

吞噬微囊藻的鞭毛虫的培养*

王 进, 李建宏**, 华秀红, 周逸芳

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘 要: 从一个有水华发生的池塘里采集分离到一种能吞噬微囊藻的动基体目鞭毛虫 (Kinetoplastida), 在光学显微镜及激光共聚焦显微镜下观察了该鞭毛虫的形态特征, 初步探讨了它的培养方法. 该鞭毛虫以集胞藻、微囊藻、鱼腥藻、小球藻以及蛋黄、奶粉、大肠杆菌和酵母为食物进行培养, 结果集胞藻、微囊藻、奶粉、蛋黄、及酵母都是该鞭毛虫很好的食物. 该鞭毛虫易于培养, 繁殖迅速, 培养成本低廉, 有应用于生态环境中控制微囊藻水华的可能.

关键词: 异养鞭毛虫; 微囊藻; 胞吞作用; 浮游动物;

Culture of a *Microcystis*-eating flagellate

WANG Jin, LI Jianhong, HUA Xiuhong & ZHOU Yifang

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097 P. R. China)

Abstract: A heterotrophic nanoflagellate (Kinetoplastida) was separated which feeds on *Microcystis* cells by endocytosis. Its morphological characters were observed by the optical microscope and confocal scanning light microscope. The eating process could be finished in several seconds (even less than 3 seconds). One flagellate could eat more than ten *Microcystis* cells at most. The flagellate was single cell protozoan with one, two or four flagella. The flagellate was transparent and without pigments. It appeared to be spherical in shape at most of the time and occasionally they are elliptical or other shape. The spherical flagellates ate *Microcystis* cells with low moving velocity, the other flagellates moved faster but didn't eat *Microcystis* cells. The flagellate reproduced by equal binary fission and this procedure lasted about 5 minutes. According to the morphological observation, the flagellate should be belonged to Sarcocystophorea, Zoomastigophorea, Kinetoplastida. The relative activity of protease was greatly improved after inducing by feeding with *Microcystis* cells. The results suggested that the flagellate have strong ability to digest the cells of *Microcystis*. It could remove 80% of the *Microcystis* cells in less than 20h in our study. The flagellate should be used for ecological control of *Microcystis* water bloom. To get a large population, the culturing of the flagellate was studied. *Synechocystis*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Chlorella*, *E. coli*, yeast cells and yolk, milk powder were used as feed, respectively. Results showed that *Synechocystis*, *Microcystis*, milk powder, yolk and yeast were its favorite foods. Among them, *Synechocystis* and yeast cells were better than others. The flagellate was endurable to low temperature. Even storing at 4°C more than a month, it could survive and reproduce as usual. The application of this flagellate to natural ecosystem will be investigated in future research.

Keywords: Flagellates; *Microcystis*; endocytosis; water bloom

由于水生生态环境的恶化, 湖泊富营养化程度日趋严重, 导致了水华频繁发生, 尤其是微囊藻水华所带来的环境灾害已引起人们的广泛关注^[1,2]. 已有不少研究探索微囊藻种群的控制, 其中利用细菌、病毒等生物学方法进行水华蓝藻的控制具有成本低、效果好、对环境的二次污染影响小等优点, 受到越来越广泛的重视^[3], 但这些研究仍处于探索之中, 尚未见到实际应用的报道.

在自然水生生态系统中, 浮游藻类是浮游动物的重要食物, 藻类种群数量往往受到浮游动物种群和数量的影响. 如能通过调控浮游动物的种群数量来控制藻类种群的数量, 将是一种理想的途径. 然而, 由于微囊藻产生的毒素对大型浮游动物是有毒的^[4], 所以它们在微囊藻种群控制中难以真正发挥作用. 原生动物的

* 教育部归国留学人员基金(2003)和江苏省教委基金(03KJD180113)联合资助. 2004-05-28 收稿; 2004-09-03 收修改稿. 王进, 男, 1968年10月生, 在读硕士研究生. E-mail: jinwang101@126.com.

** 通讯作者.

是浮游动物中的重要类群,对于原生动物与藻类的关系已有一些研究^[5,6]. 原生动物可以以细菌、藻类、有机碎屑等作为食物,在天然水生态系统中,原生动物可控制浮游藻类种群的种类和数量. 但鞭毛虫与微囊藻在环境生态中的相互关系尚未见报道.

本实验室自发生水华的池塘中采集分离到一种鞭毛虫,具有很强的吞噬微囊藻的能力,有可能培养用于控制水华微囊藻的数量. 本研究在光学显微镜下和激光共聚焦显微镜下观察了鞭毛虫的形态和吞噬微囊藻的过程,并探索大量培养该鞭毛虫的条件,旨在进一步探索新的生物控制微囊藻的方法.

1 材料与方法

1.1 材料

一种动基体目鞭毛虫 (Kinetoplastida) 采集分离自南京郊区一个发生水华的池塘;市售奶粉、新鲜煮熟蛋黄、大肠杆菌、酵母用于鞭毛虫培养;藻种:微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)、集胞藻 (*Synechocystis* PCC 6803)、鱼腥藻 (*Anabaena* PCC 7120) 均来自法国巴斯德研究所,由法国 LCB - CNRS 张承才教授惠赠;小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) 由本实验室分离培养.

1.2 方法

1.2.1 形态观察 光学显微镜观察:在鞭毛虫的培养液中加入 30% (V/V) OD₆₅₀ 值约为 0.3 的微囊藻,22℃,40W 日光灯连续光照,重新培养一天,然后将鞭毛虫滴于载玻片上,置光学显微镜下观察.

激光共聚焦显微观察:鞭毛虫的培养同上,将鞭毛虫滴入中间带有凹槽的玻璃片上,置于激光共聚焦显微镜下观察.

1.2.2 鞭毛虫清除微囊藻实验 取 OD₆₅₀ 值 = 0.3 的微囊藻 50 ml,加入 5 ml 浓度为 3.6×10^6 个/mL 的鞭毛虫,空白组加入 5 ml 的 BG - 11 培养基. 培养方法同上,每隔 4h 测一次叶绿素 a 的含量^[7].

1.2.3 喂养实验 藻类喂养:将微囊藻、集胞藻、鱼腥藻和小球藻接入到新鲜培养基中,22℃、40W 日光灯连续光照培养一周后备用. 把培养后的四种微藻的浓度都调整为 OD₆₅₀ 值 = 0.3,鞭毛虫的培养同上,血球计数板计数. 分别取调整浓度后的微藻 5 ml 加入到 20 ml 的 BG - 11 培养基中,再加入 5 ml 浓度为 5×10^5 个/ml 的鞭毛虫,则每组培养基中鞭毛虫的起始浓度均为 8.33×10^4 个/ml. 每组三个平行,40W 日光灯连续光照培养 (22℃),每天对鞭毛虫浓度计数一次.

其他培养物喂养:奶粉:0.1 g 奶粉加水 100 ml,煮沸后备用. 蛋黄:取煮熟的蛋黄 0.1 g,加水 100 ml 搅碎混匀备用. 细菌:将大肠杆菌接种到牛肉膏、蛋白胨培养基中,35℃、150 rpm 发酵 30 h,OD₅₆₀ 值约为 1.5. 取 2 ml 发酵液加入 28 ml 无菌水中备用;酵母:将酵母接种到马铃薯培养基上,25℃、150 rpm 发酵 30 h,OD₅₆₀ 值约为 1.3,取 2 ml 发酵液加入 28 ml 无菌水中备用. 参照文献的方法配制不同培养基培养鞭毛虫^[8].

用稀释 10 倍的鲁戈氏液短时固定培养后的鞭毛虫,血球计数板计数. 本实验计数结果为 5×10^5 个/ml. 分别取 5 ml 的鞭毛虫加入 30 ml 上述四种培养基中,则四种培养基中鞭毛虫的浓度均为 7.14×10^4 个/ml. 每组三个平行,培养方法同上,每天用血球计数板对鞭毛虫浓度计数一次.

1.2.4 鞭毛虫饥饿时和吞噬微囊藻后蛋白酶活力的测定 蛋白酶活力测定参见文献^[9],将含有鞭毛虫的培养液分装两个三角瓶中,其中一瓶每 4 h 加 2% 体积 OD₆₅₀ 在 0.3 左右的微囊藻维持鞭毛虫正常生长,另一瓶在使用前 12 h 停止投喂微囊藻,以确保鞭毛虫体内无微囊藻存留. 实验时先分别用血球计数板计数,然后将计数后的鞭毛虫培养液放入冰箱中冷冻过夜,解冻后低温离心,将上清液置 4℃ 冰箱中待用. 鞭毛虫裂解液的加量为 0.2 ml,标准血清蛋白的加量为 0.3 ml,分别测定饥饿 12 h 和正常喂养 12 h 后其体内的蛋白酶活性.

2 实验结果

2.1 形态分类及吞食藻过程的观察

从采集的水样中分离到一种鞭毛虫,能迅速吞噬微囊藻细胞,虫体中可观察到数个微囊藻细胞. 因此,对该鞭毛虫的形态及吞噬微囊藻的过程进行了详细观察.

该鞭毛虫虫体透明,不含色素,呈球形、长卵形、梨形或无定形变化,生活史中有单根鞭毛、双鞭毛或四鞭毛阶段;运动速度一般在 0—5 μm/s;一般球形鞭毛虫的直径为 3.5 μm—6.0 μm,长卵形的长为 6.0 μm—7.5 μm,宽为 2.5 μm—4.0 μm;球形鞭毛虫具有吞噬微囊藻细胞的能力,但运动速度较慢,其它形状的鞭毛虫基本无吞噬作用,但运动速度较快;鞭毛虫通常采用分裂的方式进行繁殖,整个分裂过程可在 5 min 内完成.

鞭毛虫摄食微囊藻是采用胞吞作用进行,胞吞作用可发生在虫体的多数部位,并非通过特殊的口器.从细胞膜发生内陷到藻细胞完全进入虫体,整个过程一般为几秒钟,最快可在 3 s 内完成.一个鞭毛虫最多时可吞入十多个藻细胞.运用激光共聚焦显微镜可以清楚地观察到微囊藻的自发荧光,说明被吞入虫体内的颗粒的确是微囊藻细胞(图 1).

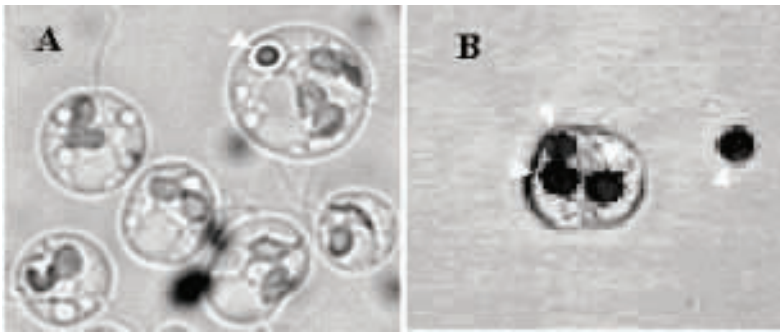


图 1 吞噬微囊藻前后的鞭毛虫形态

A 普通光学显微镜,B 激光共聚焦显微镜;白三角所示为微囊藻细胞

Fig. 1 Morphological characters of flagellates before and after eating *Microcystis*.

A: Optical microscope; B: Confocal scanning light microscope;

White triangles mark cells of *Microcystis*.

根据对该鞭毛虫的形态观察,参考有关分类学资料^[10],初步将其归为肉鞭门(Sarcomastigophorea)、动鞭毛纲(zoomastigophorea)、动基体目(Kinetoplastida).当然,仅根据形态分类还不够,细致的分类工作有待进行.

在适宜微囊藻生长的温度、pH 等环境条件下,该鞭毛虫繁殖迅速且具有很强的吞噬微囊藻的能力.从图 2 结果可见,鞭毛虫在 20 h 内可以去除实验所用微囊藻的 80% 以上,(关于环境条件对该鞭毛虫吞噬微囊藻能力的影响将在另文发表).

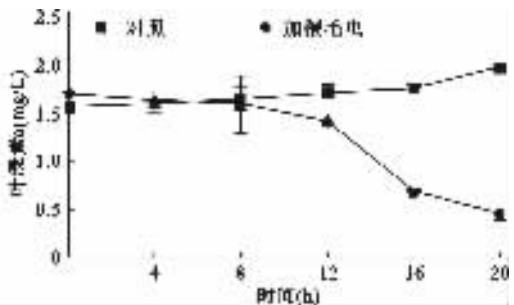


图 2 鞭毛虫吞噬微囊藻的效果

Fig. 2 The results of the flagellate eating *Microcystis*

2.2 鞭毛虫在饥饿时及食藻(诱导)后蛋白酶活力的变化

本次实验鞭毛虫密度在饥饿时为 1.6×10^6 个/ml,食藻后为 1.8×10^6 个/ml.鞭毛虫摄食微囊藻后,需要增加蛋白酶含量或提高蛋白酶活力,以便将微囊藻消化,通过实验证明,食藻后鞭毛虫的蛋白酶活力有明显提高.实验结果如表 1 所示:

表 1 鞭毛虫在饥饿时及食藻后相对蛋白酶活力对比

Tab. 1 The comparison of relative ability of protease between the induced and the uninduced flagellates

| | 未诱导 | 诱导 | 增加比例 |
|---------------------------|------|------|--------|
| 相对蛋白酶活力 (单位/ 10^6 个) | 2.91 | 4.47 | 53.61% |

本实验中以 30℃ 时, 每分钟蛋白质含量减少的微克数作为一个蛋白酶活力单位。鞭毛虫饥饿时的蛋白酶活力为 2.91 个单位/10⁶ 个鞭毛虫, 吞食微囊藻后为 4.47 个单位/10⁶ 个鞭毛虫, 增加的比例为 53.61%。

2.3 四种微藻喂养鞭毛虫结果比较

分别用微囊藻、集胞藻、鱼腥藻和小球藻四种微藻作为饵料进行培养比较, 结果图 3 所示。可以看出, 鞭毛虫以微囊藻和集胞藻为饵料生长较好, 虫浓度的增长速率分别为 0.72 倍/d 和 1.0 倍/d, 而以鱼腥藻和小球藻为饵料则难以生存。

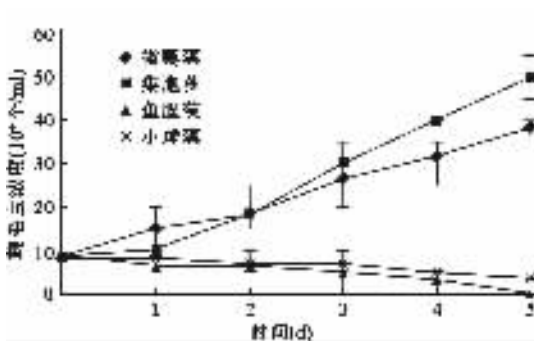


图 3 不同微藻喂养鞭毛虫比较

Fig. 3 Comparing of different microalgae as food to the flagellate

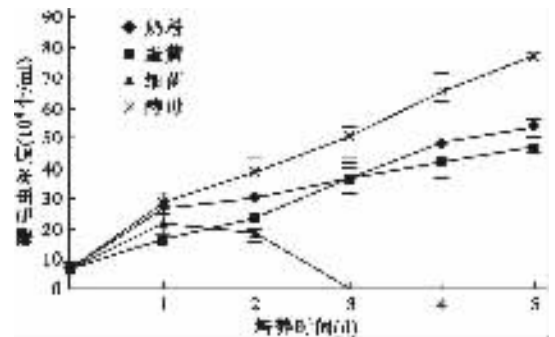


图 4 四种培养基对鞭毛虫生长的影响

Fig. 4 Effects of four media on the flagellate growth

采用几种常用的原生动动物培养物培养鞭毛虫, 结果如图 4。以酵母、蛋黄和奶粉为食能很好地生长, 鞭毛虫的数量平均增长速率分别达到 1.95 倍/d、1.11 倍/d 及 1.29 倍/d, 而以大肠杆菌喂养则不能生长, 表明该鞭毛虫对食物的吞噬具有一定程度的选择性。

3 讨论

在自然水生态系统中, 浮游动物摄食藻类, 藻类通过各种机制抵御动物捕食, 这两方面作用维持着种群生态的平衡。微囊藻产生的微囊藻毒素对很多浮游动物有毒害作用^[11]。这有可能是其在水体中很容易大量繁殖形成水华的原因之一。到目前为止尚未见有关于摄食微囊藻浮游动物的报道。

原生动动物对食物的吞噬是具有一定的选择性的^[12], Gonzalez 等在研究中也发现, 不同的鞭毛虫可以吞噬不同形状的细菌^[13], 而且能够吞噬的细菌的大小和鞭毛虫本身的大小有密切的关系。本实验结果显示, 吞噬微囊藻的鞭毛虫对不同单细胞藻类和其他颗粒状的食物均有不同的选择性。对于原核的单细胞蓝藻微囊藻和集胞藻, 该鞭毛虫有很强的吞噬能力, 但对大肠杆菌却不吞噬, 对丝状鱼腥藻也不能吞噬; 对真核的酵母细胞能吞噬, 但对体积相近的小球藻却不吞噬。从这些结果可见, 该鞭毛虫对吞噬颗粒选择并非简单地对体积大小和形态进行识别, 它对食物的选择性具有更复杂的识别过程。这种对单细胞蓝藻选择的特异性, 在运用于环境中时, 可避免过多地对生态系产生扰动。

在水生生态系统中, 异养鞭毛虫 (Heterotrophic nanoflagellates, HNF) 扮演着重要角色。它们参与了能量的转移与流动, 是联系细菌、初级生产者和较大的生物体的中间环节^[14]。许多蓝藻是原生动动物的重要食物来源, 原生动动物捕食藻类是水生食物链中的重要一环^[3, 15], 利用原生动动物来控制有害藻类的种群数量是一种应用生态种群调配的方法对水体环境进行生物治理的措施。利用生物抑藻方法控制蓝藻水华已有一些研究^[16, 17], 培养利用鞭毛虫清除微囊藻是一种新的探索。在一般富营养化水体中原生动动物的密度在 10⁴—10⁵ 个/L 之间^[18], 鞭毛虫的数量往往不足总数的 1/10, 其中具有摄食微囊藻能力的鞭毛虫即使存在也十分稀少, 在这样的低浓度下是难以发挥控制微囊藻种群的作用的。因此, 要想利用鞭毛虫控制微囊藻, 必须通过人工培养添加到环境中去。但在自然生态系统中, 在怎样的条件下才能取得理想的效果, 还有待进一步研究。

通过本研究发现,该种鞭毛虫具有很强的吞食微囊藻的能力,繁殖培养十分容易,单细胞蓝藻以及来源丰富、价格低廉的酵母、蛋黄、奶粉均可用作培养饵料。初步的研究还表明,该鞭毛虫在4℃冰箱中存储一个月以上仍然存活。这些特点为大量在环境中运用提供了可行性。

4 参考文献

- [1] Hallegraff G M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase. *Phycologia*, 1993, **32** (20): 79.
- [2] Ingrid C., Jamie B. Toxic cyanobacteria in water. London and New York: E & F N Spon Publisher, 1999: 416.
- [3] 韩继刚, 孟颂东, 叶寅等. 藻类污染防治新策略. *微生物学报*, 2001, **41**(3): 381-385.
- [4] 李效宇, 刘永定. 微囊藻毒素对大鳞副泥鳅胚胎和幼鱼的毒性效应. *水生生物学报*, 2003, **27**(3): 318-319.
- [5] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991: 233.
- [6] Hagstrom A, F Azam, A Anderson, J Wikner and F Rassoulzadegan. Microbial Loop in a oligotrophic Pelagic Marine Ecosystem: Possible Roles of Cyanobacteria and Nanoflagellates in the Organic Fluxes. *Mar Ecol Prog Ser*, 1988, **49**: 171-178.
- [7] 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1980, 88-90.
- [8] 庞延斌. 原生动物实验方法. 上海: 华东师范大学出版社, 1991.
- [9] 杨光彩. 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量. *生物化学实验指导*. 广州: 华南理工大学出版社, 125-126.
- [10] 沈蕴芬主编. 原生动物学. 北京: 科学出版社, 1999: 201-203.
- [11] 隋海霞, 陈 艳. 淡水湖泊中微囊藻毒素的污染. *中国食品卫生杂志*, 2004, **16**(2): 112-114.
- [12] Boenigk J, C Matz, K Jurgens and H Arndt. Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquat Microb Ecol*, 2002, **27**: 195-202.
- [13] Gonzalez, J. M., E B Sherr and B F Sherr. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblage of estuarine flagellates and Ciliates. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 583-589.
- [14] Azam F, Fenchel T, Field J G, et al. *MeyerReil L A and Thingstad F*. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser*, 1983, **10**: 257-263.
- [15] Campbell L and Carpenter E J. Estimating the grazing pressure of heterotrophic techniques. *Ecol Prog Ser*, 1986, **33**: 121-129.
- [16] La Noue J, Lavoie M C. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Phycology*, 1993, **9**(5): 297-306.
- [17] 彭 超, 吴 刚. 3株溶藻细菌的分离及鉴定. *环境科学研究*, 2003, **16**(1): 37-40.
- [18] 沈蕴芬. 中国淡水原生动物多样性及其所受威胁. *生物多样性*, 1998, **6**(2): 81-87.