

深圳海域细菌总数及可培养细菌总数的分布及其在环境评价中的应用研究

李和阳¹, 陈明霞^{1,2,3}, 李刚⁴, 郑天凌², 郑森林¹, 陈彬¹

(1 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 3 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; 4 深港产学研基地深圳市海岸与大气重点实验室, 广东 深圳 518057)

摘要: 采用荧光显微镜直接计数法及 2216E 平板计数法对深圳海域水体细菌数量分布状况进行研究, 结果发现细菌总数普遍高于可培养细菌总数 1~2 个数量级, 可培养细菌所占的比例为 0.13%~88.65%。清洁水域 YMK001 站位及污染严重的深圳湾 GDN053 站位始终是细菌总数的高值区。可培养细菌总数与细菌总数、COD_{Mn} 及 BOD₅ 相关关系不显著, 不能准确反应细菌总数的变化趋势及环境水体有机物的存在状态; 而细菌总数与 COD_{Mn} 及 BOD₅ 相关关系显著且相对稳定, 与环境水体有机物间呈现正相关关系。可见细菌总数相对于可培养细菌总数更适合于大范围海域的水质监测及不同海域的比较分析。

关键词: 细菌总数; 可培养细菌总数; 环境评价; 深圳海域

中图分类号: Q331 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2011)04-0487-05

Occurrence of total and culturable bacteria in Shenzhen coastal waters and their application in the environment assessment

LI Heyang¹, CHEN Mingxia^{1,2,3}, LI Gang⁴, ZHENG Tianling², ZHENG Senlin¹, CHEN Bin¹

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration Xiamen 361005, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. College of Chemical Engineering Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 4. Key Lab for Coastal and Atmospheric Research, PKU-HKUST Shenzhen-Hongkong Institution Industry Education Research, Shenzhen 518057, China)

Abstract The occurrence of total and culturable bacteria in Shenzhen coastal waters was studied using fluorescence microscope and 2216E plates. Results showed that the abundance of total bacteria were general 1~2 order of magnitude higher than that of culturable bacteria which represented 0.13%~88.65% of the total bacteria with the highest abundance at station YMK001 with healthy waters and station GDN053 with polluted waters. It seemed that the abundance of culturable bacteria was not significantly correlated with the total bacteria, COD_{Mn} and BOD₅, indicating that the distribution of culturable bacteria was not in accord with that of total bacteria and can not reflect the organic concentration within the waters. Otherwise the abundance of total bacteria showed significantly positively correlated with COD_{Mn} and BOD₅. These results demonstrated that total bacteria was a more reliable and acceptable parameter for water quality monitoring than culturable bacteria.

Key words total bacteria; culturable bacteria; environment assessment; Shenzhen coastal waters

细菌是海洋生态系统中的一个重要组成部分, 它们在海洋生态系统的物质循环、能量流动、元素转化、生态

平衡及环境净化等方面起着举足轻重的作用。在一定条件下, 海洋中的细菌和水环境之间互相联系、互相制约,

收稿日期: 2010-08-17; 修订日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41006117); 国家海洋局第三海洋研究所引进人才基金项目(海三科 2005003, 2005007); 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资助项目(海三科 2007021); 国家海洋公益性行业专项经费项目(200805064); 国家 908 专项课题评价项目(908-02-04-01); 国家 908、福建 908 专项课题调查项目(908-01-ST06, FJ908-01-01HS); 福建省青年创新人才科学基金项目(2004Z055); 福建省自然科学基金项目(Z0515011)

作者简介: 李和阳(1978-), 男, 福建惠安人, 副研究员, 主要从事海洋环境微生物生理生态学研究, E-mail: heyangl@126.com

保持着自然的、暂时的相对平衡关系。当海洋环境中的污染物增加时,随着代表水质指标的 BOD_5 、 COD_{Mn} 、 DO 、透明度、营养盐等因子发生变化,其水体的细菌种类、数量及种群结构也呈现有规律的变化,这些变化可以用来表征海洋环境质量的^[1,2]。目前我国已将细菌总数列入国家海洋监测规范中,并规定细菌总数可以通过 2216E 平板计数和荧光显微镜直接计数两种方法进行数据收集^[3]。一般认为细菌总数(主要为异养菌)反映环境中异养型细菌的污染程度,也间接反映一般营养性有机污染物的污染程度^[4]。可培养细菌总数目前是指环境中被测样品,在一定条件下(培养基成分、培养时间、温度、pH 值、通气状况等)培养后的 1 mL 或 1 g 检样中所生长的细菌菌落总数,由于培养条件本身的限制,以及环境中许多细菌处于“活的不可培养状态”^[5,6],无法反映出真实状态下的细菌总数。而荧光显微镜直接计数法直接对环境样品微生物进行荧光染色和观察,不受上述条件制约,相对于平板计数法更能反映出环境中细菌总数。本研究采用改良后的荧光显微镜直接计数法及平板计数法对深圳海域水体细菌数量分布状况进行研究,目的在于

探讨细菌总数(荧光显微镜计数法)与可培养细菌总数(平板计数法)之间的相关性以及两者在海洋环境评价中的应用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

调查站位见图 1。10 个采样站位是根据深圳环境保护监测中心的长期环境监测而设定。站位 GDN053、GDN057、GDN058、GDN060、GDN062 和 GDN063 属于深圳西部海域,站位 GDN059、GDN061、GDN064 和 YMK001 属于深圳东部海域,其中 GDN064 站位离海岸线较远,位处中国南海开放海域,可作为受人类活动影响较少的对照站位。样品分别于 2008 年 4 月、2008 年 9 月两个季度采集。水深大于 10 m(东部海域)的站位采集表层(S)、10 m 层(M)和底层(B),水深小于 10 m(西部海域)的站位仅采集表层(S),每个水层采集 500 mL 水样,保存于 4 ℃(不超过 48 h)带回实验室后立即分离培养并计数。海水水质参数由 YSI 6600 型水质多参数监测仪走航监测并提供。

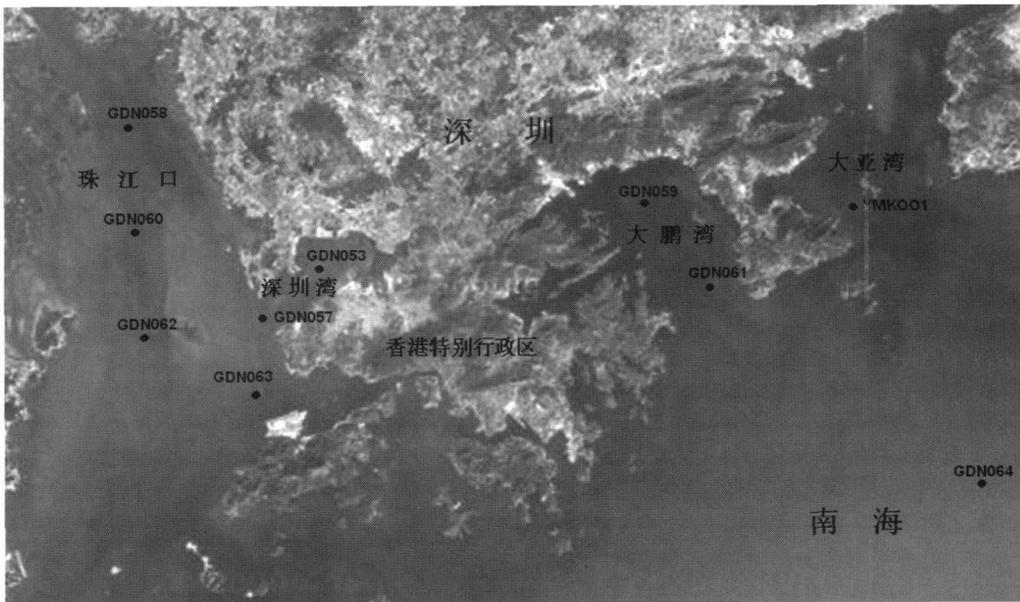


图 1 采样站位

Fig 1 Sampling sites

1.2 培养和计数

可培养细菌总数采用 Zobell 2216E 平板涂布培养计数方法:取 0.1 mL 10^0 、 10^1 和 10^2 的稀释样品于 ZoBell 2216E 琼脂平板上,以涂布法接种后置于 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱培养,48 h 后取菌落数 100~1000 CFUs 之间的平板,计数出现的菌落数,并统计单位水体异养菌数。

细菌总数采用荧光显微镜直接计数法^[7]:用 $0.02 \mu\text{m}$ 氧化铝滤膜过滤适量水样,将膜的背面(非载样面)放在 $4 \times$ SYBR Green I 染色液滴上,冰浴、避光染色 15 min 取出滤膜,吸干膜上染液,并把滤膜紧贴于载玻片上,在盖玻片上加 30 μL 荧光保护剂(PBS 甘油储液),具液面朝

下盖紧滤膜,在荧光显微镜蓝色激发光、油镜条件下对亮绿色的细菌进行观察和计数。

1.3 数据统计分析

以上所有数据的统计、相关关系分析及图片制作使用 Microsoft Office Excel 软件(2007)及 SPSS13.0 统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌总数及可培养细菌总数分布

深圳海域 2008 年 4 月份及 9 月份细菌总数及可培养细菌总数的分布状况见表 1。

表 1 各站位的细菌总数及可培养细菌总数

Tab 1 Numbers of total and cultured bacteria of different stations

站 位	2008年 4月			2008年 9月		
	细菌总数 /10 ⁶ mL ⁻¹	可培养细菌数 /10 ⁵ CFU s [*] mL ⁻¹	比例* /(%)	细菌总数 /10 ⁶ mL ⁻¹	可培养细菌数 /10 ⁵ CFU s [*] mL ⁻¹	比例* /(%)
YMK001S	3.97	3.70	9.32	4.42	2.93	6.62
YMK001M	1.69	2.75	16.27	4.13	5.33	12.90
YMK001B	1.36	0.02	0.13	1.10	ND	ND
GDN064S	1.44	8.39	58.26	3.55	0.63	1.77
GDN064M	1.04	9.22	88.65	2.30	3.24	14.09
GDN064B	0.94	6.68	71.22	2.50	5.28	21.12
GDN061S	1.18	1.28	10.85	1.84	1.85	10.04
GDN061M	2.22	2.32	10.45	1.54	ND	ND
GDN059S	0.75	3.40	45.39	3.11	1.91	6.15
GDN059M	0.58	2.64	45.21	1.66	4.28	25.78
GDN053S	3.25	0.50	1.54	3.88	1.09	2.80
GDN057S	2.32	0.55	2.37	1.94	4.76	24.53
GDN063S	1.99	0.68	3.42	1.65	3.38	20.51
GDN062S	2.32	2.63	11.34	1.51	6.94	45.93
GDN060S	2.46	0.20	0.83	1.46	1.39	9.53
GDN058S	1.72	0.02	0.13	1.19	0.61	5.08

注: S 表层; M. 10m 层; B 底层; * 代表可培养细菌占细菌总数的比值; ND. 未测定

4月份细菌总数普遍比可培养细菌总数高出 1~2 个数量级, 海域表层水体可培养细菌总数占细菌总数的 0.13%~58.26%。珠江口、深圳湾是水质污染严重的海域, 其细菌总数较高, 但可培养细菌总数不高, 占细菌总数的 0.13%~2.37%, 可见该海域该季节存在大量的不可培养的细菌; 大鹏湾细菌总数相对较少, 但表层水体可培养细菌总数占相当高的比例, 为 10.85%~45.39%; 大亚湾属于清洁的健康海域, 但却是细菌总数含量最高的海域, 表层水体有近 10% 的细菌可培养; 外洋海域 GDN064 站位细菌总数与大鹏湾相近, 但其中平均高达 72.7% 的细菌可培养。这与以往报道认为环境中不可培养的微生物高达 85%~99% 的结论差异较大^[8], 可能与近海海域细菌种类组成及细菌的生存状态有关。总之, 此次航次调查结果表明: 大亚湾和深圳湾是细菌总数的高值区域, 而大鹏湾及外洋水域细菌总数最少, 可培养细菌的高值区发生在外洋水域、大亚湾及大鹏湾湾内。

9月份, 细菌总数普遍比可培养细菌总数高出 1 个数量级, 海域表层水体可培养细菌总数占细菌总数的 1.77%~45.93%。大亚湾细菌总数含量最高, 表层水体有近 6.62% 的细菌可培养; 外洋海域 GDN064 站位细菌总数略低于大亚湾, 可培养细菌数量最低, 表层水体可培养细菌所占比例为 1.77%, 但随着水层加深, 可培养细菌比例不断增加, 呈递增趋势, 中层及下层可培养细菌比例分别为 14.09% 和 21.12%; 深圳湾 GDN053 和 GDN057 站位细菌总数分别为 3.88×10^6 /mL 和 1.94×10^6 /mL, 可培养细菌总数所占比例分别为 2.80% 和 24.53%; 大鹏湾细菌总数相对少于深圳湾, GDN059 和 GDN061 站位表层水体可培养细菌总数占细菌总数分别为 6.15% 和 10.04%; 珠江口各站位细菌总数最少, 但可培养细菌总数

相对较高, 可培养细菌最高点发生于 GDN062 站位, 占该站位细菌总数的 45.93%。总之, 此次航次调查结果表明大亚湾和外洋海域是细菌总数的高值区域, 其次大鹏湾及深圳湾湾内站位的细菌总量也非常高, 表现出湾内大于湾口的明显趋势, 珠江口水域各站位细菌总数数量相当且较其他海域低, 从上游到下游有微弱的递增趋势。可培养细菌的高值区在珠江口下游、深圳湾湾口, 其他水域相对数量较少。

对两季节调查结果进行比较分析, 发现细菌总数普遍高于可培养细菌总数 1~2 个数量级, 可培养细菌所占的比例为 0.13%~88.65%。YMK001 站位始终是细菌总数的高值区, 保持着较高的细菌基数, 这可能是该贫营养海域却可保持较高的细菌生产力的重要原因之一^[9]。GDN053 站位细菌总数也始终保持较高水平, 可能与该海域生活废水有机物污染较多有一定联系。

2.2 细菌总数、可培养细菌总数及其它环境因子间的相关关系

细菌总数、可培养细菌总数及其它环境因子间的相关关系见表 2 表 3。

细菌总数的分布与水温、pH、Chl a 浓度和可培养细菌总数间无显著的相关性, 与 COD_{Mn} 和 BOD₅ 具有显著或极显著正相关关系。可培养细菌总数的分布与温度有一定的相关性, 从表 2 表 3 可以看出海域可培养细菌种类较适宜的生态分布温度可能在 26.53~29℃。4 月份可培养细菌总数与细菌总数的相关关系为 -0.17879 ($n=10, p>0.5$), 9 月份两者的相关关系为 -0.27139 ($n=10, p>0.5$)。可见可培养细菌总数不仅在数量上远低于细菌总数, 而且也不能反映细菌总数的分布趋势, 两者甚至有微弱的负相关关系, 可培养细菌总数不因细菌总数的

多寡而起决定性作用,两者不成比例变化。此外可培养细菌总数与 COD_{Mn}和 BOD₅之间无显著的相关性,说明可

表 2 细菌总数及可培养细菌总数与环境因子的相关性 (2008-04)

Tab 2 Relativity between total and culturable bacteria and environment factors (April 2008)

类别	水温 (22.85~26.53℃)	S (5.19~33.78)	pH (7.41~8.24)	Chl a	细菌总数	细菌总数 (lg值)	可培养细菌 总数
细菌总数	-0.507	-0.115	-0.238	0.003			
细菌总数 (lg值)	-0.600	-0.260	-0.407	-0.038	0.965*		
可培养细菌总数	0.685*	0.635*	0.602	-0.622	-0.179	-0.247	
可培养细菌总数 (lg值)	0.561	0.849*	0.863*	-0.857*	-0.041	-0.161	0.778*

注: n=10 * 相关性显著; ** 相关性极显著。

表 3 细菌总数及可培养细菌总数与环境因子的相关性 (2008-09)

Tab 3 Relativity between total and culturable bacteria and environment factors (September 2008)

类别	水温 (29.0~32.2℃)	S (2.38~30.81)	pH (6.33~8.71)	Chl a	COD _{Mn}	BOD ₅	细菌总数	细菌总数 (lg值)	可培养 细菌总数
细菌总数	0.073	0.675*	0.123	-0.457	0.788*	0.694			
细菌总数 (lg值)	0.019	0.744	0.157	-0.553	0.789*	0.750	0.990*		
可培养 细菌总数	-0.537	-0.070	-0.134	-0.381	-0.039	-0.095	-0.271	-0.224	
可培养细菌 总数 (lg值)	-0.573	0.087	-0.043	-0.440	0.130	-0.126	-0.180	-0.139	0.936*

注: n=10 * 相关性显著; ** 相关性极显著。

3 讨论

可培养细菌总数是最常用来指示有机质污染的一个生物指标。研究者认为可培养细菌总数代表海域受有机污染程度,菌数与有机物浓度呈正相关,并认为总菌数、活菌数或者两者之比值同海洋的污染、富营养化程度有很大关系^[4]。吉田^[10]提出了以下数据作为相应的环境评价标准:贫营养区活菌数(可培养细菌)在 10² CFU s/mL 以下;富营养区活菌数 10²~10⁴ CFU s/mL;过营养区是 10³~10⁵ CFU s/mL;污水区是 10⁵ CFU s/mL 以上。据此我们可以断定深圳海域所有站位都属于富营养区或过营养区(见表 1),而且,4月份,东部海域污染级别比西部海域高,靠近南海外海的开阔海域 GDN064 站位污染最为严重,几乎可达污水级别,此外珠江口上游可培养细菌数量最少,应该属于全海域中污染最少的区域。然而这些结果明显与事实不相符合。

据林庆华等^[11]和厉红梅^[12]对深圳海域水质时空变化进行了分析,结果表明深圳东、西部海域水质污染存在明显差异:1985~2005年东部海域水质一直保持良好的,较少受到污染物的影响;西部海域水质总体上逐渐变差,近年来海域水质污染严重,受到较严重的 PO₄³⁻和 N 等生活型污染物影响。黄奕龙等^[13]还指出:东部海域水质富营养化程度小于西部海域,东部海域水体大多为贫营养水体;西部海域所有监测点的水体都是过营养水体。据深圳市海洋局 2007年发布的海洋环境质量公告显示,严重污染海域依然主要分布在深圳湾和珠江口近岸局部海域

(http://www.soa.gov.cn/soa/hygb/yhgb/seven/webinfo/2008/05/1271382649770746.htm)。

分析整个海区 9月份的细菌总数和可培养细菌总数与 COD_{Mn}和 BOD₅的相关关系发现,细菌总数与 COD_{Mn}和 BOD₅呈现显著的正相关关系,而可培养细菌总数与 COD_{Mn}和 BOD₅相关关系不明显或无直接相关关系,该结果与傅莲英的研究结果相符^[14]。可见细菌总数相对于可培养细菌更能够稳定地反应出海域有机物的存在状况,但这并不表示细菌总数能反映出海域的污染状况及有机物的来源。从大自然角度来讲,不存在细菌污染问题,但从人类角度来讲,细菌生长在我们认为其不该生长的地方或不利于我们的地方就叫污染,比如说我国饮用水的卫生学指标规定自来水中细菌总数不得超过 100 CFU s/mL,否则视为被污染。然而在自然环境中,细菌是土著类群,我们又如何去判断其污染状况,或其所代表的环境意义呢?下面以大亚湾为例进行讨论。

大亚湾属于贫营养盐却高生产力的水域^[15,16],其细菌总数是本研究海域中最高值,但其污染指数却很低,高细菌总数说明该处有机物浓度较高,而事实亦证明该处 COD_{Mn}和 BOD₅在所有海域中属于较高水平,那么这么高的有机物来自于何处?分析其可能来源有几个方面:(1)在于大亚湾水域是深圳的主要珊瑚礁分布的区域,一般认为珊瑚礁海域的特点就是低营养盐高生产力的水体,物质和能量代谢非常高效,实现良性循环。水体的有机质主要来自于浮游的植物及与珊瑚共生的藻类生物以及珊瑚生态系统中的大型底栖藻类及植物,珊瑚生态系统

中营养盐的“只进不出或多进少出现象”,使得水体能保持在贫营养状态,而珊瑚虫产生的废物能高效地传递给其共生的藻类生物,不断制造有机物,供给珊瑚及水体其他生物使用^[17]。(2)数量巨大的细菌对有机物的降解,促进营养元素的循环,从而促进水体中浮游藻类生长,保持另一方面的初级生产力良性循环。郑爱榕等^[16]实验结果也表明水体中溶解有机氮在有氧条件下可以降解转化为无机氮,这意味着占绝对优势的溶解有机氮降解转化为无机氮可能是大亚湾水域低营养盐维持高生产力的主要机制之一。(3)细菌的数量与 Chl a 之间并没有显著的相关关系,侧面反映细菌所需的有机物是多种来源,包括径流、排污、水体水平及垂直交换,沉积物的再悬浮等,其中水体的水平和垂直交换在此珊瑚生长海域可能占有重要比例。由此可见在大亚湾海域(YMK001 站位),虽然细菌总数极高,有机物含量较高,但并不代表其有机物污染严重,也不代表此海域存在大量细菌污染,而是应该结合实际情况并分析有机物的可能来源,从而判定其生态系统是否属于良性健康发展的高生产力体系。

总之,可培养细菌总数在大范围的海洋监测中,不能有效反应出细菌总数的数量和分布趋势,两者不具有明显的相关关系,也不能反应出海域有机物浓度的分布状况。而细菌总数可以直接反应海域中细菌的分布状况,并且与海域中有机物的分布具有直接正相关关系,能有效反应出海域有机物的存在状况。但环境评价过程中不能直接将有机物含量等同于有机物污染,必需结合实际情况,从多方面判断有机物来源。因此我们认为,可培养细菌总数适合于对小范围的、各环境因素相差不大的海域进行监测,但不同海域数据间可比性差;而荧光显微镜测定细菌总数准确度较高、可比性强,适合于大范围海域的监测及不同海域的比较分析,虽然操作过程相对复杂,但值得推广。

参考文献:

[1] 陈金鑫, 徐亚同. 微生物在苏州河生态系统中的地位及作用 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(7): 70-74

- [2] 肖 慧. 渤海湾近岸海域的细菌学研究及其在海岸带环境质量评价中的应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005
- [3] GB 17378.1-1998 海洋监测规范 [S].
- [4] 日本生态环境问题专门委员会 (卢全章译). 环境和指示生物 (水域分册) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987. 234-244.
- [5] 徐怀恕. 霍乱弧菌的越冬方式-活的非可培养状态及其检测方法 [J]. 青岛海洋大学学报, 1989, 19(2): 77-83
- [6] COLWELL R R, BRAYTON P R, GRMES D J et al Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment Implications for the release of genetically engineered microorganisms [J]. *Nature Biotechnology* 1985, 3: 817-820.
- [7] 国家海洋局 908 专项办公室. 海洋生物生态调查技术规范 [M]. 北京: 海洋出版社, 2006
- [8] AMANN R J, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiology Review*, 1995, 59: 143-169
- [9] 彭安国, 黄奕普, 刘广山, 等. 大亚湾细菌生产力研究 [J]. 海洋学报, 2003, 25(4): 83-90
- [10] 吉田阳一. 低次生产段階ニな (なる微生物生产の变化), 水圏の富营养と生产增殖 [M]. 东京: 恒星社厚生阁出版, 1973.
- [11] 林庆华, 严少红, 何 龙. 深圳近岸海域环境质量调查和评价 [J]. 海洋环境科学, 2001, 20(3): 46-50
- [12] 厉红梅. 深圳近岸海域水环境质量时空变化 [J]. 中山大学学报论丛, 2006, 26(9): 190-192
- [13] 黄奕龙, 王仰麟, 张利萍. 深圳市近岸海域水体和沉积物环境质量评价 [J]. 海洋环境科学, 2006, 25(4): 28-32
- [14] 傅莲英. 虾蟹混养池细菌多样性的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2006.
- [15] 丘耀文, 王肇鼎, 朱良生. 大亚湾海域营养盐与叶绿素含量的变化趋势及其对生态环境的影响 [J]. 台湾海峡, 2005, 24(2): 131-139.
- [16] 郑爱榕, 沈海维, 刘景欣, 等. 大亚湾海域低营养盐维持高生产力的机制探讨 [J]. 海洋科学, 2001, 25(11): 48-52.
- [17] 戴昌凤. 海洋的绿洲—珊瑚礁资源 [J]. 科学月刊, 1993, 24(9): 667-673.