

2.1 亲蟹的问题

自然环境中,中华绒螯蟹完成个体发育的周期一般为2 a。据观察,雌蟹成熟抱卵待卵孵化后,一般自然死亡,但有少数蟹可生长到3 a,到底有多少,数量如何?未能见报道。从种苗培育过程来看,有少数雌蟹可多次抱卵,到底有多少,数量如何?也未能见报道。对于雄蟹,自然环境中交配后,到底去哪里,一直未能有个明确的答案。这些问题的回答,直接关系到幼体补充数量的估算。

2.2 环境因子与幼体阶段动力学机制问题的研究

梁象秋等1974年认为,中华绒螯蟹幼体生长发育一般有6个阶段, $Z_1 \sim Z_5$ 以及大眼幼体。幼体在不同的龄期阶段对环境因子有不同的要求,不同幼体阶段与不同环境因子的动力学模式的量化有待深入研究。在协迫条件下,幼体生长发育有 Z_6 期幼体出现,但自然环境中, Z_6 期幼体是否有,如有,生长发育的动力学机制是否与正常幼体一致,有待进一步查明。中华绒螯蟹幼体生长发育与上述理化环境因子和生物环境因子的关系是建立在人工优化控制基础上的,到目前从笔者查到的资料来看,国内外实验生态学研究多集中在单一因子静态效应上,从环境毒理学的角度看,各种因子的作用往往表现为联合效应的形式。少数学者已开始注意这种现象,努力寻找联合效应的形式:相加作用、协同作用,增效作用,还是拮抗作用,这种作用的动态效应如何,已引起国内外学者的重视。

2.3 人工种苗培育过程操作工艺的完善

中华绒螯蟹是我国养殖的重要对象之一,其养殖业发展存在的关键问题是如何提高大眼幼体的成活率与质量。当前养殖的种苗(大眼幼体)有两种来源:一是人工苗,即在恒温育苗室或室外土池环境中完成生长发育的大眼幼体(前者简称恒温苗,后者简称土池苗),大眼幼体期成活率的有效控制,往往是整个人工种苗培育过程中成功的关键所在;二是天然苗,即河口区拖网作业捕获自然环境中完成生长发育的大眼幼体。象其他短尾类一样,不同环境中的大眼幼体,生长发育有一定的(非遗传性)差异,恒温苗、土池苗、天然苗在变态发育为I期仔蟹过程中,蟹苗与I期仔蟹的死亡率、发育时间等参数无疑也存在差异,但其差异程度以及形成这种差异的原因缺乏认识。上述问题的回答实质与问题2是一致的,亦即是幼体生长发育与不同环境因子的动力学模式量化的研究,如何量化这种动力学模式,提高种苗成活率,确保数量充足的优质种苗,完善我国人工种苗培育操作工艺,实为当务之急。

参考文献

- 1 堵南山.甲壳动物学(下册).北京:科学出版社,1993. 675~759
- 2 相建海等.主要蟹类幼体分布特征.见:罗秉征、沈焕庭编.三峡工程与河口生态环境,北京:科学出版社,1994. 327~329

海洋生态系统中原生动物摄食速率的研究方法简述*

BRIEF INTRODUCTION OF METHODS TO STUDY THE GRAZING RATE OF PROTOZOA IN MARINE ECOSYSTEMS

柯 林 洪华生

(厦门大学环境科学中心,国家教委海洋生态环境开放实验室 361005)

80年代以来,原生动物摄食速率的研究已成为海洋生态研究的热点之一。据测算,有超过20%的细菌年生产量流经微食物环^[6]。Storm 1993年的研究表明,原生动物年消费的初级生产所固定的有机碳量竟占总固定量的55%。然而,还有很多特别是有关过

程和调控机制的定量研究还需继续探索,原因是原生动物的个体柔软、微小,受外界环境的干扰大,处理困

* 国家自然科学基金资助项目49636220号。

收稿日期:1998-01-03;修回日期:1998-02-09

难,研究方法上尚未完全成熟。我国近年才开始涉及这个领域的研究^[1],比国外落后了二三十年。为了便于国内同行进行比较研究,本文对国际上近20 a 来在微生物环研究中有关原生动物的采样、固定、计数及摄食实验等一系列方法进行了大致的归纳。

1 原生动物的采集、固定及计数

1.1 采集

用采水器或筛绢过滤。用任何型号的筛绢过滤样品都会造成一些原生动物细胞溶解,而且任何型号的筛绢浓缩、富集都会漏掉一部分原生动物^[3],因此,最好将水样固定后再过滤,以免导致裸鞭毛虫、纤毛虫细胞的丢失。

1.2 固定

有关原生动物的固定方法有很多,且各种方法都有其优缺点,这就要求对实验对象选择最佳固定液。此外,固定会造成细胞体积的缩小,约下降75%~45%(平均50%),与碳的比率是0.16~0.20 pg/ μm^3 ,在根据体积进行换算时需考虑其影响。

比较常用的固定液:(1)福尔马林是一种常用的固定液。所用的最终体积浓度为1%~5%。可以加饱和硼砂缓冲液。但 Bloem 1986年认为缓冲福尔马林会导致100%淡水鞭毛虫细胞溶解,而用5%没缓冲的福尔马林却能保存细胞1周。(2)戊二醛是另一种海洋微生物常用的固定液。其固定的细胞会发微弱

的绿荧光。当用蓝光照射时,1%戊二醛保存叶绿素的自发荧光比5%福尔马林效果好。(3)饱和 HgCl_2 固定液固定效果较好。10 ml 饱和 HgCl_2 溶液加至230 ml 样品中,再用溴酚蓝 0.04% 染色,在光学显微镜下观察、计数。(4)Lugol's 液:酸性 Lugol's 液:1 g I + 2 g KI 溶于200 ml 去离子水或蒸馏水中,然后加200 ml 冰醋酸。碱性 Lugol's 液:10 g I + 20 g KI + 10 g Na Ac 溶于140 ml 去离子水或蒸馏水中。(5)Lugol's 混合液:用10 μl 碱性 Lugol's 液快速固定20 ml 样品,紧接着加0.4~0.5 ml 硼砂缓冲 Formalin 液(v/v 5%),然后再加20 μl 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶于100 ml 水中)。这样可以防止食物泡排出。(6)Bouin's 液:纤毛虫分类学家们常用的一种固定液^[2]。配方:1份冰醋酸(CH_3COOH),1份甲醛溶液(HCHO),15份饱和苦味酸 $[(\text{CNO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}]$ 水溶液。浓度可为5%~10%(最终浓度)。(7)Van der Veer 法:配方为4% 丙烯醛,4% Glutaraldehyde,2% 鞣酸(都为 v/v)。此法可以较好地保持鞭毛虫的形态。

1.3 原生动物的计数

1.3.1 常规计数法

取计数板,在显微镜下取20~30个视野(或全部体积)计数。

1.3.2 荧光计数法

荧光染色计数技术是近20 a 才发展起来的方法^[5]。其优点是操作简易,可现场装片,然后密封低温(5 $^{\circ}\text{C}$)保存带回实验室再计数,不影响结果。

表1 荧光显微镜常用的荧光物及参数

荧光物	激发波长(nm)	发射峰(nm)	靶的
DAPI	365	390~400	DNA
Primulin	365	425	细胞质
Proflavin hemisulfat	470~490	500~520	细胞质
FITC isomer I	470~490	500~520	细胞质
DTAF	470~490	500~520	细胞质
AO(Zn 盐)	470~500	550~570	RNA, DNA
Nile Red lipids	488~525	570~600	中性类脂化合物
Rhidamine RITC	540~560	620	细胞质

现分别介绍常用 AO (丫啶橙 Acrodine Orange) 染色法和 DAPI 染色法。

1.3.2.1 AO 法 样品可平行分为两份,一份未染 AO,一份 AO 染色。未染 AO 荧光计数所得为自养浮游生物(通过其光合色素的自发荧光);AO 染色计数所得为全部浮游生物(包括自养和异养)。减去前者的数目即可得异养浮游生物数目。操作步骤:(1)固定过的样品(2~25 ml)过滤于直径2 μm 滤膜上

(用依加仑黑染黑);(2)加样品体积1/10的 AO 溶液(0.1% W/V 与蒸馏水混和,用1%福尔马林或戊二醛保存)于样品中;(3)染色3 min 后,用2 ml 的蒸馏水漂洗,真空泵压力<17~34 kPa(5~10 in. Hg),取下滤膜;(4)滤膜置于加一小滴浸油的载玻片上,再加一滴浸油于滤膜上,使滤膜平铺于载玻片上,加盖玻片。如要长久保存,四周用石蜡密封;(5)荧光显微镜计数。取20个视野计数,最后换算为水样的丰度。真

核细胞在荧光镜下呈橙黄色。AO 染色技术的优点是：方法简单、快速，几乎全部的细胞都能染上。另外，AO 比较稳定，在适当条件下（4℃，黑暗保存）可保存数月。缺点：它的发射波长强烈覆盖叶绿素的发射波长，因此测异养浮游生物数需作平行样分别测定。另外非细菌颗粒物也会被染色，造成细菌量高估。

1.3.2.2 DAPI 法 DAPI 是标记 DNA 的荧光物。由于 DAPI 较昂贵，所以 > 5 ml 的样品都应过滤浓缩至 < 5 ml。DAPI 的原液制备：1.0 mg/ml DAPI 液，用 0.2 μm 过滤蒸馏水配制，-20℃ 低温保存。DAPI 的工作液：0.1 μg/ml DAPI 液，可在 4℃ 黑暗保存数星期。操作步骤：(1) 使用前 0.2 μm 滤膜先过滤。染色液与样品的 V/V 为 1:4，加到滤膜上（依加仑黑染黑）；(2) 染色 5 min 后，用 < 23.7 kPa (7 in. Hg) 真空泵浓缩过滤到滤膜上，固定到载玻片上（方法同上）；(3) 荧光显微镜下计数。此法优点是通过不同的波长设置分别计数异养（UV 激发）或自养（蓝光激发）浮游生物，而且由于是 DNA 染色物，可以减少 AO 染色的高估误差。缺点为价格昂贵。

2 摄食实验

测定原生动物对细菌摄食率的方法有多种，常用的有：稀释法、荧光标记细菌法、选择性原生动物的抑制法、放射性同位素标记法、溶菌酶活性法等。现具体介绍如下：

2.1 稀释法

Landry 和 Hassett 最先提出用稀释法测定微型浮游动物对浮游植物的摄食影响。适用稀释法的理论前提：(1) 浮游植物的密度不作为其生长的制约因子。(2) 消费者不会在自然摄食密度下有食物饱和现象，消费者对浮游植物的摄食数量与浮游植物的密度呈线性相关。(3) 假设浮游植物密度的变化 P 与时间 t 有以下指数关系： $P_t = P_0 e^{(k-g)t}$ 。 k, g 分别是生长率和死亡率的系数。因此可得：

$$\text{生长率} = kN_0C / \text{细胞} (\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d}))$$

$$\text{摄食率} = gN_0C / \text{细胞} (\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d}))$$

其中， N_0 表示浮游植物的最初密度， C 为浮游植物单位体积碳。

实验的主要步骤：

将未过滤实验海水与过滤的同样海水（0.2 μm 滤膜过滤）按以下体积比混和：1:0.3:1, 1:1, 1:3。培养时间为 t 。由以上的方程，每个采样点可得 4 个关系式：

$$(1/t)\ln(P_t/P_0) = k - 1.0g$$

$$(1/t)\ln(P_t/P_0) = k - 0.75g$$

$$(1/t)\ln(P_t/P_0) = k - 0.5g$$

$$(1/t)\ln(P_t/P_0) = k - 0.25g$$

由 4 个关系式可得到 4 点，作图，得一线性回归方程。其中，负斜率为摄食系数 g ， y 轴截距为生长率系数 k 。

微型单细胞浮游植物的计数可用荧光染色法在荧光显微镜下进行。与这原理相似，原生动物对细菌的摄食也可测定。

Landry 和 Hassett 测定了微型浮游动物对微型浮游植物的摄食量为 6%~24%（总生物量），而对浮游植物每天的生产量的摄食占 17%~52%。

2.2 选择性抑制剂技术

Caron 等 1991 年用此法来研究异养原生动物与细菌的摄食关系。这种方法必须基于以下 3 个前提：(1) 所加的抑制剂只对其靶的物起作用，而对别的生物没影响；(2) 所用的抑制剂必须对同一生物类群有很广的抑制性；(3) 这种抑制剂必须对靶的物的某个特定位点的活性有很快的抑制作用。

氨基青霉素可以抑制原核生物（如细菌）的细胞分裂，而且认为对真核生物没有影响，通过计算单位时间内细菌浓度的减少可以得出原生动物的摄食速率。作对照的受控实验同时加氨基青霉素和放线菌酮（真核生物的抑制剂，可以抑制真核细胞的蛋白质合成），观察细胞浓度是否保持一致。水样中氨基青霉素浓度：5 mg/L 和 10 mg/L；放线菌酮的浓度：100 mg/L。

Sherr, B. F. 和 Sherr, E. B. 等 1986 年的现场研究表明，在河口区有 40%~45% 细菌的生产量被 < 20 μm 的原生动物摄食。但 Taylor 等 1987 年对抑制剂法技术提出质疑，认为真核抑制剂会对浮游植物、细菌的生长也会产生影响，所以测定细菌生产量时会低估。他认为，这种方法不适于初级生产力高的海区。

2.3 酶活性法

Gonzalez 等 1993 年提出的一种新的测定原生动物对细菌摄食率的方法。

方法原理：原生动物分泌的溶菌酶专门降解肽聚糖，而肽聚糖是原核生物细胞壁的特有成分，原生动物摄食的细菌越多，溶菌酶的活性越强，通过测定溶菌酶活度的变化率来估算其对细菌的摄食速率。

原生动物的溶菌酶在食物泡内对细菌作用的同时也会向体外分泌酶液，浓度随着消化活动的变化而变化。用一种肽聚糖的类似物，如被荧光标记的人工合成物：4-甲基伞形酸基-B-D-N, N', N''-三乙酰

海洋科学

基壳丙糖(4-methylumbelliferyl beta-D-N, N', N'-tracetylchi-totriose; MUF-【GlcNAc 3】)作为该酶的底物,在荧光显微镜下测定 MUF-【GlcNAc 3】荧光活度的变化,得出对细菌的摄食速率。该法要用荧光标记法(FLB)进行校正。

Gonzalez 用此法和 FLB 法比较,所得结果的相关性非常好($r^2=0.98$)。

2.4 放射性同位素法

Nygaard 和 Hessen 1990 年用 ^{14}C -protein 标记细菌技术测定鞭毛虫的摄食速率。

2.4.1 RLB(Radioactive Labelled Bacteria)的制备

1~2个月陈海水(15℃)用6μm滤膜过滤,去除大颗粒,0.5 kBq(最终浓度30 μCi) ^{14}C -水解蛋白标记,15℃放置培养24~30 h,取样3份(1 ml/份)分测:总活度,总颗粒活度(0.2 μm),背景活度(1.0 μm)。

2.4.2 摄食实验

取20 μm滤膜过滤的天然海水100 ml加到400 ml含RLB瓶子中,每隔0,5,10,20,40 min取样,各取3份(10 ml/份),用 HgCl_2 固定,使 HgCl_2 的最终浓度为11 mmol/L,过滤在1.0 μm滤膜上,液闪计数,测鞭毛虫活度。

2.4.3 细菌、原生动物计数

分别取1 ml水样过滤到0.2 μm(Bacteria)、1.0 μm(Protozoa)滤膜上,DAPI染色,荧光显微镜下计数。

2.4.4 摄食速率(I)

$$I = Af / (Cf \times T(t_0 - t_1)) \times (Ab / Cb)^{-1}$$

其中,I:细菌数/(鞭毛虫·min);Af:鞭毛虫活度(DPM/ml);Cf:鞭毛虫数/ml;Ab:细菌活度(DPM/ml);Cb:细菌数/ml;T:摄食时间($t_1=10$ min)。

2.5 荧光标记细菌法(Flourescent Labeled Bacteria,FLB)

FLB法已作为测定原生动物摄食速率的常规方法^[4],在此重点介绍。

2.5.1 细菌的来源

自然海水富集。0.8 μm滤膜过滤10~20 L的海水浓缩而成。

2.5.2 FLB的制备

(1)收集细菌;(2)离心(25 ml,12 000 r/min,12~20 min);(3)悬浸于10 ml的磷酸盐缓冲溶液中(pH=9);(4)加2 mg DTAF 荧光染色,60℃水浴2 h;(5)再离心,轻将上层DTAF溶液倒出,用缓冲溶液洗涤

和离心各3遍;(6)最后一次洗涤后,悬浸于20 ml磷酸盐缓冲液中,如有块状物,应超声振荡击碎;(7)密封低温冷冻保存(-20℃)。用时解冻(加1~2 ml蒸馏水)、超声。

2.5.3 摄食实验

纤毛虫的摄食细菌量,较理想的FLB浓度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ ml/L,鞭毛虫的为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ ml/L,如果浓度过低,就很难精确测定摄食率。(1)60 μm筛绢(或100 μm)现场过滤50~400 ml的海水,设置与现场水温一样的条件,培养30 min,使原生动物恢复常态。(2)加FLB,以0,5,10,20,40 min的时间间隔分别取10 ml的水样,马上用固定液固定,在荧光分析前5℃黑暗保存。(3)原生动物及其摄食量的荧光计数。样品过滤到0.2 μm的依加仑染黑的滤膜上,加DAPI染色、计数。在UV设置下,计算原生动物的数量;在蓝光设置下,可检测每个原生动物体内的FLB数。(4)FLB细胞的平均体积为 $0.10 \mu\text{m}^3$,换算以碳为单位是 $0.22 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$,原生动物的生物量可以计算其体积(按球形或长球形),换算为碳即 $0.08 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$ 。

参考文献

- 1 洪华生、王海黎等.台湾海峡的初级生产过程研究IV.菌-藻关系及微食物环初探.见:中国海洋学文集第7期.北京:海洋出版社.1997,1~
- 2 宋微波、徐奎栋.纤毛虫原生动物形态学研究的常用方法.海洋科学,1994,6:6~9
- 3 Sherr, E. B., Sherr, B. F.. Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In: Kamp, E. B. et al. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology', Lewis Publishers, 1993a. 207~212
- 4 Sherr, E. B., Sherr, B. F.. Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey. In: Kamp, E. B. et al. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology'. Lewis Publishers, 1993b. 695~701
- 5 Sherr, E. B., Caron, D. A., et al. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. In: Kamp, E. B. et al. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology'. Lewis Publishers, 1993c. 213~227
- 6 Solic, M., Krstulovic, N.. Mar. Eco. Pro. Ser. 1994, 114: 219~235