海洋底栖原生动物生态学研究方法学综述

Methods for ecological studies of marine benthic protozoa

类彦立，徐奎栋

（中国科学院 海洋研究所，山东 青岛 266071）

中图分类号：Q178.1　　文献标识码：A　　文章编号：1000-3096（2007）05-0049-09

在浮游生态系统 (pelagic ecosystem) 中，原生动物是细菌和微型浮游植物 (microphytoplankton) 的主要捕食者，又是很多浮游动物 (zooplankton) 的重要的饵料来源。因此，原生动物被认为是食物网中从微型生物构成 (microbial components) 到较高营养级的一个能量传递的重要环节[1~4]。当前有关原生动物的生态学研究基本围绕易于采获的浮游生类群，而对于底栖类群的研究明显欠缺且存在诸多不足，尤其对于原生动物在底栖环境中数量上的重要性，以及其群落结构和生态功能所知甚少[5~10]。最新研究发现，底栖环境中蕴藏着十分丰富多样的原生动物物种或类群，其单位密度比浮游水体中高出一个甚至几个数量级[11~16]。根据 Hamels 等[17]的研究，底栖原生动物在潮间带的代谢率约占总的原生动物和小型动物消费者的 29%～96%，另外，作者研究发现，在底栖原生动物中纤毛虫通常在数量上占优势，代谢率平均可达原生动物和小型底栖动物总体的三分之一，成为底栖微食物网中极为重要的异养类群[13]。随着对底栖微食物网结构和功能的重要性认识不断加深，底栖原生动物已日益受到现代生态学研究的关注[9, 16~19]。底栖原生动物的定量与定性研究一直是底栖微食物网研究的薄弱环节，而对于主要异养类群的纤毛虫生态学研究更是其中的难点，主要原因在于：(1) 纤毛虫个体微小且极其脆弱，如何将其从泥沙中有效分离、提取并进行定量和定性分析，一直是困扰底栖原生动物生态学研究的制约因素；(2) 纤毛虫是原生动物中多样性高、功能复杂且鉴定十分困难（需经过特殊的染色）的类群，国际间缺乏具有良好的分类基础同时兼备生态学背景的研究力量。源于底栖微型生物研究技术上的滞后，国际上有关底栖微食物网的研究至今仍处于起步阶段，而对于底栖纤毛虫的生态学研究又明显滞后于其它原生动物类群[19~21]。

目前对于底栖原生动物生态学作用研究已成国际新兴热点，但总体上仍处于探索阶段。上个世纪末对于该类群的研究基本限于零星的活体观察或粗略定量[20, 22, 23]。直至 2000 年，Wickham 等[21]开创性地利用非线性密度梯度离心法结合定量蛋白银染色 (QPS)，进行底栖原生动物的定量提取及定性研究，才开始有效拓展了底栖原生动物的生态学研究。在中国，该领域的研究基本处于空白。作者综合目前有关底栖原生动物生态学研究的技术成果， 结合研究实践[13]以及相关领域国外实验室的最新研究技术及经验，对现代底栖原生动物生态学研究的方法包括采样、固定、提取、定量蛋白银染色、定性与定量分析方法以及常用统计分析方法进行了介绍，并着重于介绍微型底栖生物生态研究的关键技术——Percoll 液分离提取法及热定量蛋白银法[21, 24]。

收稿日期：2006-12-18；修回日期：2007-01-20

基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KZCX2-YW-417）；国家自然科学基金项目 (40576072)；中国科学院百人计划项目

作者简介：类彦立（1973-），女，山东新泰人，副研究员，理学博士，研究方向为微型底栖生物多样性与生态学，电话：0532-82898795，E-mail: leiyanli@ms.qdio.ac.cn; 徐奎栋，男，通讯作者，责任研究员，博士生导师，中国科学院百人计划入选者，电话：0532-82898776，E-mail: kxu@ms.qdio.ac.cn

1 采样及固定

潮间带采样可采用由塑料注射器改制的取样管（通常内径 22~36 mm）。若取样水层较深，可使用由硬质无毒有机玻璃管改制的取样管，垂直插入未受干扰的底质沉积物中。在研究原生动物在沉积物中的垂直分布时，采样时需依据不同的底质类型进行分层（如 0~0.5 cm, 0.5~2 cm, 2~4 cm, 4~8 cm 等分层）取样。对于沙质沉积物，直接将取样管插至合适的深度，取样时注意稍稍倾斜并暂时封住底部，从底部推出样品柱并进行分层切片取样。对于沙泥、泥沙质或泥质沉积物样品，取样管插入沉积物之前应将胶塞封住上端，然后边插边拔上端的胶塞，使采样过程中取样管内保持一定的真空度，以避免沉积物之间的挤压，并从底部推出样品柱，进行分层切片取样。对于船上取样，采样设备同大型及小型底栖生物，即从箱式取样器及采泥器中用取样管取芯样，采集未受扰动的底质沉积物样品。微型底栖生物生态学调查要求最少取 3 个重复样。另外，由于处理底栖样品的操作过程繁琐，即使熟练的操作人员，在后继操作过程中都可能造成样品丢失或提取及染色失败，故采样时应多备份 1~2 个重复样。

底栖原生动物样品的生态学研究需经过特殊的提取液（如 Percoll，Ludox 液），进行生物体和沉积物的离心分离提取。目前国际上基本是采用价格昂贵的 Percoll 液分离提取海洋底栖原生动物。但是当 pH 值低于 4.5 时，Percoll 提取液会形成凝胶，故酸性的 Bouin 氏液及 Lugol 氏液不适用于本法。因此，作者一般采用中性的戊二醛（glutaraldehyde）固定海洋底栖生物样品（终浓度通用为 2%）。原生动物样品经过固定后，需避光低温（4 °C）保存，直至提取分析。

采集固定样品的同时，有时还需采集活体样本，以进行各项室内生态学实验（如摄食率、生长率及世代时间等的测定）或进行更为深入的分类学鉴定工作。方法为将泥样采集到干净无毒样品瓶中，注意现场尽量多添加沉积物的浸出液，以保证微型底栖生物的天然营养来源，利于实验室培养。装瓶后注意给活体样品预留出足够的含氧空间或留出透气孔，以避免造成缺氧环境。所获活体样品放入冷藏箱（一般 4 °C）中避光保存，带回实验室进行孵化培养、活体分离、显微镜观察等操作。

对于底栖微藻（主要为硅藻及自养鞭毛虫等）的提取一般采用 Starink 等[25]的方法进行离心，然后将离心后的上清液收集到 1~5 μm 孔径的黑色聚碳酸酯膜（polycarbonate filter)上进行 DAPI 染色（终质量浓度一般为 5 mg/ L）或吖啶橙染色（acridine orange）（终质量浓度一般为 10 mg/ L）[17, 26]。经染色的样品封片以后，可避光冷冻储存一个月，分析时置于荧光显微镜下计数。而对于一些难于固定的鞭毛虫和肉足虫的生态学研究，国际上目前尚无十分有效的定性及定量手段。新近俄罗斯原生动物学家 Smirnov[27]尝试借助于不同培养基对底质沉积物样品进行室内孵化、活体观察及分析，获得对裸变形虫（gymnamoebae）的种类及数量的估计方法。该培养法最大的弊端在于实验结果易受所使用的培养基的影响。

2 底栖微型生物的离心及提取

在底栖小型动物（meiobenthos）生态学研究中，国外一般采用硅胶 Ludox 液（如 Ludox TM, Ludox HS40）提取小型底栖动物[28, 29]。Alongi [20]首次采用硅胶（silica gel）提取淡水底栖原生动物。但未经改良的硅溶胶对海水及半咸水中普遍存在的 Ca^{2+}、Mg^{2+} 等二价阳离子非常敏感，很快会形成凝胶，故难以用于海水生物类群的分离[30]。因而，目前国际上对于微型底栖生物的提取基本采用 Percoll 液（型号：Sigma P1644），该提取液为经由聚乙烯吡咯烷酮（PVP）覆膜的铝酸盐溶胶，性质柔和，不易凝胶化，故非常适用于海水及半咸水底栖原生动物（尤其是纤毛虫）样品的提取。缺点是 Percoll 液价格昂贵，因而极大地限制了其在生态学上的广泛应用，尤其是对大样品量的处理，但目前尚无其它有效替代方法。因此，开发一种更为经济有效的提取方法就成为微型底栖生物生态学研究中亟待解决的技术问题。

Starink 等[25]首次详述了采用 Percoll 液提取淡水原生动物，后来 Wickham 等[21]将 Percoll 液提取及定量蛋白银染色法相结合，开发出了一套适用于海洋底栖原生动物生态学研究的方法。该法是目前国际上唯一的能对海洋底栖原生动物同时进行定性及定量的技术方法。Percoll 离心分离及提取的具体操作步骤见图 1。

将 100% Percoll 原液（质量浓度为 1.13 g/ L）用人工海水（或过滤的原位海水）配成 50% Percoll 液，用高速离心机离心 15~25 min (46 000 r/min) 制备成密度梯度（最高质量浓度接近 1.2 g/L）。为提高生物

体与沉积物的分离效果，可先将固定后的样品适当用海水稀释（1∶1），在涡旋振荡器上涡旋 3~5 min，然后加入到制备的密度梯度 Percoll 液中离心 15 min（4000~5200 r/min）。样品经离心后分层，微型及较小型底栖生物群落（包括原生动物）都集中于上清液中，而无机质（底泥）则沉积到离心管底部。为达到更好的分离效果，离心过程应使用有自由转臂的离心机。

离心后，将所获上清液（含目标生物体）倾倒至微孔滤膜上进行过滤提取，使生物体与提取液分离。目前国际上用于过滤提取的设备一般采用 Sartorius 真空过滤系统（图 2）。滤膜经过定量蛋白银染色[24, 31]，获得微型及较小型底栖生物群落的银染制片，该永久封片可同时满足定量与定性（分类鉴定）分析。

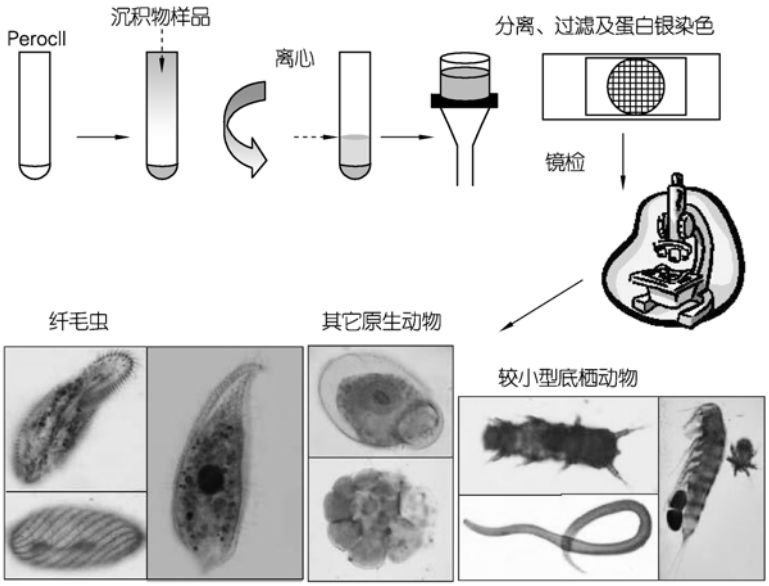

图 1 底栖原生动物及较小型底栖动物分离与提取过程示意图

3 “热”定量蛋白银染色

定量蛋白银染色法由 Montagnes & Lynn[31]创立于 1987 年，并于 1993 年略加改良。该法最初用于浮游原生动物，可在定量的基础上同时进行具有较高分辨率的蛋白银染色，从而使分类学鉴定与生态定量能同时进行，为原生动物生态学发展提供了可靠的技术平台。因其银染在常温下进行（需过夜处理），故可称之为“冷定量蛋白银法”。原描述方法在操作时间上要求有连贯性，且耗时长。

该法后经 Skibbe [24]有效改良，使银染在温箱中进行，染色时间大大缩减（只需染色 40~50 min），故将改良法称为“热”定量蛋白银法。该法不但大大缩短了实验周期，而且提高了染色质量，能稳定地得到较高质量的永久封片。此外，较其它用于专业分类的蛋白银染色技术，如 Foissner 蛋白银法和 Wilbert 蛋白银法[32]，此法对经验和操作技术依赖明显较小，且效果稳定，所以尤其适合生态学工作者普及应用。目前此法已被国外原生动物生态学研究室广泛采用。但由于本法与冷定量蛋白银法均采用滤膜作为载体收集细胞，滤膜本身以及琼脂包埋过程增加了永久封片的厚度，故对于大个体生物的染色和高倍率显微观察效果不甚理想。

“热”定量蛋白银法中的“样品过滤”操作非常重要，借助 Sartorius 真空过滤系统（图 2）可使生物样品很好地与沉积物分离，并能完好地汇集柔软、易碎的生物于滤膜之上并使之均匀分散。操作大体需要经过 6 个主要流程：实验用品准备→样品过滤→琼脂包埋→琼脂固化→蛋白银染色→脱水封片。结合作者的应用实践，将该技术的操作步骤以及各步骤应注意的

事项介绍如下。

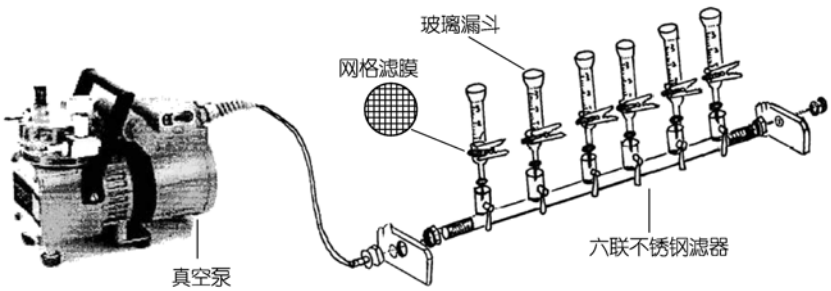

图 2　Sartorius 真空过滤系统示意图

3.1　仪器设备、工具器皿及试剂的准备

3.1.1 仪器设备

真空过滤系统（Sartorius 产品, Nr. 16692, 16483, 16863, 16306）、恒温加热板、恒温箱、显微镜、解剖镜、电子天平。

3.1.2 工具及器皿

自制滤膜筐、硝酸纤维素膜（直径 25 mm）、微量移液枪（容积 100~1 000 μL，1 000~5 000 μL）、移液管、50 mL 烧杯（20 个）、夹滤膜专用平头镊子、单刃刀片、载玻片、盖玻片（24 mm × 24 mm 或 24 mm × 32 mm）、直径 25 mm 滤纸（用作副膜衬垫）、2 mL 巴氏吸管数只、大培养皿（直径 15 cm）、称量纸。

3.1.3 化学试剂准备

包埋固化剂：琼脂（质量分数为 3%~4 %）、10% 甲醛。

染色系列试剂：0.2% 高锰酸钾、2.5% 草酸、蛋白银粉末、碎铜片、数瓶经曝气后的自来水、蒸馏水、显影液、0.5% 氯化金、2.5% 硫代硫酸钠。

显影液配方：0.1% 对苯二酚、0.5% 亚硫酸钠、0.1% 无水碳酸钠。先加对苯二酚，溶解后再依次加入亚硫酸钠、无水碳酸钠。

3.1.4 脱水封片系列试剂准备

30%，50%，70%，100% 异丙醇、异丙醇/二甲苯（1∶1）、100% 二甲苯、加拿大树脂/中性树胶。

3.2 样品过滤

将硝酸纤维素膜放置到过滤器中，为使生物体更好地在主膜上分散，下面另放一张滤膜或筛绢作为副膜衬垫。过滤样品过程中，注意用自来水不断冲洗，以置换出固定液，增强染色效果。滤膜孔径根据沉积物的颗粒大小及具体试验要求而定，一般采用 2~5 μm 孔径的优质硝酸纤维素膜。国外一般采用带黑色网格的 Sartorius 膜（型号：11404-25-N），但价格昂贵（每片膜折合人民币 5 元左右）。为此，作者曾经测试并比较了进口滤膜及数家国产滤膜，认为北京九鼎公司生产的硝酸纤维素膜较好，该膜性价比优，使用该膜获得了优良的永久封片。

3.3　琼脂包埋

（1）将数片载玻片放置在 50～60 °C 的加热板上保持加热。

（2）用镊子将滤膜从过滤装置中移出，置于一片热载玻片中心。为防止空气进入滤膜或滤膜上的细胞再悬浮，滤膜应该保持热度，且琼脂包埋前表面应干燥。

（3）取一大滴液体琼脂（3%～4 %）滴放于第二片热载玻片中心，小心翻转此载玻片，压在第一片载玻片的滤膜上，从而使整片滤膜覆盖琼脂。此时，在两片载玻片之间应形成一层“三明治”薄层。切记不要额外添加外力。

（4）将“三明治”放置在加热板上 1 min, 转入盛有自来水的大培养皿中冷却固化（15 min）。

（5）移去载玻片，用单刃刀片小心除去边缘多余的琼脂并剥落包埋好的滤膜。

（6）修整滤膜的边缘，使其能正好适合 24 mm × 32 mm 的盖玻片。

（7）将滤膜集中放在自制滤膜筐中。在滤膜筐中放置滤膜时，务必注意滤膜朝向，使有生物体的一面总是面向操作者，以免后继操作丢失生物体。

3.4　琼脂固化

转移滤膜至 10% 甲醛 10~15 min, 固化琼脂。过滤时滤膜带有固定液会影响蛋白银染色，此过程会被

清洗掉。

若暂时不能继续实验，用自来水清除滤膜中的甲醛（3 次，每次 3~5 min）后，用蒸馏水置换一次，将滤膜储存于 30% 异丙醇中可保持数周。储存的滤膜相较连续实验的滤膜染色效果稍差，故应尽量减少储存时间。另外，经储存的样品操作前要彻底清洗，染色及漂白等过程有时需要稍微延长时间，且显影时的温度也不宜过高。

3.5 蛋白银染色

（1） 将滤膜从甲醛溶液中取出，用自来水冲洗 10 s；

（2）滤膜用 0.2%高锰酸钾漂白 5～7 min; 由于底栖样品含有较多沉积物颗粒而干扰漂白，经过多次尝试发现，漂白时间以 6 min20 s~6 min30 s 为宜;

（3） 自来水冲洗 10 s;

（4） 2.5% 草酸还原 5~6 min;

（5） 自来水冲洗 10 s (3~5 次)，蒸馏水冲洗 10 s (1 次)；

（6） 将 0.32 g 蛋白银粉末撒落在 40 mL 蒸馏水上，配成 0.8% 蛋白银溶液。蛋白银溶解后，加入 0.5 g 铜片作催化剂，放于 60 °C 恒温箱中 40~50 min 染色。原方法蛋白银溶液质量分数为 0.3%，但由于底栖样品普遍受沉积物的干扰而不易染色，且因不同产地的蛋白银效能略有差异，经比较，建议采用的蛋白银质量分数为 0.6%~1%，通常可获得较佳的效果。另外，配置蛋白银溶液时，要将蛋白银粉末撒落在蒸馏水上，切勿搅动，并严禁使用去离子水；

（7） 冷却至室温 10 min 后，用显影液显影 10~30 s（为确定最佳显影时间，可取出一片滤膜在显微镜下镜检测试）; 由于底栖样品受沉积物干扰较大，作者推荐显影 15~20 s；

（8） 当镜检时细胞颜色变黄时，将滤膜转移到自来水中停止显影，换自来水 1 次(10 s)；

（9） 0.5% 氯化金染色 2~3 s; 氯化金价格昂贵，可回收使用，如果发现有颗粒出现且变色，可过滤后继续使用，一般 10~20 次后续新或更换；

（10） 2.5%草酸还原 30 s; 步骤(9)与(10)可选择使用，目的是增强染色效果，出现一种较为理想的红蓝色调；

（11） 蒸馏水浸泡清洗 2 min;

（12） 2.5%硫代硫酸钠定影 4~5 min;

（13） 自来水冲洗 3 min （3~5 次）。由于底栖样品沉积物较多，滤膜普遍较厚，作者推荐定影时间适当延长，5 min 为佳；自来水冲洗次数也要增加，一般推荐 5 次。

3.6 脱水及封片

（1） 30%异丙醇（5~10 min），→50%异丙醇(5~10 min)，→70%异丙醇(10 min)，→100%异丙醇(≥5 min)，→100%异丙醇(≥5 min)，→异丙醇/二甲苯（1∶1）5 min；100%二甲苯（≥5 min）；→100%二甲苯（≥5 min）；中性树胶封片。脱水过程可导致原生动物不同程度地收缩，这是蛋白银制片的普遍问题，收缩程度由脱水的步骤与持续时间决定。本实验不能使用常规脱水封片所普遍采用的酒精，因其可导致滤膜卷曲而难以封片。

（2） 封好片子后，放于常温干燥通风处自然晾干 24 h，然后置于 60~80 °C 的温箱烘干至少 3 d。

脱水封片为本法中的关键一环，也是操作的难点，经常面临的两大障碍是：①滤膜在脱水过程中卷曲造成封片困难; ②密封好的滤膜一段时间后出现“返潮”现象，导致滤膜不透明而废弃掉。据同行间的经验交流，原方法因该问题造成的废弃率高达 40%~80%。由于底栖样品受沉积物颗粒干扰，在某种程度上更增加了脱水及透明的难度。作者通过摸索尝试，建议脱水及透明各步骤均采用 10 min，如此不但提高了脱水效果，还可有效避免滤膜卷曲。最后的透明步骤作者亦进行了变更，即将滤膜在封片前先浸渍于二甲苯/中性树胶（1∶2）中 1 min，然后再用中性树胶封片，此变更有效地阻止了封片后的返潮现象，大大提高了制片的成功率。

4 定量与定性分析

经过以上步骤制成的永久封片，完整地保存了微型及较小型底栖生物群落（图 1），从微型的单胞藻类如硅藻，到原生动物如纤毛虫、变形虫、鞭毛虫、有孔虫，甚至小型动物（meiofauna）如线虫、桡足类等都能得到较好的染色。封片可通过显微镜（放大倍率 100~1 000）镜检分析及拍照。

4.1 物种的分类鉴定

一般原生动物的分类及鉴定可参照 Lee 等[33]，此外，对于纤毛虫的大体鉴定，可参考 Carey [34] 及 Lynn & Small 等[35]，鞭毛虫鉴定可参考 Patterson & Larson [36]和 Patterson 等 [6]，肉足虫的鉴定可参照 Page 等 [37]。

4.2 常用群落参数的计算

常用分析底栖原生动物群落结构的参数包括个体丰度 (abundance)、生物量 (biomass)、物种丰富度 (species richness)、多样性 (diversity)以及群落相似性（community similarity）等 [38]。

4.2.1 个体丰度

个体丰度的单位为个/mL（individual /mL ）或个/g（ individual /g)。指每毫升或每克沉积物中某物种/类群的个体数。

4.2.2 生物量(底栖原生动物无法称重，故只能通过体积换算计算生物量)

单位：mg /L 或μg /g。指每毫升或每克沉积物所包含的生物的碳量。

(1)将镜检所记录的每种生物长、宽、高及大体几何形状换算成生物体积（biovolume)。测量一般随机择 5~10 个个体，取平均值。

(2) 将各类底栖原生动物的生物体积根据各自类群的转换系数，转换成碳量。

表 **1** 各大类群底栖原生动物的生物量转换系数

各微型底栖生物类群	转换系数(pg /μm^3)[1)]
纤毛虫 (Ciliate)	0.14 [2)] 0.19 [3)]
裸变形虫 (Naked amoebae)	0.2
壳变形虫 (Testate amoebae)	0.11
小鞭毛虫 (Small flagellate)	0.22[4)]
腰鞭毛虫 (Dinoflagellate)	0.13
其它异养原生动物 (Heterotrophic protist)	0.2

注：1）以碳计； 2) 自福尔马林固定样品；3) 自鲁哥氏液固定样品；4) 自 DAPI 染色；

4.2.3 多样性分析

（1）物种丰富度(species richness): 单位体积或单位质量沉积物中所含物种数量。

（2）生物多样性指数按 Shannon-Wiener 或 Simpson 多样性指数方程计算：

Shannon-Wiener 多样性指数: $H= -\Sigma P_i \ln P_i$

Simpson 多样性指数:

$D=1-\Sigma[N_i(N_i-1)/N(N-1)]$

N 为单位体积沉积物某类群所有物种的总个体数；N_i 为第 i 种的个体数；式中 P_i 为种 i 的个体数与样品中的总个体数 N 的比值。

4.2.4 群落相似性

通常采用 Jaccard similarity index 分析群落相似性，计算方法：

$C_j = j / (a + b - j)$

a 和 b 为样品A及样品B所包含的物种数；j 为样品 A 及样品 B 所共有的物种数。C_j 值介于 0 到 1 之间。

5 常用统计分析方法

数据经由统计学软件（如 SAS, SPSS）进行统计分析，最为常用的分析如 t 检验、单因子及双因子方差分析（ANOVA)、相关与回归分析、聚类分析、主成分分析（PCA）及旋转主成分分析等，构建各种数学模型。

5.1 t 检验

用于总体均数与样本均数的比较以及两样本均数的比较（如比较 A 生物与 B 生物之间的系列生物学指标，检验是否属于同种或有无地理分化)。t 检验理论上要求样本来自正态分布总体，两样本均数比较时还要求两总体方差相等。实际中，当样本数 n 较小且总体标准差σ未知时，也可应用 t 检验。

5.2 单因子及双因子方差分析

5.2.1 单因子方差分析

单因子方差分析适用于实验中只考虑一个因素改变，而其它因素不变的情况。该因素取 k 个水平（至少 3 个），分析这 k 个水平对所测试目标 y 的影响(比如测定不同类型饵料对底栖原生动物摄食率的影响)。

5.2.2 双因子方差分析

当实验只考虑两个因素的作用时，需要做双因子方差分析，可同时测定这两个因素之间的交互影响（比如测定在不同温度和不同饵料的条件下，底栖原生动物的增长率)。

5.3 相关与回归分析

相关分析是用于考察两变量间的相互变化的关联关系（比如研究两种生物类群之间，生物与环境因子之间，或两种环境因子之间的关系)。两个变量之间没有因果关系。

回归分析是研究一个或多个随机变量与另一些变量关系的方法，考察的是某一变量的变化依存于其

它变量的变化程度（比如测定底栖原生动物的增长率与环境因子的关系，世代时间与饵料的关系等）。

5.4 聚类分析

用于当对生物类别尚不清楚，甚至生物类别总共可能有几种都不能确定的情况下，对生物进行分类的一种统计分析方法。例如当研究不同微型生物群落相似性时，选取代表种类进行聚类分析，探索生物群落的相似度。

5.5 主成分分析及旋转主成分分析

主成分分析(Principal component analysis)在微型生物群落分析的应用非常广泛，因为自然界中的客观因素往往是多元的，因而科学研究就需要考察多个变量。主成分分析常被用做寻找判断某种生物或现象的综合指标，并给综合指标所蕴藏的信息以恰当解释，以便更深刻地揭示事物内在的规律，并通过给出非常直观的二维平面图，直观反应因子之间的关系。比如研究底栖原生动物空间分布机制时，综合环境因子以及生物因子，通过主成分分析，寻找重要的控制因子，以及因子的特征值。

旋转主成分分析（rotated PCA）用于当所给的二维空间图所展示的因子（比如诸多生物类群之间）与诸多环境因子之间的联系不紧密（造成分布图上的样点过于松散而掩盖分布特性），可通过空间旋转坐标轴，使测试变量之间的关系更为紧密。

6 小结

历经早期的活体粗略定量到后来的定性与定量分析的结合，底栖原生动物生态学方法得到了长足发展。作者所介绍的提取方法经检验，提取率可达 95%以上。提取的样品经变更的定量蛋白银法染色可同时满足定量与定性分析，并可永久保存。而且除原生动物群落外，该法对其它微型底栖生物如蓝藻、硅藻，甚至对较小型后生动物如桡足类、线虫和轮虫等也行之有效，可较为完整地保留其群落组成。如此可在广泛的群落基础上，研究其多样性及多项生态学指标。但作者在实践过程中，亦发现本方法存在一些弊端，即对有硬质壳壁包被的生物类群，如有孔虫（foraminifers）及介形类（ostracods）的提取效果不理想，需检查残液。另外，此法对不同类型的底质沉积物的提取效果也不尽相同，一般对沙质及泥沙质沉积物样品的提取效果要好于泥质样品[39]。

随着人类对海洋底栖环境（包括潮间带）重要性的认识不断加强，以及对底栖原生动物多样性及生态功能的了解加深，对其生态学研究也要求有更高分辨率的技术支持，期待探索出一套更为经济实用的、有效的研究方法。相信底栖原生动物的分类学和生态学研究的完美结合，将有助于人们更好地探知底栖微食物网的结构与功能。

致谢：奥地利萨尔茨堡大学的 Stephen A. Wickham 教授和 Ulrike-G. Berninger 教授进行技术传授；合作者 Karen Stumm 博士（Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Germany）给予技术上的帮助与经验交流；张志南教授（中国海洋大学）与作者进行野外取样等方法学的探讨并对本文提出若干建议性意见，在此一并表示感谢！

参考文献：

[1] Azam F, Fenchel T, Field J G, *et al*. The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. **Mar Ecol Prog Ser**, 1983, 10: 257-263.

[2] Berninger U-G, Caron D A, Sanders R W, *et al*. Heterotrophic flagellates of planktonic communities, their characteristics and methods of study [A]. Patterson D J, Larsen J . The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates [C]. The Systematic Association Special Volume, New York: Oxford University Press, 1991. 45: 39-56.

[3] Sherr E B, Sherr B F. Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs [J]. **Microb Ecol**, 1994, 28:223-235.

[4] 沈韫芬，汪建国. 原生动物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 12-21.

[5] Dolan J R, Rassoulzadegan F , Caron D A. The first decade of 'Aquatic Microbial Ecology' (1995-2005): evidence for gradualism or punctuated equilibrium? [J]. **Aquat Microb Ecol**, 2005, 39:3-6.

[6] Patterson D J, Larsen J, Corliss J O. The ecology of heterotrophic flagellates and ciliates living in marine sediments [J]. **Progress in Protistology,** 1989, 3: 185-277.

[7] McCormick P V , Cairns J J. Effects of micrometazoa on the protistan assemblage of a littoral food web [J]. **Freshwater Biol,** 1991, 26: 111-119.

[8] Epstein S S, Gallagher E D. Evidence for facilitation and inhibition of ciliate population growth by meiofauna and

macrofauna on a temperate zone sandflat [J]. **J Exp Mar Biol Ecol,** 1992, 155: 27-39.

[9] Berninger U-G, Epstein S S. Vertical distribution of benthic ciliates in response to the oxygen concentration in an intertidal North Sea sediment [J]. **Aquat microb Ecol**, 1995, 9:229-236.

[10] Dietrich D , Arndt H. Biomass partitioning of benthic microbes in a baltic inlet: relationships between bacteria, algae, heterotrophic flagellates and ciliates [J]. **Mar Biol,** 2000, 136: 309-322.

[11] Lei Y, Choi J K, Xu K, *et al*. Morphology and infraciliature of three species of *Metaurostylopsis* (Ciliophora, Stichotrichia): *M. songi* n. sp., *M. salina* n. sp. and *M. marina* (Kahl 1932) from sediments, saline ponds, and coastal waters [J]. **J Eukaryot Microbiol,** 2005, 52:1-10.

[12] Lei Y, Xu K, Choi J K. *Holosticha hamulata* n. sp. and *H. heterofoissneri* Hu & Song, 2001, two urostylid ciliates (Protozoa, Ciliophora) from intertidal sediments of the Yellow Sea [J]. **J Eukaryot Microbiol,** 2005, 52:310-318.

[13] Lei Y. Taxonomic investigations of soil ciliates and ecological investigations of ciliates from marine waters, sediments and salt ponds [R]. Salzburg, Austria : Ph D Thesis, Univ., 2005.

[14] Stoeck T, Epstein S. Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 2 657–2 663.

[15] Stoeck T, Taylor G T, Epstein S S. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea) [J]. **Appl Environ Microbiol,** 2003, 69: 5 656–5 663.

[16] Garstecki T, Verhoeven R, Wickham S A, *et al*. Benthic-pelagic coupling: a comparison of the community structure of benthic and planktonic heterotrophic protists in shallow inlets of the southern Baltic [J]. **Freshwater Biol**, 2000, 45:147-167.

[17] Hamels I, Sabbe K, Muylaert K, *et al*. Quantitative importance, composition, and seasonal dynamics of protozoan communities in polyhaline versus freshwater intertidal sediments [J]. **Microbial Ecology,** 2004, 47:18-29.

[18] Fenchel T. The ecology of marine microbenthos. IV. Structure and function of the benthic ecosystem, its chemical and physical factors and the mcirofauna communities with special reference to the ciliated protozoa [J]. **Ophelia**, 1969, 6:1-182.

[19] Wieltschnig C, Fischer U R, Kirschner A K T, *et al*. Benthic bacterial production and protozoan predation in a silty freshwater environment [J]. **Microb Ecol**, 2003, 46:62–72.

[20] Alongi D M. Quantitative estimates of benthic protozoa in tropical marine systems using silica gel: a comparison of methods [J]. **Est Coast Shelf Sci**, 1986, 23:443-450.

[21] Wickham S, Gieseke A , Beminger U-G. Benthic ciliate identification and enumeration: an improved methodology and its application [J]. **Aquat Microbial Ecol**, 2000, 22: 79-91.

[22] Hartwig E. Die ciliaten des gezeiten-sandstrandes der Nord-seeinsel Sylt II. Ökologie[J]. **Mikrofauna Meeresboden,** 1973, 18:385-453.

[23] Hartwig E. On the interstitial ciliate fauna of Bermuda [J]. **Cah Biol Mar**, 1977, 18: 26-113.

[24] Skibbe O. An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protests [J]. **Arch Hydrobiol,** 1994, 130: 339-347.

[25] Starink M, Bar-Gilissen M-J, Bak RPM, *et al*. Quantitative centrifugation to extract benthic protozoa from freshwater sediments [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1994, 60: 167-173.

[26] Hamels I, Moens T, Muylaert K, *et al*. Trophic interactions between ciliates and nematodes from an intertidal flat [J]. **Aquat Microb Ecol**, 2001, 26: 61-72.

[27] Smirnov A S. Optimizing methods of the recovery of gymnamoebae from environmental samples: a test of ten popular enrichment media, with some observations on the development of cultures [J]. **Protistology,** 2000, 3:47-57.

[28] Higgins P R，Thiel H. Introduction to the Study of Meiofauna [M]. Washington D C: Smithsonian Institution Press. 1988, 1-488.

[29] 张志南，周红，于子山, 等. 胶州湾小型底栖生物的丰度和生物量 [J]. 海洋与湖沼. 2001, 32：139-147.

[30] Burgess R. An improved protocol for separating meiofauna from sediments using colloidal silica sols [J]. **Mar Ecol Prog Ser,** 2001, 214: 161-165.

[31] Montagnes D J S , Lynn D H. A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates and other protists [A]. Kemp P F, Sherr B F, Sherr E B, *et al*. Handbook of methods in aquatic

microbial ecology [C], London: Lewis Publishers, 1993. 229-240.

[32] 宋微波，徐奎栋，施心路，等. 原生动物学专论[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999. 9-27.

[33] Lee J J, Leedale G F, Bradbury P C. An Illustrated Guide to the Protozoa [M]. 2nd ed. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists, Allen Press, 2002. 1-1 432.

[34] Carrey P G. Marine Interstitial Ciliates: an Illustrated Key [M]. London: Chapman & Hall, 1992. 1-351.

[35] Lynn D H, Small E B. Phylum Ciliophora [A]. Lee J J, Leedale G F , Bradbury P C. An Illustrated Guide to the Protozoa [C]. 2nd ed. Lawrence, Kansas : Society of Protozoologists, Allen Press, 2002. 371-656.

[36] Patterson D J, Larsen J. The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates [M]. Oxford：Clarendon Press, 1992. 45: 1-505.

[37] Page F C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture [M]. Ambleside : CCAP and FBA (Freshwater Biological Association), 1988. 1-122.

[38] Magurran A E. Ecological Diversity and its Measurement [M]. New Jersey Princeton, NJ: Princeton University Press, 1988. 1-179.

[39] Tso S-F, Taghon G L. Enumeration of protozoa and bacteria in muddy sediment [J]. **Microb Ecol,** 1997, 33:144-148.

（本文编辑：张培新）

（上接第 **44** 页）

Production of natural blue pigment by marine *Streptomyces* from Jiaozhou Bay

HOU Zhu-mei[1,2]，WANG Shu-jun[3], ZHAO Fang-qing[1]，WANG Hong-hua[4],QIN Song[1]，CUI Hong-xia[1]

(1.Institute of Oceanology,the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071,China;2.Graduate School,the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039,China;3.Huaihai Institute of Technology,Lianyungang,222005,China; 4.College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130061, China)

Received：Jun.,8,2004

Key words：marine *Streptomyces* sp.; blue pigment; toxicity test

Abstract：More than 300 marine *Streptomyces* were isolated from Jiaozhou Bay, 3 percent of which can produce natural blue pigment. *Streptomyces* sp. M259 strain which can highly produce blue pigment was studied. It can be cultured in the media of M^{2+}，Gao's number 1，bennett and it has strong anti-bacteria activity to *Pseudomonas areuginosa* and *Crytococcal meningitis.* The physiological characteristics showed that it can utilize D-Glucose，D-Mannitol，Maltose，Sucrose，Starch，Glycerol，D-Galactose，Fructose，Arabinose，Inositol，Xylose，D-Mannose and most of nitrogen resources.The result told us that it belonged to the blue group and related to *Streptomyces cyanogenus* and *Streptomyces ceolicolor*.The properties of the blue pigment were studied. The results showed that the blue pigment has no odor and is well dissolved in water or methanol. The color of the pigment is red in the acidic condition and blue in the alkaline condition. The composition of fermentation medium and cultural conditions for M259 producing blue pigment were studied and optimized.

（本文编辑：刘珊珊）