

# 根足类原生动物半圆表壳虫壳体生物矿化特征

杨军<sup>①②③</sup> 沈韞芬<sup>②\*</sup>

(<sup>①</sup>中国科学院东湖湖泊生态系统实验站 武汉 430072;

<sup>②</sup>中国科学院水生生物研究所 武汉 430072; <sup>③</sup>中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要:**以有壳阿米巴类原生动物(肉鞭门,叶足纲)半圆表壳虫(*Arcella hemisphaerica*)为研究对象,利用光学显微镜和扫描电镜研究了其壳体生物矿化的特征。结果显示:矿化前期,壳体为无色透明且柔软易变形;中期,为黄色较坚硬;后期,为褐色坚硬。通过X-射线显微分析术鉴定不同矿化时期壳体的无机元素,结果表明,与矿化前期相比矿化中期和后期壳体中Si、Mn和Fe的比例增加,Cl、K、S和Na的比例减少。由此推测:(1)半圆表壳虫矿化过程中壳体坚硬的原因是Si、Mn和Fe的比例增加导致,黄色是由微量Mn和Fe引起,褐色是高含量Mn与低含量Fe的反映;(2)半圆表壳虫壳体矿化以构成壳体的小泡为基本单位进行,Si、Mn和Fe矿化体以氧化物形式通过分子间相互作用力,与小泡壁上氨基酸或多肽的羟基作用,自组装合成。

**关键词:**半圆表壳虫,生物矿化,扫描电镜,元素组成

中图分类号:Q959.114 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)01-01-07

## Characters of Biomineralization in the Shell of *Arcella hemisphaerica* (Protozoa: Rhizopoda)

YANG Jun<sup>①②③</sup> SHEN Yun-Fen<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Donghu Experimental Station of Lake Ecosystems, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

<sup>②</sup> Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

<sup>③</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The biomineralization in the shell of the freshwater testate amoeba *Arcella hemisphaerica* was investigated using light microscopy and scanning electron microscopy. The results show that the shell is colorless and flexible in the pre-biomineralization period; yellow and medium-hardness in the mid-biomineralization period; brown and rigid in the post-biomineralization period. Further, X-ray microanalysis suggested that the percentages of Si, Mn and Fe in the shell increase gradually and those of Cl, K, S and Na decrease during the process of the biomineralization. Accordingly, the increasing of Si, Mn and Fe in proportion results in the strengthening of the shell wall; the presence of Mn and Fe in trace brings about the yellow shell; and the more quantity of Mn and the less quantity of Fe lead to the brown shell. It has been demonstrated that the unit of biomineralization of the shell is the hollow alveoli arranged in a single layer. The minerals of Si, Mn and Fe in the shell may be self-synthesized, together with amino acid or polypeptide in the alveoli wall, by intermolecular force between the hydroxyl groups.

**Key words:** *Arcella hemisphaerica*; Biomineralization; SEM; Elemental composition

基金项目 国家自然科学基金(No.30270185),中国科学院知识创新工程(No.KSCX 2-2-06),中国科学院东湖湖泊生态系统实验站开放研究基金(No.200202);

\* 通讯作者;

第一作者介绍 杨军,男,博士研究生,研究方向:有壳肉足虫分类学与生态学。

收稿日期 2004-07-12,修回日期 2004-11-01

生物矿化(Biomineralization)是指在生物体内形成矿物质的过程。其显著特征是,通过有机大分子和无机物离子在界面处的相互作用,从分子水平控制无机矿物相的析出,从而使生物矿物具有特殊的多级结构和组装方式。20世纪90年代以来,出现了一种模仿生物矿化中无机物在有机模板调控下形成过程的新合成方法——仿生合成,为制备具有特殊物理和化学性能的无机材料提供了一种新方法。因此,生物矿化成为近年来国际上十分活跃的研究领域<sup>[1-5]</sup>。然而,这些工作主要集中在高等动植物和细菌生物矿化的研究<sup>[6-8]</sup>,有关低等单细胞动物生物矿化报道大都限于有孔虫、放射虫和太阳虫<sup>[9]</sup>,对大多数单细胞动物特有的生物矿化很少了解。

表壳虫(*Arcella*)是最原始、最简单、最低等的单细胞真核生物类群之一,属原生生物界(Protista)肉鞭门(Sarcomastigophora)根足总纲(Rhizopoda)叶足纲(Lobosea)表壳目(Arcellinida)表壳科(Arcellidae)。目前,国际上已描述表壳虫130多种,它们仅由单个细胞构成虫体,却具有较强的矿化能力可形成坚硬的均质壳体,壳体对虫体起保护作用,不但抵御外界机械力量,而且借助壳体形成包囊可抵抗不良环境(干涸、缺乏食物、低氧等)<sup>[10-12]</sup>。1971年,Moraczewski对盘状表壳虫(*Arcella discoides*)壳体成分进行分析,发现了几种氨基酸,因而认为表壳虫壳体是蛋白质性质或由伪几丁质类物质组成<sup>[13]</sup>。4年后,Netzel等报道表壳虫壳体由大量中空的小泡单层排列构成,小泡是在细胞分裂过程中由母体细胞分泌形成,然后按一定次序排列组合形成子壳体<sup>[14-16]</sup>。直到1980年,Ogden和Hedley才发现构成表壳虫壳体的小泡含有丰富的Fe用于硬化壳体<sup>[10]</sup>。但是,至今对于表壳虫壳体生物矿化特点及元素组成缺乏相关研究和报道。为此,本文以半圆表壳虫(*A. hemisphaerica*)为材料,利用光镜、扫描电镜及X-射线显微分析等技术对不同矿化时期壳体特征及元素组成进行研究。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 半圆表壳虫分离自武汉华中农业大学南侧的水田,参照Page培养方法进行室温培养<sup>[17]</sup>。

**1.2 光镜(LM)分析** 吸取虫体置于载玻片上,盖好盖玻片。利用Zeiss Axioplan 2 Imaging显微摄像系统进行活体观察,并拍照。为了便于对比,依据壳体颜色随日龄由无色变为黄色,以至褐色的特征,将其划分为生物矿化前、中、后3个时期。

**1.3 扫描电镜(SEM)分析** 在倒置显微镜下用微吸管将虫体挑出,2.5%戊二醛固定1h,蒸馏水中清洗3次,每次20min,然后将虫体转移到涂有L-多聚赖氨酸的玻片上(提前5min涂),室温条件下通风无尘处自然干燥3d,真空喷金后,日立X-650扫描电子显微镜观察形貌并拍照,加速电压为20kV。

**1.4 能谱(EDAX)分析** 扫描电子显微镜观察定位,20kV电压下,EDAX9100型能谱分析仪测定壳体的元素成分及含量,探头检出角为38°,采用半定量计算,经ZAF修正得出结果。对矿化前、中、后3个时期的虫体均分析2个个体。

**1.5 数据分析** 用Excel对3个矿化时期壳体的各元素含量分别平均后,作元素比例堆积图。用Statistica 6.0对3个矿化时期壳体元素含量6组数据,以欧氏距离为距离系数作K均值聚类(K-means clustering)分析。

## 2 结果

**2.1 形态特征** 半圆表壳虫壳体大小:壳直径45~60 $\mu\text{m}$ ;壳高24~35 $\mu\text{m}$ ;壳口直径11~17 $\mu\text{m}$ 。形态特征为:腹观时壳呈圆形,壳口在腹面的中央,并微凹陷于壳内(图版I:1~3)。壳口向里翻转,通常形成口管(图版I:4,图版II:5)。侧观时背面呈半圆周形,甚至还会超过半圆周,背面和腹面连接的基角微圆,不翘出(图版I:4~6)。壳体由大量直径为0.6~1.2 $\mu\text{m}$ 的泡状结构单元构成(图版I:7~12,图版II:

6) 其排列方式为每个结构单元都被 6 个相邻连结的结构单元包围, 相邻的 3 个或 4 个结构单元之间都存在一个更小的微孔, 微孔直径 100 ~ 150 nm (图版 II 6)。因此, 每个小泡先被 6 个微孔围起来, 再被 6 个相邻的小泡包围。

半圆表壳虫壳体矿化前期为无色透明 (图版 I : 1, 4, 7), 自然干燥后壳体强烈变形 (图版 II 1), 小泡也强烈变形 (图版 II 2); 矿化中期壳体为黄色 (图版 I : 2, 5, 9), 自然干燥后壳体不变形 (图版 II 3), 但构成壳体的小泡凹陷 (图版 II 4); 矿化后期壳体为褐色或深褐色 (图版 I : 3, 6, 11, 12), 自然干燥后壳体未变形 (图版 II 5), 小泡也未变形, 且微孔清晰可辨 (图版 II 6)。此外, 图版 I : 8 显示矿化前-中期壳体小泡为无色或黄色, 图版 I : 10 显示矿化中-后期壳体小泡为黄色或褐色。显然, 矿化过程中壳体颜色逐渐变黄和加深是以小泡为基本单位进行 (图版 I : 7 ~ 12)。

**2.2 元素组成** 图 1 显示, 半圆表壳虫壳体中共检测出 Si、Mn、Fe、Zn、Cl、K、S、Na、P、Ca、Mg 和 Al 等 12 种无机元素, 但是不同矿化时期各种元素的相对含量显著不同。Si 的比例矿化前期为 13.53%, 而在矿化中期和后期分别上升到 27.38% 和 30.25%, Cl、K、S 和 Na 所占份额由矿化前期的 66.13% 下降到矿化中期和后期的 33.26% 和 35.98%。另一个显著特征是矿化前期没有发现 Mn 和 Fe, 而矿化中期和后期均检测到 Mn 和 Fe, 而且随着矿化的进行 Mn 含量呈现增多的趋势 (中期 6.65%, 后期 12.83%), Fe 含量却没有明显变化 (中期 1.10%, 后期 1.00%)。还有 Zn 在矿化后期才出现, 比例为 1.93%。然而, 尽管 P、Ca 和 Mg 的相对含量在矿化中期也增加, 但矿化后期又减少; Al 的相对含量在矿化中期减少, 但矿化后期又增加。图 2 表明, 不同矿化时期的 6 组数据经 K 均值聚类分析, 在欧氏距离为 7.55 时可得两类, 即类 1 和类 2。类 1 包括矿化中期和后期共 4 组数据, 类 2 包括矿化前期的 2 组数据。显然, 类 1 与类 2 相比, Si、Mn、Fe 和 Ca 的比例增加, Cl、K、S 和 Na 的比例减少。

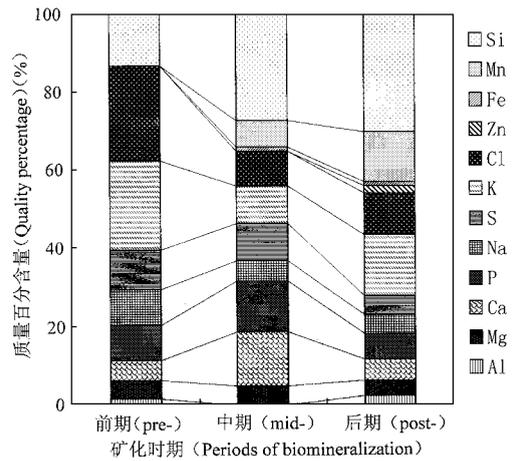


图 1 三个矿化时期半圆表壳虫壳体元素质量百分比  
Fig. 1 Quality percentages of the shell elements of *Arcella hemisphaerica* in three periods of the biomineralization

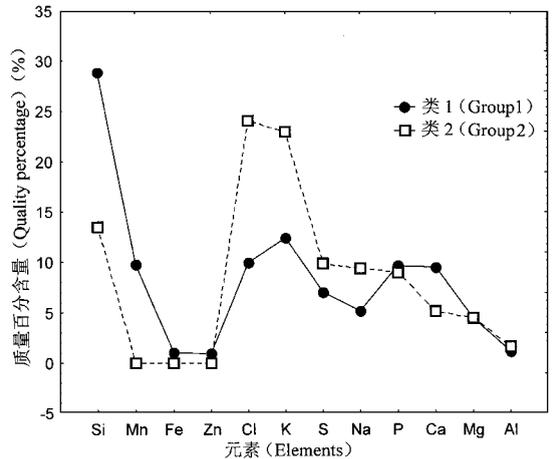


图 2 三个矿化时期半圆表壳虫壳体元素组成 K 均值聚类图  
Fig. 2 K-means clustering of the shell elements of *Arcella hemisphaerica* in three periods of the biomineralization

### 3 讨论

Ogden 和 Hedley 认为表壳虫壳体含有丰富的 Fe 用于硬化壳体<sup>[10]</sup>。然而, 本研究结果表明半圆表壳虫壳体不仅含有 Fe, 而且还有 Si、Mn、Zn、Cl、K、S、Na、P、Ca、Mg 和 Al 等 11 种元素 (图 1)。半圆表壳虫壳体矿化前期到后期由柔

软逐步变坚硬,对应于元素 Si、Mn 和 Fe 的比例增加,Cl、K、S 和 Na 的比例减少(图 1,2)。尤其是矿化后期和中期相比,Mn 含量增多,Fe 含量却没有明显变化。因此,壳体坚硬的原因可能是 Si、Mn 和 Fe 的比例增加,而非由单一元素 Fe 含量增加导致。矿化前期到中期壳体颜色由无色变为黄色,同时出现微量 Mn 和 Fe,这说明黄色是由 Mn 和 Fe 元素引起的。矿化后期与中期的壳体相比黄色变为褐色以至深褐色,而此过程中 Fe 的比例略降低,Mn 的比例明显增加,因而褐色是高含量 Mn 与低含量 Fe 的反映。显然,壳体颜色的变化反映了生物矿化过程中元素成分与比例的变化。图版 I :8 和 10 分别反映出矿化前-中期和矿化中-后期壳体颜色变黄和加深的过渡关系,表明生物矿化过程也必然是以小泡为基本单位进行,这一微观结果现象在过去研究中尚不曾报道。

生物矿物体由生物分泌形成,是生物圈和岩石圈二者通过水圈相互作用的结果。因此,其元素特征基本上介于生物圈和岩石圈之间。生物圈的主要元素含量顺序依次为 O、C、N、H、Ca、Na,岩石圈主要元素含量顺序依次为 O、Si、Al、Fe、Ca、Na、K、Mg<sup>[18]</sup>。半圆表壳虫壳体也不例外,与矿化前期相比,矿化中期和后期壳体小泡的元素组成和比例发生明显变化,矿化产物 Si、Mn 和 Fe 的比例增加,Cl、K、S 和 Na 的比例减少(图 1,2)。Moraczewski 等在表壳虫壳体中发现了氨基酸<sup>[10,13]</sup>,因此我们认为半圆表壳虫小泡矿化物是有机物分子(如氨基酸)与环境的无机矿物离子相互作用的复杂产物。半圆表壳虫作为单细胞生物<sup>[9]</sup>,其生物矿化位置属体内胞内型。根据生物矿化机制<sup>[3,6,19~22]</sup>,矿质元素离子通过与氧原子共价结合而沉积,推测表壳虫壳体中 Si、Mn 和 Fe 矿化体以氧化物形式通过分子间相互作用力,例如 Si(OH)<sub>4</sub> 中-OH,与小泡壁上氨基酸或多肽的羟基作用,自组装合成。

本文初步证明在半圆表壳虫壳体矿化过程中,多种矿质元素而非单一某种元素的含量发生明显的变化,发现其矿化过程是以构成壳体

的小泡为基本单位在常温常压条件下进行。进一步确定元素在壳体中的具体存在形式,分析壳体小泡界面的特性,在分子水平去认识生物矿化过程,对仿生合成具有重要参考价值。

致谢 感谢武汉大学分析测试中心童华教授在扫描电镜及能谱分析工作中提供帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Meldrum F C, Wade V J, Nimmo D L, *et al.* Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages. *Nature*, 1991, **349**: 684 ~ 687.
- [2] Heuer A H, Fink D J, Laraia V J, *et al.* Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science*, 1992, **255**: 1 098 ~ 1 105.
- [3] Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, 1993, **365**: 499 ~ 505.
- [4] Williams A, Cusack M, Buckman J O, *et al.* Siliceous tablets in the larval shells of apatitic discinid brachiopods. *Science*, 1998, **279**: 2 094 ~ 2 096.
- [5] Tan J, Saltzman W M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials*, 2004, **25**: 3 593 ~ 3 601.
- [6] 王荔军,李敏,李铁津等.植物体内的纳米结构 SiO<sub>2</sub>. *科学通报*, 2001, **46**: 625 ~ 631.
- [7] Tong H, Hu J M, Ma W T, *et al.* *In situ* analysis of the organic framework in the prismatic layer of mollusc shell. *Biomaterials*, 2002, **23**: 2 593 ~ 2 598.
- [8] Dunin-Borkowski R E, McCartney M R, Frankel R B, *et al.* Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science*, 1998, **282**: 1 868 ~ 1 870.
- [9] Anderson O R. Fine structure of a silica-biomineralizing testate amoeba, *Netzelia tuberculata*. *J Protozool*, 1978, **34**: 302 ~ 309.
- [10] Ogden C G, Hedley R H. *An Atlas of Freshwater Testate Amoebae*. Oxford: Oxford University Press, 1980, 3 ~ 11.
- [11] 沈韞芬. 西藏高原的原生动物. 见: 蒋燮治, 沈韞芬, 龚循矩编. 西藏水生无脊椎动物. 北京: 科学出版社, 1983, 48 ~ 100.
- [12] Meisterfeld R. Order Arcellinida Kent, 1880. In: Lee J J, Leedale G F, Bradbury P, eds. *An Illustrated Guide to the Protozoa* (2nd Edition). Lawrence, KS, USA: Allen Press, 2000, 827 ~ 860.
- [13] Moraczewski J. La composition chimique de la coque d' *Arcella discoides* Ehrbg. *Acta Protozool*, 1971, **8**: 407 ~ 421.

- [ 14 ] Netzel H. Structure and ultrastructure of *Arcella vulgaris* var. *multinucleata* ( Rhizopoda , Testacea ). *Arch Protistenk Bd* , 1975a , **117** : 219 ~ 245 .
- [ 15 ] Netzel H. The origin of the hexagonal shell structure in the testate amoeba *Arcella vulgaris* var. *multinucleata* ( Rhizopoda , Testacea ). *Arch Protistenk Bd* , 1975b , **117** : 321 ~ 357 .
- [ 16 ] Mignot J P , Raikov I B. New ultrastructural data on the morphogenesis of the test in the testacean *Arcella vulgaris* . *Eur J Protistol* , 1990 , **26** : 132 ~ 141 .
- [ 17 ] Page F C. An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae. Ambleside : Freshwater Biological Association , 1976 , 8 ~ 20 .
- [ 18 ] 戴永定 , 刘铁兵 , 沈继英. 生物成矿作用与生物矿化作用. 古生物学报 , 1994 , **33** : 575 ~ 592 .
- [ 19 ] Kröger N , Deutzmann R , Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* , 1999 , **286** : 1 129 ~ 1 132 .
- [ 20 ] Hwang J , Krebs C , Huynh B H , et al. A short Fe-Fe distance in peroxodiferric ferritin : control of Fe substrate versus cofactor decay ? *Science* , 2000 , **287** : 122 ~ 125 .
- [ 21 ] Kubicki J D , Heaney P J. Molecular orbital modeling of aqueous organosilicon complexes : implications for silica biomineralization. *Geochim Cosmochim Acta* , 2003 , **67** : 4 113 ~ 4 121 .
- [ 22 ] Rojas-Chapana J A , Tributsch H. Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *FEMS Microbiol Ecol* , 2004 , **47** : 19 ~ 29 .

杨 军等:根足类原生动物半圆表壳虫壳体生物矿化特征

图版 I

YANG Jun *et al.*: Characters of Biomineralization in the Shell of *Arcella hemisphaerica*  
(Protozoa: Rhizopoda)

Plate I

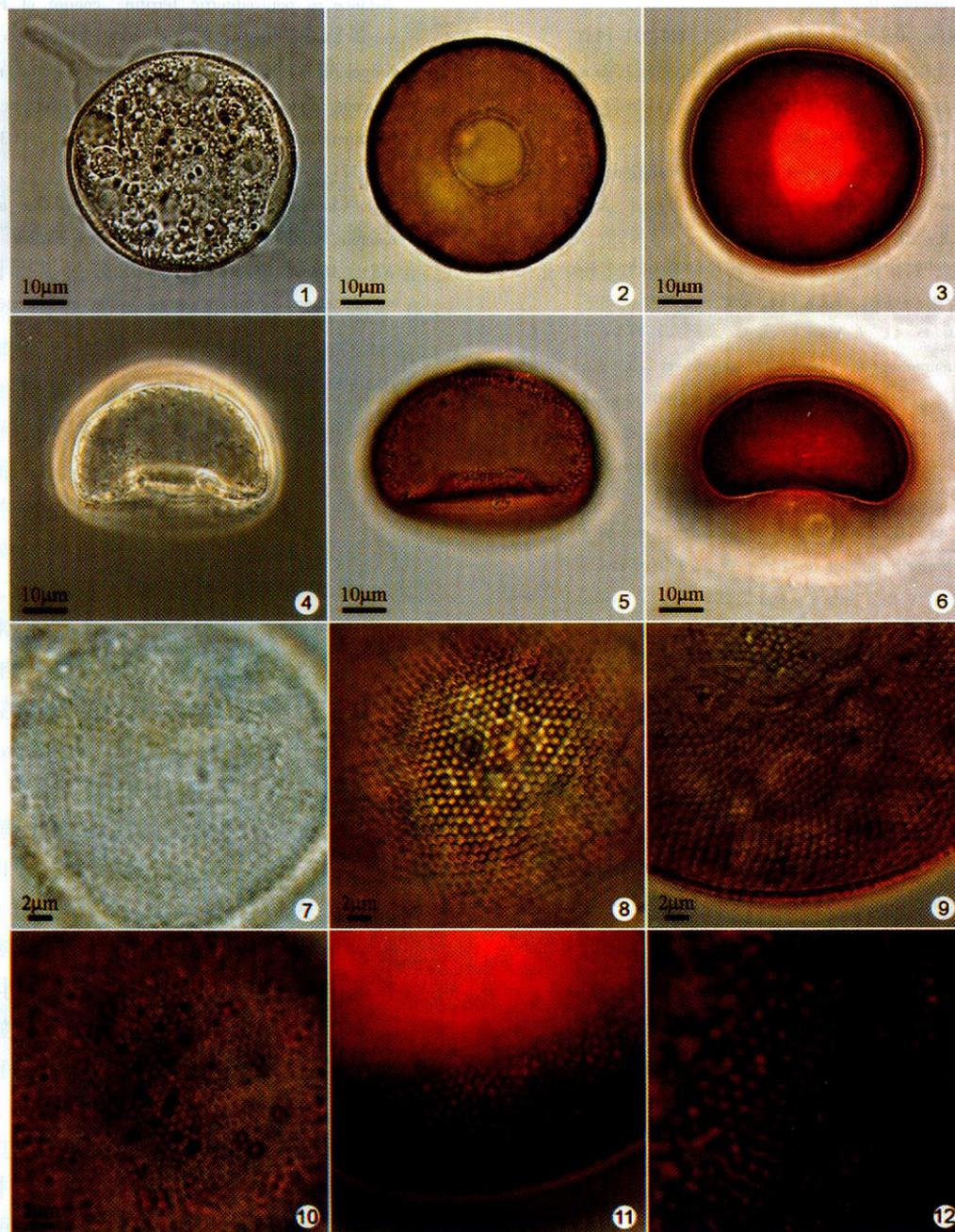


图 1~12 半圆表壳虫光镜照片(矿化前期: 1. 腹面观, 4. 侧面观, 7. 示壳体小泡; 矿化中期: 2. 腹面观, 5. 侧面观, 9. 示壳体小泡; 矿化后期: 3. 腹面观, 6. 侧面观; 11,12. 示壳体小泡, 8. 示矿化前-中期壳体小泡, 10. 示矿化中-后期壳体小泡)  
Figs. 1-12 LM photographs of *Arcella hemisphaerica* (the pre-biomineralization period: 1. ventral view, 4. lateral view, 7. view showing alveoli of the shell; the mid-biomineralization period: 2. ventral view, 5. lateral view, 9. view showing alveoli of the shell; the post-biomineralization period: 3. ventral view, 6. lateral view; 11, 12. both views showing alveoli of the shells, 8. view showing alveoli of the shell between pre- and mid-biomineralization periods, 10. view showing alveoli of the shell between mid- and post-biomineralization periods)

## 杨 军等 根足类原生动物半圆表壳虫壳体生物矿化特征

图版 II

YANG Jun *et al.* Characters of Biomineralization in the Shell of *Arcella hemisphaerica*  
(Protozoa : Rhizopoda)

Plate II

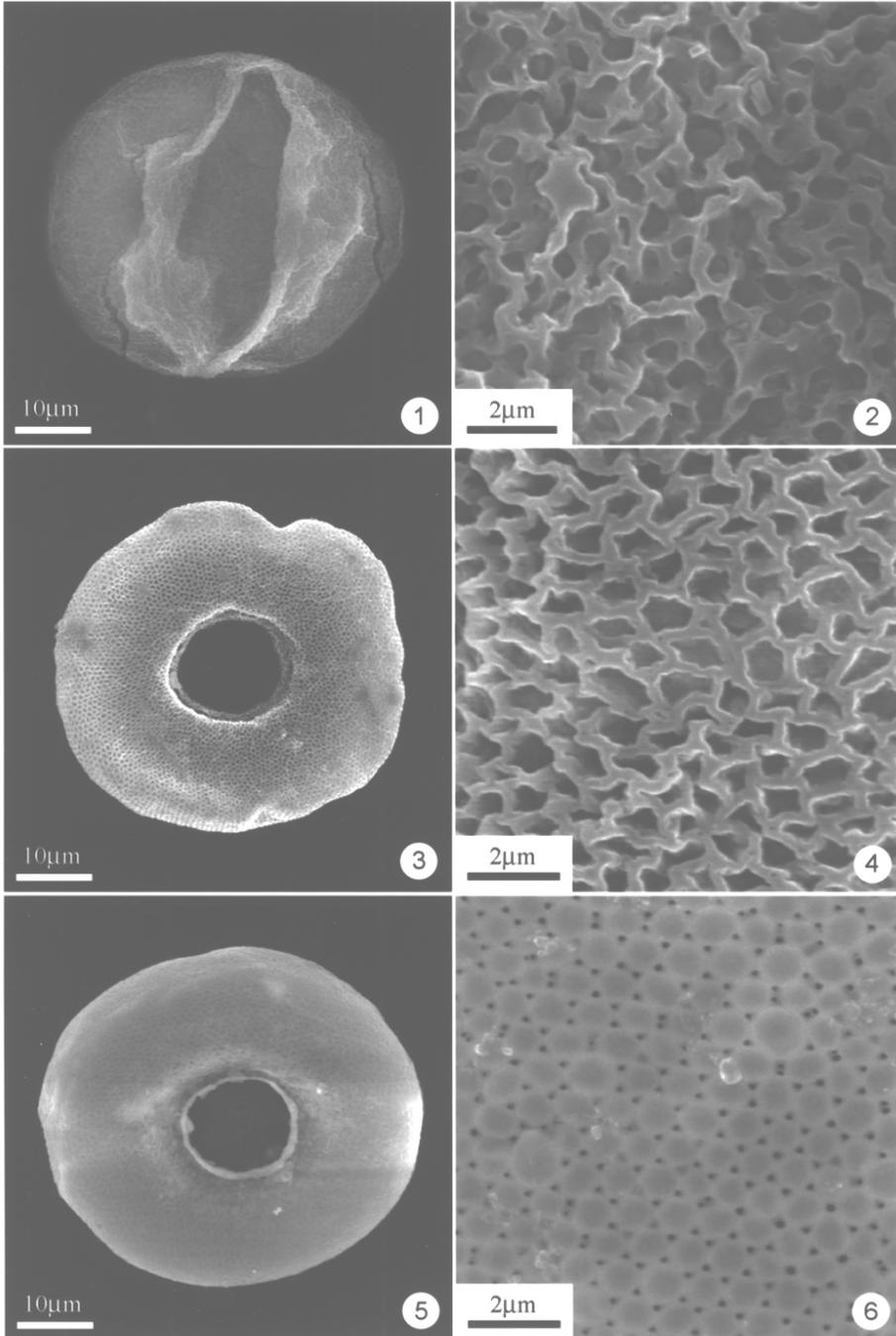


图 1~6 半圆表壳虫扫描电镜照片(矿化前期:1.背面观 2.示变形的小泡;矿化中期:3.腹面观 4.示变形的小泡;矿化后期:5.腹面观 6.示小泡和微孔)

Figs. 1-6 SEM photographs of *Arcella hemisphaerica* ( the pre-biomineralization period :1. dorsal view 2. view showing the sunken alveoli of the shell ; the mid-biomineralization period :3. ventral view 4. view showing the sunken alveoli of the shell ; the post-biomineralization period :5. ventral view ,6. view showing alveoli and small pores of the shell )