

胶州湾小球菌的研究*

薛廷耀 孙国玉 丁美丽

(中国科学院海洋研究所, 山东海洋学院)

小球菌 (*Micrococci*) 是海洋细菌的主要种类之一。据前人报导: 小球菌不仅经常存在于硬骨鱼和软骨鱼的粘液, 而且在前者的腐败初期以及后者腐败过程中的各个时期, 都发现与它们的存在有关^[1,2]; 在已知的发光细菌种类中, 小球菌约占十分之一^[1]; 海洋小球菌能破坏橡皮^[3]; 细菌是船舰附着生物的先驱^[2,15], 其中会有小球菌参加。根据我们所知道的, 国外从事于海洋细菌鉴定的研究工作者不多, 对于海洋小球菌的研究^[12] 那就更少了, 国内还没有人做过这一类的工作。实质上, 海洋微生物学尚处于开始发展阶段, 落后于其他海洋科学, 海洋微生物群落的质的研究, 是海洋微生物学的主要任务之一^[4]。为了了解我国海洋细菌的一些基本特征, 以及为了进一步研究上述各种问题当中细菌的作用, 我们首先对 1958 年所进行的胶州湾口细菌数量变动的调查工作中分离得到的小球菌进行了比较详细的研究。本文的主要内容是报导我们研究胶州湾小球菌及其菌种鉴定方法的初步研究报告。

一、实验方法

真正的海洋细菌只能在海水培养基生长或者优先在海水培养基生长, 从未被陆地污染的海区采来的海水检样, 其中只有少数的细菌能在淡水培养基生长, 同样地也只有极少数的陆地细菌能在海水培养基生长^[4]。因此, 本实验所用的培养基除特别标明者外, 都是用海水配制的。

为了尽可能减少由于风、都市下水道、雨水的流入及其他原因而带进陆地的及淡水的细菌, 本实验所采取的海水检样最初都是经过海水培养基加以分离选择的; 也就是说, 只有在初步分离时能在海水培养基生长的细菌, 我们才认为是海洋细菌。

我们用下列方法分离获得海洋小球菌的纯培养。首先将海水检样用灭菌的海水进行适当的稀释, 将稀释的海水检样 1 毫升注入培养皿, 然后倒入约 15 毫升溶化而冷却至 45°C 左右的海水肉汁琼脂或 Zobell 氏 2216 培养基^[15], 在 22°C 温箱中培养 7 天, 用接种针挑取生长于平板上的单一菌落进行涂片镜检, 如果是小球菌时, 再用移种针挑出, 种入海水肉汁, 做成混悬液, 然后用白金耳蘸取培养液在海水肉汁平板培养基上划线纯化, 如果生长出来的菌落形态、色泽、构造等特征相同时, 即用移种针将此种菌落移种于琼脂斜面培养基上, 在 22°C 培养 48—72 小时, 然后将细菌作成涂片, 用 Gram 氏染色法染色, 观察所分离的菌种是否是纯培养。菌种是用海水肉汁琼脂斜面保存的。

关于形态、染色、培养及生理生化特征的研究方法, 基本上是采用微生物方法手册^[11]

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 120 号。

所列的,經過多次試驗改进、証明是适用于海洋細菌試驗研究的方法,所改进的方法以及微生物方法手册沒有記載的方法本文都加以詳細叙述。試驗所用的培养基除淡水肉汁、石蕊牛奶、馬鈴薯斜面以外,其他的培养基都用海水配制。配制培养基所用的海水,都采用經過处理的“陈海水”^[15]。

本实验所用的海水样品是采自距青島栈桥 1.5 哩胶州湾口第 1 号浮标附近、在涨潮时 2 米深的水层。采水器是按照 J. Z. 采样器^[15]图样自制的。

(一)形态观察

1. 細胞的大小: 将菌种种入海水肉汁¹⁾, 在 22°C 温箱內培养 24 小时后, 移种于海水肉汁琼脂斜面上, 再在 22°C 温箱內培养 24 小时, 涂片以番紅染色, 用显微鏡測微仪測量其大小。

2. 細胞的排列: 将菌种种入海水肉汁, 在 22°C 温箱內培养 24 小时, 直接在相差鏡下作活体观察, 又用在海水肉汁琼脂斜面培养出来的細菌作成涂片染色观察之。

3. 动力: 用半固体培养基穿法, 观察細菌是否向穿刺綫外活动及在肉汁中培养 24 小时在相差鏡下观察其是否能运动。

(二)染色反应 Gram 氏染色反应。接种于海水肉汁琼脂斜面上的菌株, 在 22°C, 分别培养 1、3、7 天, 用 Hucker 氏改良法染色观察之。

(三)培养特征

1. 海水肉汁琼脂平板: 在 22°C 温箱內培养 7 天, 用于观察菌落的大小、形态及色泽。在低倍显微鏡下观察菌落的結構。

2. 海水肉汁琼脂斜面: 观察植株色泽。

3. 海水葡萄糖酵母浸液琼脂斜面 (配制方法: 酵母膏 5.0 克; 蛋白胨 5.0 克; 葡萄糖 10.0 克; 琼脂 15.0 克; 陈海水 1000.0 毫升, 間隙灭菌。): 观察植株色泽。

4. 淀粉琼脂斜面: 观察植株色泽。

5. 馬鈴薯斜面: 观察生长情况及色泽。

6. 海水肉汁: 观察生长情况。

7. 淡水肉汁: 观察生长情况。

(四)生理生化反应

1. 硝酸盐还原作用: 菌株分别种入装有内含 0.1% NaNO_3 的海水肉汁 Durham 氏发酵管中, 在 22°C 保温箱內分别培养 1、2、5、10 天后, 用 Griss 氏試剂測定有无亚硝酸盐出現并观察有无气体产生。

2. 明胶液化: 将植株点种于含 0.4% 明胶的海水肉汁琼脂平板上, 在 22°C 温箱內培养 7—10 天, 用 Smith 氏改良法測定明胶是否被液化。此外也配合着用明胶穿刺法观察明胶液化情况。

3. 淀粉水解: 将植株种入含 0.04% 可溶性淀粉的海水肉汁中, 在 22°C 恆温箱內培养 2 周左右, 加入 Lugol 氏碘液一滴, 观察淀粉是否被水解。

4. 醱类的发酵: 在海水肉汁中分别加入各种醱类 1.0%, 用溴甲酚紫作指示剂, 分装

1) 配制方法是: 用陈海水代替蒸餾水, 在 15 磅蒸气压力下加热 20 分钟, 滤去所形成的沉淀, 分装灭菌备用, 这是作为进行其他試驗的基础培养基。配制固体培养基时加 1.5% 琼脂, 制作半固体培养基时加 0.3% 琼脂。

成半固体琼脂高层，間隙灭菌，穿刺接种，培养于 22℃ 温箱内，經常观察其产酸、产气情况，并附带观察动力，观察时间延长至四周之久。有时也用斜面观察其产酸情况。

5. 吲哚的产生：所用培养基是海水肉汁加少量色氨酸，接种培养后，用 Kovács 氏改良法(改进 Ehrlich-Böhme 氏的方法)测定有无吲哚形成。

6. 硫化氢試驗：将細菌种入管口悬有醋酸鉛滤紙条，管中装有内含 0.25% 硫代硫酸鈉的海水肉汁的試管中，細菌生长后，观察滤紙是否变黑，以确定有无硫化氢产生。

7. 石蕊牛乳培养基：观察胰化、沉淀、石蕊还原、酸碱变化等。此外并配合着用石蕊牛乳琼脂平板(是将間隙灭菌的石蕊牛乳与等体积灭菌溶化的 3% 的琼脂同时倒入灭菌培养皿，混匀硬化)点种方法观察胰化現象。

8. 矿質氮的利用：利用 Hucker 氏^[8,9]所介紹的培养基平板上划綫及液体培养观察其是否生长，以确定其对矿質氮的利用。

9. 无氮培养基上生长情况：利用在 Ashby 培养基上平板划綫法观察其是否生长。

10. 酚的利用：采用 Gray 及 Thornton 二氏^[10]所介紹的培养基(K_2HPO_4 1.0 克, $MgSO_4$ 0.2 克, KNO_3 1.0 克, $CaCl_2$ 0.1 克, $FeCl_3$ 0.02 克, 陈海水 1000.0 毫升, 酚 1.0 克, pH 7.3)以平板划綫及液体培养两种方法观察其是否生长，以确定其是否能利用酚作为碳源。

11. 尿素的利用：采用半固体的尿素琼脂培养基(蛋白胰 1.0 克, 葡萄糖 1.0 克, KH_2PO_4 2.0 克, 陈海水 1000.0 毫升, 琼脂 3.0 克, pH 6.8, 以酚紅为指示剂。以上各种成分溶化后分装于每試管約 4 毫升, 在 15 磅蒸气压力下加热灭菌。20% 尿素溶液是用过滤灭菌的。灭菌的半固体培养基冷却至 50—60℃ 后, 每管加灭菌的 20% 尿素溶液約 0.4 毫升, 混匀、硬化后备用), 以穿刺法观察指示剂顏色是否变碱, 以确定尿素是否被利用。

12. 橡胶的分解：将菌种接入 Новогрудский 氏所介紹的培养基^[6](K_2HPO_4 0.2 克, $MgSO_4$ 0.2 克, NH_4NO_3 2.0 克, 陈海水 1000.0 毫升, 精制橡胶一小片)中。观察橡胶之被破坏与否, 以确定其能否分解橡胶, 观察期間在一个月以上。

二、菌种的鑑定

經過两年来的探索与研究，我們发现該海区涨潮时 2 米深水层有以下几种小球菌。这些小球菌都不能利用酚作为碳源，不产生吲哚，不能运动，不分解橡胶，不能在厌氧条件下生长，不能利用矿質氮($NH_4H_2PO_4$ 或 $NaNO_3$ 等)作为氮源，不能自醋产气，都是 Gram 氏染色阳性。茲将每一菌种的形态、培养及生理生化等特征分別叙述于下：

(一) M5801

細胞球形，大小为 0.4—0.5 μ ，多成双球排列或成不規則的堆团排列，个别成短鏈排列。

海水肉汁平板培养：菌落为圓形，凸圓状，湿润光滑，有光泽，全緣，細粒状构造，出現粉紅色色素。

海水肉汁斜面培养：菌落粉紅色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养：菌落粉紅色。

淀粉琼脂斜面培养：菌落粉紅色。

淡水肉汁培养：不混浊，有少量粉紅色沉淀。

海水肉汁培养:微呈颗粒状混浊,有少量肉红色沉淀。

明胶:不液化。

石蕊牛乳:无变化。

马铃薯斜面:不生长。

硝酸盐:还原成亚硝酸盐。

硫化氢:不产生。

能从葡萄糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸,不能从乳糖、麦芽糖产酸。

淀粉:水解。

Ashby 培养基平板划线培养:不生长。

(二) M 5802

细胞球形,大小为 $0.6-1.0\mu$, 成对或不规则的堆团排列。

海水肉汁平板培养:菌落圆形,红橙色,凸圆状,光滑湿润,有光泽,全缘,内部结构粒状。

海水肉汁斜面培养:菌落颜色红橙色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落粉红色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落粉红色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量淡红色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量淡红色沉淀。

明胶:不液化。

马铃薯斜面:不生长。

石蕊牛乳:没有变化。

硝酸盐:还原为亚硝酸盐。

硫化氢:不产生。

能从葡萄糖、蔗糖产酸;不能自甘油、甘露醇、麦芽糖、乳糖产酸。

淀粉:水解。

Ashby 培养基上划线培养:生长极为微弱。

(三) M 5803

细胞球形,大小为 $0.4-0.7\mu$, 成对,大多数 2 对双球或 2 对双以上双球排列在一起。

海水肉汁平板培养:菌落点状,粉红色,光滑湿润,有光泽,全缘,内部结构粒状。

海水肉汁斜面培养:菌落粉红色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落粉红色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落粉红色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量粉红色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量粉红色沉淀。

明胶:不液化。

马铃薯斜面:不生长。

石蕊牛乳:没有变化。

硝酸盐:还原为亚硝酸盐。

硫化氢: 不产生。

能从葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸; 不能从乳糖产酸。

淀粉: 不水解。

Ashby 培养基平板划线培养: 不生长。

(四) M 5804

细胞球形, 大小为 $0.7-1.1\mu$, 成单球、双球或无定形排列。

海水肉汁平板培养: 菌落为圆形, 橙色, 微微凸起, 光滑湿润, 有光泽, 全缘, 内部结构粒状。

海水肉汁斜面培养: 菌落橙色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养: 菌落为粉红色。

淀粉琼脂斜面: 菌落为粉红色。

海水肉汁培养: 均匀混浊, 有少量浅橙色沉淀。

淡水肉汁培养: 均匀混浊, 有少量浅橙色沉淀。

明胶: 不液化。

石蕊牛乳: 没有变化。

马铃薯斜面: 不生长。

硝酸盐: 还原为亚硝酸盐。

硫化氢: 产生。

能从葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖产酸; 不能从乳糖、甘油产酸。

淀粉: 部分水解。

Ashby 培养基平板划线培养: 不生长。

(五) M 5805

细胞球形, 大小为 $0.7-0.9\mu$, 多成单球及双球排列, 很少成不规则的堆团及短链排列。

海水肉汁平板培养: 菌落为圆形, 凸圆状, 湿润有光泽, 较大集落中央微有放射状皱纹, 全缘, 细粒状构造, 出现橙色色素。

海水肉汁斜面培养: 菌落为橙色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养: 菌落为淡粉红色。

淀粉琼脂斜面培养: 菌落为淡粉红色。

海水肉汁培养: 均匀混浊, 有少量浅橙色沉淀。

淡水肉汁培养: 均匀混浊, 有少量浅橙色沉淀。

明胶: 不液化。

马铃薯斜面: 呈橙色微弱生长。

石蕊牛乳: 变碱, 不凝固, 不液化。

硝酸盐: 还原为亚硝酸盐, 但在试验室内斜面上长期培养保存后便失去此一特性。

硫化氢: 产生。

能从葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖产酸; 不能从乳糖甘油产酸。

淀粉: 部分水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:不生长。

(六) M 5806

細胞球形,大小为 0.7—0.9 μ , 单球,多数成双球及不規則的堆团排列,鮮成短鏈。

海水肉汁平板培养:菌落为圓形,凸圓状,全緣,湿润光滑,有光泽,細粒状构造,出現淡黄色色素。

海水肉汁斜面培养:菌落为淡黄色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落为淡黄色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落淡黄色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

明胶:不液化。

馬鈴薯斜面:黄色的微弱生长。

石蕊牛乳:輕微变碱,不腠化。

尿素的利用:不利用。

硝酸盐:还原成亚硝酸盐。

硫代氢:不产生。

能从葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸,不能从乳糖产酸。

淀粉:不水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:不生长。

(七) M 5807

細胞球形,大小为 0.6—1.0 μ , 成双球或无定形排列,鮮成短鏈。

海水肉汁平板培养:菌落圓形,微微凸起,淡黄色,湿润光滑,有光泽,全緣,有小部分微呈波形,内部結構粒状。

海水肉汁斜面培养:菌落淡黄色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落先无色,后变淡黄色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落浅黄色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量浅黄色沉淀。

明胶:不液化。

馬鈴薯斜面:微弱生长,菌落为黄色。

石蕊牛乳:变硷,但經长期在海水肉汁琼脂斜面移植培养后失去此特性,不腠化。

尿素的利用:能利用。

硝酸盐:还原为亚硝酸盐。

硫代氢:不产生。

能从葡萄糖、麦芽糖、蔗糖产酸,不能从乳糖、甘露醇、甘油产酸。

淀粉:部分水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:生长极为微弱。

(八) M 5808

細胞球形,大小为 0.7—1.0 μ , 单球,多数成双球,不規則的堆团排列,鮮成四球及短鏈排列。

海水肉汁平板培养:菌落为圓形,凸圓状,全緣,光滑湿潤,有光泽,細粒状构造,菌落中部为檸檬黄色,边緣带橙色。

海水肉汁斜面培养:出現檸檬色的生长。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落为橙色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落为橙色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

淡水肉汁培养:肉眼看不到有生长現象,但在試驗室內斜面上长期培养保存后,再至淡水肉汁培养时,微有黄色沉淀出現。

明胶:液化。

馬鈴薯斜面:不生长。

石蕊牛乳:輕微腴化,不凝固。

硝酸盐:还原成亚硝酸盐。

硫代氢:产生。

能从葡萄糖、甘油产酸,不能自乳糖、麦芽糖、甘露醇及蔗糖产酸。

淀粉:部分水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:不生长。

(九) M 5809

細胞球形,大小为 0.7—1.0 μ , 多成单球,双球排列,鮮成不規則的堆团状排列。

海水肉汁平板培养:菌落为圓形,凸圓状,光滑,湿潤,有光泽,全緣或波状边緣,細粒构造,出現淡黄色色素。

海水肉汁斜面培养:菌落为淡黄色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落为淡黄色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落为乳白色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量淡黄色沉淀。

淡水肉汁培养:肉眼看不到有生长現象,但是在試驗室內斜面上长期培养保存后,再至淡水肉汁培养时,微有黄色沉淀出現。

明胶:不液化。

馬鈴薯斜面:不生长。

石蕊牛乳:沒有变化。

硝酸盐:不能还原为亚硝酸盐或氨。

硫代氢:不产生。

不能从葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、甘油、蔗糖产酸。

淀粉:不水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:不生长。

(十) M 5810

細胞球形,大小为 $0.5-0.7\mu$, 成单球,双球或不規則排列。

海水肉汁平板培养:集落圓形,凸圓状,黄色,光滑湿润,有光泽,全緣,内部結構粒状。

海水肉汁斜面培养:呈淡黄色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:呈乳白色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落为白色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量黄色沉淀。

明胶:不液化。

馬鈴薯斜面:生长良好,黄橙色。

石蕊牛乳:变酸。

硝酸盐:不能还原为亚硝酸盐。

硫代氢:产生。

能从葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、果糖、甘油产酸。

淀粉:不水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:不生长。

(十一) M 5811

細胞球形,大小为 $0.6-0.9\mu$, 成单球及双球排列。

海水肉汁平板培养:菌落为点状,凸圓状,光滑,湿润,有光泽,全緣,細粒状构造,乳白色。

海水肉汁斜面培养:菌落乳白色。

海水葡萄糖酵母浸液斜面培养:菌落乳白色。

淀粉琼脂斜面培养:菌落为白色。

海水肉汁培养:均匀混浊,有少量白色沉淀。

淡水肉汁培养:均匀混浊,有少量白色沉淀。

明胶:不液化。

馬鈴薯斜面:生长良好,出現白色。

石蕊牛乳:变酸,凝固。

硝酸盐:不还原为亚硝酸盐。

硫代氢:产生。

不能从葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸。

淀粉:不水解。

Ashby 培养基平板划綫培养:生长微弱。

三、討論和結語

首先需要討論的是:我們所分离得到的菌种是否是真正的海洋細菌?这可以从我們多次的試驗結果来看, M 5808 和 M 5809 两株培养在用淡水配制的肉汁中不生长,从这一个明显的培养特征,便可以完全肯定以上两种是真正的海洋細菌^[14]。虽然由于在實驗室条

件下人工培养基上多次移接长期保存的结果,在淡水配制的培养基上也出现了生长的现象,但是这种生长现象毕竟还是微弱的,只形成少量的沉淀,而与在海水配制的培养基中同时出现均匀混浊及沉淀的生长现象还是不同的。出现这样改变的原因,可能是由于在实验室条件下在人工培养基生长,以及生活环境的改变等等,使其特性发生了改变的结果所致。

其他一些菌种既在海水配制的培养基生长,又能在淡水配制的培养基生长。这些菌种是否是海洋细菌呢?我们认为:在离陆地不十分遥远的海区,由于陆地水不断地流入海洋,自然要有一些在陆地上或淡水中生活的细菌随之带入近陆海区。这些陆地的或淡水中生活的细菌,自然会有一部分因为不适于在新的海洋环境中生活而死亡,当然也会有一部分细菌逐渐地适应于海洋环境而生活繁殖着,遂成为能适应于浅海区的海洋细菌。我们所分离出的一些菌种既能在淡水配制的培养基生长,又能在海水配制的培养基良好地生长,我们认为至少可以说是一些已经能够适应于海洋环境而生活繁殖的海洋细菌了。

菌种的鉴定,主要是根据 Н. А. Красильников 氏的“细菌及放线菌鉴定”^[3]一书所列标准进行的,并参考了 Р. А. Цион 氏的“微生物鉴”^[7]及 R. S. Breed 氏等编的“Bergey 氏细菌鉴定手册”^[8,9]。在定名鉴定过程中,遇到的困难很多,首先是海洋小球菌的变异性较大,例如在细胞的生态排列方面,很不稳定,常常随着培养基成分的不同、培养条件等生活条件的改变而变化,以致在定名鉴定时难于依据比较。更突出的变异是 M 5805 由于在实验室长期保存的结果,将一般认为是比较稳定,通常作为种的鉴定主要特征的生化反应——硝酸盐还原作用——丢失了,如果不事先发现此种现象,就会很错误地将其鉴定为相距甚远的另一个种。因此我们认为:在自然界所分离出来的菌种纯化后,应立即进行各种鉴定反应,不应在实验室条件下人工培养基上长期保藏后再进行各种鉴定反应,这样或可避免由于上述情况使植株本身发生形态的、培养的和生理的特征的某些变异。

植株的颜色经常是细菌鉴定的重要依据,可是此种特征容易发生变化,常常随着培养基成分及培养条件的不同而改变,而且并不是每次都能显示出来。在鉴定书中对所用的培养基又无确切的说明,所指的顏色范围也不够明确,例如,我们用的属内各种检索表,其中有植株染为橙色一项,实际上指的是包括橙、淡红、红等颜色;同时又无适用于细菌的色素色谱可资参考,因而在判断一种颜色时确实不易。

通过实验与观察,我们认为:细菌色素虽然容易发生变化,但还是比较稳定的性质,是一种好的定名鉴定的依据,如果能够系统地加以试验,在各个不同的细菌大类型中,找出几种能使该类型细菌产生色素较好的培养基,以此作为产生色素的标准培养基,并在此类培养基上所产生的色素,作为鉴定的依据;倘若仍有少数植株,在规定的标准培养基上不产生色素,或者所产生色素不够明显,而在另一种培养基上能够产生特征性的色素时,应在后者培养基上所产生的色素作为依据,在鉴定书的记述中,予以确切说明。通过这样不断的试验与改进,最后必能找到几种适合于该类型中大多数细菌产生特征性色素的培养基及培养条件。此外我们还认为应当编制细菌色素的色谱及摄制菌落的彩色图谱,以便鉴定工作者互相参照,这对于促进细菌分类鉴定更快、更好地发展,必将有所裨益。

除了以上所提到的问题以外,我们发现在鉴定方法上也存在着一些问题。例如:在醱类发酵试验中,除因细菌发酵糖类的能力不稳定会得出不同的结果外,由于所用试剂或方

法等的不同,也会得出不同的結果;淀粉水解試驗,將可溶性淀粉的量降低至 0.04%,对于一些水解淀粉能力較弱的植株,容易看出比較清楚的結果;明胶液化試驗,如果采用穿刺方法进行观察,对一些液化明胶能力很弱的植株,液化現象即不明显,或者根本就看不出有液化現象,如果采用 Smith 氏改良法,点种測定明胶液化时,效果即有显著不同,液化現象也就很容易看出;牛乳胰化試驗,如果采用液体培养进行观察,在一些胰化蛋白質能力微弱的細菌,就极难看出胰化作用,倘若采用石蕊牛乳平板点种的方法来观察胰化現象,那就比較明显得多了。在鑑定过程中所采用的方法不同,将会得出不同的結果,比如用的是一种比較古老的方法可能測不出某一植株的某一种生理特征,但是如用比較新的精确的方法即可得出正結果。我們深深感觉到創造适用于細菌的新的标准鑑定方法是必要的,这无论对細菌分类学的发展以及对海洋細菌学更快的发展都是非常必要的。

細菌的种的定义不够明确,沒有通則可循,加上鑑定书內对以往有些种的描述过于簡單,如果根据这些簡單的描述进行定名鑑定,确实困难。此外,从自然界分离出来的菌种,极少或者根本就不可能和鑑定书內描述完全一样;一方面是由于在自然界中找不到二个完全相同的有机体,另一方面是由于我們的菌种的自然生态环境是海洋,而現有的几本分类鑑定书^[3,7,8,9]絕大多数描述的是陆地的或淡水的微生物。肯定地,海洋环境中还存在着許多尚未描述过的菌种,因此,要求从海洋分离出来的菌种的特征与鑑定书中描述的完全相同将是很少可能,或者是不可能的。

在我們短短两年从事于海洋小球菌的鑑定工作中,感觉到手边現有的几本鑑定书^[3,7,8,9]都是不完善的,有的同一个菌种,在不同鑑定书中的描述亦不相同。由 Breed 氏等編的,而通用于国际間的“Bergey 氏細菌鑑定手册”,每一新版鑑定书的内容就有很大的改变^[8,9],这使一般的細菌鑑定工作者,不易掌握。不完善的原因除了上面我們在小球菌的鑑定过程中所遇到的实际問題尚未得到解决外,当然也由于从事細菌鑑定研究工作的人員很少,对細菌分类各方面的知識不够完善等原因所致。在細菌分类鑑定尚不完善的情况下,要把我們从海洋分离出来的某些菌种,硬性地塞进現有的絕大部分是描述陆地的或淡水的鑑定书^[3,7,8,9]的种內,是不科学的,也是不可能的。因此,我們根据苏联海洋微生物学家 A. E. Крисс 氏对海洋細菌定名鑑定的方法^[5],那就是細菌的主要特征与鑑定书中所描述的基本种一致时便隶属于此种或此种之系(菌株)的方法,我們把所分离的純种定名如下:

- M-5801 = 丹砂色小球菌——A 系 (*Micrococcus cinnabarens* Flügge-Strain A.)
- M 5802 = 丹砂色小球菌——B 系 (*Micrococcus cinnabarens* Flügge-Strain B.)
- M 5803 = 丹砂色小球菌——C 系 (*Micrococcus cinnabarens* Flügge-Strain C.)
- M 5804 = 丹砂色小球菌——D 系 (*Micrococcus cinnabarens* Flügge-Strain D.)
- M 5805 = 丹砂色小球菌——E 系 (*Micrococcus cinnabarens* Flügge-Strain E.)
- M 5806 = 硫色小球菌——A 系 (*Micrococcus sulfureus* Zimmermann-Strain A.)
- M 5807 = 硫色小球菌——B 系 (*Micrococcus sulfureus* Zimmerman-Strain B.)
- M 5808 = 檸檬黃小球菌海洋变种 (*Micrococcus citreus* Migula var. *marinus* n. var.)
- M 5809 = 李氏小球菌海洋变种 (*Micrococcus ridleyi* Corbert var. *marinus* n. var.)
- M 5810 = 李氏小球菌海洋变种——A 系 (*Micrococcus ridleyi* Corbert-Strain A.)

M 5811 = 純白小球菌 (*Micrococcus candidus* Cohn.)

我們認為, 海洋細菌是一個種類繁多、數量龐大的微生物羣。現在對於它們的研究、了解、認識還是處於比較年輕的階段, 因此在進行工作時, 完全搬用陸地的或淡水的細菌研究方法, 而不加以適當的改進或創造新的適用於海洋細菌的研究方法來進行研究, 是不能成功的。現有的海洋微生物研究方法的微小成就遠遠不能滿足於進行海洋微生物研究的需要, 因此在工作中改進舊的方法和制定新的方法是海洋微生物學的主要任務之一^[4]。

參 考 文 獻

- [1] 中村浩, 1945: 發光微生物, 日本岩波書店, 197 頁。
- [2] Калиненко Н. А. и Мефедова Н. А., 1956: Бактериальное обрастание подводных частей корабля. *Микробиол.* 25 (2): 191—194.
- [3] Красильников, Н. А., 1949: Определитель Бактерий и Актиномицетов, 1—830, Издательство Академии Наук СССР, Москва-Ленинград.
- [4] Крисс, А. Е., 1954: Основные Задачи Морской и Океанической Микробиологии. Вестник Академии Наук СССР, 8: 22—34.
- [5] Крисс, А. Е., 1959: Морская Микробиология (Глубководная), 1—455, Издательство Академии Наук СССР, Москва.
- [6] Новогрудский, Д., 1932: О Бактериальном разрушении каучука. *Микробиол.*, 1 (4): 413—420.
- [7] Ципон, Р. А., 1948: Определитель Микробов, 1—484, ОГИЗ-СЕЛЬХОЗГИЗ, Москва.
- [8] Breed, R. S. et al; 1948: Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed. pp. I—XVI, 1—1529. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- [9] Breed, R. S. et al; 1957: Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. pp. 1—1094, Bailliere, Tindal & Cox, LTD., London.
- [10] Cray, P. A. and Thornton, H. C.; 1928: Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. *Zit. f. Bakt.*, II, Bd. 73, S. 74—96.
- [11] Pelczar, M. J., et al; 1957: Manual of microbiological Method. pp. 1—315. McGRAW-HILL Book Co., New York.
- [12] Wood, E. J. Ferguson, 1952: The Micrococci in a marine environment. *J. Gen. Microbiol.*, 6: 205—210.
- [13] Zobell, C. E. and Beckwith, Josephine D., 1944: The deterioration of rubber products by microorganisms. *Jour. Amer. Water Works Assoc.*, 36: 439—453.
- [14] Zobell, C. E., and Upham, H. C., 1944: A list of marine bacteria including Description of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, 5: 239—292.
- [15] Zobell, C. E., 1946: Marine Microbiology, PP. 1—240. The Chronic Botanica Co., Waltham, Mass.

STUDIES ON MARINE MICROCOCCI FROM KIAOCHOW BAY

T. Y. HSUEH, K. Y. SUN AND M. L. DING

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica and College of Oceanology of Shantung*)

(SUMMARY)

Eleven species and strains of marine *Micrococcus* have been isolated and cultivated in our laboratory from the inflowing water at high tide two meters below sea surface collected at the mouth of Kiaochow bay. The pure cultures are:

- Micrococcus cinnabarens* Flügge—Strain A.
- Micrococcus cinnabarens* Flügge—Strain B.
- Micrococcus cinnabarens* Flügge—Strain C.
- Micrococcus cinnabarens* Flügge—Strain D.
- Micrococcus cinnabarens* Flügge—Strain E.
- Micrococcus sulfureus* Zimmerman—Strain A.
- Micrococcus sulfureus* Zimmerman—Strain B.
- Micrococcus citreus* Migula var. *marinus* n. var.
- Micrococcus ridleyi* Corbert var. *marinus* n. var.
- Micrococcus ridleyi* Corbert—Strain A.
- Micrococcus candidus* Cohn.

New microbiological methods adapted to the studies of marine bacteria have been tried and the problems encountered in the determination and classification of marine *Micrococcus* discussed.