

用改进的荧光标记技术测定 具沟急游虫的摄食速率*

洪华生 柯林 黄邦钦 林学举

(厦门大学环境科学研究中心 厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室 厦门 361005)

提要 于 1997 年 10 月在厦门西海域采集纤毛虫常见种——具沟急游虫,采用改进的荧光标记法在实验室条件下进行纤毛虫的摄食速率研究。结果表明,改进的荧光标记法具有操作简便、节省昂贵的荧光染料、固定液浓度易于掌握等优点。用该方法在常温下(22℃)测得纤毛虫对细菌和微藻的摄食速率分别为 4.224pgC/(cell·h)和 5.0pgC/(cell·h)。将此实验结果外推至自然海区,可得台湾海峡南部夏季纤毛虫对细菌、微藻的同化率分别为 0.0176mgC/(m³·d)和 0.0201mgC/(m³·d);北部冬季分别是 0.0238mgC/(m³·d)和 0.0272mgC/(m³·d)。在实验条件下,温度较低时(14—26℃)对纤毛虫的摄食速率影响较大,但在较高温度(26—34℃)时差异不明显。

关键词 荧光标记技术,纤毛虫,具沟急游虫,摄食速率

中图分类号 Q178.53

纤毛虫作为细菌、微型和微微型浮游植物(nano-, pico-phytoplankton)、鞭毛虫的主要摄食者之一,在有机碳的转换中有着非常重要的地位(Sherr *et al.*, 1986; Nielsen, 1994; Simek *et al.*, 1995; Pedros-Alio *et al.*, 1995; Guhl *et al.*, 1996; Sorokin *et al.*, 1996; Simek *et al.*, 1996; 张武昌等, 2000)。急游虫是海洋小型浮游纤毛虫的常见种,是台湾海峡的优势种群,在微食物环中的作用不可低估。纤毛虫摄食速率的研究在国外已成为研究的热点之一。为了测定原生动物的摄食速率,科学家们建立了许多方法(柯林等, 1999),其中荧光标记法被认为是较好的方法(Sherr *et al.*, 1993)。本文采用改进的荧光标记法(FLB, 荧光标记细菌; FLA, 荧光标记微藻),在实验室条件下对具沟急游虫摄食细菌、微型藻类的速率进行了测定,并拟外推至自然海区估算纤毛虫在微食物环中的作用。由于微食物环的研究在我国尚属起步阶段,亟待解决的关键问题是建立方法。本文报道此项研究结果,以期建立一套适用于实验室条件操作的测定纤毛虫摄食速率的方法,以促进我国在此领域的研究。

1 材料与方 法

1.1 纤毛虫的采集、分离、培养

1997 年 7 月,用 PFU (Polyurethane Foam Unit, 聚氨酯泡沫塑料块)法(沈韞芬等, 1990)在厦门沿海采集纤毛虫,在 40 倍显微镜下吸取分离所需的具沟急游虫(*Strombid*

* 国家自然科学基金资助项目,49636220 号,49776308 号。洪华生,女,出生于 1944 年 7 月,博士,教授, E-mail: hshong@xmu.edu.cn

收稿日期: 1999-06-12, 收修改稿日期: 1999-10-18

ium sucaltum), 用麦粒浸出液在室温(22℃)条件下培养 2—3d, 直至获取足够的实验个体。

1.2 荧光标记细菌(FLB)的制备

FLB 的制备: a. 细菌采自厦门海域自然水体, 经实验室培养后, 在细菌的对数生长期收集, 细菌为混合菌种, 直径为 0.8—1.2 μm ; b. 离心(25ml, 22000g, 12—20min), 弃去上清液, 悬浸于 10ml 的磷酸盐缓冲溶液中(pH=9); c. 加 2mg DTAF 荧光染色 10min 后, 60℃水浴 2h, 再离心, 轻将上层 DTAF 溶液倒出, 剩余物用缓冲溶液洗涤和离心各 3 遍; d. 最后一次洗涤后, 悬浸于 20ml 磷酸盐缓冲液中, 如发现块状物, 应予超声振荡击碎; e. 密封低温冷冻保存(-20℃), 用时解冻(加 1—2ml 蒸馏水)、超声振荡击碎(柯林等, 1999)。

1.3 藻类获取

选用本实验室培养的微绿球藻(*Nannochloris* spp., 直径为 2—4 μm)作为摄食材料。因叶绿素可以自发荧光, 无须外加荧光标记物。

1.4 控制条件

在非生物环境因子中, 温度是十分重要的限制因子。本实验设置了 6 个不同温度: 14℃、18℃、22℃、26℃、30℃和 34℃, 各设 3 个平行组, 研究温度对纤毛虫摄食速率的影响。摄食实验在生化培养箱内进行。

1.5 纤毛虫摄食实验——荧光标记法的改进

自从 Sherr 等(1987)首次采用 FLB(FLA)技术测定原生动物的摄食速率以来, FLB 法逐渐取代了稀释法和抑制剂法而成为各国学者的首选方法。然而, 在具体的操作上也遇到了一些困难: 在现场采集的样品, 纤毛虫的浓度往往偏小(<1 个/ml); 现场的水样往往混有许多和纤毛虫粒径相类似的杂质, 有的会被 DAPI 染色, 区分困难; 过滤装置不合乎要求, 不能过滤细胞膜容易破裂的纤毛虫。因此, 作者的预实验结果都很不理想。针对上述难点, 经过摸索, 提出一种改进的 FLB(FLA)法。主要在以下方面做了改进:

从现场样品中分离出纤毛虫, 然后采用实验室内培养, 这样可以获得大量的实验个体; 屏弃过滤这一步骤, 不需染黑滤膜, 不需 DAPI, 改用微细吸管吸取, 直接转到载玻片上, 在显微镜下可用普通光和荧光观察。这是关键的一步。这一改动, 使得操作性大大提高, 只要经过熟练操作便可获得满意的结果。

用改进的 FLB 法测定纤毛虫原生动物摄食速率的流程为: 用麦汁浸出液培养 2—3d, 以获得足够的实验虫体 \rightarrow 在做摄食实验前饥饿 24h, 并用无菌海水洗涤 3 次以上 \rightarrow 滴加 FLB 至合适浓度, 开始摄食实验 \rightarrow 每隔 2、4、8、16min, 用微吸管吸取 20 个以上纤毛虫, 滴加到载玻片上, 所吸的水滴要尽量少 \rightarrow 滴加同体积的固定液终止摄食把多余的水吸去, 仅留下虫体(注意不能太干), 盖上盖玻片 \rightarrow 移至显微镜下观察, 普通光设置, 查找纤毛虫个体; 荧光设置, 记数纤毛虫个体内所摄食的 FLB, 作出摄食曲线, 估算其摄食速率。具体步骤为:

1.5.1 取经过 2—3d 培养的纤毛虫水样约 5 毫升置于胚胎皿中, 纤毛虫的浓度约为 10—20ind/ml。用无菌海水把纤毛虫培养液置换出来, 重复 3—4 次, 直至水中的自由细菌和 FLB 的浓度比小于 1:10。摄食实验开始前, 应把纤毛虫饥饿 24h。

1.5.2 加 FLB 至 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ ind/ml。以 2、4、8、16、32min 的时间间隔用微型吸管分别吸取至少 20 个虫体(此时应注意,液体要尽量少),转移至载玻片上,迅速加等量的固定液(Bouin's 液或甲醛均可)固定,使摄食活动停止。在 50 倍的体视显微镜下把多余的液体吸掉,盖上盖玻片,马上在显微镜下观察。

1.5.3 纤毛虫摄食量的荧光计数。由于屏弃了依加仑染黑的滤膜,可以先在普通光设置 100—400 倍数下观察,找到纤毛虫,然后在 1000 倍油镜下,转到荧光观察(此时应把普通光源关闭或光强调至最暗)。在蓝光设置下可以检测到每个纤毛虫体内的 FLB 数(如果是纤毛虫摄食微藻的实验,那么在绿光设置下可以观察纤毛虫体内微藻的个数)。观察纤毛虫的总个体数不少于 10 个,取平均值。

1.5.4 换算以碳为单位的摄食速率。细菌: $0.22\text{pgC}/\mu\text{m}^3$ (Sherr *et al.*, 1987); 微型藻类: $0.2\text{pgC}/\mu\text{m}^3$ (Weisse, 1993)。

1.5.5 每组实验设 3 个平行对照组。

2 结果与讨论

2.1 常温条件下(22℃)具沟急游虫的摄食速率

由表 1 可知,8min 以后,急游虫的摄食速率降低,意味着急游虫已经开始消化细菌。随着时间的延长,急游虫的摄食速率最终会与消化速率持平,甚至低于消化速率。Sherr 等(1987)在实验中发现一种寡毛类纤毛虫在 10min 后开始消化细菌,与本实验的结果基本一致;而一种盾纤类纤毛虫(Scuticociliate)开始消化的时间为 20min 以后。说明不同纤毛虫的消化能力不同。急游虫对藻类的消化能力稍差一些,在荧光显微镜下观察,直到 32min 纤毛虫体内的微藻细胞依然清晰可见(表 1)。为了减少消化活动所带来的误差,纤毛虫的摄食时间缩短到 8min(细菌)或 32min(微绿球藻),作回归相关分析。结果表明,在 22℃ 下具沟急游虫摄食细菌/微藻速率的回归方程分别为:

$$y = -0.45332 + 3.2569x \quad (r = 0.998)$$

和 $y = 1.35883 + 0.794208x \quad (r = 0.972)$

由回归直线方程可计算急游虫的摄食速率。

对细菌的摄食速率: $192\text{cells}/(\text{cell}\cdot\text{h})$, 换算为碳量是 $4.224\text{pgC}/(\text{cell}\cdot\text{h})$; 对微绿球藻: $49.01\text{cells}/(\text{cell}\cdot\text{h})$, 换算为碳量是 $5.0\text{pgC}/(\text{cell}\cdot\text{h})$ 。

表 1 常温下(22℃)具沟急游虫摄食细菌(FLB)和微藻(FLA)的速率

Tab. 1 The grazing rate of *S. sucalum* on FLB and FLA at normal temperature (22℃)

时间 (min)	对 FLB 的摄食速率 [cells/(cell·h)]	对 FLA 的摄食速率 [cells/(cell·h)]	时间 (min)	对 FLB 的摄食速率 [cells/(cell·h)]	对 FLA 的摄食速率 [cells/(cell·h)]
0	0	0	8	192	68
2	154	—	16	138	66
4	196	42	32	90	50

2.2 温度对急游虫摄食速率的影响

温度对纤毛虫摄食的影响非常大(表 2)。在 14℃ 时,一开始急游虫几乎不摄食;当温度升高时,摄食活动逐渐加强,到 34℃ 高温时,摄食活动依然活跃。由于此种纤毛虫是亚热带暖水种类,它对温度的耐受性很强,而摄食活动的最适温度偏高温。

Vaque 等(1994) 也认为, 在 18℃以下温度对原生动物的摄食速率影响显著, 而在 18℃以上时, 则无显著的影响; 温度的影响在室内实验较显著, 在现场条件下不显著。原因是原生动物在自然条件下对温度有个适应过程。作者在实验中也发现, 急游虫在低温(14℃) 条件下培养 24h 以后, 摄食率增加, 与常温下(22℃) 无异。表明急游虫有很强的适应能力。

表 2 不同温度下具沟急游虫摄食荧光标记细菌(FLB) 的速率

Tab. 2 The grazing rates of *S. sucalum* on FLB at different temperatures

温度(℃)	14	18	22	26	30	34
摄食速率[cells/(cell·h)]	12	108	192	490	506	584

2.3 不同方法测定原生动物摄食速率的比较

把所有的方法分成两大类, 一类为荧光法, 一类为其它方法[包括稀释法、过滤法、选择性抑制剂法、RLB(放射性同位素标记) 法等]。用不同方法测得的原生动物摄食率有很大差异(表 3)。

表 3 不同方法测定的原生动物的摄食速率比较

Tab. 3 The comparison of grazing rate of protozoa with different methods

方法	原生动物类群	细菌或微藻浓度 (cells/ ml)	摄食速率 [cells/(cell·h)]	作者
稀释法	异养微型鞭毛虫	10 ⁶	17—38	Landry <i>et al.</i> , 1984
选择性抑制剂法	异养微型鞭毛虫	10 ⁶ —10 ⁷	20—80	Sherr <i>et al.</i> , 1986
RLB	异养微型鞭毛虫	10 ⁶	36—188	Nygaard <i>et al.</i> , 1990
RLB	非具壳类纤毛虫	—10 ⁶	700—213000	Lessard <i>et al.</i> , 1985
RLB	砂壳类纤毛虫	—10 ⁶	600—32000	Lessard <i>et al.</i> , 1985
荧光标记微球法	异养微型鞭毛虫	—	2—25	McManus <i>et al.</i> , 1986
荧光标记微球法	纤毛虫	0.87×10 ⁶	—33	Pace <i>et al.</i> , 1986
FLB	异养微型鞭毛虫	10 ⁶	6—29	Nygaard <i>et al.</i> , 1990
FLB	盾形纤毛虫	10 ⁶	140	Sherr <i>et al.</i> , 1987
FLB	寡毛类纤毛虫	10 ⁶	—260	Sherr <i>et al.</i> , 1987
FLB	寡毛类纤毛虫	2—4×10 ⁶	360—2130	Simek <i>et al.</i> , 1995
FLA	寡毛类纤毛虫	3—4×10 ⁵	76—210	Simek <i>et al.</i> , 1995
FLB	急游虫	—10 ⁶	—195	本文
FLA	急游虫	—10 ⁵	—49	本文

本文的结果与 Sherr 等(1987) 的类似, 比 Simek 等(1995) 的要低, 因为后者是现场实验的结果。荧光标记方法与其它方法相比, 结果普遍较低, 但误差范围较小。Vaque 等(1994) 解释其原因时, 认为原因可能是这两类方法存在着“系统上的差异”(Systematic differences)。在现场实验中, 造成摄食率结果的差异并不是由环境条件引起的, 而是由于

方法上的差异造成的。

2.4 改进的荧光标记法的优点及不足

本文结合自身的实际情况对 Sherr 等(1987)建立的 FLB 技术作了一些改进,在研究纤毛虫的摄食速率时取得了较满意的结果。与原方法相比,改进后的方法具有以下优点:

a. 操作比较简便、直观。由于屏弃染黑滤膜,可以在普通光显微镜下先观察,找到目标后,再转到荧光设置下进行计数,缩短了查找的时间,同时还可以对纤毛虫进行种类鉴定,这在原方法中是不可能实现的。

b. 可以省去 DAPI 荧光染料。在原方法中,有些类似于纤毛虫的碎屑也被染色,很难与纤毛虫区分。改进后的方法可以避免杂质的干扰。

c. 可以控制固定液的浓度。一般来说,固定液的浓度越大,固定效果越好,如果浓度降低,纤毛虫柔软的体细胞膜容易破裂。由于作者吸取的水量非常微小(0.01—0.02ml),很容易把固定液浓度提高(一般取等体积的固定液固定水样)。

本文采用的改进方法尚有下列不足:

a. 只适合在实验室内进行,现场实验不适用。

b. 不能低温保存,必须在实验结束后 6h 内观察,并且应把待观察的玻片放在阴暗处,防止水分蒸发过快。因为固定液水分蒸发以后会引起结晶现象,破坏虫体细胞。

c. 对实验操作技术依赖性强:如纤毛虫的分离、用微吸管吸取、转移等操作都在体视显微镜下进行。实验者必须具有较熟练的原生动物学实验技术方能胜任。

有关原生动物摄食速率研究方法的出现至今不到 20 年,远未达完善的地步,有待国内外的同行在这方面进一步研究。

2.5 纤毛虫在台湾海峡微食物环的作用

研究纤毛虫的摄食速率,最主要的目的是探讨纤毛虫在微食物环中碳循环中的作用。台湾海峡浮游植物以微型和微微型为主,POC 产率相对较高,细菌生长速率快,表明该海区存在以微食物环为主体的生源有机碳转换机制。洪华生等(1997)对台湾海峡微型生物体的碳收支进行了粗略的估算,但由于原生动物的生物量和摄食速率未确定,使得该海域的微食物环无法“闭合”。

本研究中,由该海域纤毛虫的丰度获得该海域纤毛虫的生物量:台湾海峡南北部的纤毛虫丰度分别为 171.0 ind/L 和 231.1 ind/L;生物量分别为 $0.330\text{mgC}/\text{m}^3$ 和 $0.395\text{mgC}/\text{m}^3$ 。在实验室条件中测得厦门沿海纤毛虫优势种群——急游虫的摄食速率,若将结果外推至自然海区,则纤毛虫对细菌的摄食速率为 $4.224\text{pgC}/(\text{cell}\cdot\text{h})$;对微藻的摄食速率为 $5.0\text{pgC}/(\text{cell}\cdot\text{h})$ 。

由此可得纤毛虫在台湾海峡通过对细菌和微藻的摄食每天的同化率为:夏季南部: $0.0176\text{mgC}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ (细菌), $0.0201\text{mgC}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ (微藻);冬季北部: $0.0238\text{mgC}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ (细菌), $0.0272\text{mgC}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ (微藻)。

从外推的结果来看,纤毛虫摄食而固定的碳量在台湾海峡南部仅占细菌生产力的 0.8%;北部稍高,仅为 2.4%,占初级生产力的比例更低。由于本次研究对象大部分为较大的纤毛虫($> 20\mu\text{m}$),较小的纤毛虫被忽略了;此外,根据作者的调查研究发现,微型的异养鞭毛虫($< 20\mu\text{m}$)的生物量($17.57\text{mgC}/\text{m}^3$)远高于纤毛虫的生物量($0.317\text{mgC}/\text{m}^3$);

因此它们在该海区微食物环中可能会起更重要的作用,有待进一步研究。

3 结论

3.1 改进的荧光标记法测定纤毛虫的摄食速率具有操作简便、直观,节省荧光染料,易控制固定液浓度等优点,适合在实验室条件下进行。

3.2 室温条件下(22℃)纤毛虫对细菌的摄食速率为 4.224pgC/(cell·h);对微藻的摄食速率为 5.0pgC/(cell·h)。实验室条件下温度较低时(14—26℃)对纤毛虫的摄食速率的影响大,但在较高温度(>26℃)时差异不明显。

3.3 将实验室结果外推至自然海区,可得台湾海峡南部夏季纤毛虫(>20μm)对细菌和微藻的同化率分别为 0.0176mgC/(m³·d)和 0.0201mgC/(m³·d),北部冬季分别为 0.0238mgC/(m³·d)和 0.0272mgC/(m³·d)。

参 考 文 献

- 沈韞芬,章宗涉,龚循矩等,1990. 微型生物监测技术. 北京:中国建筑工业出版社,1—510
- 张武昌,王 荣,2000. 渤海微型浮游动物及其对浮游植物的摄食压力. 海洋与湖沼,31(3):252—258
- 柯 林,洪华生. 1999. 海洋生态系统中原生动物摄食速率的研究方法简述. 海洋科学,121:40—43
- 洪华生,王海黎,黄邦钦等,1997. 台湾海峡初级生产过程 IV. 菌-藻关系及微食物环初探. 见:洪华生编著:中国海洋学文集(“台湾海峡初级生产力及其调控机制研究”论文集). 北京:海洋出版社,38—48
- Guhl B E, Finlay B J, Schink B, 1996. Comparison of ciliate communities in the anoxic hypolimnia of three lakes: general features and the influence of lake characteristics. J Plankton Res, 18: 335—353
- Landry M R, Hass L W, Fagerness V L, 1984. Dynamics of microbial plankton communities: experiments in Kaneohe Bay, Hawaii. Mar Ecol Prog Ser, 16: 127—133
- Lessard E J, Swift E, 1985. Species-specific grazing rates of heterotrophic dinoflagellates in oceanic waters, measured with a dual-labeled radioisotope technique. Mar Biol, 87: 289—296
- McManus G B, Fuhrman J A, 1988. Clearance rates of bacteria sized particles by natural populations of nanoplankton in the Chesapeake Bay outflow plume. Mar Ecol Prog Ser, 42: 199—206
- Nielsen T G, Kilbøe T, 1994. Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate, coastal ecosystem. 2. Ciliates. Limnol Oceanogr, 39: 508—519
- Nygaard K, Hessen D O, 1990. Use of ¹⁴C-protein-labelled bacteria for estimating clearance rates by heterotrophic and mixotrophic flagellates. Mar Ecol Prog Ser, 68: 7—14
- Pace M L, Bailiff M D, 1987. Evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. Mar Ecol Prog Ser, 40: 185—193
- Pedros-Alio C, Massana R, Latasa M *et al.*, 1995. Predation by ciliates on a metalimnetic *Cryptomonas* population: feeding rates, impact and effects of vertical migration. J Plankton Res, 17: 2131—2154
- Sherr B F, Sherr E B, Andrew T L *et al.*, 1986. Trophic interactions between heterotrophic protozoa and bacterioplankton in Estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors. Mar Ecol Prog Ser, 32: 169—179
- Sherr B F, Sherr E B, Fallon R D, 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. Appl Environ Microbiology, 53: 958—965
- Sherr E B, Sherr B F, 1993. Preservation and Storage of Samples for Enumeration of Heterotrophic Protists. In: Kamp E, Sherr E B, Sherr B F ed. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, 207—212
- Simek K, Bobkova J, Macek M *et al.*, 1995. Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: A study at the species and community level. Limnol Oceanogr, 40: 1077—1090
- Simek K, Macek M, Pernthaler J *et al.*, 1996. Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? J Plankton Res, 18: 597—613

- Sorokin Yu I, Sorokin P Yu, Mamaeva T I, 1996. Density and distribution of bacterioplankton and planktonic ciliates in the Bering Sea and North Pacific. *J Plankton Res*, 18: 1—16
- Vaque D, Gasol J M, Marrase C, 1994. Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors. *Mar Ecol Prog Ser*, 109: 263—274
- Weisse T, 1993. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Adv Microb Ecol*, 13: 327—370

THE GRAZING RATE OF *STROMBIDIUM SUCALTUM* USING A MODIFIED FLUORESCENCE-LABELED TECHNIQUE

HONG Hua-Sheng, KE Lin, HUANG Bang-Qin, LIN Xue-Ju

(*Environmental Science Research Center, Xiamen University,*

Ministry of Education, Marine Environmental Laboratory, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Studies on the grazing rate of *Strombidium sucaltum*, one of the common species of ciliates in Western Sea, Xiamen, were carried out under laboratory conditions using a modified technique of fluorescence-labeled bacteria or nanophytoplankton, in Oct. 1997. Compared to the previous fluorescence-labeled technique, two steps were changed. Firstly, ciliates collected in the field were cultured under laboratory conditions prior to the grazing experiments, in order to obtain larger amount of ciliates. Secondly, the filtering step was replaced by pipetting, so that individual ciliate could be more easily identified. These changes have the following advantage: the procedures are simplified because ciliate staining is not required and the concentration of fixative can be adjusted. The grazing rates of *Strombidium sucaltum* on bacteria and nanophytoplankton under room temperature (22 °C) were 4.224 pgC/(cell·h) and 5.0 pgC/(cell·h), respectively. Extrapolating the results to in situ situations, the assimilation rates of carbon by ciliates on bacteria and nanophytoplankton in the southern Taiwan Strait in summer were 0.0176 mgC/(m³·d) and 0.0201 mgC/(m³·d), respectively, and in the northern Taiwan Strait in winter were 0.0238 mgC/(m³·d) and 0.0272 mgC/(m³·d), respectively. An increase in temperature led to an increase in grazing rate of ciliate over the range of 14—26 °C while at higher degrees (26—34 °C) no further increase in grazing rate was observed.

Key words Fluorescence-labeled technique, Ciliate, *Strombidium sucaltum*, Grazing rate