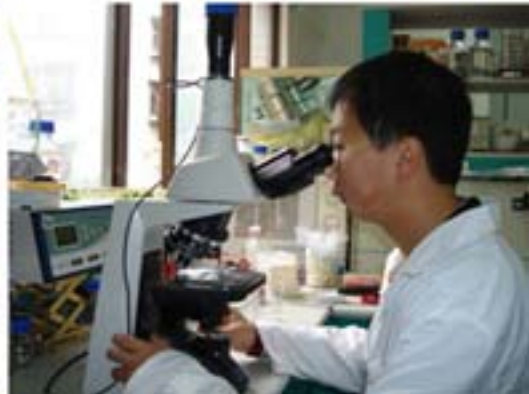
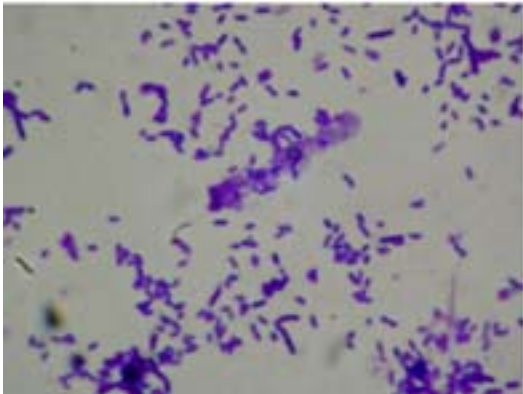
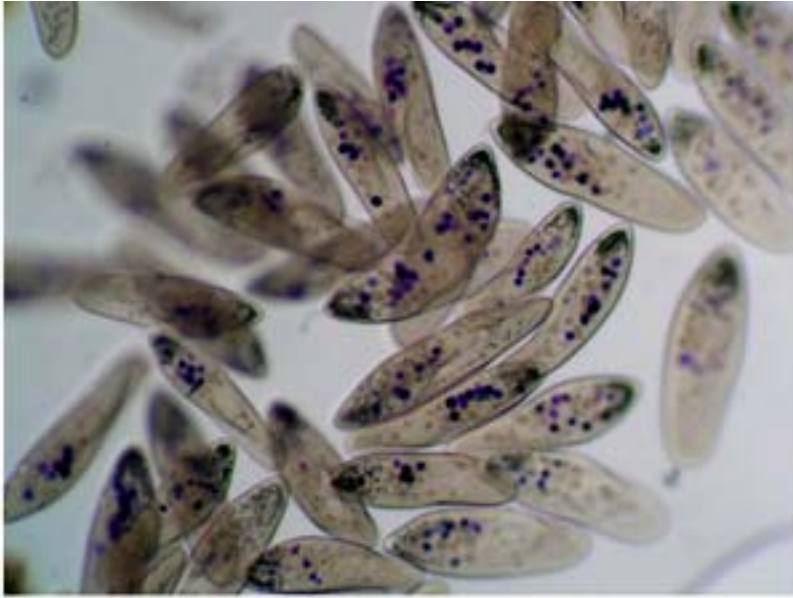


云南滇池草海大草履虫单栖培养用饵料细菌的筛选



作者：鞠尚达

学校：云南师范大学附属中学

指导教师：张亚平、李文鹏、苏罗毅

2009年3月

云南滇池草海大草履虫单栖培养用饵料细菌的筛选

摘要: 草履虫在生物学研究、水体生态系统修复和环境监测中均具有很广泛的应用。无论进行科学研究还是开发草履虫活性产物，首先要解决的问题是如何在最短的时间内得到大量、性状稳定的草履虫。本研究首次采用单栖培养方法，考察不同饵料细菌对云南滇池草海大草履虫生长的影响，达到找出适宜的饵料细菌，缩短培养时间，获得高密度大草履虫的目的。19种细菌饲喂大草履虫的试验结果表明，在单栖培养中不同细菌对大草履虫生长的作用不一样。根据细菌与大草履虫生长的相互关系，可将细菌分为不适宜细菌、一般饵料细菌和理想饵料细菌三类群。假单胞菌属细菌比较适合作为大草履虫单栖培养的饵料细菌。以假单胞菌菌株 12 作为大草履虫饵料，培养 8 天，虫口密度达 6280 个/ml，是目前最常用饵料细菌虫口密度的 4 倍。根据大草履虫对假单胞菌的偏好性、以及假单胞菌的耐污能力，推测云南滇池草海仍属于高碳氢化物污染类水质。由于云南滇池草海大草履虫能有效降低污水中病原细菌的种群数量，调节细菌种群，在水污染的生物净化和防治具有较高的应用价值。

关键词: 大草履虫；单栖培养；饵料细菌，筛选，云南滇池草海

在初中生物课的学习中我第一次知道了草履虫。

草履虫是动物学课程中原生动物门的代表动物，是一种身体很小，圆筒形的原生动物，它只有一个细胞构成，是单细胞动物。最常见的是大草履虫，体长 180~300 微米。因为它身体形状从平面角度看上去像一只倒放的草鞋底而叫做草履虫。

■草履虫的生活

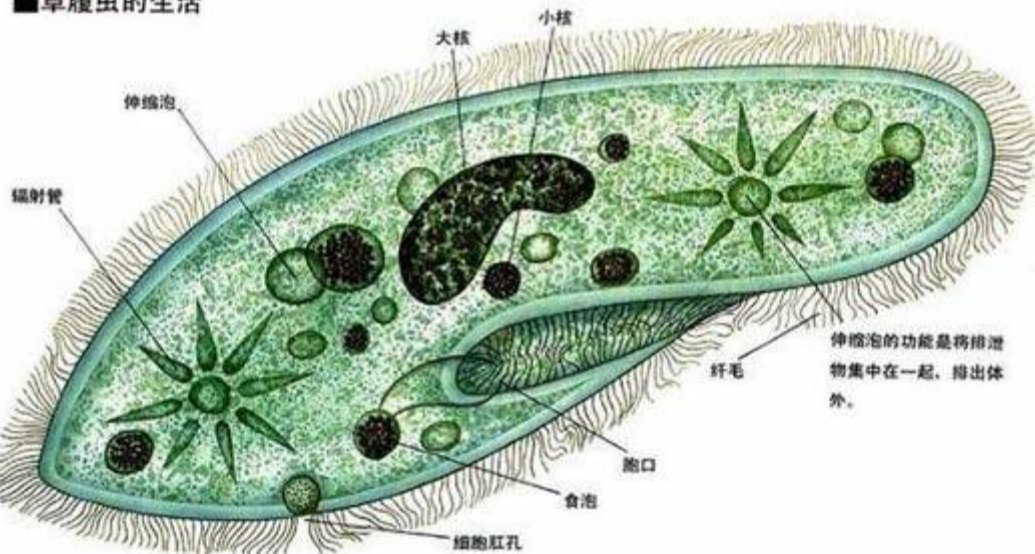


图 1 草履虫结构^[1]

草履虫全身由一个细胞组成，身体表面包着一层膜，膜上密密地长着许多纤毛，

靠纤毛的划动在水中旋转运动。它身体的一侧有一条凹入的小沟，叫“胞口”，相当于草履虫的“嘴巴”。胞口内的密长的纤毛摆动时，能把水里的细菌和有机碎屑作为食物摆进胞口，再进入草履虫体内，供其慢慢消化吸收。残渣由一个叫肛孔的小孔排出。草履虫靠身体的表膜吸收水里的氧气，排出二氧化碳。

草履虫属于动物界中最原始、最低等的原生动物。它喜欢生活在有机物含量较多的稻田、水沟或水不大流动的池塘中，以细菌和单细胞藻类为食。据估计，一只草履虫每小时大约能形成 60 个食物泡，每个食物泡中大约含有 30 个细菌，因此，一只草履虫每天大约能吞食 43000 个细菌，它对污水有一定的净化作用^[2]。

随着对草履虫的不断认识，我知道了由于草履虫因为其个体较大，结构典型、繁殖快、观察方便、容易采集培养，以及细胞功能丰富多样的特点，因此它是生物学家研究细胞结构和遗传的首选实验生物。近年来在细胞生物学、神经生理学、分子遗传学、分子生物学、生物信息学、仿生学^[3]等研究领域得到了广泛的应用。

草履虫作为原生动物，在水体生态系统中的食物链、营养再生、调节细菌种群和自净作用方面起着重要的作用。草履虫和周围介质能够充分接触，对毒物的反应较为灵敏，而且在自然水体中容易采集，生长繁殖快，培养方法简单，是一种比较理想的实验动物，可用于重金属和有机农药急性毒性试验，为评价水体环境的污染程度控制废水的排放和制订水质标准等提供科学依据^[4]。

综上所述，草履虫在生物学研究、水体生态系统修复和环境监测中均具有很广泛的应用。

无论进行科学研究还是实施应用，首先要解决的问题是如何在最短的时间内得到大量、性状稳定的草履虫。

通过请教老师及查阅资料，我了解到，由于草履虫不能在合成培养基上生长，只能通过取食其他微小生物来维持生命。目前通用的草履虫繁殖培养方法主要以稻秸秆和其他禾本科植物秸秆为材料，通过自然接种细菌获得草履虫生长所需的饵料。例如稻草培养液中最高草履虫密度为 746 个/mL，达到高峰所需时间为 20 天^[3]。小麦穗培养液的效果最好，第 8 天达到虫体密度高峰 (5701 个/mL)，且较高密度的持续时间长^[5]。

这种方法只考虑了饵料细菌生长的机质，而忽略了草履虫繁殖培养的重要因素——饵料细菌。由于是依靠自然接种饵料细菌，秸秆的来源、自然接种时所处的环境条件等都会影响饵料细菌的种类和数量，最终导致草履虫繁殖培养的质量不可控制。

无论是作为研究材料，还是开发草履虫活性产物，首要条件是获得大量、性状稳定的草履虫纯培养物，尽量减少其他生物的干扰。为此目的，人们建立了草履虫的单栖培养(monoxenic culture)技术，即在培养草履虫时，只用一种细菌作饵料。

据老师介绍，目前国外关于草履虫的研究中，多数采用单栖培养获得性状稳定的草履虫纯培养物，最常用的饵料细菌是肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)，草履

虫口密度为 600~700 个/mL，达到高峰所需时间为 4~5 天。

目前，国内外都没有关于草履虫单栖培养中饵料细菌筛选方面的研究。既然草履虫以细菌为食，那么是否可以从自然界中找到一种饵料细菌，在最短的时间内得到大量、性状稳定的草履虫呢？

本实验采用单栖培养，用不同细菌饵料来培养大草履虫，考察它们对大草履虫生长的影响，达到找出适宜的饵料细菌，缩短培养时间，获得高密度大草履虫的目的，最终为科学研究、环境监测、污水处理和开发大草履虫活性产物提供大量性状稳定的大草履虫。也希望用课余时间学习掌握一些生物实验技能及基本操作，自己设计研究实验，完成并取得预期的效果。

1. 材料和方法

1.1 草履虫采集、分离和培养



图 2. 大草履虫的采集

草履虫的采集：从云南滇池草海采集水样和水浮莲，放在容器中靠近光照充足的地方，5~7d后可见在上层水中有许多白色小点呈灰白色云雾状成群漂动回荡，这可能就是草履虫，吸少许在显微镜下镜检，凡呈乳白色，个体较大，圆柱状，一端稍圆一端稍尖的动物，就是草履虫，确证后可作为种源（如图 2）。

大草履虫的分离：

首先根据大草履虫的大小，大草履虫体长 180~300 微米，利用 380 目的分样筛（孔径 40 微米）对大草履虫进行浓缩；其次与其他原生动物比较，大草履虫对牛肉汁的敏感性要大得多，而且大草履虫在电场中有向阴极的应激性，即当直流电通过其培养液时，大草履虫会向阴极快速游动。其安全电压为 4~12 v，在牛肉汁和电极的双重刺激下，分离得以快速有效地进行^[6]。

分离时取载玻片平放于显微镜的载物台上，用微吸管吸取牛肉汁 1 滴，滴于载玻片 1 端，吸取待分离的培养液 1 滴滴于载玻片另一端(两者距离约为 2 cm)。用解剖针从牛肉汁一端引 1 条沟(引渡线)，把这两滴液滴连接起来。设置 6 v 直流电(采用干电池较好)，负极放于牛肉汁上，正极放于待分离液中。镜检，可观察到大草履虫很快经引渡线到牛肉汁一端(如图 3)。待大草履虫聚集较多时，用吸水纸切断水线，擦去分离液，将含有大草履虫的牛肉汁冲至培养器皿中。

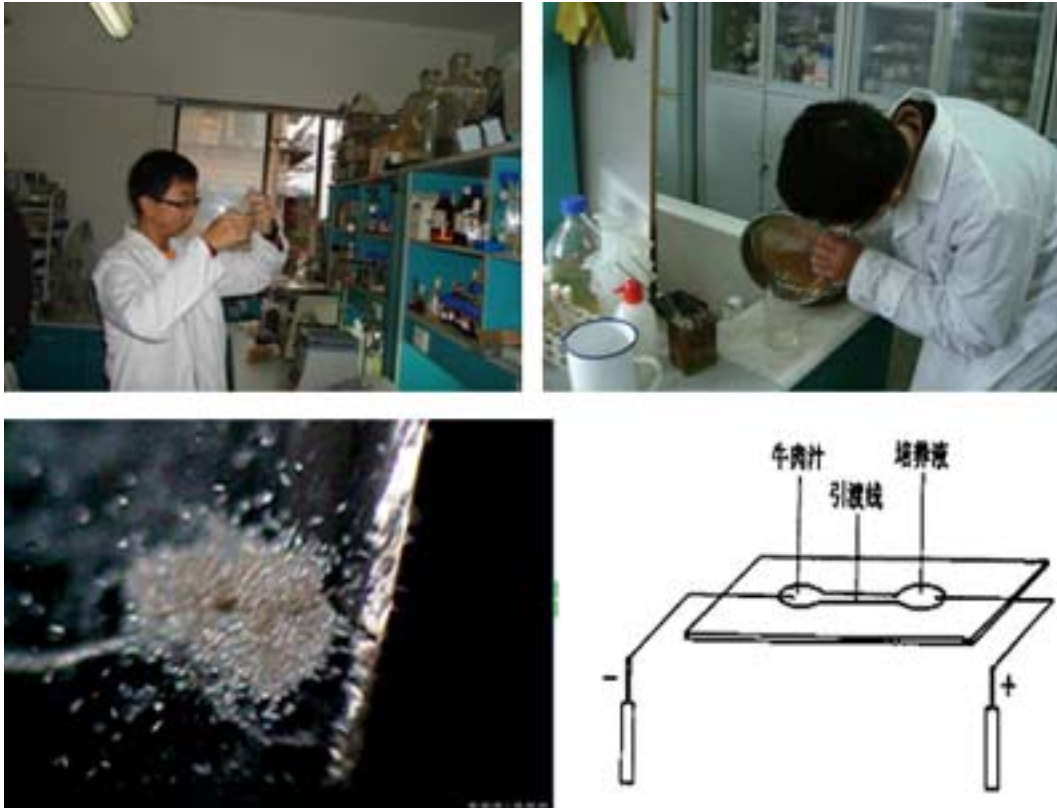


图 3. 大草履虫的分离

大草履虫的培养：莴苣叶 25 克，加水 500ml，绞碎煮沸 10min，100 目筛过滤，分装在玻璃管中，每管 25ml，用棉花塞住管口，121℃灭菌 20 分钟，冷却后接种细菌，25℃培养 1 天，接入分离好的大草履虫，放在 25℃的恒温培养箱中培养(如图 4)。



图 4. 大草履虫的培养

1.2 饵料细菌的分离、纯化和培养

样品：云南省元江县万绿公司芦荟基地根腐病株

培养基：营养琼脂(g/L)：牛肉膏 10.0, 蛋白胨 10.0g, 葡萄糖 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0-20.0, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0。

土样的稀释：取 10 克腐根，绞碎，置于装有 90ml 无菌水的锥形瓶中。震荡 20 分钟，静置 3-5 分钟。用一无菌移液管取上层液 1ml，移至一装 9ml 无菌水的试管中，

混匀。依次，稀释至 10^{-7} (如图 5)。

制备及涂布平板：营养琼脂 121°C 灭菌 20 分钟，冷至 55°C 左右，倒平板，标记。每个平板上加入 0.2ml 相应的土样稀释液，涂布均匀。

培养：营养琼脂平板倒置于 30°C ，培养 48 小时。

挑单菌落：从培养基平板上，选取细菌菌落转接到营养琼脂斜面中，编号标记，分别置培养箱培养，备用。

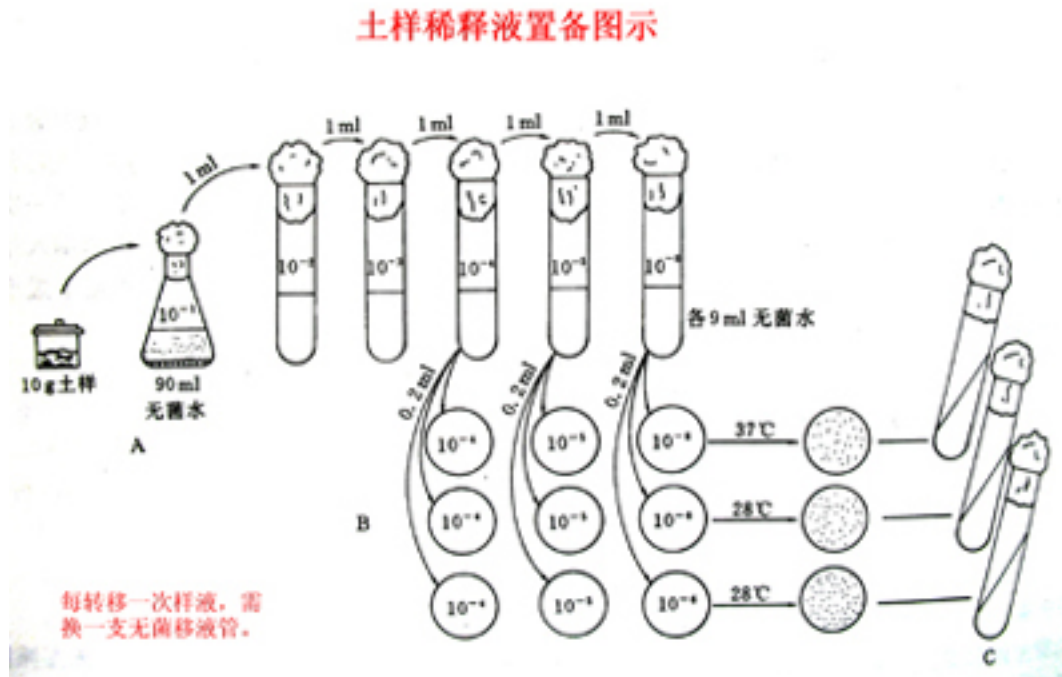


图 5. 细菌的分离和纯化

1.3 不同饵料细菌培养大草履虫

莴苣叶 25 克，加水 500ml，绞碎煮沸 10min，100 目筛过滤，分装在玻璃管中，每管 25ml，用棉花塞住管口， 121°C 灭菌 20 分钟，冷却后接种不同细菌（其中菌株 1~18 分离至芦荟根腐病株腐根，菌株 19 为目前最常用的饵料细菌）， 25°C 培养 1 天，每 25 ml 细菌培养液接种 1ml 培养好的大草履虫(500 个/ml)接，放在 25°C 的恒温培养箱中培养(如图 4)。每隔 2 天记录一次大草履虫的数目。

1.4 大草履虫的计数

取饵料细菌的大草履虫培养液 10 微升，酒精灯火焰上加热杀死大草履虫，在显微镜下计数大草履虫数目，每种培养液记录 10 个重复，计算 10 微升培养液中大草履虫的平均数目，平均数目乘以 100 即得每毫升培养液中大草履虫的数目。

2. 结果和讨论

2.1 大草履虫分离和培养

经过分离和纯化，获得了试验所需的大草履虫种子(如图 6)。根据形态特征鉴定为大草履虫，学名 *Paramecium caudatum*。

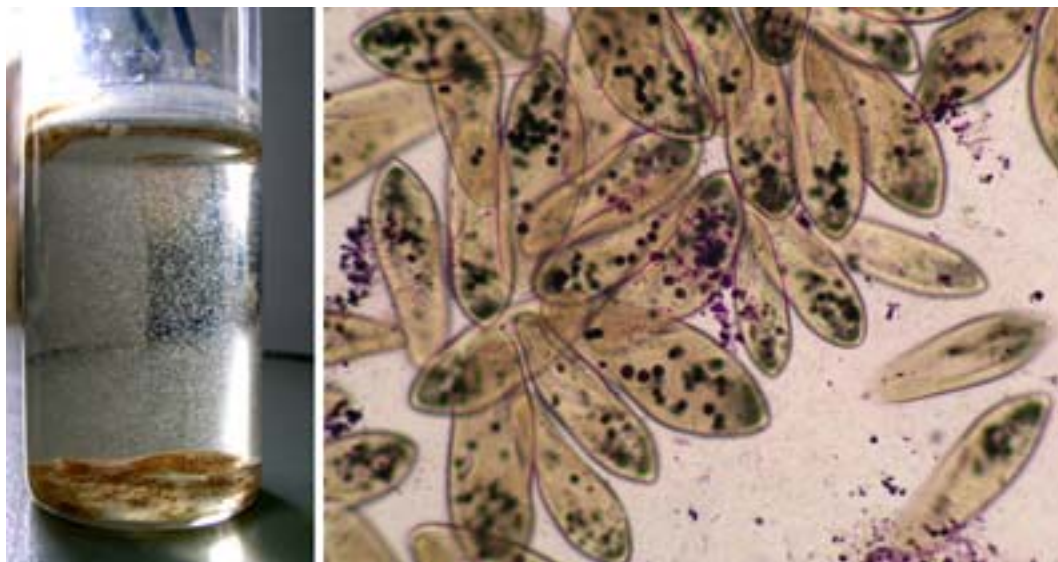


图 6. 大草履虫分离和培养结果

2.2 饵料细菌的分离、纯化结果

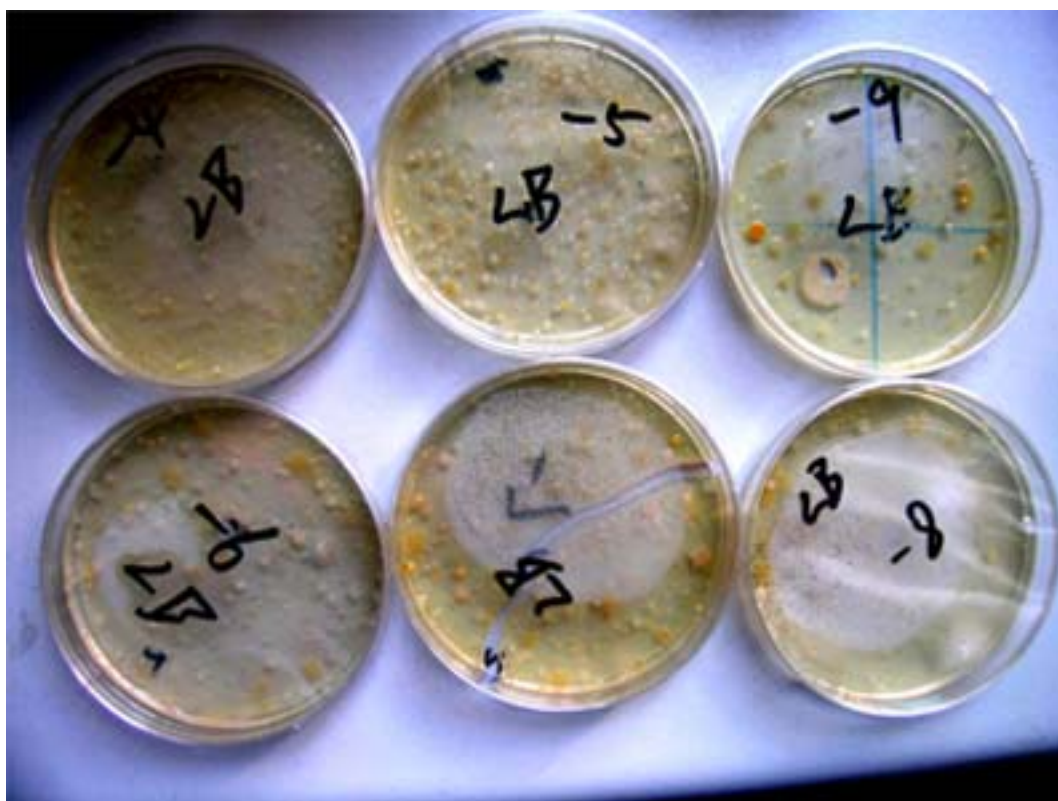


图 7. 营养琼脂平板上形成的单菌落

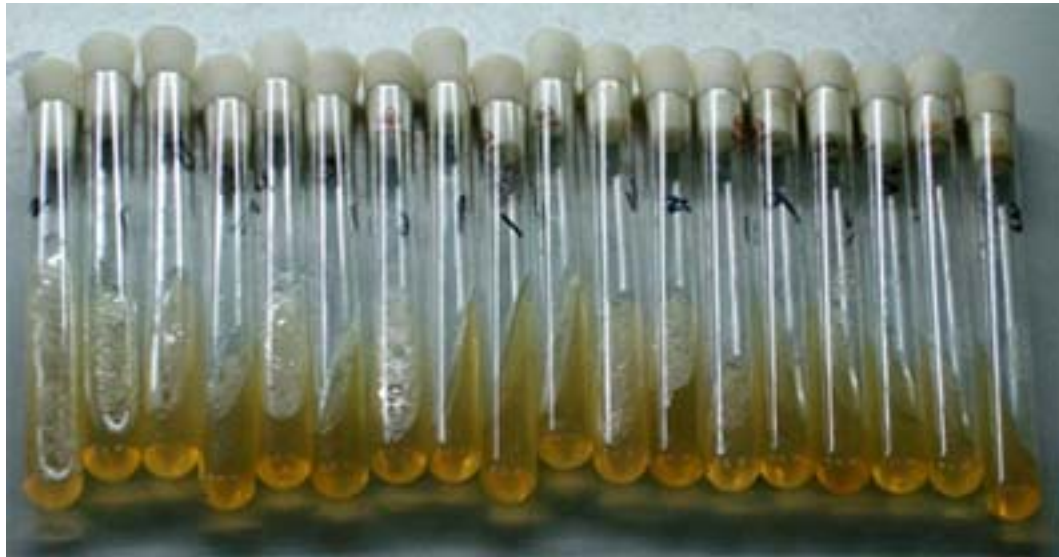


图 8. 营养琼脂斜面

从芦荟根腐病株腐根分离、纯化获得 18 株细菌，这些菌株在营养琼脂上生长迅速，12~24 小时可形成菌落或长满斜面(如图 7，8)。

2.3 不同饵料细菌培养大草履虫结果

表 1. 不同饵料细菌培养大草履虫的生长情况

编号	拉丁文名称	中文名称	大草履虫密度 (个/ml)				
			培养时间 (天)				
			0	2	4	6	8
1	<i>Klebsiella oxytoca</i> A1	产酸克雷伯氏菌 A1	20	20	0	0	0
5	<i>Sphingobacterium multivorum</i> A5	鞘氨醇杆菌 A5	20	20	20	0	0
7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> A7	嗜麦芽窄食单胞菌 A7	20	20	0	0	0
14	<i>Enterobacter dissolvens</i> A14	溶解肠杆菌 A14	20	20	0	0	0
17	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A17	木糖氧化无色杆菌 A17	20	20	0	0	0
18	<i>Klebsiella</i> sp. A18	克雷伯氏菌 A18	20	20	0	0	0
6	<i>Klebsiella oxytoca</i> A6	产酸克雷伯氏菌 A6	20	40	880	1020	860
16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> A16	嗜麦芽窄食单胞菌 A16	20	80	920	1140	960
11	<i>Bacillus licheniformis</i> A11	地衣芽孢杆菌 A11	20	200	1040	1420	1060
3	<i>Chryseobacterium</i> sp.A3	金黄杆菌 A3	20	80	140	1120	1340
9	<i>Ochrobactrum</i> sp. A9	苍白杆菌 A9	20	80	120	160	1440
10	<i>Bacillus sphaericus</i> A10	球形芽孢杆菌 A10	20	20	20	340	1540
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i> A19	肺炎克雷伯氏菌 A19	20	120	1180	1280	1540
8	<i>Ochrobactrum</i> sp. A8	苍白杆菌 A8	20	120	220	1160	1620
4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A4	醋酸钙不动杆菌 A4	20	80	320	920	2060
2	<i>Pseudomonas</i> sp.A2	假单胞菌 A2	20	100	1020	2060	2100
13	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> A13	变形假单胞菌 A13	20	160	800	1620	2380
15	<i>Pseudomonas putida</i> A15	恶臭假单胞菌 A15	20	80	1880	2040	3080
12	<i>Pseudomonas</i> sp. A12	假单胞菌 A12	20	160	740	2060	6280

从表 1 可以看出，不是所有细菌均适合作为大草履虫生长的饵料。根据第 8 天的大草履虫虫口密度，可将所检测的细菌分为三类：第一类，菌株 1、5、7、14、17 和 18，大草履虫虫口密度为零，大草履虫不能生长；第二类，菌株 3、6、8、9、10、11、16 和 19， $0 < \text{虫口密度} < 2000$ ；第三类，菌株 2、4、13、12 和 15，虫口密度 > 2000 。

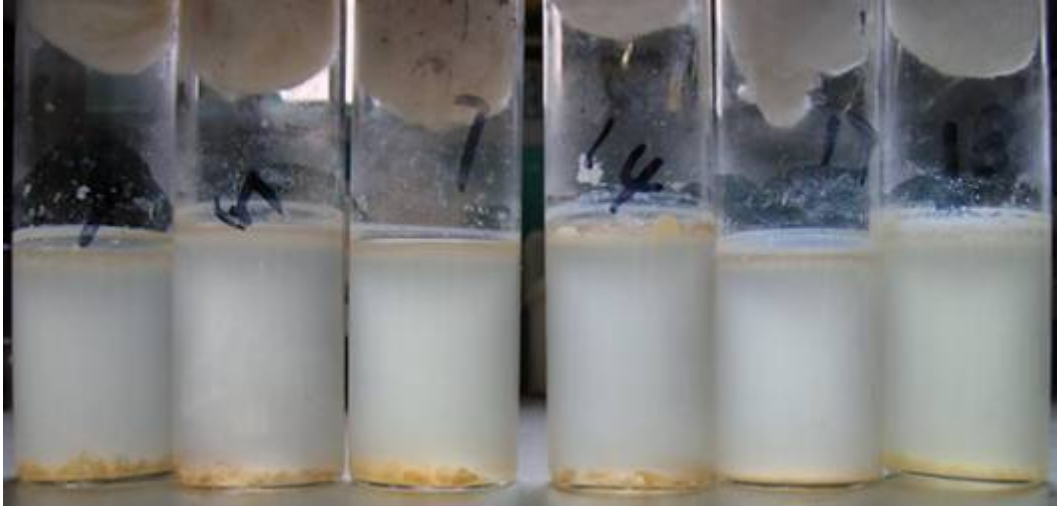


图 9. 第一类菌株

第一类菌株，第 2 天时均可检测到少量大草履虫存活，第 4 天时则检测不到活大草履虫。从外观上看，此类细菌培养液呈乳白色，不透明，细菌生长旺盛(如图 9)。可能有两个方面的原因造成这种现象，第一是此类细菌能合成杀大草履虫的毒素，致使大草履虫死亡；其次是此类细菌具有某种对抗大草履虫捕食的机制，大草履虫无法捕食此类细菌或捕食后无法消化此类细菌，最终大草履虫无法获得必需的营养而饿死。由于大草履虫大草履虫在此类细菌基质中不能生长，称为不适宜细菌。

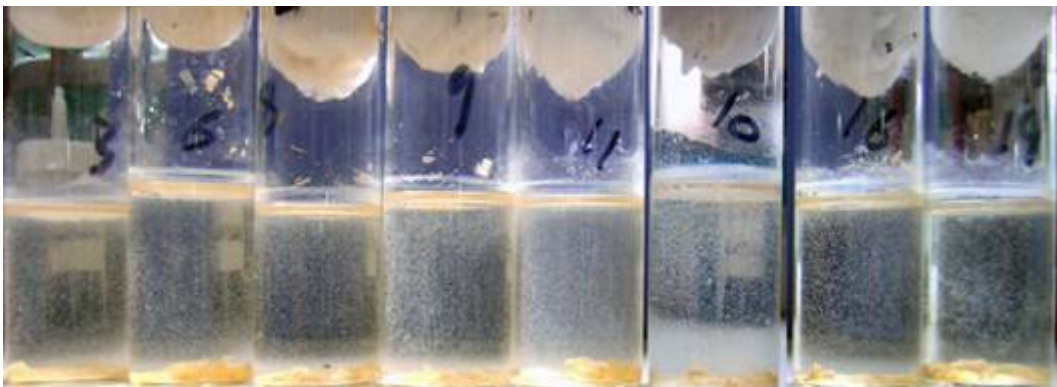


图 10. 第二类菌株

第二和第三类菌株，虫口密度随时间推移逐渐递增。从外观上看，此类细菌培养液初期亦呈乳白色，不透明，随着虫口密度增加，渐递变得澄清透明，水中有许多白色小点呈灰白色云雾状成群漂动回荡(如图 10, 11)。这表明这两类细菌均适合作为大草履虫饵料。第二类菌株的虫口密度与目前最常用的饵料细菌—菌株 19 接近，称为一般饵料细菌。第三类菌株的虫口密度均比菌株 19 高，其中菌株 12 第 8 天虫口密度达

6280 个/ml，是理想的饵料细菌。

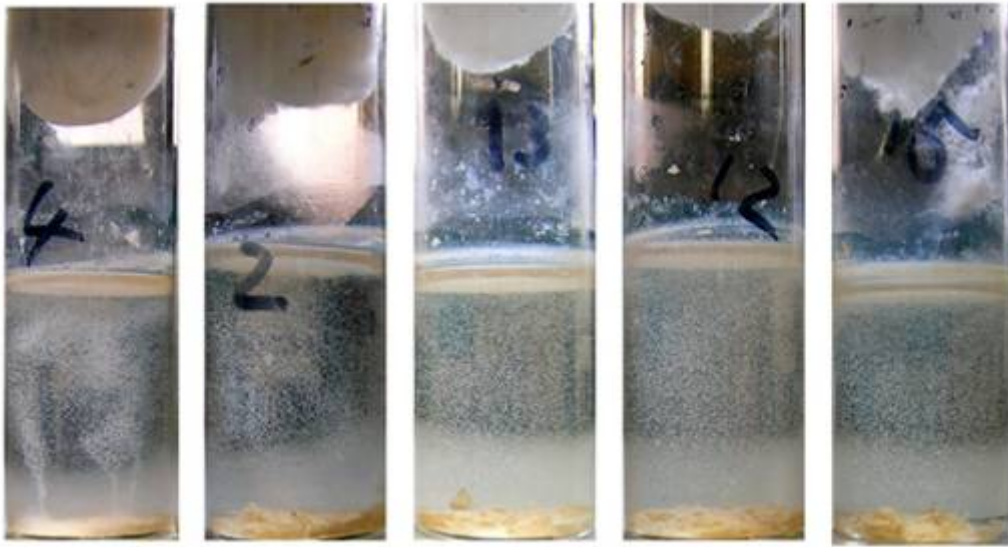


图 11. 第三类菌株

虫口密度 >2000 个/ml 的 5 个菌株中，除虫口密度较低的 4 号菌株为醋酸钙不动杆菌外，其余虫口密度较高的 2、13、12 和 15 号菌株均为假单胞菌属。这表明，在所考察的 10 个不同属的 19 个菌株中，假单胞菌属细菌比较适合做大草履虫单栖培养的饵料细菌。

一般认为，草履虫具有抗污性高，净化污水，吞噬细菌和单细胞藻类的习性。在水污染的生物净化和防治中起到一定的作用，还可以在水污染治理和毒性检测中作为指示生物。我们所用的大草履虫来自滇池草海。经过多年治理，曾经严重富营养化的草海水质已经得到改善。由于外源性污染源得到有效控制，目前滇池草海实际上是一个污水净化湿地系统。在污水净化湿地系统中，以碳氢化物为主要营养来源的假单胞菌属由于耐污能力较强，是主要的优势种群，在去除碳源污染物方面起着重要的作用^[7]。大草履虫长期经受假单胞菌高种群密度的选择压力，逐渐发展出一套以假单胞菌属细菌为理想饵料的适应机制。我们的结果一定程度上也说明，滇池草海的水质仍然属于污水类，底泥释放的碳氢化物含量还较高，滇池草海治理的任务任重而道远。

大草履虫对水质的改善通过两方面的机制来实现：其一在水中前进时，它不停地摆动口沟里的纤毛，鼓起水涡，摄取水里的病原细菌和粪大肠菌群；其二，大草履虫的水溶性多糖可以改变水中悬浮胶体微粒的表面电荷，使之絮凝而沉降。

假单胞菌属是植物病原细菌中一个重要的属^[8]。金黄杆菌、苍白杆菌、克雷伯氏菌和嗜麦芽窄食单胞菌广泛存在于水，土壤，动物体内，为条件致病菌，随着临床抗生素和免疫抑制的广泛和大剂量应用，其分离率呈上升趋势，而且对多种抗生素耐药，因而给临床治疗带来很大困难。我们的结果表明，大草履虫对这些病原细菌的捕食能力较强，因此大草履虫用于处理污水，特别是医院污水，能有效降低污水中病原细菌的种群数量，调节细菌种群。

4 结论

4.1. 在单栖培养中不同细菌对大草履虫生长的作用不一样。根据细菌与大草履虫生长的相互关系,可将细菌分为不适宜细菌、一般饵料细菌和理想饵料细菌三种类群。

4.2. 相对而言,假单胞菌属细菌比较适合作为大草履虫单栖培养的饵料细菌。以假单胞菌菌株 12 作为大草履虫饵料,培养 8 天,虫口密度达 6280 个/ml,是目前最常用饵料细菌虫口密度的 4 倍。

4.3. 大草履虫能有效降低污水中病原细菌的种群数量,调节细菌种群,在水污染的生物净化和防治具有较高的应用价值,还可以在水污染治理和毒性检测中作为指示生物。

5 进一步要做的工作

5.1. 假单胞菌菌株 12 的培养条件(培养基、温度和 pH)及菌体浓度对大草履虫生长的影响。

5.2. 不同水体来源的大草履虫对饵料细菌的偏好与水体优势细菌种群的关系。

5.3. 大草履虫处理不同污水对水中细菌种群、BOD 和 COD 的影响。

5.4. 大草履虫活性代谢产物的开发。

6 体会

通过参加这次科学探索活动,我认识到随便一个简单的现象,比如草履虫在电场中向阴极的应激性,都需要了解许多知识,生物的、化学的和物理的你才可能解释清楚这种现象,因而你会觉得自己的知识太少,你必须加倍努力学习课内、课外的各种知识。

真正做起实验时,我才发现,要完成一个研究,需要重复无数遍的同一类型的实验及操作,还要尝试不同的方法。从早到晚站着不停的加这种、那种的试剂、测数据,一天下来,脚痛,手酸,全身疲倦只想睡觉,不想坚持继续做下去。例如大草履虫的分离,获得纯净的大草履虫种子是这次实验的关键。首先根据大草履虫的大小,利用 380 目的分样筛(孔径 40 微米)进行分离,结果发现可以将大草履虫与较小的水生动物分开,但较大的水生动物仍然与大草履虫混杂在一起;其次根据比重的差异尝试了离心分离方法,发现离心导致大草履虫大量死亡;最后,根据分样筛可以浓缩大草履虫和大草履虫对牛肉汁的敏感性大,而且大草履虫在电场中有向阴极的应激性的原理,将两种方法结合起来才解决了这个问题。

但看着经过自己的努力浑浊的细菌培养液渐递变得澄清透明,水中有许多白色小点呈灰白色云雾状成群漂动回荡,内心的喜悦又别提有多高兴。另外通过在大学实验

室里进行实验，我体会到了做实验研究和在中学校园里做验证性实验的不同。不单是实验器材更加先进、准确；试验方法和思想也不大一样。在把握实验原理的大方向的同时，更要注意实验的细节，如何操作能够减小误差，获得更为精确的数据。我发现，做这样的实验没有标准答案，也没有最佳方案，需要自己去不断思考、不断探索。

我还体会到有时候，你花费了大量的时间和精力，做出的实验结果并不如愿，这时就推动着你去思考、动脑筋、想办法努力寻找解决问题的方法。

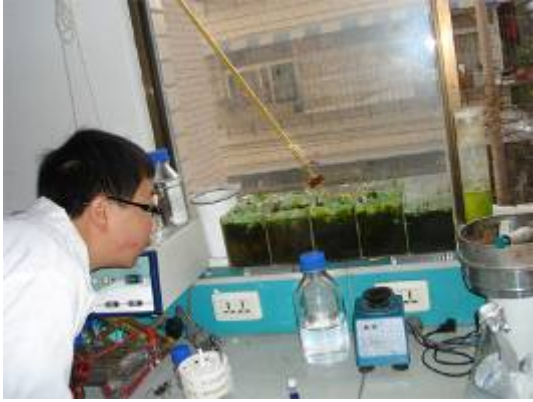
致谢

该实验是在云南大学生命科学学院张亚平院士、李文鹏博士及苏罗毅老师的悉心指导下完成的，在此表示衷心的感谢。同时还要感谢我的父母亲多方面的关心和教导。

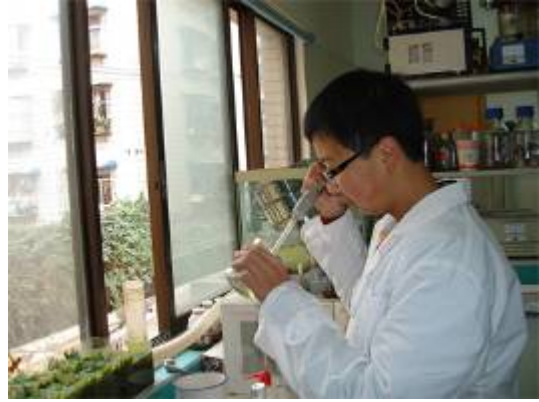
参考文献

- [1] <http://imgsrc.baidu.com/baike/pic/item/509b9fcb993493ee53664f27.jpg>
- [2] 大草履虫_百度百科. <http://baike.baidu.com/view/21739.htm>.
- [3] 杨春英, 李娜. 培养液及其浓度和 pH 值对草履虫种群增长的影响[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(4): 70~72.
- [4] 潘志崇, 刘云, 孙平跃. 铜、锌离子对尾草履虫的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2005, 24(10): 19~21.
- [5]. 韩九皋, 马惠钦, 王洪江. 草履虫培养与观察方法的探讨[J]. 水利渔业, 2007, 27(6): 77~78.
- [6]. 栾华英, 徐丽娜. 分离草履虫的新方法[J]. 生物学通报, 2003, 38(1):58.
- [7] 陈博谦, 尹澄清. 污水净化湿地模拟系统中细菌和藻类的生态分布研究[J]. 生态学报, 1998, 18 (6): 634~639.
- [8] 郭亚辉, 郭坚华, 李斌. 根据 16S rRNA 序列对假单胞菌属分类学的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24 (2): 38~41.

草履虫科技活动照片



观察水浮莲下草履虫的生长情况



采集草履虫



如何分离草履虫？



与老师讨论



分样筛浓缩草履虫

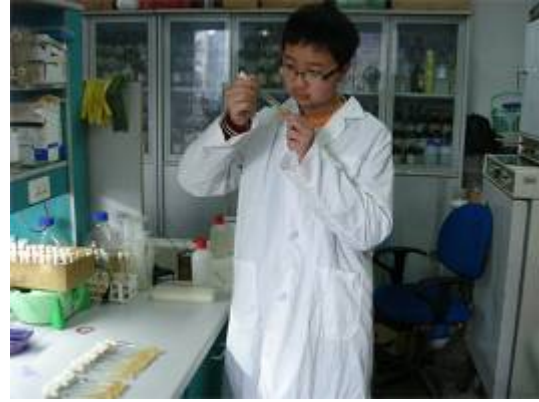


收集草履虫

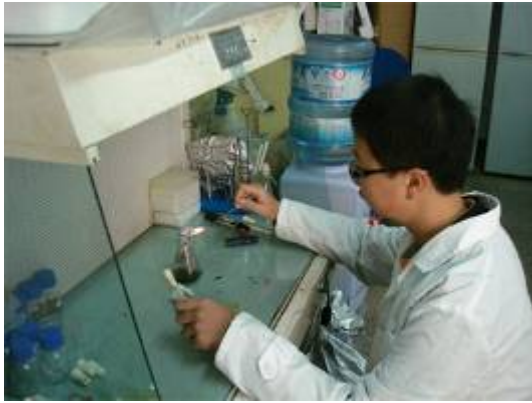
草履虫科技活动照片



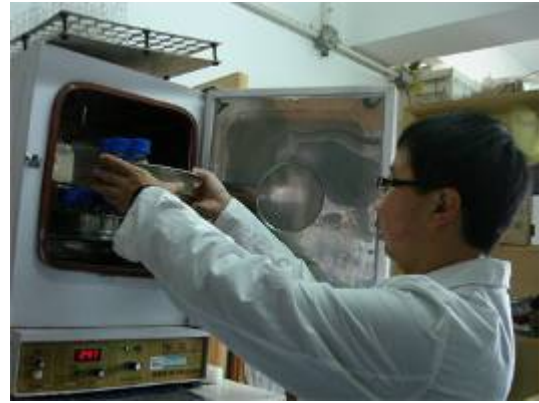
离心浓缩草履虫



检查细菌生长情况



草履虫和细菌接种



培养草履虫



细菌草酸铵-结晶紫染色



草履虫计数