



CytoSense 扫描成像藻类监测系统 淡水监测方案

2020.02.21

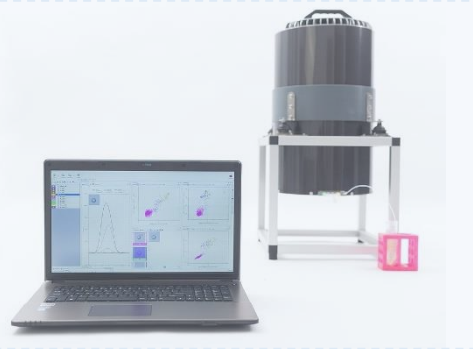


上海泽泉科技股份有限公司
王阳阳 13761793649
sunny.wang@zealquest.com

1. 简介

随着人类文明的不断进步，流式细胞仪逐渐成为研究微观生物最先进的科研工具。但是传统的为临床医学开发的流式细胞仪因为分析管径较小，容易堵塞而无法得到更好的应用。因此，结合长期的监测经验和当前用户需求，荷兰 CytoBuoy 系列扫描成像浮游植物流式细胞仪，针对传统流式细胞仪分析水环境样品的诸多不足进行了技术突破，使得流式细胞仪技术从实验室走出到野外，可现场原位进行更为快捷的藻类检测分析和自动识别。是目前在浮游植物监测领域中技术最先进的仪器之一。

- ◇ 独创的脉冲信号指纹图谱技术
- ◇ 高质量高速流动成像技术
- ◇ 超大的分析流动池（粒径范围）
- ◇ 内置循环鞘液系统
- ◇ 可定制模块化的系统设计
- ◇ 稳健的野外适用性
- ◇ 原位自动监测



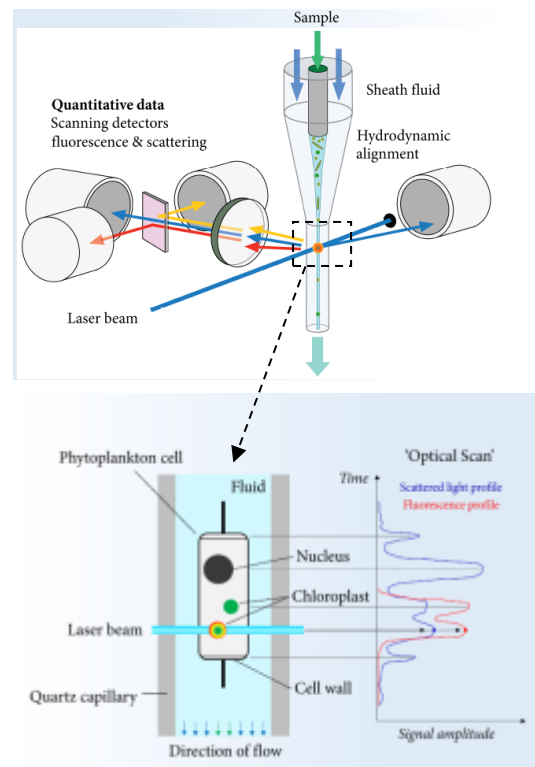
2. 测量原理

样品中的细胞和颗粒物在鞘液的流体力学聚焦作用下高速列队经过狭窄的喷嘴，在测量区液流和激光垂直相交。颗粒经过激光时产生的前向、侧向散射和叶绿素等色素荧光通过检测器收集而进一步分析。

基于激光扫描的人工或自动粒子数据聚类，扫描记录各种光学信号（散射、荧光）的动态变化，包括多达 8 个光散射和荧光散射信号通道，每个信号有 10 个形状和大小参数，包涵了丰富的细胞形态学信息，因此每个粒子有 80 个相关变量可用于聚类，可以将不同特征（大小，形态，色素等）藻细胞聚类区分开来，利用这些形态学信息结合流动成像可以建立浮游植物特征信息数据库，进而利用 CytoSense 对浮游植物详细分类，了解浮游植物的种群变化和水华预警。

在自然水体中，我们需要关注的是优势藻种，正是这些藻种在生态中其主导作用。CytoSense 快速聚类分析，对于定点水域，同样参数的散点图可以以时间序列来反映水体优势种类的变化，对未来的藻华预警。藻类的自动识别是目前藻类监测领域最为复杂和最具有挑战性的工作，我们正在和相关单位、用户合作完成的藻类建库和自动识别功能，使该仪器得到更好地应用。

在实际应用中，CyoSense 可以在种群之间进行良好区分。除浮游植物外，纤毛虫、无节幼体、线虫、卵等也容易被鉴别。这些颗粒 100% 可以被检测和表征，因此浓度的测定非常可靠。散射和荧光是定量的，可很好的表征生物量和体积，较易生成分布，并且单细胞表达的生物量是线性的，因此比图像分析*更可靠。

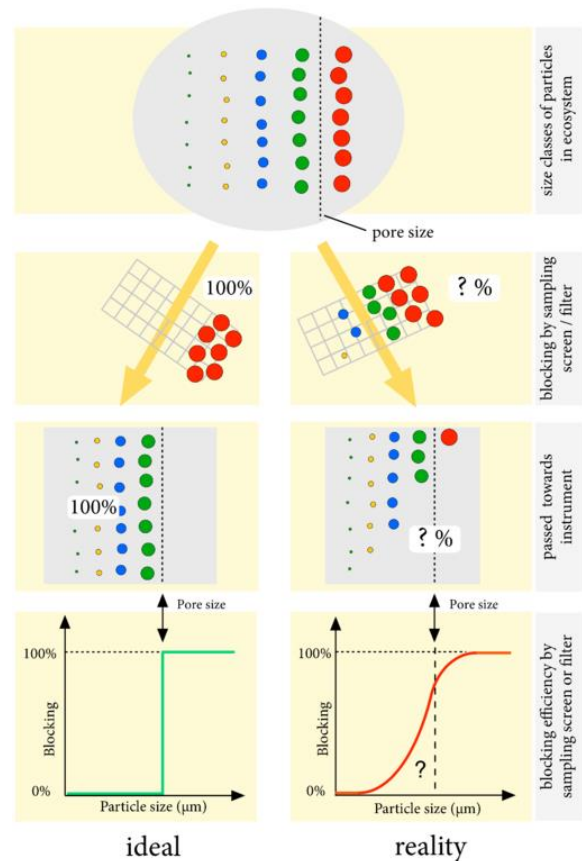
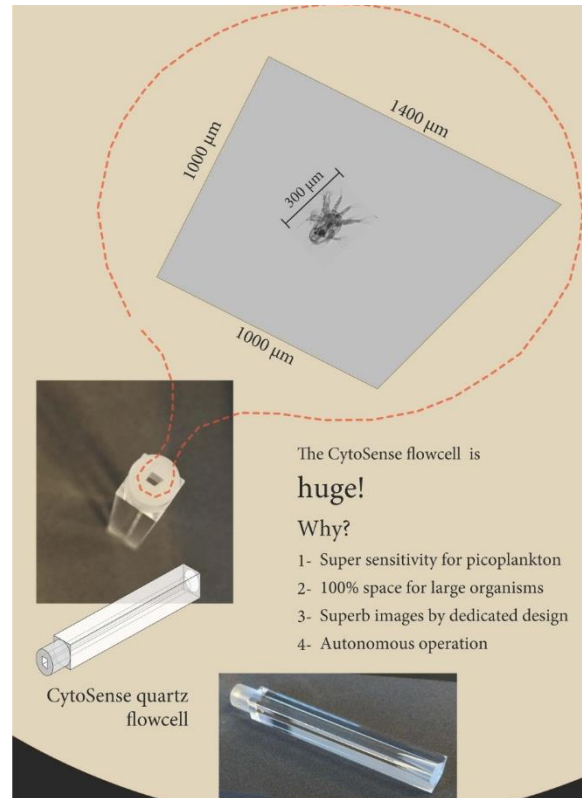
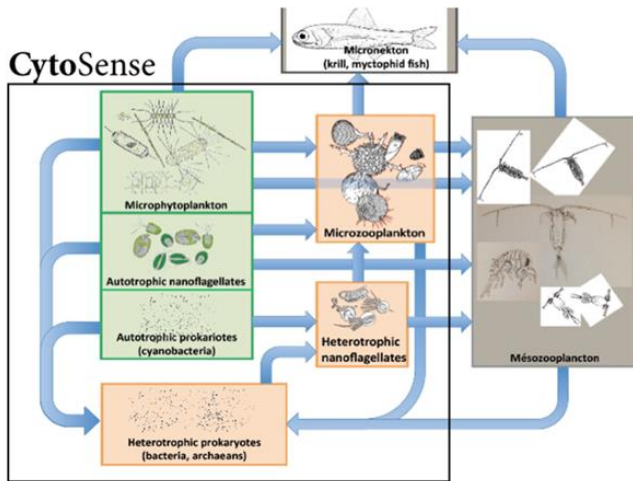


*二维图像的生物量/体积分析取决于粒子的方向（对于所有非球形形状）。CytoSense 进行的激光扫描与粒子的方向无关，颗粒通过薄层激光束，发射光被实时采集并数字化，从而对每种光学特性进行稳健的体积测定

3. CytoSense 扫描成像流式细胞仪在浮游植物监测中的优势

3.1 超大粒径分析范围样本无需过滤分级

- 可测定粒径范围 0.1-700 μm (1/1.2 mm 过滤, 无样品破坏) 的浮游植物细胞或其他颗粒 (细菌、浮游动物及沉积物等)。
- 浓度范围广, 无需对样品过滤或分级处理 (10-10¹⁰ Particles/L)
- 可直接测定大粒径藻细胞和藻群体 (如常见的微囊藻群体等)
- 低剪切力设计可测定易碎颗粒和丝状藻。(最长 4mm)



注 1: 过滤有哪些弊端?

如果使用 $X \mu\text{m}$ 的滤筛过滤样品, 通过的颗粒粒径只有 X 的 $1/3$. 颗粒大于 $1/3X$ 的将很难通过滤筛, 因此, 通过的颗粒数量偏低且对浓度的评估不准确, 因为接近 X 大小的颗粒几乎没有通过。所以, 使用非常粗略的方法可以假定, 在仪器入口前进行通过 $X \mu\text{m}$ 的筛网进行任何过滤, 所得最大颗粒粒度的正确测定值仅为 X 的一半。(Sample filtration reduces representative sampling to $1/3$ of filter pore size, George B.J. Dubelaar MSc, Puck Willemse BSc, Tina Silovic PhD)

3.2 高速流动成像技术藻类识别更直观

流动成像模块可在颗粒通过系统时对其进行实时拍照，对应脉冲图谱，对藻类进行初步鉴定。

成像质量——可观测到鉴定相关的细节和小结构的清晰图像

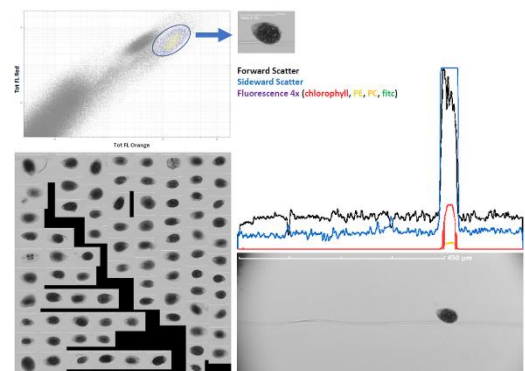
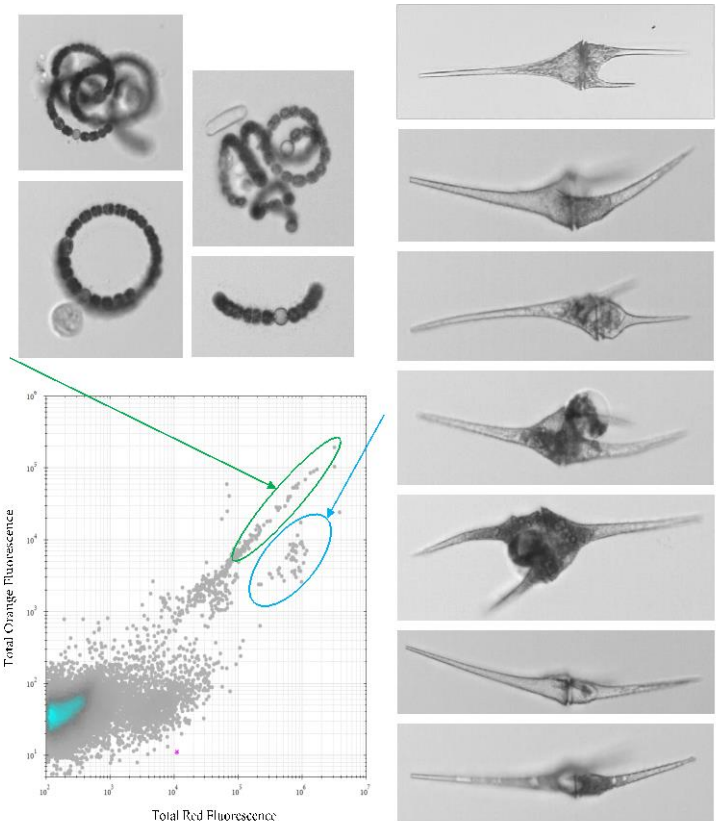
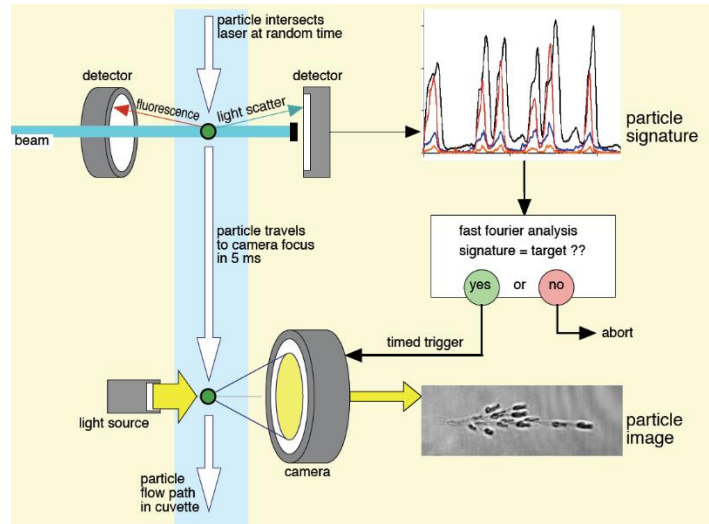
CytoBuoy 经过很长时间的科技攻关，获得了合适的光学元件，实现了可以在 16X 放大倍率下使用非常大的流动池呈现高质量的图像。

CytoSense 最新透镜（专业定制设计）的光学设计非常优秀，聚焦的图像的清晰度比普通设备 20X 放大倍率还要好。更重要的是，我们可以对所有大到直径 500um 的颗粒进行高质量成像。

一般来说放大倍数越高，成像质量越好，但由于高倍率的所需的景深越来越小，通常需要采用非常窄的流动池，也就意味着能分析的颗粒越小。那么野外样品（如天然地表水等）就需要将所有大的颗粒过滤掉。

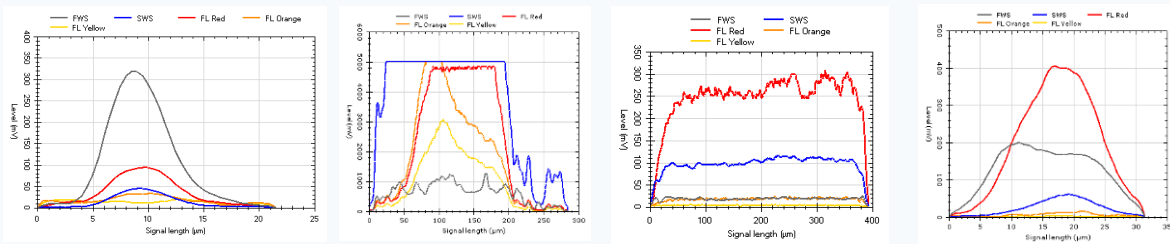
而小孔径过滤则常常产生样本损失，实际上只对样本颗粒的部分进行成像和分析。

CytoSense 在 16X 高清成像的前提下，可实现全粒级浮游生物检测，且无过滤引起的样品损失。



3.3 独创的脉冲信号指纹图谱技术获取更多特征信息

藻类独特的脉冲信号

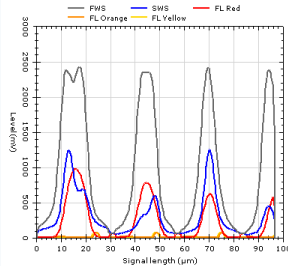


蓝藻 905 单细胞

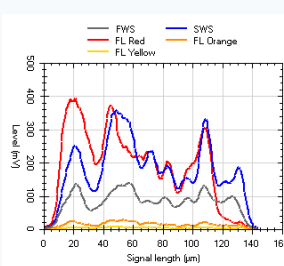
太湖微囊藻群体

太湖直链藻

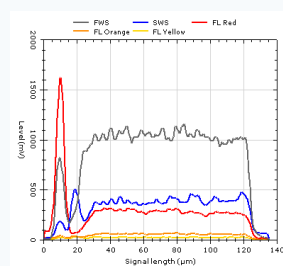
淡水甲藻



中肋骨条藻，每一个峰代表一个细胞

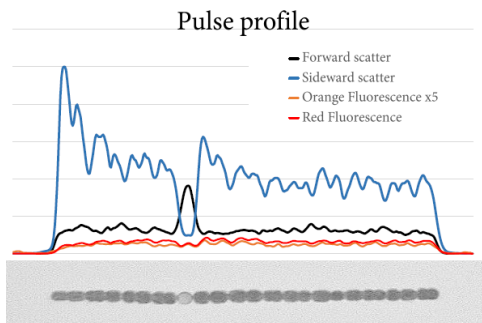
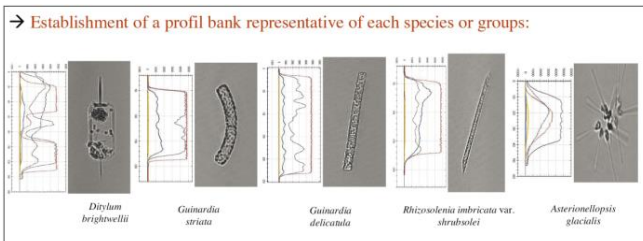


太湖星杆藻



鱼腥藻，链的开始部分有明显的异形胞

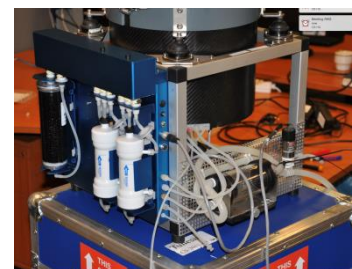
Silico-imaging 详细记录细胞的全部光学信息，逐个扫描，不放过自然水体中的稀有藻种。



3.4 循环鞘液系统

纯净的再循环鞘液：循环鞘液系统可提高数据质量，保证浓度计数可靠，防污染功能（样品不会污染流通池），可减少维护频率。

自清洗校准系统：自清洗系统含 2 个方便更换的外置滤器，可自动添加生物抑制剂和自动测定标准小球。



3.5 模块化的系统

通讯控制模块：接受外部控制指令并对外发送检测分析数据。

细菌染色模块：水体异养微生物自动染色、藻类、细菌、浮游动物及沉积物等在线检测。

水下测量模块：可升级为 CytoBuoy 和 CytoSub，最大工作水深 200 m，适合于水体剖面分层分析和水下原位分析。

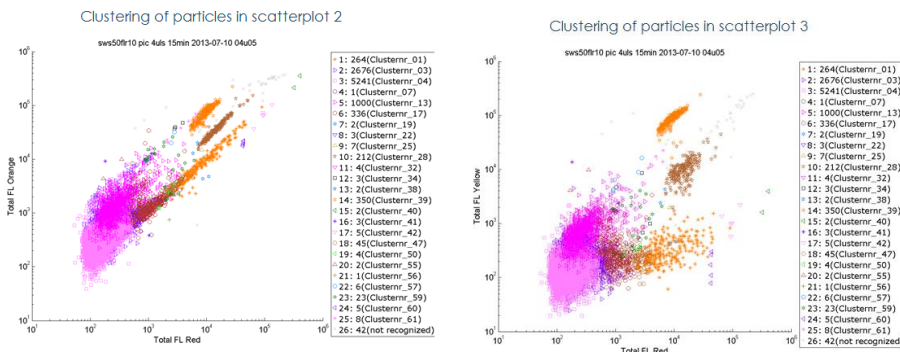


4. 自动聚类分析软件：EasyClus

EasyClus 是针对浮游植物流式细胞仪 CytoSense/CytoBuoy/CytoSub 的数据分析编写的专业分析软件，可用于建立藻种专家库来对未知的环境水样中藻类信息进行自动聚类分析和比对。基于强大的 MATLAB 分析工具，Easyclus 不仅仅适用于 CytoSense 流式细胞仪数据，还可应用于其他流式细胞仪的数据处理。

EasyClus 软件采用多种逻辑运算方法，并经过多年的流式细胞仪数据分析检验，可根据人工预设的规则对流式细胞仪数据进行全自动的聚类分析，整个过程仅仅需要几分钟的时间，不仅减少了人工聚类分析带来的误差，而且大大提高流式细胞仪数据分析的效率。增加 Easyclus Live 功能，还可实现网站实时显示数据。

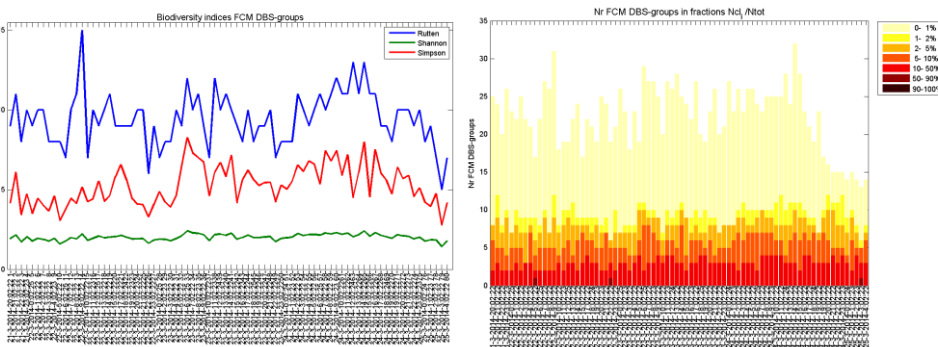
以下二维散点图由 EasyClus 自动在线聚类。每个 cluster 由特定的符号和颜色表示，代表一类散射和光学特征相似的颗粒。这些散点图可以清楚的表达不同浓度、大小及色素含量的藻类在水体中的分布（有时这些聚类只包含一种浮游植物，但有时也会由于极为相似的特性包含几种浮游生物）。



其中 Rutten-index 是由软件开发者 Thomas Rutten 根据前两个公式推算得到。一般该值越高表示生物多样性越高，越低表示生物多样性低。通过与已建立的数据库比对，可得到各相似度级别的聚类数量，从而确定优势种群。

4.1 Bio-indicators 生物多样性指数及优势种

光学特性相似的颗粒通过 EasyClus 聚类，如果将这些聚类视为一个“种”，那么根据这些聚类计算得到的生物指数可直观的表征类似生物多样性的特征。而如果对所测水域浮游植物种类有一定的了解，前期进行了已知种类的命名并建立数据库，则可根据已有的数据库比对后为聚类单位计算，更加准确的反应水体生物多样性。包括 Shannon-Wiener-index、Simpson-index 及 Rutten-index。

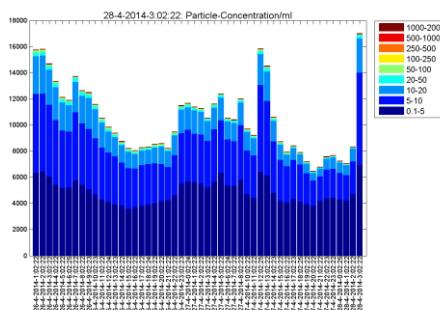
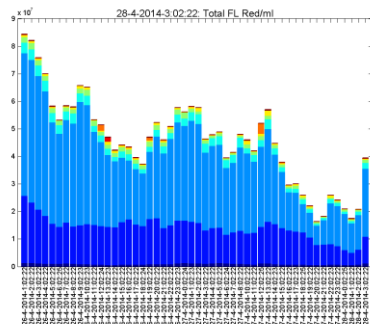


其中叶绿素 a-红色荧光强度与水体中叶绿素浓度 Chl-a/ml 高度正相关、藻胆蛋白-橙色荧光强度表征水体中含藻胆蛋白的藻类生物量、体积-散射光强度变化表征水体中藻类总体积变化，与含碳量高度相关。

4.2 粒度分布

浮游植物的粒度结构能够反映浮游植物对环境的响应并影响海洋生态系统的物质循环和能量流动。近些年，关于浮游生物粒径结构的研究主要涉及粒级的划分及方法比较、粒度生物量及粒径谱分析等。

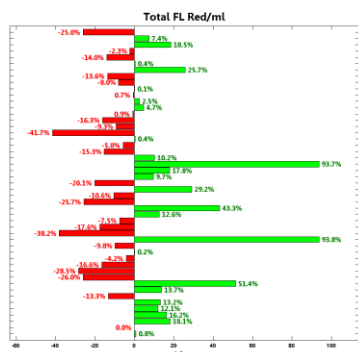
一般情况下，水域的营养盐条件、温度、光照等环境因子是影响浮游植物粒度分布的主要因素。其次为悬浮物。与其他化学因子的胁迫作用不同，悬浮物对浮游生物的影响大多是间接和慢性的，更多地表现为其粒径结构方面的变化。



EasyClus 根据 FCM 参数进行批量统计，可将测试样本中不同颗粒粒度进行分类计数。可得不同粒径颗粒的分布比例及浓度，选择 Red-FL 通道，可得到浮游植物粒级生物量分布特征。

4.3 总生物量参数变化跟踪

叶绿素是通用的衡量浮游植物生物量的指标，将其作为藻类生物量的主要指标，在不同时间尺度上观测其变化趋势有利于了解浮游植物的生命周期及生物量变化。



此外，水下型浮游植物流式细胞仪 CytoSub 可应用于浮标，Ferrybox 等监测平台，在垂直剖面不同层位获取浮游植物生物量信息，对研究微囊藻沉浮机制，浮游动物、水文、水质等因素对浮游植物生态位影响提供数据依据。

5. 技术参数

| | |
|-------------|---|
| 测量参数 | |
| 测量指标 | <p>数量参数： 每个样品和亚群的颗粒数目，浓度；</p> <p>形态参数： 细胞粒径或颗粒长度（等效直径尺寸 ESD）、面积、长宽比、圆度、链状硅藻的弯曲度、细胞体积等；</p> <p>光学参数： 前向光散射（FWS）、侧向光散射（SWS）、荧光散射（3 个）；</p> <p>扫描图谱： 基于激光扫描的二维脉冲扫描图；</p> <p>照片信息： 多通道荧光和散射光均可触发的图像信息。</p> |
| 样品类型 | <p>所有悬浮液中的显微颗粒，包括细胞性颗粒和非细胞性颗粒；</p> <p>特别适合于浮游植物研究，单细胞、群体皆可；</p> <p>海水、淡水均可。</p> |
| 样品大小范围 | <p>Min. 0.1 μm</p> <p>Max. 800 μm(φ); 4 mm (Length)</p> |
| 样品浓度范围: | 10~10 ¹⁰ 个/升，无需对样品进行浓缩、过滤或分级处理。 |
| 数据获取 | 全脉冲数字信号（4MHZ）和实时捕获所有检测器输出信号用于分析颗粒形态。 |

| 物理参数 | |
|----------|---|
| 激光器 | 488 nm, 60mW CW 优质激光模块(多种波长和功率可选). |
| 流通池 | 标准孔径: 1x1mm(其他尺寸可选)。低流体剪切力适用于易碎颗粒。 |
| 进样系统 | 精密入注系统 , 可精确测定进样体积及分析体积 流体原理: 水力聚焦作用使颗粒直线依次通过检测系统。 流速可调: 0.003-24 μ L/S |
| 检测器 | 6个检测器: 前向散射 (FWS-R/FWS-L), 侧向散射 (SWS), 红色荧光 (FLR), 黄色/绿色荧光 (FLY) 及橙色荧光 (FLO) 去极化检测: 一些细胞具有特殊的细胞内部结构, 可改变侧向散射的偏振状态, 这些信号可以被检测到。 曲率: “额外的 FWS ‘曲率’ 光电二极管检测曲度和/或螺旋形颗粒 |
| 软件 | CytoUSB 用于操作仪器, CytoClus 用于数据分析, EasyClus 自动分析软件可选 |
| 外壳和包装 | 安装于轻质铝质支架, 带高质量防震垫。包装于重载航空箱内。 主机尺寸: 365L \times 365W \times 640H mm, 主机重量 23kg |
| 标准流动成像模块 | |
| 图像分辨率 | 光学分辨率: 0.8 μ m; 相机分辨率: 4.5pixels/ μ m; |
| 帧频 | max. 20 fps. |
| 像素 | 4.5 μ m pixels / μ m (其他像素可定制) |
| 物镜 | 放大倍率: 标准 16 倍放大倍率, (其他倍率可定制) 视野大小: 236 \times 420 μ m; 614 \times 778 μ m 物平面可定制; |
| 采集速率 | 100Par/S |
| 目标成像 | 数字信号处理器 (DSP) 实时对比每个颗粒的 Silico-image 的成像点与预选择的 silico-image 范围, 对目标区域进行拍照 |
| 几何结构 | 紧凑设计, 整合在 CytoSense 保护仓内 (同样适合 CytoSub 与 CytoBuoy) |

6. CytoSense 藻类在线监测系统案例

应用案例一: River Meuse (Eijsden, Netherlad) 浮游植物群落长期演变趋势分析

单位: 荷兰水环境管理司 (RWS)

【项目背景】 第一套浮游植物流式细胞仪远程藻类在线监测系统。该系统利用 CytoSense (CytoBuoy BV, 荷兰) 每半小时取样、分析河水样品, 之后经 EasyClus[®] LIVE (Thomas Rutten Projects, 荷兰) 计算各种浮游植物信息, 最后将处理结果上传至用户指定的网站。同时, 为确保仪器正确运行, 仪器的运行状态也显示在网站上供实时检查。

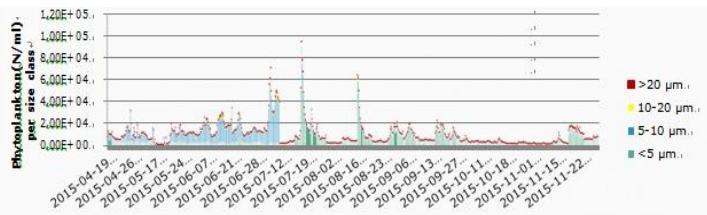
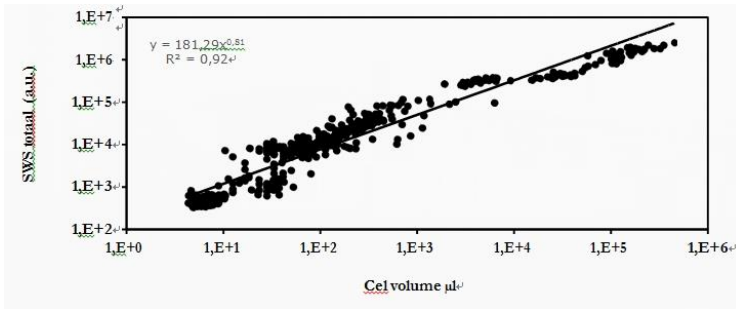
【项目目标】 水源地水质预警控制
浮游植物群落长期演变趋势分析

【系统组成】

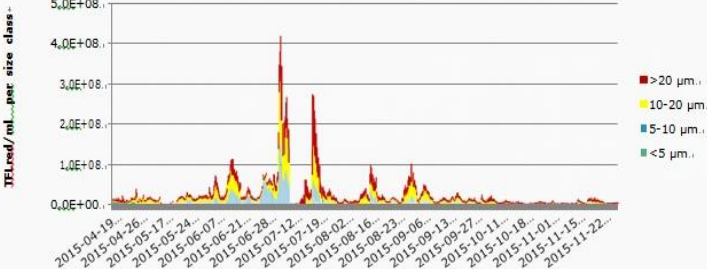
自动取样系统: 488nm+552nm 双激光器; IIF 成像模块; BST 系统
通道: FLY(550-600nm), FLO(600-650nm), FLR(>650nm);

【项目结果】

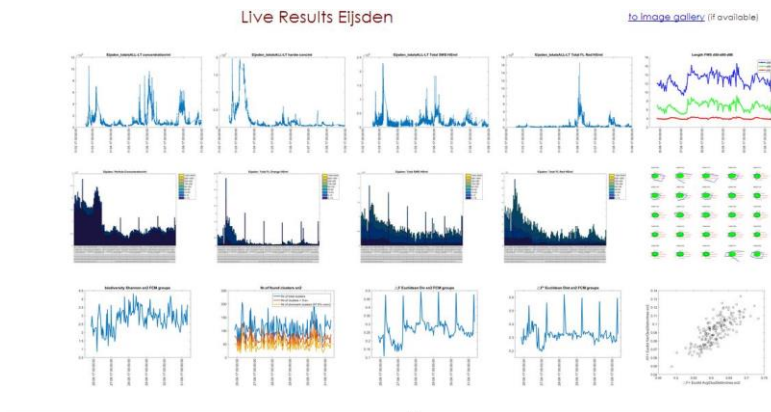
1. 浮游植物动态分析



2.



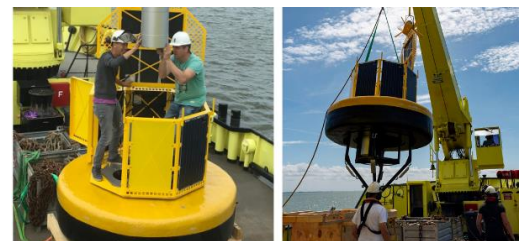
3. 网站实时查看 (测试频率 1 次/30min)



案例二、“Marker Wadden” 监测项目

单位：荷兰水环境管理司 (RWS)

【项目背景】中荷水利部为更好的进行数据交流，选择了与太湖类似的湖泊 Markermer 湖 进行水质在线监测。以绘制 Markermer 湖水水质变化图；提供生态系统功能的见解；评估项目本身的政策目标。



应用案例三：重要水源地藻类在线监测系统

单位：太湖流域管理局水文局（信息中心）

【项目概况】根据《水利部太湖流域管理局关于太湖流域水事管理信息服务系统及重要水源地藻类在线监测系统实施方案的批复》，为建设重要水源地藻类在线监测系统，利用流式细胞仪实现藻类在线监测，太湖流域管理局水文局（信息中心）（以下简称水文局）利用 CytoSense 流式细胞仪建立了重要水源地藻类在线监测系统。

【系统组成】

CytoSense 主机、BST 系统、远程控制软件、触发接口及剖面采样装置。

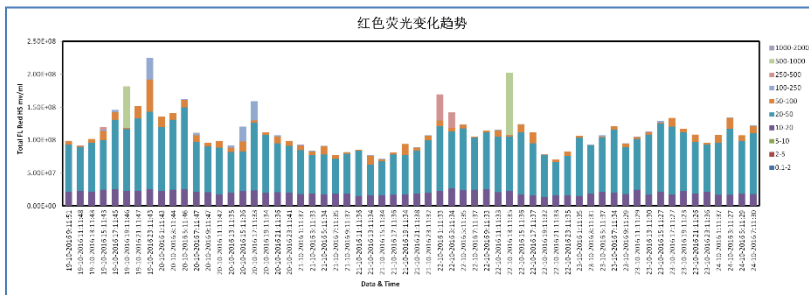
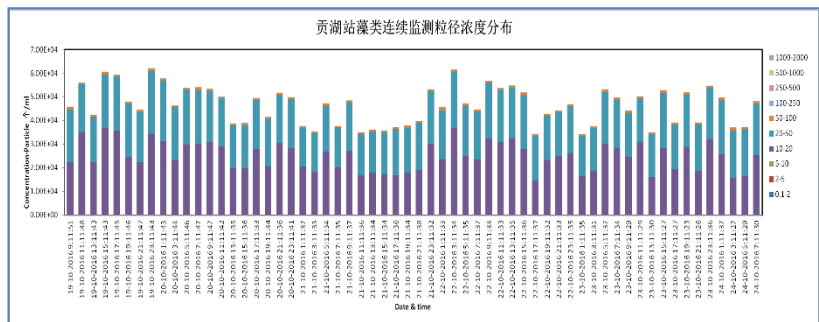
【远程数据监控】

贡湖站通过无线非视距传输设备与监测中心实现点对点通讯，提供了藻类在线监测系统的远程控制的通讯条件。经联机测试，远程控制软件可在实验室通过远程桌面登录在线监测控制服务器，查看、分析数据，也可根据结果，随时更改测试设置，如成像区域，采样时间等。可通过 TRP 网站设置藻类信息实时动态观察，用户可选择公开或加密查询 EasyClus 数据处理结果。

【项目结果】

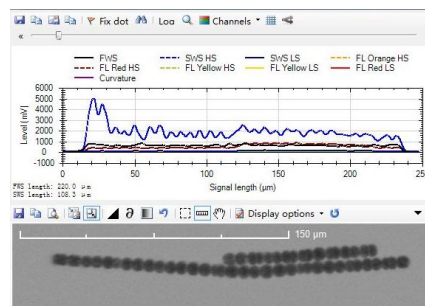
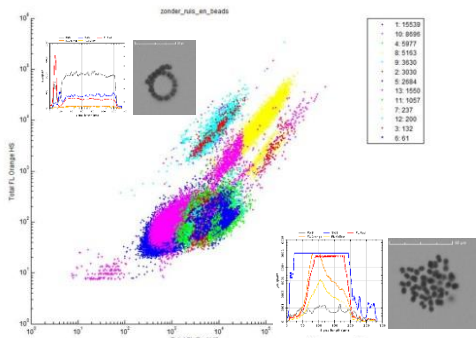
1. 无人值守连续 120h 试运行数据

EasyClus 根据 FCM 参数进行批量统计，将测试样本中不同颗粒粒度进行分类计数。得到不同粒径颗粒的分布比例及浓度。



选择 Red-FL 通道，得到浮游植物粒径生物量分布特征。

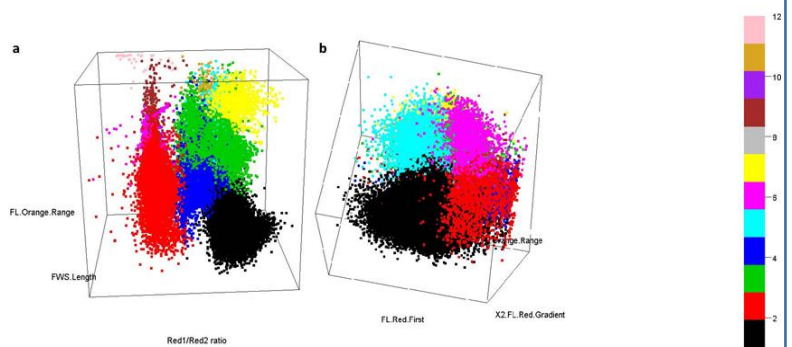
2. 扫描图像数据



案例四： CytoSense 结合机器学习建立浮游植物数据库

瑞士联邦水产科学技术研究所 Mridul K. Thomas 等人利用扫描流式细胞仪 CytoSense、机器学习和随机森林 (Random Forest) 以及无监督聚类算法 (Flowpeaks), 对流式细胞仪获得的大量数据通过多个决策树进行训练做成分类器。同时使用 FlowPeaks 这一早已应用于浮游植物种群的算法, 并利用相对有限的计算资源, 提供快速、合理的结果浮游植物特有的色素组成, 使得流式细胞对单个细胞的检测成为可能。

CytoSense 浮游植物流式细胞仪因具备单细胞脉冲扫描功能, 可以实现对自然浮游植物群落的实时高频监测, 提高我们了解其生态过程的能力。对于一些生态问题, 例如与短期环境变化对数量和群落造成的影响等问题, 它们是目前唯一可行的测量工具(包括成像流式细胞仪)。而自动分析 FCM 和 SFCM 数据的工具将大大提高这些设备的使用效率, 提高我们理解自然群体高频动态的驱动因素的能力。



案例五： 新型自动化流式细胞仪 CytoPro 高频监测水生生态系统中异氧微生物的原位特征及动态

CytoBuoy 团队与地中海研究所科学家共同设计开发了自动染色模块 (SM), 安装于 CytoSense 流式细胞仪, 推出一款可同时原位自动采样、分析浮游植物和细菌的新型流式细胞仪 CytoPro。新设备依托于地中海 PIANO 实验: Cytopro 和 SM 模块安装在 PEACETIME 项目的科考船上, 水样在行船过程中持续泵入系统, SYBRI 绿色荧光染料通过小的染色容器逐滴加入样品 (V/V=1: 10000), 经 15min 染色反应后自动泵入流式细胞仪。整个系统通过卫星通讯在实验室远程控制

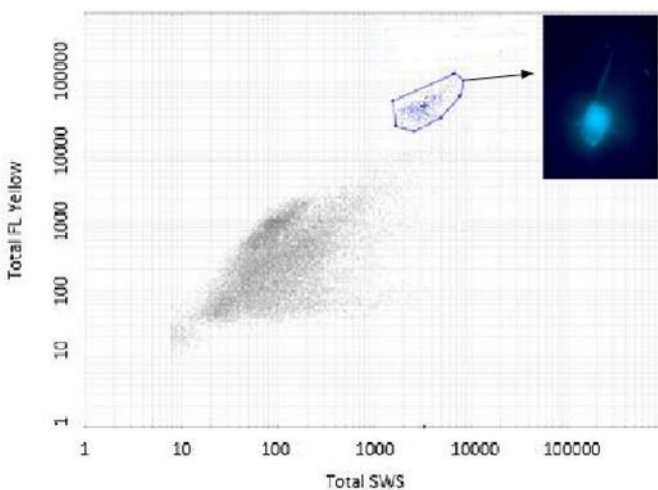


Fig.2. Cytogram of Total SWS vs total Yellow Green fluorescence (gated cluster indicate heterotrophic nanoflagellates)



7. 部分文献目录

数据来源： Cytometry , Goolge scholar等, 截至2019年, 共收集相关文献124篇。

1. Dubelaar, G. B. J., A. Groenewegen, et al. (1989). "Optical plankton analyser: a flow cytometer for plankton analysis, II: Specifications." *Cytometry* 10(5): 529-539.
2. Peeters, J. C. H., G. B. J. Dubelaar, et al. (1989). "Optical plankton analyser: A flow cytometer for plankton analysis, I: Design considerations." *Cytometry* 10(5): 522-528.
3. Jonker, R. R., G. B. J. Dubelaar, et al. (1994). "The European Optical Plankton Analyser: A high dynamic range flow cytometer." *Scientia Marina*.
4. Jonker, R. R., J. T. Meulemans, et al. (1995). "Flow cytometry: A powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton " *Water Sci. Technol.* 32(4): 177-182.
5. Dubelaar, G. B. J., P. L. Gerritzen, et al. (1999). "Design and first results of CytoBuoy: A wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters." *Cytometry* 37(4): 247-254.
6. Wilkins, M. F., L. Boddy, et al. (1999). "Identification of Phytoplankton from Flow Cytometry Data by Using Radial Basis Function Neural Networks." *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4404-4410.
7. Dubelaar, G. B. J. and P. L. Gerritzen (2000). "CytoBuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography." *Sci. Mar. (Barc.)* 64(2): 255-265.
8. Dubelaar, G. B. J. and R. R. Jonker (2000). "Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton." *Scientia Marina* 64(2): 135-156
9. Woodd-Walker, R. S., C. P. Gallienne, et al. (2000). "A test model for optical plankton counter (OPC) coincidence and a comparison of OPC-derived and conventional measures of plankton abundance." *J. Plankton Res.* 22(3): 473-483.
10. Reynolds, C. S., V. Huszar, et al. (2002). "Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton." *J. Plankton Res.* 24(5): 417-428.
11. Cunninghama, A., D. McKee, et al. (2003). "Fine-scale variability in phytoplankton community structure and inherent optical properties measured from an autonomous underwater vehicle " *J. Mar. Syst.* 43(1-2): 51-59.
12. Dubelaar, G. B. J. and P. J. F. Geerders (2004). "Innovative technologies to monitor plankton dynamics " *Sea Technol.* 45(8): 15-21.
13. Dubelaar, G. B. J., P. J. F. Geerders, et al. (2004). "High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics." *J. Environ. Monit.* 6: 946-952.
14. Takabayashi, M., F. P. Wilkerson, et al. (2005). "Response Of Glutamine Synthetase Gene Transcription And Enzyme Activity To External Nitrogen Sources In The Diatom *Skeletonema Costatum* (Bacillariophyceae)." *J. Phycol.* 41(1): 84-94.
15. Takabayashi, M., K. Lew, et al. (2006). "The effect of nutrient availability and temperature on chain length of the diatom, *Skeletonema costatum*." *J. Plankton Res.* 28(9): 831-840.
16. Dubelaar, G. B. J., R. Casotti, et al. (2007). "Phytoplankton and their analysis by flow cytometry." *Flow Cytometry with Plant Cells*: 287-322.

17. 17. Thyssen, M., D. Mathieu, et al. (2008). "Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer." *J. Plankton Res.* 30(9): 1027-1040.
18. 18. Thyssen, M. T., N. Garcia, et al. (2008). "Sub meso scale phytoplankton distribution in the north east Atlantic surface waters determined with an automated flow cytometer." *Biogeosciences Discuss* 5: 2471-2503.
19. 19. Thyssen, M. T., G. A. Zubkov, et al. (2008). "The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability." *J. Plankton Res.* 30(3): 333-343.
20. 20. Barofsky, A., P. Simonelli, et al. (2009). "Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp." *J. Plankton Res.* 32(3): 263-272.
21. 21. Pereira, G. C., A. Granato, et al. (2009). "Viriplankton Abundance in Trophic Gradients of an Upwelling Field." *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 857-865.
22. 22. Van Donk, E., S. Cerbin, et al. (2009). "The effect of a mixotrophic chrysophyte on toxic and colony-forming cyanobacteria." *Freshwater Biology* 54(9): 1843-1855.
23. 23. Barofsky, A., P. Simonelli, et al. (2010). "Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp." *J. Plankton Res.* 32(3): 263-272.
24. 24. Hansen, B. W., H. H. Jakobsen, et al. (2010). "Swimming behavior and prey retention of the polychaete larvae *Polydora ciliata*." *Journal of Experimental Biology*(213): 3237-3246.
25. 25. Pereira, G., A. de Figueiredo, et al. (2010). "Assessing the ecological status of plankton in Anjos Bay: a flow cytometry approach." *Biogeosciences Discussions* 7: 6243-6264.
26. 26. Thyssen, M., B. Beker, et al. (2011). "Phytoplankton distribution during two contrasted summers in a Mediterranean harbour: combining automated submersible flow cytometry with conventional techniques." *Environmental Monitoring and Assessment* 173(1): 1-16.
27. 27. Thyssen, M. and M. Denis (2011). *Temporal and Spatial High-Frequency Monitoring of Phytoplankton by Automated Flow Cytometry and Pulse-Shape Analysis*. *Global Change: Mankind-Marine Environment Interactions*. H.-J. Ceccaldi, I. Dekeyser, M. Girault and G. Stora, Springer Netherlands: 293-298.
28. 28. Vidoudez, C., J. C. Nejstgaard, et al. (2011). "Dynamics of Dissolved and Particulate Polyunsaturated Aldehydes in Mesocosms Inoculated with Different Densities of the Diatom *Skeletonema marinoi*." *Marine Drugs* 9(3): 345-358.
29. 29. Malkassian, A., D. Nerini, et al. (2011). "Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer." *Cytometry Part A* 79A(4): 263-275.
30. 30. G.C. Pereira, N.F.F. Ebecken *Combining In Situ Flow Cytometry And Artificial Neural Networks For Aquatic Systems Monitoring Expert Systems with Applications*
31. 31. Juliano C. Cury, Fabio V. Araujo, Sergio A. Coelho-Souza, Raquel S. Peixoto, Joana A. L. Oliveira, Henrique F. Santos, Alberto M. R. Dávila, and Alexandre S. Rosado *Microbial Diversity Of A Brazilian Coastal Region Influenced By An Upwelling System And Anthropogenic Activity* *LoS One*. 2011; 6(1): e16553. Published online 2011 January 27. doi: 10.1371/journal.pone.0016553.

32. 32. Thyssen, M., Ferreyra, G., Moreau, S., Schloss S., Denis, M., Demers, S. Combined Effects Of Ultraviolet Radiations B And Temperature Increase On Phytoplankton Dynamics And Cell Cycle Using Pulse Shape Recording Flow Cytometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, under acceptance.
33. 33. Francesco Pomati, Jukka Jokela, Marco Simona, Mauro Veronesi, and B. W. Ibelings An Automated Platform for Phytoplankton Ecology and Aquatic Ecosystem Monitoring *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45 (22), pp 9658–9665
34. 34. Q. Zhou, W. Chen, H. Zhang et al. A Flow Cytometer Based Protocol for Quantitative Analysis of Bloom-forming Cyanobacteria (*Microcystis*) in Lake Sediments *Journal of Environmental Sciences* 2012, 24(9) 1709–1716
35. 35. Johanna Bergkvist, Peter Thor, Hans Henrik Jakobsen, Sten-Åke Wängberg and Erik Selander Grazer-induced chain length plasticity reduces grazing risk in a marine diatom *Limnol. Oceanogr.*, 57(1), 2012, 318–324
36. 36. Andrea Gerech, Ylenia Carotenuto, Adrianna Ianora, Giovanna Romano, Angelo Fontana, Giuliana d'Ippolito, Hans H. Jakobsen, Jens C. Nejstgaard Oxylin production during a mesocosm bloom of *Skeletonema marinoi* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, August 2013, Volume 446, 159-165
37. 37. Francesco Pomati, Nathan J. B. Kraft, Thomas Posch, Bettina Eugster, Jukka Jokela, Bas W. Ibelings Individual Cell Based Traits Obtained by Scanning Flow-Cytometry Show Selection by Biotic and Abiotic Environmental Factors during a Phytoplankton Spring Bloom *PLOS ONE*, August 2013, Volume 8, Issue 8, e71677
38. M. Thyssen, S. Alvain, a. Lefèbvre, D. Dessailly, M. Rijkeboer, N. Guiselin, V. Creach, L.-F. Artigas, Phytoplankton community structure in the North Sea: coupling between remote sensing and automated in situ analysis at the single cell level, *Biogeosciences Discuss.* 11 (2014) 15621–15662.
39. M. Latasa, J. Henjes, R. Scharek, P. Assmy, R. Röttgers, V. Smetacek, Progressive decoupling between phytoplankton growth and microzooplankton grazing during an iron-induced phytoplankton bloom in the Southern Ocean (EIFEX), *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 513 (2014) 39–50.
40. M. Dugenne, M. Thyssen, D. Nerini, C. Mante, J.C. Poggiale, N. Garcia, F. Garcia, G.J. Grégori, Consequence of a sudden wind event on the dynamics of a coastal phytoplankton community: An insight into specific population growth rates using a single cell high frequency approach, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1–14.
41. M. Thyssen, G.J. Grégori, J.-M. Grisoni, M.L. Pedrotti, L. Mousseau, L.F. Artigas, S. Marro, N. Garcia, O. Passafiume, M.J. Denis, Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 387.
42. S. Fontana, J. Jokela, F. Pomati, Opportunities and challenges in deriving phytoplankton diversity measures from individual trait-based data obtained by scanning flow-cytometry, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1–12.
43. E.D. Cooper, B. Bentlage, T.R. Gibbons, T.R. Bachvaroff, C.F. Delwiche, Metatranscriptome profiling of a harmful algal bloom, *Harmful Algae.* 37 (2014) 75–83.

44. G.C. Pereira, L.P. Andrade, R.P. Espíndola, N.F.F. Ebecken, Structural Analysis and Static Simulation of Coastal Planktonic Networks, *JILSA* (2014) 113–124.
45. M. Denis, Recent advances in assessing the Dynamics of phytoplankton assemblages by high frequency analysis at the single cell level, *CIBS Meeting Proceedings*, (2014) 77–85.
46. S. Glüge, F. Pomati, C. Albert, P. Kauf, T. Ott, The challenge of clustering flow cytometry data from phytoplankton in lakes, In *Nonlinear Dynamics of Electronic Systems*, Springer International Publishing, (2014) 379-389.
47. M.N. McFarland, Impact of Phytoplankton Community Structure and Function on Marine Particulate Optical Properties, *Open Access Dissertation* (2014).
48. K.R. Owen, Flow Cytometric Investigation of the Size Spectrum of North Sea Phytoplankton Communities, *Open Access Dissertation* (2014).
49. L. Duforêt-Gaurier, W. Moutier, N. Guiselin, M. Thyssen, G. Dubelaar, X. Mériaux, L. Courcot, D. Dessailly, H. Loisel, Determination of backscattering cross section of individual particles from cytometric measurements: a new methodology, *Opt. Express*. 23 (2015) 31510-31533.
50. N.F.F. Ebecken, G.C. Pereira, Ecological Networks : From Structural Analysis to Synchronization, 9 (2015) 938–942.
51. S. Fontana, O.L. Petchey, F. Pomati, Individual-level trait diversity concepts and indices to comprehensively describe community change in multidimensional trait space, *Funct. Ecol.* 30 (2015) 808–818.
52. M. Thyssen, S. Alvain, A. Lefèbvre, D. Dessailly, M. Rijkeboer, N. Guiselin, V. Creach, L.-F. Artigas, High-resolution analysis of a North Sea phytoplankton community structure based on in situ flow cytometry observations and potential implication for remote sensing, *Biogeosciences*. 12 (2015) 4051–4066.
53. M.N. McFarland, J. Rines, J. Sullivan, P. Donaghay, Impact of phytoplankton size and physiology on particulate optical properties determined with scanning flow cytometry, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 531 (2015) 43–61.
54. S.A. Coelho-Souza, F. V. Araujo, J.C. Cury, H.E. Jesus, G.C. Pereira, J.R.D. Guimaraes, R.S. Peixoto, A.M.R. Davila, A.S. Rosado, Bacterial and archaeal communities variability associated with upwelling and anthropogenic pressures in the protection area of Arraial do Cabo (Cabo Frio region - RJ), *An. Acad. Bras. Cienc.* 87 (2015) 1737–1750.
55. S. Bonato, U. Christaki, A. Lefebvre, F. Lizon, M. Thyssen, L.F. Artigas, High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154 (2015) 214–223.
56. M. Dugenne, M. Thyssen, N. Garcia, N. Mayot, G. Bernard, Monitoring of a Potential Harmful Algal Species in the Berre Lagoon by Automated In Situ Flow Cytometry, In *Marine Productivity: Perturbations and Resilience of Socio-ecosystems*, Springer International Publishing, (2015) 117–127.
57. A. Golabgir, D. Ehgartner, L. Neutsch, A.E. Posch, P. Sagmeister, C. Herwig, Imaging Flow Cytometry and High-Throughput Microscopy for Automated Macroscopic Morphological Analysis of Filamentous Fungi, *InGenetic Transformations Systems in Fumgi*, Volume 2, Springer International Publishing, (2015) 201–210.
58. D. Ehgartner, J. Fricke, A. Schröder, C. Herwig, At-line determining spore germination of *Penicillium chrysogenum* bioprocesses in complex media, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 8923–8930.

59. D. Ehgartner, C. Herwig, L. Neutsch, At-line determination of spore inoculum quality in *Penicillium chrysogenum* bioprocesses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 5363–5373.
60. S. Bonato, E. Breton, M. Didry, F. Lizon, V. Cornille, E. Lécuyer, U. Christaki, L.F. Artigas, Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore-offshore gradients using flow cytometry: A case study in the eastern English Channel, *J. Mar. Syst.* 156 (2016) 76–85.
61. S. Fontana, M. K. Thomas, M. Moldoveanu, P. Spaak, F. Pomati, Individual-level trait diversity predicts phytoplankton community properties better than species richness or evenness, *The ISME Journal* (2017) 1-11
62. T. Silovic, G. Grégori, M. Dugenne, M. Thyssen, F. Calendreau, T. Cossart, H. Kools, G. Dubelaar, M. Denis, A new automated flow cytometer for high frequency in situ characterisation of heterotrophic microorganisms and their dynamics in aquatic ecosystems, IMEKO International Conference on Metrology for The Sea, Naples, Italy, October 11-13, 2017
63. D. Ehgartner, C. Herwig, J. Fricke, Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry—the fast alternative to microscopic image analysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 7675-7688
64. G.C. Pereira, A.R. Figueiredo, N.F.F. Ebecken, Using in situ flow cytometry images of ciliates and dinoflagellates for aquatic system monitoring, *Braz. J. Biol.* (2017)
65. L. Haraguchi, H. H. Jakobsen, N. Lundholm, J. Carstensen, Monitoring natural phytoplankton communities: a comparison between traditional methods and pulse-shape recording flow cytometry, *Aquat. Microb. Ecol.* 80 (2017) 77-92
66. W. Moutier, L. Duforêt-Gaurier, M. Thyssen, H. Loisel, X. Mériaux, L. Courcot, D. Dessailly, A.-H. Rêve, G. Grégori, S. Alvain, A. Barani, L. Brutier, M. Dugenne, Evolution of the scattering properties of phytoplankton cells from flow cytometry measurements, *PLoS ONE* (2017)
67. E. Breton, U. Christaki, S. Bonato, M. Didry, L.F. Artigas, Functional trait variation and nitrogen use efficiency in temperate coastal phytoplankton, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 563 (2017) 35-49
68. H. Tan, T. Oishi, A. Tanaka, R. Doerffer, Y. Tan, Chlorophyll-a specific volume scattering function of phytoplankton, *Optics EXPRESS* 25 (2017) A564-A573
69. F. Pomati, J. Jokela, S. Castiglioni, M. K. Thomas, L. Nizzetto, Water-borne pharmaceuticals reduce phenotypic diversity and response capacity of natural phytoplankton communities, *PLoS ONE* (2017)
70. J. Taucher, M. Haunost, T. Boxhammer, L. T. Bach, M. Alguero-Muñiz, U. Riebesell, Influence of ocean acidification on plankton community structure during a winter-to-summer succession: An imaging approach indicates that copepods can benefit from elevated CO₂ via indirect food web effects, *PLoS ONE* (2017)
71. J. Taucher, J. Arístegui, L.T. Bach, W. Guan, M.F. Montero, A. Nauendor, E.P. Achterberg, U. Riebesell, Response of Subtropical Phytoplankton Communities to Ocean Acidification Under Oligotrophic Conditions and During Nutrient Fertilization, *Front. Mar. Sci.* (doi: 10.3389/fmars.2018.00330)
72. M.K. Thomas, S. Fontana, M. Reyes, F. Pomati, Quantifying cell densities and biovolumes of phytoplankton communities and functional groups using scanning flow cytometry, machine learning and unsupervised clustering, *PLoS ONE* (2018)
73. M.K. Thomas, S. Fontana, M. Reyes, M. Kehoe, F. Pomati, The predictability of a lake phytoplankton community, over time-scales of hours to years, *Ecol. Lett.* (2018)

74. K. Leblanc, B. Quéguiner, F. Diaz, V. Cornet, M. Michel-Rodriguez, X. Durrieu de Madron, C. Bowler, S. Malviya, M. Thyssen, G. Grégori, M. Rembauville, O. Grosso, J. Poulain, C. de Vargas, M. Pujo-Pay, P. Conan, Nanoplanktonic diatoms are globally overlooked but play a role in spring blooms and carbon export, *Nature Comm.* 9 (2018)
75. J. Agagliate, R. Röttgers, M. S. Twardowski, D. McKee, Evaluation of a flow cytometry method to determine size and real refractive index distributions in natural marine particle populations, *Appl. Optics* 57 (2018) 1705-1716
76. J. Agagliate, I. Lefering, D. McKee, Forward modeling of inherent optical properties from flow cytometry estimates of particle size and refractive index, *Appl. Optics* 57 (2018) 1777-1788
77. L. T. Bach, K. T. Lohbeck, T. B. H. Reusch, U. Riebesell, Rapid evolution of highly variable competitive abilities in a key phytoplankton species, *Nature Ecol. Evol.* (2018)

上海泽泉科技股份有限公司联系方式:

| | 地 址 | 邮 编 | 电 话 | 传 真 |
|--------------|---------------------------------|--------|------------------------|--------------|
| 上海总公司 | 普陀区金沙江路 1038 号华东师大科技园 2 幢 8 层 | 200062 | 021-32555118 | 021-32555117 |
| 北京分公司 | 海淀区北三环西路 43 号青云当代大厦 1109-1110 室 | 100048 | 010-88824075/76/77 | 转 828 |
| 广州代表处 | 天河区潭村路 348 号马赛国际商务中心 2206 室 | 510632 | 020-85645707 | 020-85645359 |
| 成都代表处 | 人民南路一段 97 号现代之窗 1018 室 | 610016 | 028-86722096, 86719836 | 028-86721922 |
| 武汉代表处 | 武昌区中南路 7 号中商广场写字楼 A 座 | 430071 | 18627071855 | |

高新技术: www.zealquest.cn **产品销售:** www.zealquest.com

微信公众号: 上海泽泉科技, 泽泉快讯 **E-mail:** sales@zealquest.com service@zealquest.com

QQ 技术讨论群: 154279317 (陆地环境应用); 222678293 (水环境应用)

如需植物表型、生理生态、基因型、种子纯度鉴定等测试服务及项目合作, 请联系亚洲首个高通量植物表型开放实验平台:

| | 地 址 | 邮 编 | 电 话 | 传 真 |
|----------------------------|----------------------|---|--------------------|---|
| AgriPheno 平台 | 上海浦东新区沔北路 185 号 C9-1 | 201210 | 021-50199251/3/6/8 | 021-50199252 |
| 微信公众号: AgriPheno 平台 | | 网址: www.agripheno.com | | E-mail: phenotype@zealquest.com |