

• SUM UP •

当前海洋微生物研究中的几个重要方面*

孙国玉

陈世阳

王文兴

(中国科学院海洋研究所)

(山东海洋学院)

(国家海洋局第一海洋研究所)

海洋微生物学和其他学科一样,随着科学和技术的发展而发展。本文试图结合我国的具体情况,提出海洋微生物研究中的几个重要方面。

生态调查是海洋微生物学的一项基本工作。目前调查海域中细菌总量所用的方法主要是平皿培养法、直接镜检法、稀释计数(MPN)法及超滤膜萌发计数法等,但各有优缺点。比如,超滤膜萌发法不受琼脂凝固点 42°C 的影响,能收集到比平皿培养法多得多的菌种;缺点是,在过滤几十毫升水样时,其中的微生物集聚到一个较小面积(直径35毫米)的滤膜上,就有可能几个细菌聚集成一块,生长成一个菌落,也可能有的细菌被抽滤到滤膜的孔隙中,甚至滤膜本身还有杀菌作用。因此在滤膜上长出的菌落数目往往只是实际菌数的 $1/50-1/5$ 。直接镜检法不可避免地将活菌、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,得出的细菌数目可以比平皿培养法多1000倍以上。因此探索比较正确而简便的计算菌数的方法,对确定细菌的种类、数量、随环境因素的变化,以及细菌在海洋现场的增殖率和估计细菌的生产量等,都具有实际意义。对那些用培养方法检查不出来的微生物群,探讨出一种行之有效的调查方法更有必要。

确定微生物群体的数量,可作判断它们矿化有机物质的参考。一般说来,一个细菌构成菌体需要的能,大约等于其体重四倍的有机物

质分解释放的能。但现有的测定微生物生理类群的方法,所得菌数比实际数量要少,不适于计算绝对数量,只适用于对微生物转化物质强度的相对估计,并且在只有差异十分大的条件下才可以作出这种估计^[2]。

在调查研究工作中,采样是关键的第一步。采样方法不准确,以后的试验结果就不可靠。30年代ZoBell氏使用的J-Z式采水器,后来改进为ORIT式采水器,水样瓶为一个或两个橡皮球,采深水样时,虽不像J-Z式采水器有被压碎之虞,但不易洗涤洁净,因此所采得的水样不是直接镜检的理想材料;国外近来广泛使用Niskin采水器,特别是在采大量水样时较为理想。苏联远洋调查及我国50年代进行的近海调查都是用Nansen(颠倒)采水器^[1],到近80年代的调查^[5]仍然有人使用颠倒采水器。颠倒采水器不能预先灭菌,沾附的微生物在浅水层得不到充分的冲刷,污染率极大,不宜用于海洋微生物的调查,特别不宜用于近海微生物的研究。

我国常用曙光(HNM₁₋₂)采泥器,柱状采样管或箱式底质取样器。在调查船上的试验室内,从采上来的大块原状底质样品内,无菌地采取微生物样品。用开放式的、污染率极大的底栖生物采泥器采得的底质样品,进行微生物学研究,所得结果是不准确的。

采用微孔(Nuclepore)多糖成分透明的滤膜,用荧光显微镜或相差显微镜等提高直接

* 本文承山东海洋学院薛廷跃教授审阅并提出修改意见,致谢。

镜检的分辨率,用活体染色法分辨死活细胞对细菌进行直接计数,足见采用适于海洋微生物学研究用的新仪器及新技术,改进现在的调查方法,乃是当代海洋微生物学研究工作中一个重要方面。

二

调查中收集到的一些菌种,有些是进入海洋的陆栖菌,它们进入海洋后的命运如何?陆栖细菌进入海洋中的消失机理,即稀释,凝集沉淀,毒素物质的影响,捕食生物的存在和饥饿等因素中,哪些因素是最主要的?需要搞清楚。

什么是海洋细菌?迄今尚无确切的定义及简便可行的鉴别法。如用下列四种细菌,即淡水(陆地)细菌、*Vibrio cholerae* 发光型(分离自易北河的菌株)、嗜盐菌、发光细菌,进行平行的比较研究,或可找出它们之间的本质差别。

不能用鉴定陆生细菌的方法鉴定海洋细菌,如对温度敏感的海洋种类,在25℃以上时便被杀死。典型的海洋细菌要在含有Na⁺, K⁺, Mg⁺等35‰盐度的培养基中才能良好生长,在37℃不能生长。它们的某些生理特征在培养过程中也容易消失。生物发光是鉴定发光细菌的主要根据,如果不发光了,根据这类细菌的其他特征来鉴定时,便容易得出错误的鉴定结果。有的海洋细菌调查报告中^[11],未报道有发光细菌,就是事先未重视生物发光现象,在保藏、移种、试验过程中丢失了发光特征,错误地鉴定为其他属了。有的报告中报道,“在调查区内还偶尔发现发光细菌……”,

“未做鉴定”^[5]。众所周知,发光细菌是典型的海洋细菌^[7],是海洋中普遍而终年存在的异养菌,有时引起海洋发光。在东海大陆架各站位的水样中,发光细菌的出现频率为0—9.2%,泥样中的发光细菌为0—6.3%。根据其形态特征,生长温度和几个生化反应等很容易地鉴定到属。何以“偶尔发现”,“未做鉴定”。

在浩瀚的海洋里,生活着千百种微生物,但是由于对它们的分离、培养方法等研究还不深入,目前所知者仅为很少的一部分。通过初步的调查研究,已有一些新的发现,如固氮菌的新变种^[3],亮发菌(*Leucothrix*),突起丝菌(*Prosthecochloris*),副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等都发现于海洋环境中。因此对海洋微生物种类的进一步调查,将有更多的新发现;除了积累新的资料逐步使目前尚属人为的分类系统(如细菌分类)逐渐接近于自然分类系统外,还会提供有经济价值的新菌种。

三

海洋微生物的调查必须保证与海洋学的其他学科,如水文、化学、生物等结合进行;把观测的资料进行比较分析,才能得出比较符合实际情况的结论。图1是用直接镜检法得到的河流对黑海西北部微生物总体水平分布的影响图。总的趋势是黑海西北部德聂伯—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1.5—2.5倍,一般认为是因多瑙河的有机物质浓度比德涅斯特河及德聂伯河少1.5倍所致。但是进一步的研究指出,德涅斯特河每年流入黑海的水量为8.3立方千米,德聂伯河与布格河为54.7立方千米,多瑙河则多达203立方千米;三条河流入黑海的水量虽比多瑙河流入的水量少得多,但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(8.53毫克/升)高以外,还因为多瑙河流入黑海中的水汇入总的环流,向南流去,减弱了对河口区域的影响,所以多瑙河口对面水域中细菌的密度比德聂伯—布格湾和德涅斯特河口对面一带少1.5—2.5倍。足见,只根据偶然性的海上调查,或只在海面个别工作站,得到的海洋微生物调查资料绘制成的调查图表只能解释调查时瞬间情况^[2]。又如在黑海进行的微生物调查中,发现在H₂S水层生活着大量依靠光能来同化CO₂的紫硫菌。Крисс认为,黑海H₂S

水层透射进去的光线极其微弱，在其中生活的紫硫菌，应当有还原 CO_2 所必需的、与光合作用和化能合成作用类似的能源，可以称之为放射能合成作用 (Radiosynthesis)^[11]。

我们用纤细红硫菌 (*Chromatium gracile*) 为材料^[10]，用 ^{32}P 进行了近一个月的实验，证实紫硫菌不能利用放射能来进行合成作用。

黑海 H_2S 水层生活着大量的紫硫菌是无可置疑的事实。那么它们在 H_2S 水层怎样生活着的呢？我们根据实验认为，黑海具有如下特点。

1. 黑海中有水团的垂直混合作用 (图2)^[11]。这就使 H_2S 带和光照带之间有水团交换。

2. 黑海水中含有微量的有机物质^[11]。由于水团的垂直混合作用，将黑海 H_2S 水层中的紫硫菌带到了光照层，在适当厌氧及光强条件下便迅速的繁殖，在体内积累了丰富的营养物质，尔后因水团的垂直混合作用，再回到厌氧的 H_2S 水层生活。

紫硫菌中有些种是兼性营养型。黑海 H_2S 水层生活着的紫硫菌在获得适当的厌氧与光强条件，便营自养生活，在厌氧条件下，光强不足或极其微弱时便进行兼性营养型生活。

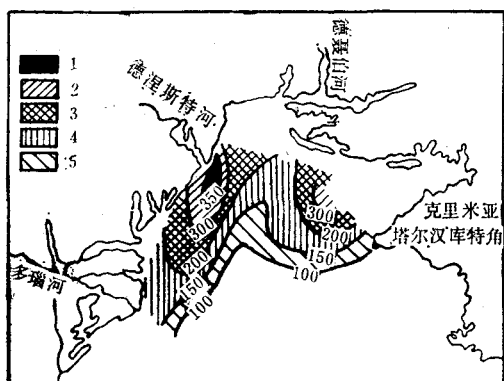


图1 河流对黑海西北部微生物数量分布的影响

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

日高和坂井二氏主要以耐盐度为标准，将海洋中的细菌区分为海洋型细菌、嗜盐型细菌和陆地型细菌。将调查收集到的菌种进行一次鉴别，再与调查的盐度资料相互参照，对估计某一海域受陆源侵染的范围、距离、程度等有一定的指示作用。

生活在大洋中的细菌90%以上是 G^- 菌。将在不同海区不同站位收集到的菌种进行革兰氏染色反应的统计，参照同时进行调查的盐度等资料，找出 G^- 菌与 G^+ 菌的相互消长关系，也可以粗略地估计某海域受陆源影响的程度。

利用微生物的特殊形态，可以指示水文学的某些现象，如蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) 在固体培养基上形成特殊形态的菌落可以很容易鉴别出这种在土壤中广泛分布的细菌。依萨琴柯推测，鄂比—叶尼塞河水的某些水域内发现了蕈状芽孢杆菌，并认为鄂比—叶尼塞河的水可能达到东经 92° — 93° 后便转而向北，因为向东直到维尔克茨基海峡就观察不到蕈状芽孢杆菌了^[11]。

利用发光细菌的发光特征可以测定抗生素的效价及检测残存的某些微量毒性物质。

有一些形态异常的微生物广泛地分布在大洋中，而另一些的分布区则较狭。海洋微生物学中的水文学方向目前还处于发展的阶段，但

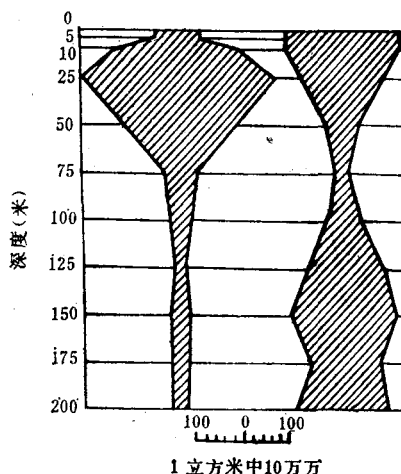


图2 黑海沿岸观测站上微生物密度的垂直分布

左边夏天，右边冬天，用微生物指示水团的垂直混合作用。

是在分布上适应于一定成分的水的、极易识别的微生物类型(如丝状类型),则可以用来指示水团的起源,以及用来对由于各种原因引起的水团交换进行数量鉴定。

在大西洋中,表层洋流边界上细菌的数量大大地增加;可能是由于在大洋流的边缘上积聚有大量死亡的浮游生物尸骸和有机物质的缘故。

在巴伦支海,在暖的大西洋水和该海的冷水的交接处,细菌含量增加。可能是由于对生活条件变化敏感的浮游生物在该处死亡,而引起细菌积聚现象。

在淡水与海水的辐合带及在离河口的一定距离处,发现微生物的数量很高。

由上得知,不仅在暖流和冷流交接处产生大的温度梯度,而且由于来源不同的水的混合,盐度降低,都决定着各种水团的辐合区中微生物数量有所增加。不同密度的水的混合造成界面,由于吸附现象或其他原因,有机物质发生很大的积聚,细菌大量地繁育。

在温跃层中能观察到微生物数量剧增。因温暖的表层水和冷的深层水之间的这一边界层中造成的密度梯度,引起微生物生命活动所需有机物质的一定积聚,因而微生物能较强烈的繁殖。

根据微生物密度的变化,可以指示某些水文现象——来源不同的水团的辐合带(水流的边界和河水与海水的混合区)以及温跃层。用现有的方法测定海洋水中的微生物数量,便可揭示因上述水文学原因给微生物的细胞密度在分布上造成的差别。

在微生物数量分布发生反常现象的一些水域内,其温度梯度以及盐度的变化是很大的。在暖流与寒流之间,在温跃层的水域之内,温度差别达到好几度;在河水与海水的“锋面”区域,盐度降低也是很显著的。

利用细菌学方法的灵敏度,并利用这种方法来查明海洋水团结构中微弱的异相性变化的可能性,是具有很大意义的。

综上所述,与海洋的变化环境相适应,海

洋细菌菌株有哪些变化,不同水团和细菌菌株之间有无关系等,都是值得研究的

四

在自然条件下,海洋生物病害尚未引起人们足够的重视。近年来,随着我国大规模地开展海产经济动植物养殖事业的发展,病害给生产上带来的损失也与日俱增,对养殖生物的病害的研究才逐步开始。如对我国养殖的海带发生的叶卷病,首先进行了细菌、真菌的分离、培养及感染试验,证实它不是上述微生物所引起的。以后进行了超显微镜微生物的研究^[1]。从症状明显典型的病海带中提取到类菌原体(MLB或MLO);超薄切片中也观察到了这种MLB;还证明四环素族抗菌素有明显抑制发病的作用,但尚未按照Koch原则确证海带叶卷病MLB的病原性。

生产上以通流透光、合理密植、增加藻体抗病能力、采取“四个加大一个浅”(即加大排距、筏距、苗绳距、苗距和浅水层培育)的养殖方法,可使发病率有所降低。

表面健康的大连种海带,其幼苗及游孢子的组织或提取液中都可观察到MLB,是带菌者,或可传染叶卷病。因此从未发过病的海区选用种海带采孢子,是防止叶卷病的一项措施。至于1974年大连沿海养殖的海带大面积发病,病原体从何而来?今后还能否突然性的大面积感染?如何预防?还有待深入研究。

海带幼藻体病烂的原因是复杂的,各报告中报道缺肥;光强、光照不适当; H_2S 的毒害作用;射线的作用;附着基质处理不净,渗出之有毒物质的作用;水质被污染;褐藻酸降解菌的作用^[1];孢子成熟不佳;及孢子囊成熟期

1) 中国科学院海洋研究所、福建省三沙育苗室(执笔人陈驹),1981。褐藻酸降解菌研究Ⅲ。海带育苗系统中脱苗烂苗的原因分析及预防措施1—19页(文稿于1981年7月在山东省微生物学会年会基础微生物组上宣读,以及1981年11月在成都召开的第二次全国藻类学术讨论会上宣读)。

的海面水温升高等都有关系。病征是细胞肿大、畸形、腐烂、脱落。上述几种病害²⁾是否为同病异名，同一种病的不同阶段，或病状的形态变异等都值得进一步的研究探讨。此外，紫菜的红腐病，已知为腐霉菌 (*Pythium porphyrae*) 所引起的。其他的病害尚急待研究。

当前，鱼、虾、海参及贝类等病害也很严重；从卵、幼体到成体不同发育阶段都发生各种微生物所引起的病害；鱼、虾的卵常被水霉菌 (*Saprolegnia*) 及链壶菌 (*Lagenidium*) 等真菌寄生引起大量死亡。其他还有已知的弧菌、丝状菌及病毒性病害等，如“黑死病”、“斑点病”、“水肿病”等，至今病因不明。今后随着鱼、虾、贝、藻养殖事业的发展，必然发生更多的病害。因此开展养殖生物病害的研究也是我国海洋微生物学的一个重要方面。

在海产鱼、贝类及浮游生物体表面及消化道中的菌群组成已有不少报告，为海产品的防腐保鲜提供了依据。但是在海藻微生物区系是否与前者相同？尚待进一步研究。海水中的细菌菌株和生物体上的菌株有何相互关系？相互差异？哪些微生物是致病菌？浮游生物是否又会受到细菌、酵母菌及霉菌等的感染？对海洋中那种作用巨大的生物学过程（如浮游动物的昼夜移栖和浮游植物的“开花”有关的微生物群落的动态）进行研究，对于浮游生物学具有一定的意义。在鱼、贝类的大量死亡中，病原菌所起的作用如何？大洋性洄游的鱼类及鱼卵等是否受细菌感染？在不受污染的海域中，藻类是否也发生病害？在海洋环境中，哪些固氮微生物活性最大？有无与海藻共生的固氮微生物存在？在生产上应用的意义如何？都是值得研究的课题。

当泥团通过沙蚕 (*Neries succinea*) 的消化道时，其中微生物约有一半被消化，于是形成了微生物-沙蚕-鱼的食物链；在鱼类发育的早期阶段，细菌、酵母等可直接成为幼鱼的饵料。沉没在海里的木材、绳索、电缆及网具等，上面有大量的真菌、细菌等繁殖，引起腐

烂。因此，开展海洋真菌类（海洋霉菌、酵母菌等）的研究，具有经济意义。

五

微生物对海水中金属和混凝土建筑物的腐蚀，以及舰船水下部分和利用海水工业的机械设施上的附着物的作用如何？急待解决。有的试验认为，微生物（特别是细菌——抗毒菌等）首先附着到吃水部分的表面上形成一层起隔绝作用的菌膜，而后其他大型生物附着上去；另外的试验则认为，形成的菌膜有阻止其他生物附生的作用。

海洋具有高压的生态特点。深海底部压力可以高达1200个大气压。在大洋底质中生活了亿万年的微生物群落中，是否存在着嗜压微生物，一直是海洋微生物学工作者注意的课题。Zobell氏的调查研究认为大洋底质中生活着嗜压微生物，压力影响着它们的生存、繁殖和生理活动。Крисс的调查研究指出，在自然界中广泛分布着能在高压条件下繁殖的微生物，它们不仅生活在高达数百个大气压的海洋底质中，而且在陆地土壤的表层也有发现^[11]。

近来的研究指出，将采自大洋深处的细菌，分别培养在一个大气压下和放回原来采样的海底培养，结果未看出有明显的不同。但也有人证明岸上的食物沉于4000米的深海底可以长期不腐。在海洋中是否有专性嗜压菌？在进行嗜压微生物的试验时，应考虑到恒压转移问题。众所周知，高压在改变反应的速度及方向中起重要的作用；详细研究嗜压微生物的数量、种的组成及生理学是很有必要的。

超显微镜微生物的研究发现，在海带叶卷病的病变组织中有类菌原体。海藻是否受病毒感染？原因是什么？沿岸水域中除发现有肠道族细菌的噬菌体外，在外海亦发现有发光细菌的噬菌体，它们对限制海洋细菌的生长，对沿岸带污水起的净化作用及生态学上的意义如

2) 孙国玉、陈世阳，1983。养殖海带的病害。海水养殖1:19—25。

何?也有待研究^[6]。海马瘤肿伴同一种纤毛尾丝藻(*Uronema*)中存在有病毒;海洋鱼类所患的淋巴囊肿病(Lymphocystis)是由病毒所引起的。对海洋中大量微生物类型的生物学研究又是海洋微生物学的另一方面。

微生物参与地球上所有物质的转化,试验室里新合成的地球上未曾有过的物质投放到自然界中后,很快的便有一种甚至几种微生物参与其转化。在沿岸、水层及底质中,微生物直接参与碳、氮、硫^[8]、铁、锰、钙、铬^[4]等的循环;并能浓缩铁、锰、镍、钴、锑、钒、碘、汞、及镉等;也积极参与成岩作用;分解流入海洋中的农药、PCB、合成洗涤剂及石油等;分解海洋生物的尸体等。研究这些微生物类型的数量及其活动性,也是海洋微生物学的重要工作。

参 考 文 献

- (1) 王祈楷、徐绍华、刘如臻、乔宝义、张佐芳、孙国玉, 1980. 海带叶卷病的研究——病原体的电子显微镜检查。中国科学

6:581—591。

- (2) 孙国玉, 1980. 海洋微生物生态调查的若干问题。海洋科学4:48—51。
 (3) 陈世阳等, 1962. 从海洋中分离的一个固氮菌新变种。微生物学报8(4):459—460。
 (4) 沈世泽、孙国玉, 1983. 含铬废水的微生物净化实验。海洋科学2:22—24。
 (5) 陈弱等, 1982. 东海大陆架异养细菌的生态分布。海洋科学集刊19:1—9。
 (6) 薛廷耀, 1962. 海洋细菌学。科学出版社。
 (7) —, 1964. 海洋生物发光的比较生化。海洋与湖沼6(4):423—432。
 (8) —, 孙国玉、丁美丽, 1959. 海泥中硫杆菌的分离培养研究。海洋与湖沼2(2):75—81。
 (9) —, —, —, 1960. 胶州湾小球菌的研究。海洋与湖沼3(1):1—12。
 (10) —, —, —, 1963. 厌氧光合作用硫细菌的研究 I. 红硫菌的分离及培养。微生物学报9(1):362—366。
 (11) Крисс, А. Е., 1959. 海洋微生物学((深海), 孙国玉等译, 1964.)。科学出版社, 第5—18页。
 (12) Крисс, А. Е., 1954. 海洋微生物学的主要任务(孙国玉译, 1958.)。海洋与湖沼1(3):337—343。