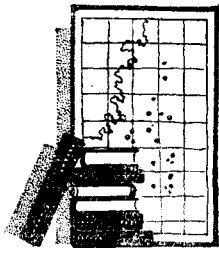


关于海洋微生物数量调查的若干问题*

孙 国 玉

(中国科学院海洋研究所)



海洋微生物学的发展落后于海洋的其他学科，迄今仍然处于年青阶段；因此，海洋微生物的调查仍然是海洋微生物学研究的重要内容之一。本文讨论的主要内容是海洋细菌的调查，海洋中的放线菌、霉菌和超微微生物等也约略地提到一些。对于浮游生物的调查，本文不予讨论。

浩瀚的海洋是由含有大约35%氯化钠为主要成分的多种盐类组成的水溶液，低温、高压、低浓度的有机物质，稀疏的动植物区系及不停运动着的潮汐、流、浪等形成了微生物栖息和生命活动的特殊生态环境。

最早的调查是俄国科学家 B. Л. 伊萨琴科在北冰洋进行的海洋微生物调查研究开始的。在1914年出版了《北冰洋细菌的研究》，阐述了微生物在约15亿立方公里的海水中物质转化过程中的作用，使海洋微生物学发展成为一门独立的学科。

目前，在海洋微生物学的领域中，已拥有相当数量分布方面的调查资料。这些数量分布方面的资料，主要是用平皿培养法、直接镜检法取得的；间或也用稀释法和超滤膜萌发法进行数量分布方面的调查。

下面讨论用各种调查方法获得之数量分布的资料。

一、平皿培养法 平皿培养法的理论依据是，检样中的每一个细菌在适当的培养基中都发育成为一个菌落，因此在平皿中长出的菌落数目，便是检样中的细菌数目。

表中的数据，是黑海不同深度1毫升水样中细菌的数目。从表中明显看出，在数量方面，直接镜检法能够测得的细菌数目比用平皿培养后计算菌落法测得的细菌数目高得多。

我们知道，根据微生物对碳源的不同要求，可分为两大类型，即无机营养型(自养菌)和有机营养型(异养菌)。现在所取得的海洋微生物数量分布方面的调查资料，主要是异养菌方面的调查资料，极少进行自养菌方面数量分布的调查。根据细菌对氧气的需要与否，又可分为需氧菌与厌氧菌两大类型。迄今所进行的一般调查，也多限于需氧菌方面的调查。所以用平皿培养后计算菌落法得出的细菌数量，主要是异养的好氧菌(或有兼性好氧菌及兼性厌氧菌)的数量，不是检样中全部细菌的数量。

同时，我们还知道，不同类群的微生物需要不同的 pH 值、渗透压、表面张力、气体张力、氧化还原电位、温度及其他环境因子。但是培养基的成分及 pH 值等常常是影响微生物生长与数量方面的主要因子。现在常用于计算海洋细菌数量的培养基有美国 Zobell 氏用的 2216 E 号培养基。

利用平皿培养法计算海水检样中的细菌数目，所用的培养基种类很多，几乎同其他微生物学工作所用的培养基数目相等。每种培养基所得到的结果，不但有量的不同，而且有质的差别，但所得到的数量只是直接镜检法的 1—10%。

用平皿培养法所得到的数量少的原因之一，是没有一种培养基能使海洋中的全部细菌都能生长出来。另外一个原因是，由于海洋中的大部份细菌聚集成为丛团、链状或片状，沾附于海洋中的微粒，附着于浮游生物体上或其他固相上而生存，单独自由漂浮于海洋中生活的较少。接种到平皿中培养时，每一个颗粒、链片或团丛聚集的微生物仅能产生一个菌落，

* 承山东海洋学院薛廷耀教授审阅，特此致谢。

黑海不同深度 1 毫升水中细菌的数目

深度 (米)	计算菌落法			直接镜检法		
	工作站 1	工作站 2	工作站 3	工作站 2	工作站 3	工作站 4
0	80	330	20	111000	197000	222000
10				123000	122000	160000
25	30	70	160	105000	130000	232000
37				140000	151000	185000
50	320	20	90	38000	109000	43000
75	20	20	10	25000	12000	33000
100	10	10	10	11000	18000	29000
125	20	50	0	70000	17000	
150	270	20	30	93000	42000	57000
175	250	40	40	122000		66000
200	20	0	20	104000	72000	72000
225	20	20	10	75000	102000	42000
250	90	0	20	74000	4000	30000
300	20	150	10	70000	63000	49000
500	30	100	0	57000	67000	47000
750	30	10	0	35000	91000	31000
1000	290	330	10	38000	59000	82000
1250	0	30	70	20000	40000	64000
1500	400	10	10	16000	43000	45000
1750	70	80	0	25000	30000	48000
2000	420	0	30	36000	63000	65000

可是这类聚集丛团中的许多细菌，用显微镜直接检查时，就能区别开来。此外，由于海洋中的细菌是生活在较低温的环境中，用琼胶培养基时，由于琼胶的凝固点约为42°C，许多种海洋细菌在此温度情况下较易受损伤。如果在倾注琼胶培养基之后，不尽快地将培养皿置于冰上冷却，以减少这种损伤程度，则生长出来的菌落数量也减少很多。有些对温度敏感的深海种类，在20.5°C时便被杀死。

由于以上种种因素，用平皿培养计算菌落法所得到的细菌数量比自然情况下存在的实际数量要少得多。所以平皿培养法除用于收集菌种外，所得到的数量资料，在目前情况下，仅可做为同种方法中所得到的数量相互比较和相互参考。

二、直接镜检法 该法的操作程序是用适合于细菌学研究用的采水器（如 J-Z 式采

水器或 ORIT 式采水器等）。从不同深度采上水样后，用细菌学的采样法，自采水器的出水口将水样流入洁净无菌的玻璃容器中。用夹有滤膜的、有效过滤直径为 1 厘米的小滤器过滤 10—50 毫升水样，这样，水样中的微生物和其他微粒便沉积在滤膜上。过滤操作结束后，将滤膜取下固定、染色。滤膜晾干后，滴上一滴香柏油，盖上盖玻片，在 1,350 倍视野下检查即可进行微生物数目的计算。

通常用下式换算成为 1 毫升水样中所含微生物的数目：

$$X = \frac{S \cdot N}{s \cdot v}$$

X 为 1 毫升水样中的细菌数目。

S 为滤膜的过滤面积。

N 为接目镜计数网小格中细菌的平均数。

s 为接目镜计数网小格的面积。

v 为过滤水样的容积。

从上式可看出，所用滤膜应当是不污染无细胞或微粒的薄膜，否则，会引起相当大的误差。因此，滤膜的洁净程度是直接镜检法准确度的关键之一。所以，用于直接镜检的滤膜必须是专门制备的。要将制滤膜用的火棉胶溶液通过赛氏细菌滤器过滤，除去其中所含的细菌及微粒等。镜检用的香柏油等也应当经超滤膜过滤，除去其中所含的细胞及微粒等才能使用。

由于用直接镜检法不可避免地会将活菌、死菌、真菌和放线菌的孢子以及菌丝断片、胶体微粒和其他形态上类似细胞的微粒等都计算在内了，所以用直接镜检法得出的检样中的细菌数目一定比平皿培养后计算菌落法大得多，通常大 1,000 倍以上。因此，与其说直接镜检法是计算了水样中的细菌数目，不如更确切地说，是计算了包括细菌在内的很多种微生物及形态上类似细胞的有机的和无机的微粒的总数目。

直接镜检法的准确度尽管有上述缺陷，但是由于这种方法过滤的水样多，统计的数目大，还是有其优点的。比较表内资料，可以明显地看出，直接镜检法能够查明比平皿培养法

多得多的微生物，而且直接镜检法还能够测出微生物总体垂直分布的一定规律。依照表内资料，微生物的最高密度是在水表层，至50米深时便急剧下降，以后接近硫化氢上面界限(200米)时又增多，直到海底已看不出显著的变动。

下面我们来具体分析根据直接镜检法所得出的两个海区中细菌数量分布的资料。

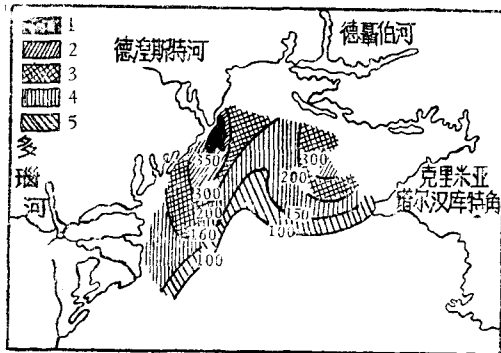


图1 河流对黑海西北部微生物数量分布的影响

1——1毫升水中微生物细胞在35万以上；
2——从30万到35万； 3——从20万到30万；
4——从15万到20万； 5——从10万到15万。

图1是河流对黑海西北部微生物数量分布的影响。这是用直接镜检法得到的微生物总体水平分布图。从该分布图的总趋势来看，黑海西北部德聂伯—布格湾与德涅斯特河口对面一带细菌的密度比多瑙河口对面区域要多1.2—2.5倍。究其原因，一般认为是因为多瑙河的有机物质浓度比德涅斯特河及德聂伯河少1.5倍。深入一步的研究知道，德涅斯特河每年流入黑海里的数量为8.3立方千米，德聂伯河与布格河每年流入黑海里的数量为54.7立方千米，多瑙河每年流入黑海里的数量为203立方千米；上面三条河流入黑海中的水量虽然比多瑙河流入黑海中的水量少的多，但是除了德涅斯特河和德聂伯河水中有有机碳含量（分别为11.48毫克/升和13.59毫克/升）比多瑙河水中的有机碳含量（8.53毫克/升）高以外，还因为多瑙河流入黑海中的大量水汇入总的环流，

向南流去，减弱了对河口区域的影响，所以多瑙河口对面的细菌密度比德聂伯—布格湾和德涅斯特河口对面一带少1.5—2.5倍。那么，为何黑海西北部微生物分布的最密集区出现在德涅斯特河口？而不出现在别的区域？这就需要海岸、海底地形、水化学、水文学及浮游生物学等的实测资料为依据，才可能得出比较切合实际的因果关系。

浮游植物在海洋中的分布，受光、流、浪、潮汐及营养物质等影响。浮游动物在海洋中的分布除受上述几种因子的影响外，它们还能自己移栖，向适宜于它们的生态环境中移动。除光合细菌外，细菌极少受光线的影响，亦无移栖的能力；它们的分布主要受流、浪、潮汐、营养物质、浮游植物及浮游动物等的影响。

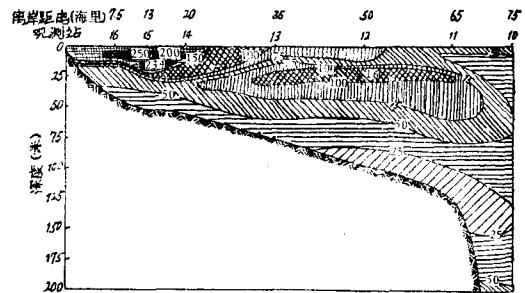


图2 随着多瑙河口的渐次递远，微生物数量的分布数字为1毫升水中细菌数目

图2是随着多瑙河河口的渐次递远微生物数量分布的纵断面图。多瑙河对黑海中细菌数量发生的影响在20海里左右距离处还很明显。在离多瑙河口20海里的表层（0—10米）中，微生物的浓度稍低于离河口13海里和7.5海里处微生物的浓度。粗略的分析这一纵断面图后，概括性的解释仍然是：多瑙河流入黑海，带进了很多营养物质，促使了微生物数量的大量繁殖；随着离河口愈远，营养物质的浓度便随着递减。要再进一步解释如果没有同步观测的流、浪、潮汐、水化学、浮游生物学等资料为依据，想找出发生此种现象的原因，将是不实际的。

三、稀释计数法 此法是将检样用灭菌的海水按10倍一直稀释下去，将适当稀释度的稀释液接种到液体培养基中。此法是在室外缺乏检查海水样本平板设备的情况下，将检样稀释几次，然后接种到几管液体培养基中，以便对菌数有个约略的估计。

用各种特殊的培养基估计不同生理类型的细菌时，广泛地使用了稀释法(即 MPN 法)。

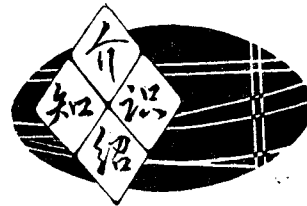
四、超滤膜萌发计数法 此种方法的理论依据是，由于外海检样中的细菌数目较少，接种 1 毫升或几毫升检样到一个平皿中时，培养出来的菌落数目很少，或者培养不出来；因此，用夹有滤膜、过滤直径为35毫米的滤器，过滤10—20毫升或更多的水样，使水样中的微生物浓缩在滤膜上，而后将滤膜取下，铺放在盛有适当琼胶培养基的平皿中培养，计算在滤膜上长的菌落数目，再换算成为 1 毫升水样中细菌的数目。

该法的优点是：不受琼胶凝固点42°C的影响，是收集菌种的一种良好方法。用此种方法，能收集到比平皿培养法较多种类的微生物。其缺点是：几十毫升水样中的微生物到直径为35毫米面积的滤膜上，在密密覆盖着滤膜的大量菌落间，几个细菌互相集聚成为一丛，生长成为一个菌落时，则无法计算其菌数。因此在滤膜上长出的菌落数目是同一份水样中直接接种到琼胶表面上的1/5—1/50。



为此，我们建议改进海洋微生物数量分布的调查方法。海洋微生物数量分布的调查工作必须保证与海洋的其他学科同步观测，结合其他水文、化学、生物等学科同步观测的资料来分析所获得的微生物数量分布，才能得出比较符合

实际情况的结论。否则，只是偶然性的参加海洋调查，或只在海面的个别工作站上工作，用这类方法得到的海洋微生物数量分布资料来绘制成的海洋微生物数量分布图表，那只是调查的那段时间内的瞬间情况。那样得出的结论，是值得怀疑的。(参考文献略)



箱式底质 取样器

海洋地质研究不仅需要有一定数量的海底表层样品，而且要求保持样品的原始状态。为了取得原状样，各国学者曾对表层取样器进行了多次改进，目前以箱式底质取样器最好。

箱式底质取样器(图1)主要由一个箱壁薄面和开口面积为20×30厘米、高60—90厘米的不锈钢箱体，以及一个可转动的铲刀、释放

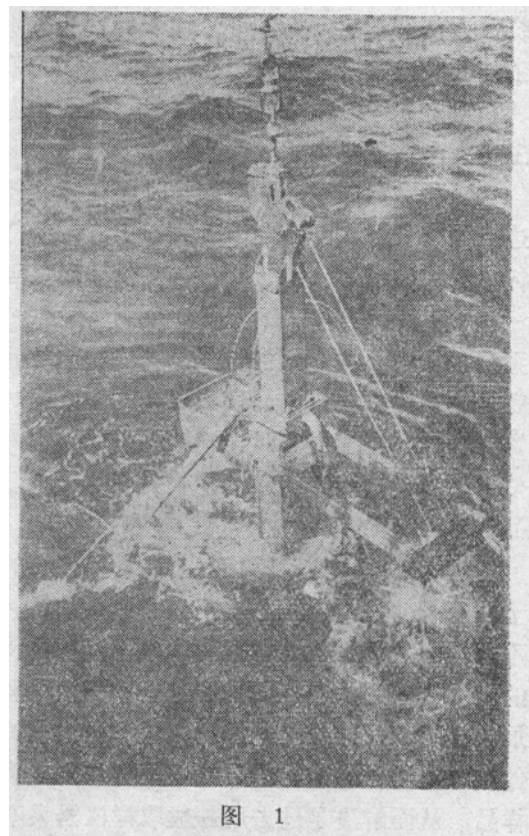


图 1