

# 海洋微生物学

\* 深海 \*

A.E. 克里斯 著

科学出版社

# 海洋微生物学

\* 深海 \*

A. E. 克里斯 著

孙国玉 李世珍 译

刘 贵 贤 校

科学出版社

1964

A. E. КРИСС  
МОРСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ  
(ГЛУБОКОВОДНАЯ)

Изд. АН СССР, 1959, Москва

內 容 簡 介

本书共分九章,第一章阐述深水微生物的研究方法,第二章讨论海洋中异养微生物的数量分布,第三章描述了海洋微生物的种的组成,约占全书的四分之一,第四章为海洋微生物的生化活动的讨论,第五章研究海洋微生物总量及其生物量,第六章是海洋微生物的形态特征,第七章详细阐明了海洋中微生物繁殖的速度,第八章讨论了微生物和海的生物学生产力问题,第九章,即最后一章,研究了微生物作为海洋中水文学现象的指示菌。

本书不是一般性的综述,而是作者结合自己的调查研究工作写成的一本专著。其中对于几乎有关整个世界海洋,包括太平洋、印度洋、大西洋、北极和南极的洋面到洋底的细菌生存情况的考察结果进行了分析研究,阐明了海洋深处的有机和无机化合物的变化过程,海洋微生物学在生产实践中的应用及与其他学科的相互关系。

本书可作大专院校有关系科的教学参考书,并供生物学、地质学、海洋学、养殖学、海洋化学及医学卫生科学工作者参考。

全部译稿均经薛廷耀教授审阅。施正铨先生校对第九章。

海 洋 微 生 物 学

· 深海 ·

A. E. 克 里 斯 著  
孙国玉 李世珍 译  
刘 贵 贤 校

\*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门大街 117 号

北京市书刊出版业营业许可证出字第 061 号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\*

1964 年 10 月 第 一 版 开本: 787 × 1092 1/18

1964 年 10 月 第 一 次 印 刷 印张: 23 1/3

精装: 1—1, 100 插页: 26

平装: 1—800 字数: 590,000

统一书号: 13031 · 1973

本社书号: 3036 · 13—4

定价: [科七] 精装本 5.30 元  
平装本 4.60 元

# 目 录

引言	1
第一章 深水微生物学的研究方法	5
取样方法	5
超滤膜上的微生物萌发法	6
直接镜检研究法	13
超滤膜的应用	13
附生玻片法	17
底质的直接镜检研究	18
第二章 海洋深水层中异养微生物的数量分布(在试验室的培养基上生长的种类)	19
海洋深水区域的微生物数量	19
鄂霍次克海和太平洋西北部	23
太平洋的中部区域	28
印度洋	30
北冰洋	31
格陵兰海	34
黑海	37
海洋中微生物分布的微带性	39
深水底沉积物中异养微生物的数量	47
海洋深处酵母菌的数量	66
微生物能否利用海洋深处分布的稳定的有机物?	75
高压下繁殖的微生物	87
嗜压微生物	88
耐压微生物	96
第三章 海洋微生物的种的组成	101
球菌类型	105
球菌的种	105
无芽孢杆菌	121
无芽孢杆菌的种	121
芽孢杆菌	155
芽孢杆菌的种	155
分枝杆菌	173
分枝杆菌的种	175
放线菌	180
放线菌的种	181

酵母菌	183
酵母菌的种	183
自黑海分离的微生物类型在厌氧生活条件下的发育能力	207
个别海洋微生物种的分布	209
球菌类型	209
分枝杆菌	210
无芽孢杆菌	211
芽孢杆菌	212
放线菌	213
酵母菌	213
酵母菌是否是海中栖息的微生物?	213
第四章 海洋微生物的生化活动	218
黑海中的几丁质分解菌	220
黑海深处氨与氮积聚的原因	221
黑海中硫化氢的起源	229
关于黑海深处硫酸盐含量与硫化氢浓度之间的依存关系	229
关于黑海水层中硫化氢的起源	233
黑海海底形成硫化氢的微生物学过程的活动性	236
黑海深水区域中的氧化过程	241
黑海含硫化氢深层中的紫色硫细菌	245
海洋深处的噬菌体	251
第五章 海洋中微生物的总量及其生物量	255
深水区域水层中的微生物	255
黑海	256
黑海中微生物分布的生态学规律	262
微生物的分布与离陆地距离的关系	262
河流对微生物分布的影响	263
氧气带微生物密度的垂直分布	267
浮游生物与微生物的分布	268
微生物数量在昼夜不同时间的变化	271
微生物数量的季节性变化	273
微生物分布的地理因素	273
阳光与微生物数量的分布	274
氧气与微生物数量的分布	276
硫化氢带是微生物的生态学场所	278
里海	281
太平洋	292
北冰洋(北极区域内)	297
深水区域底质中的微生物	300

微生物在海洋不同深度的数量和生物量·····	308
第六章 海洋微生物的形态学特征·····	311
在海洋各深度处发现的微生物新綱·····	314
发现的方法·····	325
形态学·····	325
分布·····	336
分类地位·····	340
在海洋各深度处发现的超显微镜生成物·····	348
第七章 海洋中微生物的繁殖速度·····	351
测定微生物繁殖速度的方法·····	352
定居在载玻片上的微生物的数量昼夜变化过程·····	357
载玻片上細菌微菌落的形成及其数量組成的昼夜变化·····	359
海洋中微生物的繁殖速度·····	362
北极区域的大洋中微生物的繁殖速度·····	364
海洋中微生物昼夜生产量的大小·····	368
第八章 微生物和海的生物学生产力·····	370
微生物在黑海生物学生产力中的作用·····	370
黑海中的“尸体雨”·····	373
黑海硫化氢区域的底部死的有机物质的命运·····	378
海域內有机物质受微生物矿化作用过程的强度·····	382
第九章 微生物是海洋中水文学现象的指示菌·····	386
用微生物学方法指示印度洋中的深水环流·····	392
太平洋中部的水团分布(根据微生物学资料)·····	402
深水海洋微生物学的当前任务·····	406
附录·····	409
表 112—118	
太平洋中部区域不同深度的异养微生物数目·····	411
表 119—124	
印度洋不同深度的异养微生物数目·····	418
表 125—126	
格陵兰海中微生物不同分类类羣的分布及其数量·····	426
参考文献·····	430
人名对照表·····	449
地名对照表·····	452
微生物中名索引·····	454
微生物学名索引·····	456

# 引 言

海是微生物栖息的特殊环境。特殊的盐类成分,低温,高压,低浓度的有机物质,植物及动物区系的稀少等构成了微生物生命活动的广阔海洋区域的一些主要生态特征。

海洋中最初的微生物学研究,早在上一世纪就已经进行了,但是它们局限于较狭小的任务——确定细菌在海洋中的存在及其组成。而 B. Л. 依薩琴柯的著作“北冰洋细菌的研究”,奠定了阐明微生物在世界大洋的水团内物质循环过程中作用的基础。该著作是在 1908 年完成的,但是直到 1914 年才出版。这篇包括有关海区中微生物活动多方面资料的专论,确定了多年来海洋微生物学的研究方向并使海洋微生物学发展成独立的科学部门。

目前这门学科已拥有大量的实际资料,而且我国的研究工作在海洋微生物学知识的进展中,占有卓越的地位。许多微生物学考查队曾调查过祖国东、南、西、北沿岸的全部海洋。

目前可以看出海洋微生物学的研究发展得极其迅速,这不仅是由于微生物学家的注意,而且也是由于研究海洋中物理、物理化学、化学及生物学等现象的邻近科学部门的需要。许多从事水生生物学、水化学、海洋地质学甚至水文学工作的科学家们也都认识到微生物学资料在阐明海洋中进行的过程的实质和原因有着重要的意义。

在海洋水生产力问题的研究中,海洋微生物学占有特殊的和极为重要的地位。由于分布在水层中及密布于海底表面的微生物具有强烈而复杂的酶促活动,因而成为构成生源物质循环主要环节的反应的生物催化者。它们在有机物质的转化及形成过程中具有显著的作用。微生物破坏着死的有机物质并由此再产生水生植物发育所必需的无机化合物,因而保证着水生植物的增殖。但这不是在海洋中制造有机物质的唯一途径,因为也有一些微生物,能借助于光能(也可能是放射性衰变能)或化学物质氧化能来同化二氧化碳,建造自己的身体。

由无机化合物产生的、呈植物及微生物细胞状态的有机物质经过营养链进入到各种转化的循环内,使得经济上重要的水生动物种类繁殖起来。

无论在陆地上抑或在世界大洋内,要估计有机物质巨大变态过程以及有机物质由矿物质恢复的过程的数量变化及动态,不考虑微生物活群体的量及其所进行的决定着生源元素循环的破坏性及创造性的活动是不可能的。当然,这种数量计算应该建立在微生物和其周围的其他生物类型及无生命界的相互关系的生态学研究基础上。只有这样的研究,才可能阐明以微生物生物量分布为基础的并决定着自然界中微生物学过程强度的那些规律。

如果要说明近年来海洋微生物学发展的一般特征,就应注意两种情况:第一,

已进行的一些工作，主要是在沿岸区域及海洋的表层，深水研究的比重很小。实际上，海洋微生物学还仅处于发展的开始阶段，因而落后于海洋学的所有其他部門。

第二，研究工作主要是根据所谓的培养法，这只能相对准确地断定能在与自然条件很不相同的实验室环境內人工培养基上繁殖的种类不多的海洋微生物。因而实际上缺乏有关海域中微生物的数目及生物量和它们的垂直及水平分布规律的資料。

只有最近才广泛地推广了显微镜直接检查法，这种方法的发现与应用是我国科学工作者們的功績。这种方法能相当准确地测定棲居于海洋中的微生物类型的数目及其形态的多样性，因而，更有根据来解决有关物理、化学及生物学因素对海洋微生物影响的許多問題。

直接鏡检法的准确度还不够完善，因为判断一些微小的細菌細胞与死亡的微生物还有困难。但是在目前这种方法比微生物学、水生生物学及魚类学中应用的其他計数法是准确得多了。

自苏联科学院微生物研究所在不同海洋深水区域进行微生物学研究时起已有12年了。这些研究工作开始于1946年，它与塞瓦斯托波尔生物学工作站共同研究了黑海中远离陆地、个别地方深度在2,000米以上的外海区域的全部水层与底質。

黑海是地球上一个特殊的海域。根据流行的見解，黑海的水团应当垂直地划分为两个不同厚度的水层。自海表面到深度125—225米是含有氧气的狭薄上层；下层含有硫化氢，在深水区域的一些地区深度超过2,000米。

以前曾认为，由于黑海中水的盐度及密度分布异常，水层間的交换是困难的，只能依靠由博斯普魯斯海峡下沉的含較高盐分的地中海水来使黑海水扩散及上升的过程而进行交换。結果黑海的硫化氢区域处于完全停滯的状态，而在氧气带，由于有热的对流而进行着混合。

沃嘉尼茨基(1941,1948)提出了另外的見解。他曾假设，黑海水表层的下沉过程在其环流周围不断地进行；而在中部区域，由于这类环流的迴轉力，深水层升涨，这样就造成深度在1,000米以內的水的混合。較深层水的移动是取决于热的对流。

黑海水团构造的水文学特征給該水域的水化学及水生生物学烙上痕迹，这表现在化学化合物及生物类型在海中分布的异常方面。有人曾认为，在硫化氢带中能生存的只有厌氧菌；在这个带里大量积聚的只能是还原反应的产物。

黑海的微生物学研究首先是从它的东部开始的，而后扩展到中部及西北部(图1)。由于这类研究工作几乎每年各季都进行，所以能收集到大量的各方面的科学資料。可以这样说，直到目前为止，在微生物学方面黑海仍是研究得最充分的一个海域。

除在黑海进行微生物学調查以外，自1951年开始，苏联科学院微生物研究所根据同一計劃和同样的方法对其他类型的海域进行了比較性的研究。选择了各种类型的海作为代表：里海——湖型的海，曾詳細地研究了它的浅水区域及深水区域；鄂霍次克海——与大洋直接沟通的外海，在其南部区域深度很大，我們的調查工作主要是



在这里进行的;格陵兰海——它与北冰洋和大西洋相连接。

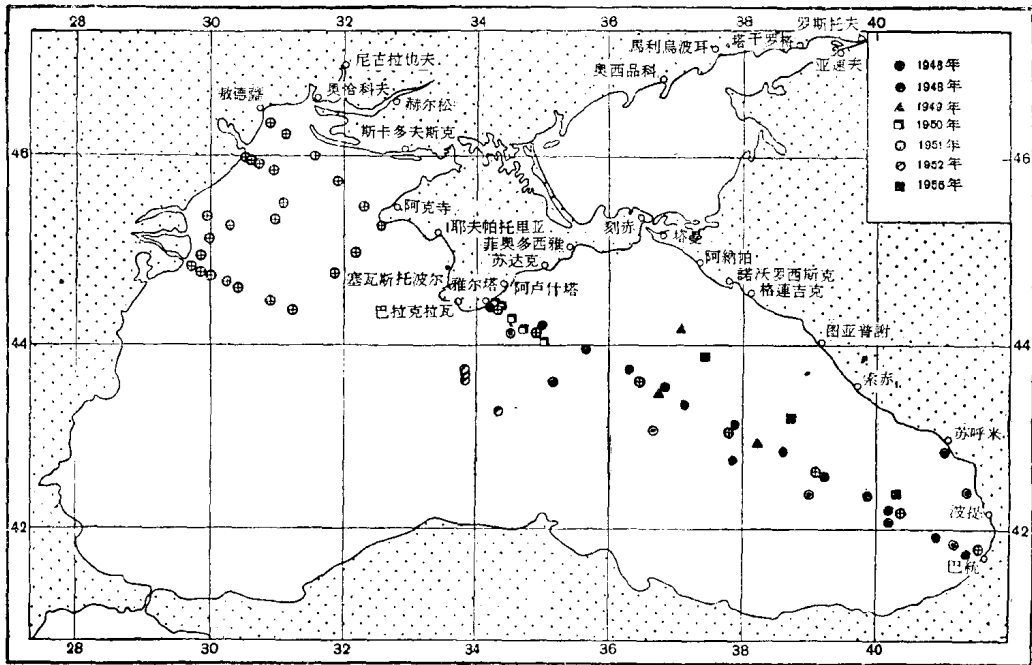


图1 黑海微生物学观测站图

参加“勇士号”海洋调查船上的调查工作，也使我们有机会进行了邻接千岛群岛及堪察加半岛的太平洋西北部及太平洋中部的微生物学调查。

说明印度洋不同地理带(自赤道到南极)的微生物生活的珍贵资料，是在“鄂毕号”航行时收集到的。对世界大洋的最深处——千岛群岛-堪察加洼地及太平洋的其他洼地——的微生物分布的规律及组成的研究具有特殊的意义。

不久之前，看来还似乎是不能实现的宿望——在中北极水域中，特别是在北极区域内(图2)进行微生物学研究，现在已成为现实了。在水温接近 $0^{\circ}\text{C}$ 的北冰洋诸海内栖息着各种类型的微生物，这是早已众所周知的事实，但是有关微生物学的研究，还仅是在这些海的近大陆区域或海岛附近的浅水区域内进行的。曾推测所发现的微生物区系主要是来源于大陆，是偶然带到海中而得以保持着生命力的细菌类型。这种推测似乎是可能的。估计到冰的浮动性(由于风向的改变使冰逼近岸边及远逐到海洋中)，就有可能将陆地上的土壤细菌带到甚至相当远的海洋中。因此，查明中北极区域，北冰洋的各深度处，在多年浮冰群的冰下是否有细菌生活的问题显然是有很大的意义。

不只是在黑海，里海，鄂霍次克海及格陵兰海，而且在太平洋，印度洋和北冰洋的微生物学观测站上进行了垂直断面的研究，旨在得到从表层到海底的足够多的水平线的水样，以便评定海洋全部水层的特性；同时也对底质之各层进行了研究。在这些研究工作中，除用培养法以外，也广泛地使用了直接镜检法。结果得到了能在实验室

条件下培养的异养微生物的数量和种的组成的资料,以及有关某些微生物种的自然分布区、微生物的总数、它们的形态组成、水平分布和垂直分布规律的资料。知道了海洋表层及深水层微生物细胞的生物量,并大致了解到海洋微生物在其生活的自然环境中繁殖的速度,这样就可以研究细菌生产量的问题,以及微生物对海域中之有机物质的矿化作用活动之数量的估计。由此明确地看出微生物作为海洋水文学现象指标的重要意义。

由于在海洋中进行的深水微生物学的研究,在深海微生物学方面已积累了一定的经验。本书的内容适应着海洋微生物学这一新的发展阶段,但是这一阶段还具有海洋微生物学形成的最初阶段的特点。

本书不再重复佐别尔著的“海洋微生物学”(1946)中和更早的、主要是总结陆棚海及海洋表层的微生物学研究成果(仅是借助于培养方法进行的研究)的专著中的资料了。本书是叙述深海微生物学的资料。应当再一次地着重指出,直接镜检研究法在对海洋深处微生物界的研究中所获得的成果具有着毋庸置疑的意义。

本书所引用的大部分实际资料是我的同事们及研究生们的工作成果,他们是 C. C. 阿拍卓娃, O. A. 阿尔诺里特, B. И. 毕留卓娃, Л. A. 瓦尔福洛莫娃, A. И. 茹柯娃, H. B. 依萨琴柯-扎瓦尔茨娜, B. A. 拉姆毕娜, M. H. 列别杰娃, E. M. 玛尔克阿诺维奇, И. H. 米茨凯维奇, И. E. 米舒斯基娜, M. И. 诺沃日洛娃, Л. K. 奥斯尼茨卡雅, E. A. 罗金娜, A. C. 吉洪涅柯, M. Д. 丘马克。M. H. 列别杰娃的学位论文“黑海微生物数量和生物量的测定(它们分布的生态学规律)”及 M. И. 诺沃日洛娃的“海域中酵母菌的分布”,很充分地反映在适当的章节中。

## 第一章 深水微生物学的研究方法

为微生物学研究所取的水样和泥样在取到之后，应立即进行初步的处理显然是十分必需的。众所周知，在保存水样时，微生物区系能很快地(可以说在最初几个小时)生长，微生物种的组成的相互关系也发生变化。为了防止这类现象的发生，凡研究海洋微生物的数量及种的特征用的一切接种，以及直接镜检研究用的样本的制备，均在船上为此专设的微生物学试验室中进行。

实践证明，即使是在一个不大的船上，完全可以建造一个微生物学试验室。一间单独的舱经适当整理后就可以作为专门进行微生物学工作的处所。洗涤，干热灭菌或加压灭菌等设备，极易在船上的其他房间或角落里装置。特别的橱柜及装有各种大小隔板抽屉的箱子，桌边钉以木板条，固定的台架及其他设备等可以防止仪器受到颠簸的影响。

在“勇士号”海洋调查船这所浮动的研究所中，有三个工作位置的良好微生物学试验室，每个工作位置有大的方形舷窗，试验室在夜间有日光灯，有辅助船舱以便洗涤及灭菌用，即是在实际上为微生物学工作所建立的条件与岸上的固定机构几乎没有区别。

### 取 样 方 法

深水微生物学的研究工作通常是在调查船上与水文学、水化学及水生生物学的研究工作共同综合进行的。已积累的經驗证实，为了采取海洋各深度的水样，并不需要各研究者所建议的专门的微生物学采水器。为此，可以用水文学家所用的金属采水器。这类采水器的表面结构较应用微生物学采水器更不易于将海上层的细菌带到水深处。至于它的内部结构，当向各深度沉放时，开着的采水器是一个系在钢丝绳上的金属管子，它的降落速度很大，通常超过1米/秒。采水器的壁面与水发生强烈的摩擦，使细菌不能附着到采水器的壁面上，因而避免了采水器将细菌带到较深的水层中。

应当对采水器的栓采取预防染污的措施，因为采水器在水中时栓是关闭的，所以栓管内未受到水的冲洗。这些预防染污的措施即是在采水样前对栓进行细心的用火焙烧。我们是用焊灯或用酒精蘸湿的棉花团点燃后的强烈火焰焙烧的。如果操作时细心，这样烧并不会影响到南辛(Нансен)式构造的采水器或构造与其类似的采水器上固定的深水测温仪的度数，因此深水测温仪可以不必拆下。烧后，启开栓，栓便受到(采水器中的)激水流的冲洗和冷却，以后将灭菌的烧瓶或其他容器注满水样。

在启开气栓使水样自采水器中流出时，气栓有被微生物染污的危险。根据已进行的实验证明，由于微生物学家首先是自采水器中采取水样，所以，气栓的启开，以及

空气进入采水器,都不至于将外界环境中的細菌带入所采到的水样中。在容积为 0.5 升, 1 升或更大容积的采水器中,安置于采水器上部的气栓与位于采水器下部的出水栓之間有一段高的水柱,因此如果空气染污是經過气栓的話,那么不等微生物达到水柱的下部,此时已流出几十毫升供微生物学研究用的水样了。

必須注意佐別尔(1946)及其他研究工作者們所指出的关于采水器之金属壁的杀菌作用。在采水器向各深度水层沉降的时间里,这种情况能促进采水器的杀菌作用,但是也有相反的方面。因为当水样在采水器中蓄存的一定时间里,会减少能在試驗室內培养基上发育的細菌的数目。充滿水的采水器甚至是从最深处取上时所用的那段时间,不足以使那些用培养方法計算的异养微生物的含量发生任何重大的变化。但是当采水器取上之后,必須不吐水样蓄存在采水器中,而应立刻轉注到灭菌的玻璃容器里。

古尔芬(1935)用金属采水器和灭菌的依薩琴柯(1914)式玻璃采水器由相同的各个深度取了水样,作了比較研究。取水样所用的時間不超过 5 分钟。将这些水样接种后,根据长出的菌落数目計算,作者确定,金属采水器中的水样和用灭菌的依薩琴柯式玻璃采水器所取的水样間,在八个試驗中細菌数目的平均差額是 9% 左右。引起氨化作用及反硝化作用过程的微生物生理类羣經測定具有相同的效价。微生物区系的形态学組成在同时取的水样中也是相同的。

用各种不同結構的絞車将系到鋼絲繩上的采水器沉到适当的深度。除能采到采水器中的水样外,如果需要得到带有表面底質表层的原状土样(МОНОЛИТ)时,用管状工具或海底采泥器还能采得自海底表层不同深度之泥土沉积的样本。在我們的研究工作中,由于使用了斯索耶夫-庫吉諾夫(Сысоев-Кудинов)式重力管,得到了 30 米以上之泥土柱。

自采水器中取水样及自采泥管内取土样,通常是在微生物学試驗室中进行,所以这样做,是考虑到由于微生物試驗室中的无菌条件要比甲板上好些。在这里我們不想論述微生物学試驗中常用的并已为人們所熟知的接种方法,只想詳細地叙述所謂超滤膜上萌发法,在我們的水样研究工作中就是采用了这种方法。

### 超滤膜上的微生物萌发法

文献中有一些报导討論了关于使用超滤膜过滤水样及其他液体来使沉淀在其表面上的微生物細胞萌发的可能性問題。

萌发法就是将超滤膜放到适当的固体培养基上或者将它沉沒在液体培养基中。

巴尔索夫(1932),巴尔索夫和索契洛娃(1933)以及拉卓莫夫(1933)曾建議用这种方法进行水的卫生細菌学分析。由于比較簡單和方便,超滤膜上微生物萌发法已成为卫生細菌学試驗室中測定水的粪便染污的常規方法。阿普特(1946)曾用这种方法对漿果的汁液及各种蔬菜和肉类罐頭进行細菌学分析。业已查明,利用超滤膜上微生物萌发法(作者称其为超过滤法)能很准确地測定罐頭的带菌与否,并能較快地

得到細菌学的分析結果。米良夫斯卡雅(1949)报导,当白喉杆菌,金黄色葡萄球菌,溶血性链球菌,結核杆菌,百日咳杆菌及脑炎球菌等的菌悬液经过滤膜过滤后,如果将超滤膜移到合适的培养基上,便可观察到有关細菌种的菌落在超滤膜上发育。

采用超滤膜微生物萌发法的研究工作者們着重指出,在比較試驗中,在滤膜上发育的菌落数目与接种同一份材料到培养皿中固体培养基上发育出来的菌落数目是相吻合的。同时,也未观察到在滤膜上生长的大腸杆菌及一些病原微生物类型的菌落在培养特征上有任何差异。

根据这些文献資料,我們决定用超滤膜上萌发法来进行海洋微生物学的研究。在黑海的最初研究工作中发现,接种 0.1, 0.25, 0.5 毫升不同深度的海水水样到注有魚腺琼胶的培养皿的表面上,由于异养菌在海水层中的密度較小及它們分布的微带性(микрзональность),結果是无菌的。但是增大接种水样的体积是不可能的,因为加到培养基表面上的水样超过 0.5 毫升时,即便是比較干燥的琼胶培养基,也由于过于潮湿而导致微生物的成片生长。

至于考赫(Kох)的方法,可以使几毫升的水样与溶化后冷却到 45°C 左右的琼胶培养基相混合而不損害琼胶凝胶的硬度,但是由于下面的理由我們避免使用这种方法。很难設想,所試海水样本中悬浮的全部微生物細胞皆能忍受自 0°C 以上几度的溫度突然升高到近 50°C 的热琼胶。除此而外,对培养基深层中发育的菌落与培养基表层的菌落进行比較和鉴定也是十分困难的,因为同一种类型微生物的生长特性在琼胶表面与深层是不相同的。繁殖迅速并有漫延生长能力的微生物也常常蔽盖琼胶培养基的表面,这对分离长在琼胶深处的菌落造成很大的困难。

我們曾采用考赫的傾注法和微生物的超滤膜上萌发法来测定异养菌在海洋中含最少时的数量,对这两种方法的适用性的比較測定指出,第一种方法是远不及第二种方法的(表 1)。显然,有很多沉到热琼胶中的細菌失去了它們的生命力,因为在 18 个比較性的測定試驗中,只有两个試驗是傾注法比萌发法得出較好的結果,有四个試驗是結果一样,而在 12 个試驗中,滤膜上长出的菌落数比同一份水样在滤膜上濃縮后再与冷却至 42°—45°C 的琼胶相混合长出的多很多。在很多情况下,可以确信,用傾注法时完全未发现异养菌,而用超滤膜上微生物萌发法,确能够自同一份水样中在同一种培养基上获得四个,五个,七个甚至二十一个菌落。

超滤膜上微生物萌发法是:将 20—50 毫升的水样通过煮好的用于卫生細菌学分析的 2 号滤膜过滤。过滤后,将滤膜放在营养琼胶培养基的表面上,使滤膜上沉降的微生物細胞萌发。经过 3—5 天 22°—30°C 的溫度培育,計算滤膜上长出的菌落总数。算完总数之后,由每个菌落制片进行显微鏡检查;同时計算微生物各分类类羣代表的数量。

可以預料,超滤膜上微生物萌发法可以消除微生物学家为确定微生物羣落特性必須研究很大容积水样时所发生的一切困难,因为超滤膜表面具有适当大小的孔隙,很容易濃縮 500—1,000 毫升水样中的微生物,当然少量容积的水样就不用說了。假如滤膜上长出的菌落数,即使是近似地反应了落在它上面的細胞数,犹如将水样直接

表1 海洋水团中异养微生物含量少时,测定数目的傾注法(按考赫法)及微生物在超滤膜上萌发法的比較評定

取水样的深度 (米)	所研究水样总容积中异养微生物的数目(菌落数目)			
	观测站 10		观测站 31	
	傾注法	萌发法	傾注法	萌发法
0			0	5
10	1	9	0	0
25			0	7
50			0	0
75			1	3
100	10	2	0	0
150			1	9
200			2	5
250			9	16
300	0	0	668	431
500			11	46
600			0	21
750			2	5
1000			0	4
1500			9	31

傾注法的研究是将 35 毫升水样經過 No. 3 直径 3.5 厘米的超滤膜过滤,而后将表面上沉淀了微生物細胞的滤膜浸入盛有 5 毫升肉汁之試管中。經過長時間的振动后,将肉汁与溶化并冷却至 42—45°C 的魚朊琼胶在培养皿中混合。在 27—28°C 之溫箱中培育 3—4 天后,計算长出的菌落数目。

超滤膜上萌发法是水样經過滤膜过滤后将滤膜鋪在培养皿中已凝固的魚朊琼胶表面上。

接种到琼胶培养基表面时一样,那么在海洋微生物学家手中就已掌握了一种确定某一容积水样中异养微生物的数量及种的組成的比較簡單的方法,这样的容积比用直接接种法研究的水样容积能更准确地确定該水域水层的性質。

虽然文献資料中似乎对这方面有所說明,但是我們不能不考慮到如下情况,即研究工作者在比較超滤膜上萌发法及直接接种到琼胶平板上的方法时所用的培养基或培养条件(例如培养大腸杆菌时),強烈地限制了很多种微生物类型的发育;而有时用同一个种的菌种来評价两种方法。

在这类試驗研究中,不能闡明象微生物相互間的拮抗作用这种决定生长出的菌落数目的重要因素的影响。而同时还应当考慮到,含有不同种的微生物的水样經過滤膜过滤后在这不大的萌发滤膜上(工厂制造的超滤膜直径是 3.5 厘米),比在直径为 10 厘米的培养皿中的琼胶上細胞分布比較稀疏的情况下更容易产生拮抗效应。

上述各項理由激发了我們要闡明以下問題:在研究水域中的水样时,用超滤膜上萌发法和用琼胶表面上的直接接种法,在普通肉汁朊琼胶或魚朊琼胶上长出的菌落数目的測定結果能相同到何种程度。

最初的試驗是用水族池的水。一定容积的水样(5;1;0.5;0.1 毫升)与 20 毫升灭

菌的自来水混合,而后经过蔡司(Зейтц)滤器中的超滤膜 No.2 过滤。过滤完毕后,将滤膜背面朝下铺到培养皿中已注满肉胰琼胶的表面上。在 28°C 下经过 3 天培养后,计算滤膜上长出的总的菌落数。小菌落的数目是借助放大镜或低倍显微镜来确定的。

在过滤的同时,移种同一份水族池水样 0.1 毫升到另外一个肉胰琼胶培养皿上,并用玻璃刮匙沿营养琼胶的整个表面涂布。同样在 28°C 下经过 3 天的培养,计算长出的菌落数。

从用水族池水样所作的三个试验中得到的数据列于表 2。

表 2 用水族池水样作试验长出的菌落数  
(换算成 0.1 毫升水样)

研究的方法	试验 1				试验 2			试验 3		
	重 复									
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3
直接接种到培养皿中的营养琼胶上	57	97	61	55	38	43		73	94	244
超滤膜上萌发	8 (396)*	49 (491)**	8 (41)***		27	28	11 (54)***	76	95	149

括号内表示过滤 5\*, 1\*\* 和 0.5\*\*\* 毫升水样后滤膜上长出的菌落总数

在第一个试验中,用超滤膜分别过滤 5, 1 及 0.5 毫升的水族池水样。过滤 5 毫升水样的,以后在滤膜上长出了 396 个菌落,过滤 1 毫升水样的,生长了 491 个菌落,即是不仅不相应的减少,反而比第一种情况多;过滤 0.5 毫升水样的,生长了 41 个菌落。为了便于比较,如果把得到的数字换算成直接接种到琼胶表面上的水的容积,即换算成 0.1 毫升水样,那么得到的数字为 8, 49, 8。但是,把 0.1 毫升水样直接接到培养皿中的琼胶平板上长出的菌落数目为 55, 57, 61, 97。

在第二个和第三个试验中,过滤的水样容积与直接接种到琼胶平板上的容积相等,长出的菌落数目大致相同。

用水族池水样作的试验使我们感到,如果水中所含的微生物浓度相当高,那么过滤大量容积的水样在测定异养微生物数量时能造成相当大的误差。在这方面试验 No.1 是很明显的:通过超滤膜过滤之水族池水样容积的加大,从 1 到 5 毫升,反而使滤膜上长出的菌落数目减少。在试验 No.2 中过滤水样的容积由 0.1 增到 0.5 毫升,同样也没有长出相应的菌落数目。过滤 0.5 毫升水样时,只长出比过滤同一份水族池水样 0.1 毫升时多一倍的菌落。

还应当注意到,从同一个水族池的同样容积的水样中长出的微生物的菌落数目也不一致。在第一个试验中,四个培养皿中每个培养皿接种 0.1 毫升水样时,长出 55, 57, 61 及 97 个菌落,即在 1:2 的范围内变动。在试验 No.3 中,发现长出的菌落数差别更大些。接种 0.1 毫升的水样长出了 73, 94 及 244 个菌落。长出的菌落数有

这些变动除由于其他一些原因外,正如同在水域中一样,可能在某种程度上,还取决于微生物在水族池中分布的微带性及分布的不均衡性(неравномерность),尽管水族池内引起这种分布微带性的条件与大的水域中比较起来不甚明显。

为了尽可能地接近自然状况,在黑海用海水进行了以下试验,来比较评价使我们感到兴趣的两种研究方法。水样取自海湾及离岸一定距离的不同深度。取到水样之后,立刻在岸上用超滤膜 No.3 过滤了不同数量的水样,此外,并接种 0.1 毫升水样到培养皿中鱼肝琼胶的表面上。过滤水样后的超滤膜同样放在培养皿中的鱼肝琼胶上使之萌发。培养的温度条件在所有情况下都是一致的。3—4 天后,计算了琼胶平板面上及滤膜上长出的菌落数,并且在显微镜下研究了这些菌落中的微生物的形态特征。一部分超滤膜在计算和测定了菌落组成之后,在温热的福尔马林蒸气中固定,用含 1% 藻红的 5% 石炭酸溶液染色,而后晾干。

表 3 是用海水所作的比较试验的资料。应当指出,表中仅是研究各种水样时得到的资料的一小部分。有很多情况未在此表中表现出来,这是由于长出的菌落很多(图 3, a, б, в),难以计算滤膜上的菌落数目,或者由于滤膜表面有成片的细菌生长(图 3, г, д),因而甚至不可能计算。

表 3 所研究之海水样本长出的菌落数  
(换算为 0.1 毫升水样)

取水样的地点	深度 (米)	在培养皿中固体培养基上的直接接种法		超滤膜上萌发法							
		重	复	过滤水样容积(毫升)							
				1	2	5	10	25	50	75	200
海湾·····	0	20	20		5 (521)						
	10	3	5			2 (580)					
距岸 2.5 哩·····	10	10		4 (200)*							
距岸 10 哩·····	1	1	1			0.32 (80)	0.17 (87)	0.10 (78)			
	50	1	1			0.03 (7)	0.03 (17)	0.09 (65)		0.02 (32)	

\* 括号内表示过滤后滤膜上生长的菌落总数

从表 3 可以看出,微生物在超滤膜上萌发时,在所有的情况下所得到的都是比较性的资料,从未长出象在培养皿中的琼胶平板上直接接种时长出的那样多的菌落数目:滤膜上的菌落数目在换算成同样水容积(0.1 毫升)时总是少些。这种情况在研究港口中的污水及分析取自离岸一定距离的比较清洁的水时,也同样能观察到。当过滤很大容积的水样时,用我们比较的这两种方法得到的资料之间的差别更是明显。取自离岸 10 哩的水样,在滤膜上长出的菌落比同一份水样直接接种到琼胶表面上长



出的菌落少到  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{30}$ ,  $\frac{1}{50}$ 。

用离岸 10 哩在 1 及 50 米深度取得的黑海水样作试验来评价滤膜上萌发法是很意义的。用同一份水样渐次增加水的数量用超滤膜进行了过滤。出乎预料,发现取自 1 米深的过滤水样尽管在容积上差别很大——25, 50 及 75 毫升,但是滤膜上长出的菌落数却大致相同: 80, 87 及 78(表 3)。用 50 米深的水样作研究时所得的结果有些不同。在这个试验中虽然增大了过滤水样的容积,但是滤膜上长出的菌落数目也没有相应的增加,而在 200 毫升水样中,用超滤膜上萌发法测定的微生物数目少于 75 毫升同一份水样中的微生物数目。

下面的一些观察可以阐明用超滤膜过滤了 50, 75, 200 毫升这样大容积的水样之后滤膜表面上长出的菌落数不太多的一些原因。我们发现,在很多滤膜上,特别是用水族池的水或港湾的海水作的试验中,长出了大量的菌落,以致于难以进行计算。这时我们用显微镜检查发现,长出的菌落在很大程度上是同样的,并且是某一种细菌类型。在那些菌落数目不多并且分散稀疏的滤膜上,观察到有各种各样的细菌(图 3, б, в)。我们推测,限制海水中某些种微生物在滤膜上发育的因素当中,拮抗性起着不小的作用;由于滤膜的面积不大,也可能是由于它们的特殊结构,在滤膜上就给拮抗作用的发挥创造了比在培养皿中之琼胶平板上更为有利的条件。当密密复盖滤膜的大量菌落中间有拮抗菌的菌落发育时,在滤膜上便可以看到表现拮抗现象的典型情况(图 3, г)。

虽然相互间的拮抗作用甚至是相当重要的,但是这仍不是影响滤膜上长出的菌落数目的唯一原因。应当考虑到,菌落可能不是由一个细胞,而是由几个或者很多个细胞发育成的,这种可能性在滤膜上比在培养皿中之琼胶平板上更是经常遇到,特别是在过滤大容积的水样时。在滤膜上观察到的一些混合种类的菌落便能确证这一点;当构成这类混合菌落的细菌类型在形态上彼此有很大区别时,这一点特别容易发现。

根据所做的试验研究可作出如下结论,适于测定水中大肠杆菌的效价及其他目的的滤膜上萌发法,只是在要求了解水域中栖息的微生物的数量及种的组成时才能采用。如果水域中的微生物密度很高,而且取得的各份研究水样的量不能很大时,那么超滤膜上萌发法,与考赫法或常用的接种水样到盛有琼胶之培养皿中的方法比较起来,不仅没有优越之处,相反,并且还不及后者,因为这种方法在调查条件下不甚方便。过滤大量容积的含有相当数量微生物的水样,而后再将这些滤膜萌发,会给测定该水样中微生物的数量及种的组成造成很大的误差。

为进行微生物学的研究,但由于微生物的密度很小而必须利用大量容积的水样时,超滤膜上萌发法才可能是有效的。应该指出,根据工作的目的,超滤膜表面上带有浓聚的微生物细胞的微生物萌发法,有时不是用固体培养基,而是用适当的选择性液体培养基,把滤膜浸入其中更为方便。