**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](mailto: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 μl和100 μl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 μl和100 μl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n1 |  |
| 计数视野数n2 |  |
| 采样面积S/cm2 |  |
|  |  |
|  |  |
| …………………… |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
| 检测总个数n |  |
| 总密度*N* (个/cm2) |  |
| ，其中L为盖玻片边长2cm，d为1000倍下显微镜视野直径，v=0.1mL | |

检测： 校对： 审核：

**注意事项**

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。
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。
3. 上清为酸液，需专门废液回收处理。
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，则需重新离心。
5. 配制树胶-二甲苯溶液时，不可剧烈摇晃，避免气泡产生。
6. 树胶彻底干燥、凝固后的永久玻片方可镜检。

**失败经验**

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”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，可有效较少泥沙的影响。
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、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体积的95%酒精溶液，再进行玻片制作，一般不低于100 μl；一并记录该信息用于最后密度计算。
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、永久玻片制作”步骤9中的离心转速，并适当延长离心时间。

**溶液配方**

1. 树胶溶液

Naphrax:二甲苯 (v:v) = 1:1

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