涉到的工作量非常大,显微镜方法在物种计数的速度与准确性方面受到很大限制。

近年的文献检索表明,应用流式细胞计(Flow Cytometry, FCM)检测微型及微微型的浮游植物正为越来越多的研究者所采用。流式细胞计以其快速、样品制备简单、数据可存储备份的特点,在常规显微技术所难以检测的细菌、微型及微微型浮游植物类群的分析检测方面逐渐占有了一席之地。流式细胞计最初设计用于分选哺乳动物细胞及研究动物细胞生物化学特性,至今仍大量应用于以生物化学、细胞生物学、生物医学为代表方向的研究领域,分析的细胞类型多为动物细胞,也有极少数的高等植物细胞,而流式细胞计最早应用于分析浮游植物是在80年代,Paau等^[1,2]、Yeutsch等^[3,4]有关海洋中个体细胞及微粒分析方法的叙述,对于流式细胞计应用于海洋微型浮游植物研究上起了积极的推动作用,Yeutsch^[5]、Olsson等还专门对于分析方法作了综述,更进一步地促进了流式细胞计在微型及微微型浮游植物生物学研究中的运用。可以说正是流式细胞计的使用,发现并分离出一种微微型浮游植物原绿球藻(*Cyanobacterium Prochlorococcus nanus*)^[6],为迄今为止发现的个体最小的一种可进行光合作用的细菌,而研究结果表明原绿球藻与另外一种光合细菌聚球藻(*Cyanobacterium Synechococcus*)广泛分布于世界各大海域,并在初级生产力构成中占有重要地位^[7]。

1 流式细胞计检测分析海洋浮游植物的方法

1.1 研究方法

许多应用于细胞生物学或生物化学的流式细胞术方法并不能被很好地套用于浮游植物的分析。Marie等总结了一般用于浮游植物、细菌、病毒分析的流式细胞计方法^[8]。

1.1.1 浮游植物样品的采集及处理

(1) 取样 由于流式细胞计分析所需样品量一次仅需几毫升,因而可采用一般棕色塑料试剂瓶(50 mL)采样;为了获得较好的分析结果,取样应采取合理的时间/空间尺度,如可根据CTD剖面确定采样层次,根据研究区域的物理、化学或生物因子的不同确定采样站位等。

(2) 过滤与浓缩 流式细胞计在分析大粒径微粒方面还有局限,这主要是受仪器自身激光光斑大小、进样口口径较小等因素限制,如FSCScan型流式细胞计的氩离子激光器光斑仅为20 μm × 60 μm,较大的浮游植物通过时激光所通过的可能仅为藻体的一部分,但仪器可能把此认定为通过整个细胞,必然会产生错误,再者大型藻类有可能堵塞样品进样管,因而通常需要用滤膜过滤样品,以去除大型浮游动、植物的影响,滤膜的种类由研究的目的而作出选择,而孔径一般在50 μm以下;当单位体积样品中细胞数量过

* 国家重点基础研究专项经费资助 G19990437号。

第一作者:晁敏,出生于1975年,博士,研究方向为海洋生物地球化学。电话:021-62232887。

收稿日期:2001-03-20;修回日期:2001-12-10

少时通常采取浓缩的方法,但并不是必需步骤。

(3) 保存 Marie^[8] 提出利用甲醛(1%)或戊二醛(0.1%) (在样品中的最终浓度) 固定过滤样品,在室温下固定 5~15 min,然后放在液氮罐中保存,采用此方法可避免浮游植物细胞数量的过多损失、损坏,固定后样品可带回实验室内分析,这种方法据作者报道可使样品性质在 1 年左右不会发生较大改变。

1.1.2 流式细胞计样品测量

(1) 材料 过 50 μm 滤膜的浮游植物样品,如样品已固定且保存于液氮罐中,则可在水浴条件(37℃) 融化或自然解冻后再过滤。1.0 μm 荧光微球(PolySciences),每毫升样品加入 5~20 μL 浓度约为 10⁵ 个微球/mL 的微球鞘液(可用 Milli-Q 水直接作为鞘液,或蒸馏水过 0.22 μm 混合纤维素酯微孔滤膜) DNA 特异荧光染料如 SYBR Green I、YOTG1、TOTO1、TQPRO1 等。

(2) 上机测试 设置所有测试参数在对数模式;以 FL3 为阈值,设置 FSC = EOI,SSC = 450,FL1 = 650,FL2 = 650,FL3 = 650,可很好地检测海洋微型浮游植物样品^[8];分别设置窗口观测感兴趣的信号,设定检测时间、文件存贮路径并作详细实验记录。

2 流式细胞计检测微型及微微型浮游植物的基本原理

每个样品可获得 2 种散射光信号及 3 种荧光信号,这些信号是细胞/微粒在激光束作用下产生的光电信号,其中前向光散射信号(Forward scatter light, FSC)可表征细胞/微粒大小,侧向散射光(Side scatter light,SSC)是 90° 散射光信号,可表征细胞形状、大小、细胞内特殊内含物等,FL1、FL2、FL3 分别表征绿色荧光(530 nm ± 30 nm)、橙色荧光(585 nm ± 42 nm)、红色荧光(> 650 nm),则可用于鉴定细胞/微粒特定成分。一般来说,DNA 特异染料-细胞 DNA 复合体受激光激发产生的荧光可用 FL1 来表征,聚球藻属藻类(*Synechococcus* spp.) 含有的藻红素被激发产生的荧光,可用 FL2 来表征,叶绿素在浮游植物中广泛存在,其被激发荧光可近似用 FL3 来表征,FSC 信号被光电二极管收集,SSC、FL1、FL2、FL3 分别被相应的光电倍增管收集,各信号通过数据传输线传输至计算机检测终端,在终端可同时观测到所检测到的细胞类群,分析时可对不同类群的数量、平均粒径、单位细胞荧光含量进行统计分析。

下面便为流式细胞计检测浮游植物所应用到的几种技术。

2.1 应用浮游植物的自发荧光检测微型及微微型浮游植物

微型及微微型浮游植物细胞一般为单细胞个体,大小小于 20 μm,个体大小不会超过激光光斑大小,也不会堵塞进样口,因而符合流式细胞计样品需为单细胞悬液的要求,且微型及微微型浮游植物细胞内含有光合作用色素叶绿素(chlorophyll),叶绿素被激发产生红色荧光,可与水体中其他杂质或泥沙颗粒相区别,还有些浮游植物如红藻(Red alge)、隐藻(Cryptophyta)、聚球藻属(*Cyanobacterium Synechococcus*) 等具有藻红素(phycoerythrin, PE),受激发后可产生橙色荧光,因而可由流式细胞计的橙色荧光光电倍增管检测器收集该色素的光电信号,与仅含有叶绿素的浮游植物和杂质、泥沙颗粒相区别。在此,以流式细胞计在东海某站位检测到的浮游植物图谱(见图 1)来说明应用自发荧光检测浮游植物的基本原理。

图 1a 中聚球藻及原绿球藻位于 1.0 μm beads 的左侧,由于 FSC 表征细胞/颗粒大小,所以聚球藻及原绿球藻细胞大小小于 1.0 μm,之所以确定这两类群分别为聚球藻和原绿球藻,是因为在世界海洋迄今为止发现的小于 2.0 μm 的浮游植物仅有两个属,聚球藻属浮游植物不但具有光合作用色素叶绿素(发射红荧光),还具有特征辅助色素藻红素(发射橙荧光),所以同时具有 FL2、FL3 信号,在图 1a、c 中均可观测到此类群,原绿球藻细胞比聚球藻还小,具有光合作用色素叶绿素 a2 及 b2(亦可发射红荧光,但弱于聚球藻红荧光强度),由图 1a 可看出位于聚球藻左下方的类群即为原绿球藻,图 1a、b 还可观测到微微型及微型真核微藻,这两个类群包含较多物种,因大小、色素含量相近,因而通常统称其为微微型真核微藻(> 1 μm and < 2 μm)、微型真核微藻(> 2 μm,约 6 μm)。

2.2 应用外源荧光

外源荧光是相对于藻类的自发荧光而言,是人为利用特定染料对细胞内特定成分如 DNA、RNA、蛋白质、脂质等进行标记,染料或染料与靶物质的复合体在激光束作用下产生的荧光即外源荧光。这些染料分为两类,一类是非常特异,但通常不可定量分析,另一类可以准确定量分析细胞某一组分如 DNA 的含量等,染料可以自身带有荧光或者与细胞组分结合而产生荧光,应依不同的研究目的选择不同的染料,染料或染料复合体的激发波长应与激光器的波长相近,才可收到较好的检测效果。

总结起来,共有两种应用流式细胞计检测外源荧光的技术,分别为免疫荧光技术、DNA 及 RNA 定量分

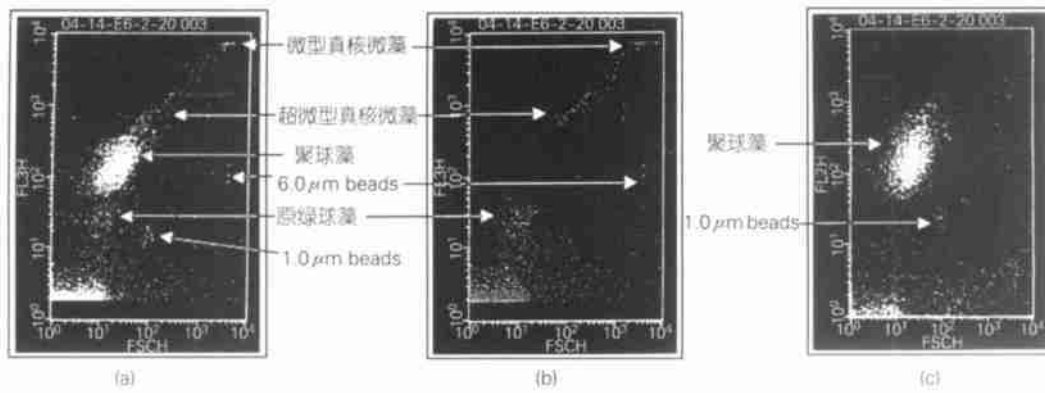


图1 东海某站位流式细胞计图谱

Fig.1 Dot Plot of flow cytometry
各子图为同一样品不同参数观察图谱

The three subgraphs come from the same sample detected which analyzed with different parameters

图1a、b为前向散射光 FSC与红色荧光 FL3的二维点图,图1c为 FSC与橙色荧光 FL2的二维点图,总共有4个生物类群被检测,分别为聚球藻一种(*Synechococcus* sp.)、原绿球藻(*Prochlorococcus*)、微型真核微藻(Picocaryotes)及微型真核微藻(Nanoeukaryote),图1b去除了c中聚球藻类群的影响,并加入1.0 μm标准荧光微球(beads, Polyscience公司)及6.0 μm三色微球(beads, Beckton Dickinson公司)作为内标,(本图来自于本课题组2000年10月东黄海航次E7站位20m深处流式细胞计海水样品分析结果)。

析技术在目前的浮游植物研究中应用较广泛。

2.2.1 免疫荧光技术

本技术根据抗原-抗体反应原理,利用单克隆抗体对细胞内抗原进行免疫标记,从而在流式细胞计下检测,对浮游植物进行分类的技术。基本方法是从某一特定浮游植物中提取抗原(如细胞壁、蛋白质等),纯化后制备相应的抗血清(antiserum),该血清即可与浮游植物中同型抗原特异结合,利用染料对抗体-抗原复合体染色后,上流式细胞计进行检测。Visser等^[9]1978年曾对利用流式细胞计进行免疫荧光定量及相关染色技术有过综述,Shapiro等1989年、Campbell 1989年则获得了真核藻类细胞的抗体,可用于分析真核藻类色素类型或细胞壁成分(多糖、糖蛋白、蛋白等),Vieling等1995、1996年利用提纯后的抗细胞壁血清抗体免疫检测 *Dinoflagellates pirocentrum*,并成功利用流式细胞计检测到了这种免疫荧光。

2.2.2 DNA、RNA定量分析技术

无论原核浮游植物还是真核浮游植物都具有核物质,核物质的状态反映浮游植物的生理状态,Velthuis等人^[10]建立了个体浮游植物DNA含量的精确数据库,研究结果表明在DNA含量(经染料染色后测得)和浮游植物生物量之间存在良好的相关关系。而流式细胞计在定量研究DNA、RNA定量分析方面具有相当的优势,目前主要涉及以下4个方面。

(1) 浮游植物基因组大小(genome size)及倍性

(ploidy)研究 相关技术 Galbraith等^[11]就已应用于高等植物组织细胞的倍性及基因组大小分析,在浮游植物研究中,基因组大小分析可以区分在形态上相似的微型或微型真核浮游植物,而倍性分析则可以用来帮助认识真核浮游植物的有性生殖过程^[12-14]。

(2) 浮游植物细胞周期分析(cell cycle analysis)

细胞周期分析可帮助研究者认识浮游植物细胞分裂及其与所处环境如光及营养盐水平的相互关系^[13],还可帮助认识自然水体中浮游植物细胞分化(cell division)的速率,从生理生态学角度研究浮游植物分布的机理及原因。

(3) 应用种特异寡核苷酸荧光探针的原位杂交

(in situ hybridization)进行浮游植物鉴定 rRNA有一部分序列在进化过程中是非常保守的,而其他序列则与进化有关,从而使各物种形成了自身特定序列;荧光标记的rRNA探针非常小,较易穿过固定细胞的细胞膜与靶细胞同源序列杂交即原位杂交技术,并标记细胞,可鉴定特定物种或类群^[15]。流式细胞计在对原位杂交细胞的荧光定量方面则非常有效,而利用表面荧光显微镜检测 FITC 标记的探针与细胞的原位杂交则较困难,这是因为叶绿素的自发荧光会严重干扰探针的荧光。因而应用流式细胞计检测寡核苷酸探针介导的原位杂交可应用于浮游植物鉴定、浮游植物的多样性(diversity)研究,此技术在认识微生物群落结构与功能方面也大有前途^[16]。

3 流式细胞计在浮游植物研究领域的 应用前景

3.1 微微型浮游植物及微型浮游植物在世 界海域的分布及生态学

目前流式细胞计已广泛应用于微微型浮游植物的检测,微微型浮游植物由于仅限于 *Synechococcus*、*Prochlorococcus* 两个属及真核微微型浮游植物,其用于流式细胞计测试的样品处理方法简单,可直接利用自发荧光特性,快速鉴定各种群,至今已在各大洋对微微型浮游植物的分布、丰度及垂直分布特征作了大量的研究^[17,48],同时在许多近岸水域如 Frankel 等在地中海有关原绿球藻冬季的分布^[19], Veldhuis^[20] 在红海的研究, Vaulot 等^[21] 在长江冲淡水区聚球藻分布及细胞性质的研究, Philips^[22] 对聚球藻在佛罗里达海湾一个亚热带内陆泻湖中形成的水华的研究,并从生理学角度探讨了聚球藻水华形成的机制。

Hofstraat^[23]、Jonker^[24] 对于浮游植物的流式细胞计分析结果表明,每单位体积的红色叶绿素荧光总量与分光光度计测得的叶绿素浓度具有良好的相关关系,建立在这种关系上,与常规分级叶绿素方法仅可给出不同粒级对生物量的贡献相比,流式细胞计的结果则可回答不同类群对于生物量的贡献,从而使研究更加深入。

3.2 浮游植物生理学

浮游植物的分布与温度、光、营养盐浓度有直接关系,不同种类浮游植物具有特定的生物地理分布范围,大多数浮游植物分布在近岸的营养较丰富的区域或者海洋真光层的某一特定层次,而有些浮游植物如原绿球藻大量分布于寡营养的大洋区,流式细胞计的细胞周期研究结果可良好地反映上述各种生态因子对于浮游植物的作用,如以处于不同分裂阶段的个体数量可反映分裂的速率及活度^[25],以单位细胞荧光含量来反映浮游植物对于光的适应程度^[17],以某一特定营养限制蛋白如磷限制蛋白 Pst_s 的出现来反映出现磷限制的临界磷浓度等^[26]。

3.3 微生态系统多样性及群落动态

微生态系统研究一向是生态学家或生理学家研究的热点,不仅因为其具有较强的可操作性,而且还可使科学家实现在野外所无法进行的实验工作^[27],许多微生态系统中初级生产者往往首选简单的微型或微微型浮游植物作为生态系统的生产者,对于系统的操作可着眼于捕食^[28]、光适应^[14]、营养盐利用等研究内容^[29]。

4 流式细胞计用于浮游植物检测的局 限性及展望

现今流式细胞计的设计还不能完全适合于海洋学研究。如仪器自身的性能如液流速度、电子噪声、光波动等均可影响观测结果^[30,31];当样品中细胞/微粒较大时,在流动室内使液流粘滞系数增大影响流速,样品粒径更大时则易造成样品管的堵塞或截留;在选择用于浮游植物外源荧光研究目的时,还需考虑去除浮游植物自身所带有的叶绿素荧光的干扰^[16]。

Dubelaar 等^[32]设计了一种专门用于浮游植物分析的流式细胞计,对于光学元件、液流系统、进样口形状及大小均作了详细描述,与现有商业出售的流式细胞计相比,这种型号的流式细胞计不但适合于测量单细胞的微型、微微型浮游植物,还可测定多细胞的宽度最大达 5 000 μm、长度最大达 1 000 μm 的大型浮游植物,相信不久的将来,这种机型便可面市,但更多地是,科学家根据研究目的的不同,对仪器的光学系统进行了部分改装。流式细胞计分选术是流式细胞计的一个非常重要的性能,把分选术应用于单种海洋浮游植物分选与培养将有助于室内浮游植物研究的进一步开展,但未见有成熟方法的报导,这方面仅 Vaulot 等^[21]作过一次尝试,如果在这些方面有所突破的话,将会大大促进海洋浮游生物学的各项研究。此外,目前连有外部成像设备的流式细胞计已出现并用于医学研究,能否应用于在种形态水平上难以鉴别的微型或微微型浮游植物研究方面还是一个未知数,不过前景广阔,有待于不断尝试、开拓。

5 我国同类研究的现状及不足

利用流式细胞计研究浮游植物的研究在我国还较少,宁修仁^[33]利用流式细胞计研究了长江口及其毗连海域(30°45' N~32°00' N, 121°00' E~124°00' E)聚球藻的分布及细胞特性,焦念志等^[34]利用流式细胞计(FASCALibur)测试了东海一些样品,但未附更详细的数据说明东海区微微型浮游植物的分布及动态。邹立于 1999 年 9 月首次应用流式细胞计(Facscan)研究了东黄海区微微型浮游植物的分布,但由于测试方法的不完善,未能取得较好的效果。973 课题“东黄海区生态系统动力学及其持续利用”2000 年 10 月航次时,作者所在的课题组把流式细胞计携带上科学考察船(东方红 II 号,青岛海洋大学),对于中国东黄海区微微型浮游植物进行了现场检测。此外作者所在的课题组于 2001 年 5 月东黄海区航次亦采用流式细胞计研究了东黄海的微微型浮游植物,分析结果将在不久后作以报告。

由此看来,我国应用流式细胞计研究浮游植物的研究范围及领域还较局限,仅限于微小型浮游植物的分布及生态学研究,且此项研究亦需连续进行下去,其他领域的研究还没有太多涉及,相信随着研究工作的深入,这些领域工作也会逐步开展。

致谢: 在此对华东师范大学河口海岸国家重点实验室生物地球化学组老师及同学在航次期间给予的帮助表示感谢!

参考文献

1 Paa A S, Oro J, Cowles J R. Application of microfluorometry to the study of algal cells and isolated chloroplasts. *J Exp Bot*, 1978, 29:1 011-1 020

2 Paa A S, Cowles J A, Oro J, et al. Separation of algal mixtures and bacterial mixtures with flow microfluorometer using chlorophyll and ethidium bromide fluorescence. *Archives of Microbiology*, 1979, 120:271-273

3 Yentsch C M, Horan P K. Cytometry in aquatic sciences. Special Issue of Cytometry. *Cytometry*, 1989,10(5) :1 250-1 255

4 Yentsch C M, Horan P K, Muirhead K, et al. Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnology & Oceanography*, 1983,28(6) : 1 275-1 280

5 Yentsch C M. Flow cytometric methods to assess our water world. In: Darzynkiewicz Z, Crissman H A eds. , *Methods in Cell Biology*. New York: Academic Press, 1990. 33

6 Chisholm S W, Olson R J, Zettler E R, et al. A novel free-living prochlorophyte occurs at high cell concentrations in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 1988,334:340-343

7 Campbell L, Vaulet D. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr*, 1994, 39(4) :954-961

8 Marie D, Partensky F, Vaulet D, et al. *Current Protocols in Cytometry*. [S. L.] John Willey & Sons. Inc. 1999

9 Visser J W M, Haaijman J, Trask B J. Quantitative immunofluorescence in flow cytometry. In: Knapp W, Holubar K, Wick G, eds. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Amsterdam: Elsevier/ North Holland Biomedical Press, 1978

10 Veldhuis MJ W, Cucci T L, Sieracki M E. Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. *J Phycol*, 1997,33: 527-541

11 Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in plant tissues. *Science*, 1983, 220:1 049-1 051

12 Simon N, Barlow R G, Marie D, et al. Flow cytometry analysis of oceanic photosynthetic picocaryotes. *J Phycol*, 1994, 30:922-935

13 Vaulet D, Birrien J L, Marie D, et al. Morphology ploidy

pigment composition and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J Phycol*, 1994, 30: 1 022-1 035

14 Vaulet D, Olson R J, Chisholm S W. Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Exp Cell Res*, 1986, 167:38-52

15 Amann R I, Binder B J, Olson R J, et al. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Env Microbiol*, 1990, 56(6) : 1 919-1 925

16 Marie D, Simon N, Guillou L, et al. DNA/ RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. In *Current protocols in cytometry*, [S. L.]: John Wiley & Sons, Inc., 2000

17 Olson R J, Chisholm S W, Zettler E R, et al. Pigments, size, and distribution of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnol Oceanogr*, 1990, 35(1) :45-58

18 Partensky F, Blanchot J, Lantoin F, et al. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the subtropical northeastern Atlantic ocean. *DeepSea Res*, 1996, 43: 1 191-1 213

19 Frankel S L, Binder B J, Chisholm S W. Winter presence of prochlorophytes in surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr*, 1990, 35(5) :1 156-1 164

20 Veldhuis MJ W, Kraaij G W. Cell abundance and fluorescence of picophytoplankton in relation to growth irradiance and nitrogen availability in the Red Sea. *Neth J Sea Res*, 1993, 21: 135-145

21 Vaulet D, Ning X R. Abundance and cellular characteristics of marine *Synechococcus* spp. in the dilution zone of the changjiang(Yangze river, China). *Cont Shelf Res*, 1988, 1 171-1 186

22 Philips E J, Badyal S, Lynch T C. Blooms of the picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* in Florida Bay, a subtropical innershelf lagoon. *Limnol Oceanogr*, 1999, 44(4) :1 166-1 175

23 Hofstraat J W, de Vreeze M E J, van Zeijl W J M, et al. Flow cytometric discrimination of phytoplankton classes by fluorescence and excitation properties. *J of Fluorescence*, 1991, 1(4) :249-265

24 Jonker R R, Meulemans J T M, Dubelaar G B J, et al. Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton. *Water Science and Technology*, 1995, 32(4) :177-182

25 Vaulet D, Marie D, Olson R J et al. Growth of prochlorococcus, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science*, 1995, 268:1 480-1 482

26 Scanlan D J, Silman N J, Donald K M, et al. An immunological approach to detect phosphate stress in populations and single cells of photosynthetic picoplankton. *Appl and Envir Microbio*, 1997, 63(6) : 2 411-2 420

27 晁敏,王仁卿,姚红艳. 微生态系统研究. *植物学通报*, 1999,16(6) :665-670 (下转封三)

(上接第 22 页)

- 28 Hansen F C, Witte H J, Passarge J. Grazing in the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: size selectivity and preference for calcified *Emiliana huxleyi*. *Aquat Microb Ecol*, 1996, 10: 307-313
- 29 Zettler E R, Olson R J, Binder B J, et al. Iron enrichment bottle experiments in the equatorial Pacific: Responses of individual phytoplankton cells. *Deep Sea Res II*, 1996, 43 (4): 1 017-1 029
- 30 Rivkin R B, Phinney D A, Yentsch C M. Effects of flow cytometric analysis and cell sorting on photosynthetic carbon uptake by phytoplankton in cultures and from natural populations. *Applied and Environmental Microbiology* 1986, 52 (4): 935-938
- 31 Haugen E M, Cucci T L, Yentsch C M, et al. Effects of flow cytometric analysis on morphology and viability of fragile phytoplankton. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(11): 2 677-2 679
- 32 Dubelaar G B J, Groenewegen A d C, Stokdijk W S, et al. Optical plankton analyzer: A flow cytometer for plankton analysis, II: specifications. *Cytometry*, 1989, 10: 529-539
- 33 宁修仁, 沃洛 D. 长江口及毗连东海水域蓝细菌的分布和细胞特性及其环境调节. *海洋学报*, 1991, 13(4): 552-559
- 34 焦念志, 杨燕辉. 四类海洋微小型浮游生物的同步监测. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 506-511

(本文编辑:张培新)