

舟山盐田环境嗜盐菌和耐盐菌数量分布调查

刘雪珠, 汤新潮, 朱斌 (浙江海洋学院海洋科学学院, 浙江舟山 316004)

摘要 2006~2007年冬春夏3季在舟山定海、朱家尖、岱山盐场盐田中取卤水和底泥样品,对嗜盐菌和耐盐菌的分布状况进行调查。以NaCl为限制性生长因子,主要采用高盐、中盐及低盐3种平板,对样品中的嗜盐菌进行初步鉴定和培养计数研究。结果表明,盐田中的嗜盐菌类群在菌落、个体特征以及数量分布上有所不同,并且底泥中的菌量比卤水中高1~2个数量级。

关键词 耐盐菌;嗜盐菌;盐田;数量分布

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16519-03

Investigation on the Numerical Distribution of Halotolerant Bacteria and Halophilic Bacteria from Brine Pan in Zhoushan

LIU Xue-zhu et al (Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316004)

Abstract The distribution of halotolerant and halophilic bacteria in brine and sediment samples from three salt fields of Dinghai, Zhujiajian and Daishan in Zhoushan was investigated in the winter, spring and summer from 2006 to 2007. Using NaCl as the limiting growth factor, the preliminary identification and culture counting of halophilic bacteria in samples were studied by using three solid media with high salt, moderate salt and low salt. The results showed that the colony morphology, cell shape and numerical distribution of halophilic bacteria in brine pan were different. And the number of halophilic bacteria in sediment was $10^1 - 10^2$ higher than that in brine.

Key words Halotolerant bacteria; Halobacteria bacteria; Salt field; Numerical distribution

必须生活在高盐浓度下才能生长的微生物,称为嗜盐菌;既能在高盐环境下生活,又能在低盐环境下生长的微生物为耐盐菌。嗜盐与耐盐微生物通常分布在盐湖、晒盐场和腌制海产品中。嗜盐菌在盐田生态系统中发挥重要作用,它既能分解有机质,降低卤水粘度,又能产生红色素,提高卤水温度,增加卤水蒸发速度,有利于海盐产量和质量的提高^[1-4]。在不同盐浓度的盐池中,不仅藻类种群、卤虫数量随季节交替变化,嗜盐细菌的种群和数量也随之变化。因此,研究晒盐场盐田嗜盐菌分布状况对海盐生产具有重要意义。笔者对舟山部分盐场分季节取样调查,旨在了解嗜盐菌的特征、数量分布及其变化规律,为后期进一步研究提供第一手资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料 嗜盐菌于2006~2007年秋、冬、春3季采自舟山定海、朱家尖、岱山等盐田,每次随机采集样品14份,包括卤水和底泥各7份。其中水样取1000 ml 卤水于无菌塑料瓶中,并用黑色塑料袋包裹,操作时尽量缩短开盖时间;泥样用直径50 mm、高50 mm的塑料圆筒插入泥面,并用花铲托底将底泥托起取出,放入无菌培养皿中。采样完毕后立即返回实验室进行培养计数。

1.2 培养基

(1)碱性、高盐培养基:水解酪蛋白7.5 g/L;酵母膏10.0 g/L;柠檬酸钠3.0 g/L;MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L;KCl 2.0 g/L;Na₂CO₃ 10.0 g/L;NaCl 200.0 g/L。其中,Na₂CO₃和其他成分要分开灭菌,之后再混合。灭菌前的Na₂CO₃体积按照需求总量的20%配制,其余成分占80%。

(2)中盐培养基:水解酪蛋白1.0 g/L;酵母膏10.0 g/L;可溶性淀粉2.0 g/L;MgCl₂·6H₂O 160.0 g/L;K₂SO₄ 5.0 g/L;CaCl₂·2H₂O 0.1 g/L;NaCl 125.0 g/L;pH值为7.0。

(3)中性、低盐培养基:胰蛋白胨10.0 g/L;酵母膏5.0

g/L;NaCl 15.0 g/L;pH值为7.0。

1.3 试验方法

1.3.1 水样中菌种的分离与培养。采用分级稀释平板涂布法,选择3个适宜浓度,各取0.2 ml 均匀涂布在含不同质量浓度NaCl的3种平板上,每个稀释度3个重复。涂布均匀并于28℃恒温箱中正培养1 h后倒置培养1~3周进行分离、培养。

1.3.2 泥样中菌种的分离与培养。取25 g 泥样放入盛有225 ml 无菌海水并带有玻璃珠的三角锥形瓶中,并将其置于恒温振荡器中振荡约30 min,使土壤微生物充分分散。用1 ml 无菌吸管吸取1 ml 土壤悬液注入第1支盛有9 ml 无菌海水的试管中,充分混匀。以此类推逐级稀释制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 土壤稀释液。菌种的分离、培养方法同“1.3.1”。

1.3.3 计数。分别对各培养皿中的菌落数进行计数,按不同培养基归类记录试验数据并进行数据处理,然后计算1 ml 卤水和1 g 底泥样品中所含的菌数。

1.3.4 水样盐度测定。取500 ml 卤水于1000 ml 烧杯中,用H-BD5w多参数水质分析仪对样品进行盐度测定,若样品盐度超过其量程,可先将样品稀释10倍后测定,所得数值乘以10即为原样品盐度,记录试验数据。

1.3.5 底泥盐度测定。将底泥取出置于定性滤纸上放在干燥处自然风干,风干后将其碾磨成粉末。称取5 g左右泥样粉末溶解于25 ml 双蒸水中,过滤蒸干后于恒温干燥箱中110℃干燥1 h。冷却后于电子天平上称量,并按以下公式算出含盐量(w):

$$w(\%) = \frac{(m_2 - m_1)}{m_0} \times 100$$

式中, m_0 为称取的底泥样品质量; m_1 为蒸发皿质量; m_2 为蒸发干燥后总质量。

1.3.6 菌种纯化及初步鉴定。取优势菌落反复进行平行划线,进行纯化。记录菌落形态,革兰氏染色,观察细胞形态。

2 结果与分析

2.1 盐度测定的结果 3次所采泥样的含盐百分数有一定差异,多数集中在2.00%~4.00%,最低为1.40%,最高为

基金项目 舟山市科技计划项目(07105)。

作者简介 刘雪珠(1973-),女,浙江岱山人,硕士,副教授,从事海洋生物研究。

收稿日期 2009-07-15

8.80%。秋、冬、春 3 季盐度所采泥样的平均盐度分别为 3.79%、3.11% 和 2.44%。3 次水样含盐百分数明显高于泥样,3 季所采水样的平均盐浓度分别为 20.12%、5.01% 和 6.78%。水样及泥样中 3 季盐度平均盐浓度分布趋势见图 1。弱嗜盐微生物的最适生长盐浓度为 0.20~0.50 mol/L (即 1.17%~2.92%),中度盐微生物的最适生长盐浓度为 0.50~2.50 mol/L (即 2.92%~14.61%),故从盐度分析盐田环境比较适宜中度嗜盐菌生长。

2.2 分离培养各次试验细菌总数的统计 试验在碱性高盐培养基中没有分离到嗜盐菌,另 2 种培养基中嗜盐菌与耐盐菌计数结果如表 1、2 所示。由表 1、2 可以看出,在低盐及中盐培养基中,同一时间、同一培养基相同样本性各个采点的菌体数量分布差异不是非常明显,7 个样品中多数集中于某一数量级。同一时间同一培养基不同采点都显示出泥样中菌数大于水样中菌数。

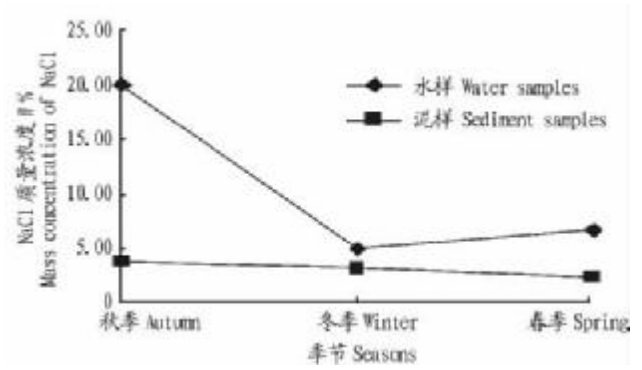


图 1 不同季节水样及泥样的平均盐浓度
Fig. 1 Average salt concentration in the water samples and sediment samples in different seasons

图 2、3 表明,无论泥样与水样秋季嗜盐微生物分布最多。在低盐培养基中,水样的耐盐微生物冬季与春季分布相近,且春季略高于冬季;而泥样中数量分布冬季明显高于春季。

表 1 不同季节、不同培养基中水样所含嗜盐菌与耐盐菌的数量

Table 1 Numerical distribution of halotolerant bacteria and halophilic bacteria from water samples in different media and different seasons

水样 Water samples	秋季 Autumn		冬季 Winter		春季 Spring	
	中盐培养基	低盐培养基	中盐培养基	低盐培养基	中盐培养基	低盐培养基
	Moderate-salt media	Low-salt media	Moderate-salt media	Low-salt media	Moderate-salt media	Low-salt media
W ₁	1.5 × 10 ²	5.2 × 10 ³	0.9 × 10 ²	3.0 × 10 ³	0.7 × 10 ²	3.8 × 10 ³
W ₂	1.8 × 10 ²	1.2 × 10 ⁴	0.8 × 10 ²	1.6 × 10 ⁴	1.0 × 10 ²	3.9 × 10 ³
W ₃	1.0 × 10 ²	4.6 × 10 ³	1.1 × 10 ²	7.5 × 10 ³	1.0 × 10 ³	2.3 × 10 ⁴
W ₄	1.2 × 10 ²	4.2 × 10 ³	0.1 × 10 ²	3.3 × 10 ²	0.6 × 10 ²	3.7 × 10 ³
W ₅	2.0 × 10 ²	1.2 × 10 ⁴	0.21 × 10 ²	2.8 × 10 ²	1.3 × 10 ²	3.7 × 10 ³
W ₆	2.5 × 10 ³	1.4 × 10 ⁴	0.3 × 10 ²	7.5 × 10 ³	0.9 × 10 ²	5.4 × 10 ³
W ₇	1.0 × 10 ²	4.2 × 10 ³	0.8 × 10 ²	9.5 × 10 ³	1.1 × 10 ²	3.9 × 10 ³
平均数	4.8 × 10 ²	8.0 × 10 ³	0.6 × 10 ²	6.3 × 10 ³	2.23 × 10 ²	6.8 × 10 ³

表 2 不同季节、不同培养基中泥样所含嗜盐菌与耐盐菌的数量

Table 2 The amount of halotolerant bacteria and halophilic bacteria in the sediment samples in different media and different seasons

泥样 Sediment samples	秋季 Autumn		冬季 Winter		春季 Spring	
	中盐培养基	低盐培养基	中盐培养基	低盐培养基	中盐培养基	低盐培养基
	Moderate-salt media	Low-salt media	Moderate-salt media	Low-salt media	Moderate-salt media	Low-salt media
S ₁	3.2 × 10 ³	1.7 × 10 ³	3.3 × 10 ³	5.0 × 10 ³	3.1 × 10 ³	6.0 × 10 ³
S ₂	7.8 × 10 ³	1.8 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴	5.0 × 10 ⁴	5.7 × 10 ³	1.0 × 10 ⁴
S ₃	5.0 × 10 ²	1.2 × 10 ⁴	2.8 × 10 ³	1.5 × 10 ⁴	4.8 × 10 ³	5.7 × 10 ²
S ₄	4.7 × 10 ³	1.7 × 10 ⁴	3.1 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁴	2.8 × 10 ²
S ₅	6.3 × 10 ⁴	5.5 × 10 ⁴	6.7 × 10 ³	5.4 × 10 ³	3.4 × 10 ³	3.8 × 10 ³
S ₆	1.5 × 10 ³	1.4 × 10 ⁴	9.6 × 10 ²	1.8 × 10 ⁴	7.3 × 10 ²	3.8 × 10 ³
S ₇	6.2 × 10 ⁴	7.0 × 10 ⁴	4.1 × 10 ³	5.6 × 10 ³	1.0 × 10 ⁵	3.2 × 10 ³
平均数	2.0 × 10 ⁴	2.8 × 10 ⁴	9.8 × 10 ³	2.04 × 10 ⁴	1.9 × 10 ⁴	4.0 × 10 ³

季。在中盐培养基中,水样中嗜盐微生物的分布数量远远少于低盐培养基中,相差 2 个数量级;在泥样中低盐与中盐培养基的嗜盐微生物分布无明显差异,其中秋、冬两季低盐培养基中的微生物分布高于中盐,但在春季中盐培养基中的微生物数量高于低盐。

2.3 菌落形态及细胞形态 低盐平板培养 3 d,中盐平板培养 7 d 后共分离纯化菌株 84 株,其中低盐平板 52 株,中盐平板 32 株。多数菌落直径为 0.5~3.0 mm,表面光滑,绝大多数不透明。菌落呈现白色、红色、橙色等不同颜色,其白色菌落居多,有 73 株,占菌株总数 71%;其次是红色,有 13 株,占

菌株总数 15.5%。菌落形状以圆形为主,占总数的 94%,其余为长形。

分离自低盐平板的菌株细胞形状为球形的最多,占 60%;其次为杆状,占 15%;其余为不规则形或具有多种形态。分离自中盐平板菌株细胞形状为球形和杆状的最多,分别占菌株总数的 45% 和 44%。来源于 2 种培养基的菌株革兰氏染色大多为阴性,分别为 94% 和 70%,表明分离菌株中大部分可能为古生菌。

3 讨论

3.1 不同基质样品中的盐度差异与菌体分布 不同季节水

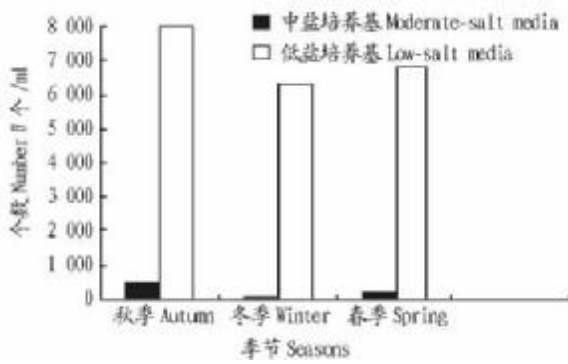


图2 不同季节不同培养基水样中嗜盐微生物平均分布

Fig. 2 Average distribution of microbes in water samples in different media and different seasons

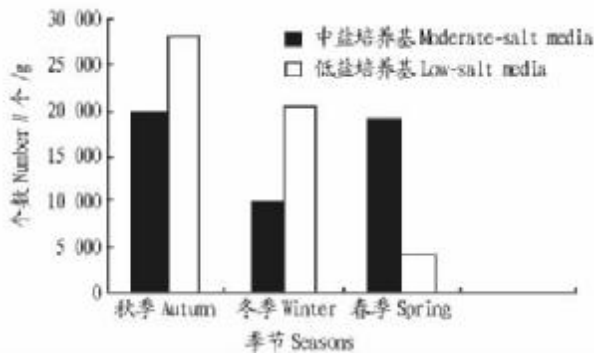


图3 不同季节不同培养基泥样中嗜盐微生物平均分布

Fig. 3 Average distribution of microbes in the sediment samples in different media and different seasons

样及泥样中的 NaCl 质量浓度分布情况如图 1 所示,从图 1 可以看出,无论泥样还是水样秋季的盐度最高。这可能是因为秋季温度高、日照强、水蒸发量大导致盐饱和度增加,水体受直接影响较大故不同季节变化明显;而泥样在水环境下受气温、日照影响小故不同季节变化不大,随着温度逐渐降低呈微弱下降趋势。与水样中盐度有明显的季节差异性不同,水样的菌体数量在 3 个季节中没有出现对应的变化,但在已筛选出的菌株中不难发现 3 个季节中菌落特征有明显不同。春、冬两季的菌落多呈白色、乳白色、淡黄色,但秋季水体中

筛选到的菌落多数为橙黄、粉红、玫红等较鲜艳的颜色,显然菌体组成在不同季节的水体中有很大差异。与水样正好相反,泥样的盐度变化不大但菌体数量变化显著:低盐培养基中菌体数量随着盐度渐降而趋少;中盐培养基的菌数与盐度没有正相关关系,春季盐度稍低于冬季但菌落数高于冬季。

3.2 不同基质样品中菌体数量分布差异 图 2、3 表明,无论是泥样还是水样,秋季嗜盐微生物分布最多,可能因为秋季温度明显高于冬、春两季。泥样中总菌数大于水样。这与其他盐田环境分布调查一致^[5-6],很有可能是泥样中含有比水样更多的营养成分。水样的低盐培养基中耐盐微生物冬季与春季分布相近,且春季略高于冬季;而泥样中数量分布冬季明显高于春季。水样的中盐培养基中微生物的分布数量远远少于低盐培养基中,相差近 3 个数量级;在泥样中低盐与中盐培养基的微生物分布有明显的区别。

图 2 显示低盐与中盐环境培养基菌落数有非常大的差异。可能是由于盐田水环境营养物质相对贫乏单一,NaCl 的含量成为其最重要的生长限制因子。水样受外界环境温度的影响比较大,图 2 显示出温度是一种重要的外界影响因素。图 3 表明低盐与中盐环境培养基菌落数没有非常明显的差异。可能在泥样中营养物质相对多样且丰富,所以菌落数明显高于水样,另外由于泥样中可能含有多种无机盐离子也相对削弱了 NaCl 对其分布的影响。

参考文献

- [1] 李爱民,王威,张志香,等. 盐田良性生态系统中嗜盐菌的研究[J]. 南开大学学报:自然科学版,1994,27(4):68-71.
- [2] 吕爱军,刘隳民,华栋,等. 盐田中嗜盐菌的初步研究[J]. 实验与技术,2003,27(12):5-6.
- [3] 迪丽拜尔·托乎提,徐晓晶. 新疆艾丁湖及邻近地区嗜盐菌和耐盐菌的数量分布[J]. 生态学报,2001,21(8):1388-1391.
- [4] OREN A. The ecology of the extremely halophilic archaea[J]. FEMS Microbiol Rev,1994,13:415-440.
- [5] 吕爱军,温洪宇,胡斌,等. 连云港台南盐田中嗜盐菌数量分布的调查[J]. 徐州师范大学学报:自然科学版,2003,21(1):77-78.
- [6] MOICA F J, CISNEROS E, FERRER C, et al. Osmotically induced response in representatives of halophilic: the bacterium *Halomicrobium elongata* and the archaeon *Haloflex volcanii*[J]. J Bacteriol,1997,179:5471-5481.

(上接第 16486 页)

贡、德阳、乐山、眉山、泸州、雅安、内江、宜宾、南充市属于生态较安全的第 1 类;攀枝花、遂宁、广安、达州、绵阳、广元、巴中市及阿坝藏族羌族自治州属于生态较不安全的第 2 类;资阳市、甘孜藏族自治州、凉山彝族自治州属于生态不安全的第 3 类。这反映出四川省内大部分地区都属于生态相对比较安全的类型,这与国家近几年来对四川省投入大量生态建设资金进行生态整治、建设生态屏障有很大关系。

7 结语

运用因子分析进行的生态安全评价方法较为客观,克服了特尔菲权重确定法中的主观性。其评价结果能够较好地反映客观实际情况,具有一定的参考价值。但是,由于作者水平限制,评价中的因子选择并不十分全面,阈值确定也可进行改进,这些问题都有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 四川省统计局,四川省调查总队. 四川省统计年鉴(2006)[M]. 北京:中国统计出版社,2006:6.
- [2] 肖薇薇,谢永生,王继军. 黄土丘陵区农业生态安全指标体系的建立[J]. 水土保持通报,2007,27(2):146-149.
- [3] 李玉平,蔡运龙. 河北省土地生态安全评价[J]. 北京大学学报:自然科学版,2007,43(6):784-789.
- [4] 田克明,王国强. 河南省农用地生态安全评价探讨[J]. 中国生态农业学报,2007,15(1):156-158.
- [5] 王惠勇,曲衍波,郑晓梅,等. 主成分分析法在城镇土地生态安全评价中的应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(1):4614-4617.
- [6] 丁辉. 地理学中的相关分析与回归分析[M]. 成都:电子科技大学出版社,1996(1):72-117.
- [7] DENG X Z, ZHAN J Y, ZHANG X L. Simulation and analysis of land system structure changes in Huang-Huai-Hai plain area [J]. 2007,8(3-4):45-52.
- [8] LI X, GUO N, SONG F R. Relationship between the cultivated land change and the population and economic development in Shandong Province since 1990 [J]. Asian Agricultural Research,2009,1(1):14-17,33.