

海洋异养细菌生物量与生产力的研究方法*

REVIEWS OF THE MEASUREMENTS OF BACTERIAL BIOMASS AND PRODUCTION

赵三军 岳海东 肖天

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

随着人类对海洋生态系统的不断研究和探索,海洋异养细菌在海洋生态系统物质循环、能量流动及维持海洋生态系统多样性与稳定性方面的重要性被人们广泛认可并展开深入研究。国际领域的一些有关海洋与全球变化的重大研究项目如:全球海洋生态系统动力学研究、全球海洋通量联合研究及海陆相互作用研究等都将其列为主要研究内容之一。海洋异养细菌生物量和生产力是研究海洋异养细菌的重要依据,随着新技术与新方法在海洋生态系统研究中的应用,海洋异养细菌的研究方法也得到不断发展。

1 异养细菌生物量的计数方法

海洋异养细菌的个体微小,难以观察。各种实验观察技术的革新不断推动异养细菌计数方法的发展与进步。有关异养细菌生物量的研究技术主要有平板计数法、表面荧光显微镜计数法、透射电镜观测法、流式细胞仪计数法等。

1.1 平板计数法

平板计数法是经典的细菌计数方法^[1]。将所要计数的细菌在稀释后用装有特殊培养基的玻璃平皿培养,稀释后细菌在平板中约几十个到100个之间,单个细菌在培养一段时间后,形成菌落。通过计数菌落的方法可得到异养细菌生物量。该方法的优点是在计数的同

时可以得到活的菌株,以便于以后对其进行分类鉴定、形态生理方面的研究;该方法的缺点是现场操作较复杂,需要严格的无菌操作,且很多海洋细菌用目前的培养基不易培养。该方法现在对异养细菌生物量的野外生态学研究已经很少使用,但是,在对异养细菌的培养、分类鉴定及形态生理研究中还在大量使用。

1.2 表面荧光显微镜

该方法的原理是用特异的荧光染料着色异养细菌,在荧光显微镜下能够观察到发荧光的异养细菌。用不同的染料着色异养细菌所需激发光的波长范围不同。目前常用的有光神霉素、吖啶橙、联脲基苯吡啶及其延伸物(如DIPI)、色霉素A-3及橄榄霉素等荧光染料。它们都是针对细菌核酸物质进行着色。其中吖啶橙和联脲基苯吡啶是目前研究最常用的荧光染料,所不同的是吖啶橙形态能够嵌入核酸,因此能使核糖核酸和脱氧核糖核酸同时着色,且激发光高峰值范围在455~500 nm之间的蓝光区域。DAPI与核酸的AT碱基对区域结合形成DNA-DAPI复合物,而核糖核酸一般不会被着色,且根据着色对象不同有时还需要加入电解质溶液,以调节渗透压,它所需激发光高峰值范围在340~370 nm间的紫外区域。表面荧光显微镜计数法的优点是操作简便快捷、经济实用,是实验室异养细菌研究的常规

研究方法之一。但是,有可能将一些自养型超微型浮游植物如原绿球藻等计数在内形成误差。笔者在2000年秋季黄、东海的调查中发现,在近岸及中陆架区(富营养、中营养海区)原绿球藻的丰度比异养细菌的丰度低两个数量级,影响较小,误差可忽略。而在陆坡(寡营养海区)原绿球藻的丰度比异养细菌的丰度只低约一个数量级,此时用表面荧光显微镜计数异养细菌时,由原绿球藻带来的误差较大。

另外,早在有人将计算机系统与荧光显微镜联接进行镜象分析来进行细菌及病毒方面的分析计数,且在使用荧光显微镜计数海洋异养细菌方面得到不断的应用和发展^[2]。该方法无疑大大减轻使用表面荧光显微镜计数带来的繁重工作负担。

1.3 透射电子显微镜观测法

透射电镜的基本原理是以电子激发的光子作光源照射被观测样品,由于波长极短,大大提高了仪器的分辨率。该法的优点很多,如可以观察到细胞的亚显微结构;

* 国家重点基础研究发展规划项目G19990437号。

第一作者:赵三军,出生于1975年,中国科学院海洋研究所在读硕士生。

E-mail: zhaosanjun@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2001-06-11;

修回日期:2001-08-08

能观测到含有病毒颗粒的细胞；可以测量细菌个体的大小计算体积，可利用它估算单个细菌细胞生物量碳单位的转换系数，可区分和鉴别原绿球藻或更小粒径的病毒及细胞体等。但是该方法制片方法复杂、成本高；仪器操作复杂且耗时；不适合在自然生态的现场调查中使用。

1.4 流式细胞仪计数法

流式细胞仪是在近几年应用于对海洋超微型浮游生物的研究中，并显示出了极大的优越性。其工作的基本原理是当带不同电荷的单个发特殊荧光的细胞通过检测小室时，监测系统能够接收其发出的荧光信号，并把光信号转化为电信号，传输到计算机终端进行数据分析与处理。该方法能够迅速地检测、分类并计数不同粒径不同发光特征的超微型浮游生物；还可以对样品的核酸、线粒体、叶绿体等亚细胞结构进行分析。操作简便、工作量大、用很少量的分析样品即可得到大量详尽的可靠数据。缺点是该仪器设备价格昂贵，样品的分析需要标准样品进行校正，仪器的操作需要丰富的经验。

以上的测量方法都是针对异养细菌的数量及其丰度的研究方法，所得的数据都是细菌的数量或丰度。根据 Lee S. 等人于 1987 年的研究将异养细菌数量或丰度转化为生物量碳单位较为常用的方法有两种，一种是利用细胞个数与碳单位之间的转换系数 20 fg/cell 将异养细菌数量转化为碳单位表示的生物量。另一种是利用细菌体积与碳单位之间的转化系数即 0.38 g/cm^3 将数量转化为表示的生物量。这两个转换系数都是由实验粗略得来，不同海域不同时期其数值存在差异，可以根据具体情况测

量海水样品中异养细菌的具体转换系数，以获得更精确的数值。

2 异养细菌生产力的测定方法

在海洋生态系统中海洋异养细菌即是分解者也是生产者，它可以利用溶解有机物生长、增殖，将其变为颗粒有机物，后者被微型浮游动物捕食利用转化为更大的颗粒后进入主食物链。由于海洋异养细菌在海洋生源要素循环中所起的作用，把它称为海洋异养细菌二次生产又称为异养细菌的二次生产力。估算海洋异养细菌生产力的大小无疑是研究其在海洋生态系统中作用大小的重要依据。异养细菌生产力的研究方法主要是用同位素示踪法标记细菌体内的物质，以间接测量其生长、增殖的速度，然后将其转化为碳单位，以表示其利用溶解有机物合成自身物质的能力大小。目前国际上主要的研究方法有 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶核苷示踪法及 [^{14}C] - 亮氨酸示踪法等。

2.1 [甲基- ^3H]胸腺嘧啶示踪法

美国科学家 Fuhman J. A. 等于 1982 年发表利用 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶示踪法测定海洋细菌生产力的主要原理是根据核酸是异养细菌体内的遗传物质且含量相对稳定，胸腺嘧啶是合成核酸的重要成分之一，且海洋生态系统中自养生物不能或只能极少地吸收利用游离于外界的胸腺嘧啶，而异养细菌能够吸收、利用外界的胸腺嘧啶。该法假设 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶与游离于外界的未标记的胸腺嘧啶在细菌核酸合成时有相同的吸收转化率，且 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶被吸收后不会因代谢而损失。将样品中加

入 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶，现场培养后冰浴 1~2 min，之后分别用 10% 和 5% 的三氯乙酸 (TCA) 抽提，再经过抽滤后加入闪烁液，最后用液闪计数器测出每分钟放射数 cpm (Counts per minute) 转化为每分钟衰变数 dpm (Disintegrations per minute) 值之后，利用公式将其换算成碳单位。该法的优点是较灵敏，能够体现出细菌的增殖速度，经济、简便、实用性强、应用广泛、数据较多。缺点是本法只反映了细菌的增殖速度，不能准确反映其增长速度，不同的海域细菌的转换系数不同，需要校正，另外根据 James T. Hollibaugh 等 1988 年研究表明一些核外物质也被标记，并且标记胸腺嘧啶的代谢等会影响计算的准确性。

2.2 [^{14}C] - 亮氨酸示踪法

研究表明，异养细菌蛋白质占其自身重量的很大比重 (约 50%)。并且，异养细菌消耗了大量能量用于其蛋白质合成。因此可以用测量细菌蛋白质合成速率间接表示细菌生产力。实验表明，亮氨酸的合成与异养细菌蛋白质增长及细菌数量增加有平行关系。因此可以用放射性同位素标记的亮氨酸间接测量异养细菌的生产力。该法的操作与上面的 TTH 法相同。与上一方法相比该法既能反映异养细菌的增长速度，也能反映异养细菌的增殖速度，能够较真实地体现细菌生产力的概念。此外也有人用该方法校正 [甲基- ^3H] 胸腺嘧啶的转换系数。缺点是 ^{14}C 的放射性太高、半衰期长，废弃样品的处理较麻烦，且容易造成环境污染。David C. SMITH 等人在 1992 用 [^3H] - 亮氨酸代替 [^{14}C] - 亮氨酸，且用离心的方式而不是过滤的方法收集培养样品，这样所需样品及加入亮氨酸



的量比过滤法少,并且废弃物处理方便,不容易污染环境。

另外,有人用放射标记的葡萄糖,三磷酸腺苷(ATP)等物质来标记异养细菌,以间接表示异养细菌的生长同化能力,并取得了一定的进展。

2.3 细胞分裂频率法

1979年A. Agstrom等人将细胞分裂周期应用于海洋细菌生产力的研究,细胞分裂频率法的原理是通过观察计数处于不同细胞周期的细菌来估算异养细菌生产力。增殖细菌的分裂周期是由其增长期与分裂期组成,两者所用时间相加即为细菌分裂一个周期所用时间,细胞分裂频率(FDC)的大小取决于细菌的生长率与平均分裂时间,因此细胞分裂频率能间接体现细菌的增殖速率。隔膜的出现可作为细菌分裂的标志,通过表面荧光显微镜或扫描电镜观察用甲醛固定的样品计数处于分裂期的细菌。该方法的优点是直接对固定的样品进行观察计数无须对样品进行培养,避免了因对样品的培养引入的人为影响因素;避免了因使用放射性同位素造成的环境污染;所使用的仪器都为常规仪器等。该方法的缺点是处于休眠期的细菌会降低细菌生产力的数值,处于不同营养状态的细菌行为方式也有所不同,也会影响细菌生产力的大小。如Novitsky J. A.等1978年发现处于饥饿状态的细菌会通过不断的分裂频率增加其细胞数量,但是其细胞大小保持不变。此外,在1a的周期中,在不同的时期细菌群落

处于不同的状态,该因素也会影响对细菌生产力的计算。

随着现代生物技术在海洋生物学中的应用,尤其是分子生物学技术在海洋生物学中的广泛应用,涌现出了许多新方法与新思路,人们对异养细菌的研究方法也必将得到不断发展与进步,如有人利用细胞内相对保守的核糖体16SrRNA序列来鉴定古核细菌,并取得了一定进展。相信随着分子生物学技术在海洋异养细菌的研究中进一步的应用与发展,会有更多、更可靠、更方便、更能准确反映异养细菌在海洋生态系统中的分布及其生物量、生产力大小的方法不断涌现出来,使人们能够更进一步的了解与评估异养细菌在整个海洋生态系统中的功能及作用。

主要参考文献

- 1 薛延耀. 海洋细菌学. 北京: 科学出版社, 1962. 20~40
- 2 Alexander Shopov, Samanthia C. Williams, Peter G. Verity. Improvement in image analysis and fluorescence microscopy to discriminate and numerate bacteria and viruses in aquatic samples, *Aquat. Microb. Ecol.*, 2000, **22**: 103~110

辅助参考文献

- Fuhrman J. A. and F. Azam. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California, *Appl. Envir. Microbiol.*, 1980, **39**: 1085~1095
- J. A. Fuhrman and F. Azam. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production

in marine surface waters evaluation and field results, *Marine Biology*, 1982, **66**: 109~120

James T. Hollibaugh. Limitation of the ^3H thymidine method for estimating bacterial productivity due to thymidine metabolism, *Mar. Eco. Prog. Ser.*, 1988, **43**: 19~30

David Kirchner, Elizabeth K'NEES, Robert Hodson. Leucine incorporation and it's potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems, *Appl. Envir. Microbiol.*, 1985, **49**(3): 599~607

David C. Smith, Farooq Azam. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ^3H -leucine, *Marine Microbial Food Web*, 1992, **6**(2): 107~114

Heresa B. Britschgi, Stephen J. Giovannoni. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing, *Appl. Envir. Microbiol.*, 1991, **57**(6): 1707~1713

A. Hagstrom, U. Larsson *et al.*. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments, *Appl. Envir. Microbiol.*, 1979, **37**(5): 805~812

Lee S., Fuhrman J. A.. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton, *Appl. Envir. Microbiol.* **53**(6): 1298~1303

(本文编辑:刘珊珊)