

河湖着生硅藻样品采集、永久玻片制作及鉴定

Sampling, Preparation and Identification of Benthic Diatom from Rivers and Lakes

陈威¹, 宋高飞², 赵先富¹, 杨英¹, 张俊芳¹, 马沛明^{1,*}

¹ 长江流域水生态监测中心, 水利部中国科学院水工程生态研究所, 武汉, 湖北; ² 水工程藻类生态学学科组, 中国科学院水生生物研究所, 武汉, 湖北

*通讯作者邮箱: pablomaming@gmail.com

摘要: 本方法概述了河湖着生硅藻的样品采集、永久玻片制作、显微鉴定及其注意事项, 为规范实验操作过程/提高后续相关数据分析的可比性提供依据。本实验以固定面积法采集河湖自然底质表面的着生硅藻样品, 通过强酸溶解有机质的方法, 去除有机杂物及硅藻细胞内含物, 只留下硅藻细胞壁, 并利用树胶制作成永久玻片, 在显微镜下鉴定、计数, 得到硅藻种类及密度数据, 用于下游群落分析。

关键词: 着生硅藻, 样品采集, 永久玻片, 鉴定, 计数

材料与试剂

1. 样品瓶
2. 硬质牙刷
3. (可选) 刀片
4. 圆形塑料片 (直径约 6 cm)
5. 100 ml 量筒
6. 1,000 μ l 和 100 μ l 移液器吸头
7. 2 ml 离心管
8. pH 试纸
9. 载玻片和盖玻片
10. 无尘布
11. 浓硫酸溶液
12. 浓硝酸溶液
13. 稀盐酸

14. 重铬酸甲饱和溶液
15. 无水乙醇及 95%乙醇溶液
16. 蒸馏水
17. Naphrax 树胶
18. 二甲苯
19. 镜油
20. 树胶溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀
2. 10 ml 玻璃试管及金属试管架
3. 1,000 μ l 和 100 μ l 移液器
4. 平口镊子
5. 水浴锅
6. 通风橱
7. 离心机
8. (可选) 加热板
9. 光学显微镜

实验步骤

一、样品采集

1. 合适的基质：直径 6~20 cm 的鹅卵石为最佳选择，实际情况中，也可以选择其他尺寸的石块，或沉水植物及挺水植物的水下部分茎段。
2. 样品的收集：首先轻轻冲洗基质，去除表面松散的附着物，使用固定面积的圆形塑料片 (直径约 6 cm) 覆盖在基质上，使用硬质牙刷刷去塑料片覆盖以外的所有附着物；取另一牙刷 (或刀片) 刷取并收集塑料片覆盖下的附着物，装入样品瓶中；至少重复采集 5 份平行样进行混合，记录总体积，并立即加入甲醛固定剂固定保存，使其在样品中的最终浓度为 4%。

3. 通过采集整株沉水植物或挺水植物水下部分植物茎段，直接刷取或剪成合适长度放入样品瓶中，加入蒸馏水快速摇晃，记录采样面积并加入甲醛溶液固定保存。

二、永久玻片制作

1. 测量固定硅藻样品的体积；

2. 视各样品浓度，取 1~2 ml 于厚壁玻璃试管中，放置在金属试管架上；

3. 将水浴锅设置为 85~90 °C，放置于通风橱中；

4. 将试管架置于上述水浴锅中，并加入与样品等体积的浓硫酸溶液，加热 0.5 h；

5. 沿试管壁加入 1~3 滴浓硝酸溶液 (此反应比较猛烈，会产生大量棕色气体)；待反应减弱或无反应时，加入与样品等体积的浓硝酸溶液，连续热水浴 8 h 以上；

6. 反应完毕并冷却后，缓慢从水浴锅中取出试管架，置于试验台上，用 1,000 µl 移液器吸去上清；

7. 加入 0.5~1 ml 重铬酸甲饱和溶液，摇匀后静置 12 h；

8. 将上述混合液转移至 2 ml 离心管中，不足 2 ml 则需加入蒸馏水定容至 2 ml；

9. 将适用于 2 ml 离心管的离心机转速设置为 2,500 rpm，离心 30 min，去上清，再次加入蒸馏水定容至 2 ml 并摇匀，同等条件下再次离心，重复 4~5 次；

10. 待所有样品上清均为透明，且 pH 值为 7 后，加入 95%乙醇溶液，定容至步骤 2 中的原始样品体积；

11. 取稀盐酸洗过、浸泡在无水乙醇中的盖玻片 (2 cm*2 cm)，用无尘布擦干后置于水平桌面上备用；

12. 将步骤 10 中的样品摇匀后，使用 100 µl 移液器迅速吸取中间层溶液 40 µl，垂直滴在盖玻片正中间，样品自动均匀扩散至整个盖玻片表面，待乙醇完全挥发干燥，或放置中加热板上加热干燥；

13. 取树胶溶液 40 µl，缓慢滴在干净的载玻片中间，使用平口镊子将上述固定有样品的盖玻片反盖在树胶溶液上，树胶溶液均匀扩散，如有气泡，使用牙签把气泡挤出，或使用加热板加热后去除气泡。贴上包含样品信息的标签并置于通风处干燥 2~3 天。若有树胶溢出，可使用牙签或手术刀将溢出的教剥离掉，达到便于观察和美观的效果。至此，着生硅藻永久玻片制成，等待镜检。

三、样品鉴定

1. 确定分类标准：根据数据使用的需求确定鉴定到种或属水平，采用与研究区域相关的植物区系命名系统或国家级的硅藻名录、图册等权威资料作为分类参考标准；
2. 镜检：将制作好的着生硅藻永久玻片置于光学显微镜下，低倍镜下寻找目标硅藻，然后在高倍镜下 (1,000 倍) 使用油镜进行鉴定和计数，带有相差或微分干涉功能的显微镜为佳；
3. 计数：按行格法或视野法计数硅藻壳瓣数 (一个细胞为两个壳瓣)，计数总数不低于 400，计数表格如表 1 所示；
4. 质量控制：同一批样品中随机选取不低于 10% 的样品在同等条件下进行重复计数，两次结果的误差均在 15% 以内，则本次计数结果有效。

表 1. 着生硅藻定量检测记录表

检测标准:	仪器名称编号:	环境温湿度:
检测时间		
样品编号		
浓缩体积 V/ml		
计数行数 n_1		
计数视野数 n_2		
采样面积 S/cm^2		
.....		
检测总个数 n		
总密度 N (个/ cm^2)		
总密度 $N = \frac{\frac{1}{2}n \cdot L^2 \cdot V}{(L \cdot d \cdot n_1 + \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot n_2) \cdot v \cdot S}$, 其中 L 为盖玻片边长 2cm, d 为 1000 倍下显微镜视野直径, $v=0.1\text{mL}$		

检测:

校对:

审核:

102 注意事项

- 103 1. 加入浓硫酸和浓硝酸时应缓慢、沿试管壁加入，避免反应剧烈而溢出。
- 104 2. 水浴锅长时间高温工作时，应有人值守，定时加水，避免烧干。
- 105 3. 上清为酸液，需专门废液回收处理。
- 106 4. 每次吸取上清酸液时应在不吸到沉淀物的前提下，多去上清，如果沉淀物被搅动，
- 107 则需重新离心。
- 108 5. 配制树胶-二甲苯溶液时，不可剧烈摇晃，避免气泡产生。
- 109 6. 树胶彻底干燥、凝固后的永久玻片方可镜检。

111 失败经验

- 112 1. 泥沙较多：当样品中泥沙较多时，会在镜检时难以观察。需在“二、永久玻片制作”
- 113 步骤 2 中取样时，摇匀后待样品稍沉淀 10 s 左右，待泥沙较硅藻先沉降再取上层
- 114 样品；步骤 12 中也可在摇匀后约 10 s 再取上层样品制作永久玻片，可有效较少泥
- 115 沙的影响。
- 116 2. 样品浓度低：若最终样品中硅藻细胞密度非常低，会影响数据准确性。需将“二、
- 117 永久玻片制作”中步骤 10 所得样品进行离心，加入样品原始体积的 1/5 至 1/2 体
- 118 积的 95%酒精溶液，再进行玻片制作，一般不低于 100 μ l；一并记录该信息用于最
- 119 后密度计算。
- 120 3. 硅藻细胞破碎：若个体较大的硅藻细胞破碎率较高，难以准确计数。需调低“二、
- 121 永久玻片制作”步骤 9 中的离心转速，并适当延长离心时间。

123 溶液配方

124 1. 树胶溶液

125 Naphrax:二甲苯 (v:v) = 1:1

126 配制之前将 Naphrax 树胶置于温水 (> 80 °C) 中加热，使其成为液态后取适量体

127 积到 2 ml 离心管中，加入等体积二甲苯，轻轻上下颠倒使其充分溶解备用，切勿

128 用力摇晃。

参考文献

1. 朱蕙忠, 陈嘉佑. (2020) 中国西藏硅藻. 科学出版社.
2. BS EN 13946:2014. Water quality: Guidance for the routine sampling and preparation of benthic diatoms from rivers and lakes.
<https://shop.bsigroup.com/ProductDetail/?pid=000000000030247820>
3. BS EN 14407. (2014) Water quality: Guidance for the identification and enumeration of benthic diatom samples from rivers and lakes.
<https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=000000000030247826>