

水生细菌生物量的估算方法*

邱大俊 焦念志

(厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室 环境科学研究中心 厦门 361005)

摘要: 细菌的生物量是海洋微生物研究的关键参数之一。目前, 细菌生物量估算方法主要根据其体积的大小进行换算, 但换算的方式也不尽一致。对细菌体积和细菌碳含量主要的测定方法、体积与生物量之间换算系数、换算模式进行介绍, 评述。认为流式细胞术是测定细菌体积较为合适的方法, X-射线微量分析法是测定单个细菌生物量(碳含量)最合适的方法, 异速生长模式是目前生物量换算过程较为常用的模式。

关键词: 细菌, 体积, 碳含量, 换算系数

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0111-05

Methods to Assess Biomass of Aquatic Bacteria

QIU Da-Jun JIAO Nian-Zhi

(Key Laboratory for Marine Environmental Sciences of Ministry of Education / Environmental Science Research Centre, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: Bacterial biomass is considered as one of the central parameters in the research on marine ecosystems. Now, the methods to convert bacterial biomass could depend on bacterial volume, but there is some difference among the different conversion models. Not only the measurements of bacterial volume and bacterial carbon concentration, the conversion factor between the volume and bacterial biomass, but also the conversion model will be discussed in this paper. Conclusions can be reached that flow cytometry is available to assess bacterial volume and X-ray microanalysis is the best method to measure single bacterial biomass and allometric model is widely used in conversion of biomass.

Key words: Bacteria, Cell size, Carbon content, Conversion factor

细菌是各类水环境中单细胞生物的重要组成, 也是海洋中的碳和氮循环的一个重要的中间环节, 估算水生细菌的生物量对于研究碳循环等方面具有十分重要的意义。目前, 细菌的生物量是海洋微生物研究的关键参数之一, 也是水生生物学家长期以来一直致力研究的方向之一。随着技术的进步, 细菌生物量的估算方法有了很大的发展, 但准确的测定细菌的生物量仍是现代水生微生物生态学的突出问题^[1,2]。目前, 还没有直接测定细菌生物量的可行性方法, 只有估算细菌生物量的方法, 其中方法之一就是根据换算系数把测定细菌的体积换算为细菌生物量。为了比较不同方法的优缺点, 本文将分别对细菌的体积的测定方法、细菌碳含量的测定方法、体积与生物量之间换算系数、换算模式进行介绍, 评述。

1 细菌生物量的估算方法及其换算系数

细菌量的早期研究对象是细菌数量, 随后是细菌生物量。广义的细菌生物量包括

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (No. G20000078500)

收稿日期: 2003-09-19, 修回日期: 2003-11-28

细胞数量、体积、蛋白质含量、干重、碳含量等。但由于现行的生态系统动力学模式都以能量或能转换为能量的碳含量作为生物量的单位,所以狭义的生物量指碳含量。1980年 Fuhrman 和 Azam 使用碳含量来表示细菌的生物量,细菌碳含量的测定方法也是随着科技的不断进步而取得革新,Veen 等(1979)通过 $K_2Cr_2O_7$ 和 H_2SO_4 对样品进行处理后测定碳含量;1985年 Bratbak 利用 CHN 分析仪测定 C、N、P 的含量;同年,Heldal 等提出用 X-射线微量分析法测定个体细胞的碳含量,Norland(1995)第一次应用它直接测定自然水样中的细菌细胞各种元素的含量;Fukuda 等(1998)利用高温催化氧化法(HTCO 法)测定水样中细菌碳含量;测定细菌碳含量的方法还有 ^{14}C 法等。本文中生物量的测定方法单指测定细菌碳含量的方法,而干重、蛋白质等其他生物量测定方法就不进行介绍;细菌的体积测定方法在第3部分进行介绍。

通过对代表性样品的细菌体积和生物量的测定,根据二者求出相对应的换算系数、换算模式;然后可根据测定的细菌体积直接换算为细菌的生物量(碳含量),较为常用换算系数求法目前有3种^[3]:(1)基于碳含量与湿重的比值和细菌的浮力密度来估算合适的换算系数,但它不是单独根据细菌的大小来提供一个合适的换算系数。由浮力密度和细菌的体积换算成湿重,根据干重与湿重比值或者碳含量与湿重的比值求出换算系数的值。(2)基于估算细菌单细胞的体积并根据样品中细菌的数量来确定细菌总体积;同时测定有代表性样品的细菌生物量(干重或者碳含量),根据二者来求换算系数的值。(3)通过在透射电子显微镜上加 X-射线微分析技术直接测定细菌单细胞的干重或者碳含量,同时直接估算相对应细菌的体积,通过细菌干重(碳含量)和体积之间的关系求换算系数的值。

换算系数最为常用的求法是方法(2),方法(1)、方法(2)受仪器限制比较小;方法(3)受到仪器的限制,但方法(3)的准确性高,这种方法测定单细胞的碳含量排除了细胞碎片和其它非细菌的碳含量的影响,且测定的细菌体积与碳含量二者直接呈对应关系。

2 细菌体积的测定方法

细菌的体积估算方法目前有许多种,常用的有落射荧光显微镜、扫描电子显微镜和透射电子显微镜,库尔特计数器,流式细胞仪等方法。前面3种方法较为常用,只对它们稍作讨论;流式细胞术对颗粒体积测定是一种新兴的方法,在下文中将作稍多介绍。

荧光显微镜技术联合 AO、DAPI 或者 SYBR Green I 等荧光探针对细菌细胞进行检测,使得细菌细胞与其它颗粒区分开来。但光学显微镜的分辨率有限,使得体积很小的细菌细胞难以准确被测定。电子显微镜拥有比较高的分辨率和放大倍数,细菌的体积能够非常准确的测量。然而,其处理步骤麻烦;同时,细菌细胞在处理过程中发生皱缩和扭曲,使得细菌细胞体积在估算过程中产生误差。自然水样中的细菌的大小分布通常会与其它小的生物、有机碎片,无机颗粒等相互重叠,库尔特计数器无法从中区分出细菌^[3]。

流式细胞术与荧光探针二者相结合也能够区分出细菌与其它颗粒。这种方法对细菌细胞的体积分析是以收集到小角度的前向散射光强度与细菌的大小和形状等之间的相关性为基础;研究表明椭圆型颗粒在光束的作用下,其前向散射光的强度与颗粒体

积呈指数对应关系, 这为应用流式细胞仪对细菌大小测定奠定了基础^[4,5]。

Koch A L 等 (1996) 已经验证, 在限定的区间内散射光强度与干重和体积使用简单的数学转换是可行的, 提出流式细胞仪测得的前向散射光强度 (20°角) 换算成细菌体积的公式^[4]:

$$V = 1.031269F^{(0.66188 + 0.0089587)\ln(F)} \quad (1)$$

$F = KI$, K 是个经验常数, I 是流式细胞仪测得前向散射光强度。Roberson 等 (1998) 根据体积和干重的换算系数把公式 (1) 转化为计算出颗粒的干重的公式^[5]:

$$X_{dry} = e^{a\ln(KI)^3 + b\ln(KI)^2 + c\ln(KI) + d} \quad (2)$$

这里的 a 、 b 、 c 、 d 为常数。细菌细胞碳含量可根据干重的 47% 换算而得。

这种方法有着测定速度快、灵敏度高等优点, 但也有着它自身的限制和不足: 首先, 不同厂家、不同型号的仪器参数不同, 且目前这方面开展的研究不多, 直接套用参数进行结果计算存在着困难。其次, 因不同样品或者样品中细胞群体间的散射系数不同, 这种方法应用到未知种类或自然状态下细菌种群的生物量测定, 其准确性就会下降。

3 细菌碳含量的测定方法

目前, 对细菌生物量的研究中测定碳含量的方法很多, 对于自然样品重细菌碳含量的常用测定方法有温燃烧红外热导分析法、高温催化氧化法、X-射线微量分析法等。

3.1 温燃烧红外热导分析法 (CHN 分析法) 这种方法通常先把样品过滤到 GF-F 膜上, 干燥、酸熏, 以去除无机碳, 再是通过 CHN 元素分析仪测定样品中细菌的 C、H、N 等元素的含量。细菌数量可通过荧光显微镜或者其它方法进行测定, 后计算出单个细胞的碳量平均值。这种方法具有操作简单、准确快速、自动计算并处理结果等优点^[5]。这种方法的不足在于小细菌可能透过膜而无法被收集, 自然样品中细菌的碳含量受到细胞碎屑和其它浮游生物的干扰。

3.2 高温催化氧化法 (HTCO 法) Fukuda 等 (1998) 利用高温催化氧化法测定海洋细菌碳含量和氮含量。首先把海水中的藻类和碎片去除, 并且用切向超滤法 (CFF) 进行浓缩, 再用 HTCO 法测定样品的碳量和氮量^[6]。浓缩液中可能包括了一定的其它浮游生物和碎屑, 导致估算出细菌生物量的值存在着一定误差。

3.3 X-射线微量分析法 (X-Ray Microanalytic Method) X-射线微量分析法是基于透射电子显微镜与 X-ray 微量分析 (XRMA) 结合; 这种方法需要检测器的灵敏性足够高, 以使单个细胞的微量碳元素和氮元素能够准确被测定^[7~11]。样品需进行空干预处理, 后在 XRMA 和 TEM 一起在扫描的模式下测定单个细胞内所有元素的含量 (H 除外)。通过这种技术也能够测定细胞内各方面的生理状态^[8], 但是受到实验步骤的限制很难得到准确的校正^[12]。

通过 X-射线微量分析法研究发现单位体积内小细菌细胞的 C、N、P 的元素含量比大细菌来的高^[9,12]。不同海区、同一站位不同的水层的细菌细胞的碳含量各不相同。因此, 直接测定细菌个体的碳含量显的尤为重要, 而直接检测单个细菌细胞的碳量的目前只有 X-射线微量分析法, 这种方法也可避免其他生物体和细胞碎片的碳被计算为细菌的碳含量。因此, X-射线微量分析法是目前研究细菌单细胞碳含量最为合适的方法。

4 从细菌体积到细菌生物量常用的换算方法

目前, 由细菌的体积换算为细菌生物量的模式常见的有 3 种: 比率常数模式、生物量常数模式、异速生长模式。

4.1 比率常数模式 (Constant Ratio Model) 1985 年 Bratbak 提出体积与生物量的比值为体积换算成生物量的换算系数, 即比率常数模式。然而, 这个换算系数在不同情况下测定的值变化很大, 其相当部分变化是由于细菌种类、生长条件、测定方法与测定过程等因子的不一致而引起的; 同时也证实了细菌生物量与体积之间具有相关性^[3,13]。

4.2 生物量常数模式 (Constant Biomass Model) 生物量常数模式是由 Lee 和 Fuhrman (1987) 提出, 认为每个细菌细胞的碳含量是一个相对常数 (20fg C cell⁻¹), 至少它适用于 0.036μm³ ~ 0.073μm³ 细胞体积区间的生物量的估算, 因为小细胞细菌单位体积的碳含量比大细胞细菌的高^[3,14]。

4.3 异速生长模式 (Allometric Model) 异速生长模式假设干重与体积的比值和体积是呈线性对应关系, 即小细胞的有机体比大细胞的有机体拥有更高的干重与体积比。这种关系最早在藻类的碳浓度与体积的关系中进行相关的研究, Norland 等 (1987) 应用 X-射线微分析技术对细菌单个细胞的干重和投射电子显微镜对体积进行测定时证明了二者呈异速生长关系。Simon 和 Azam (1989) 对自然海区细菌种群的蛋白质浓度和体积大小研究也证明二者呈异速生长关系。异速生长关系可以描述次方函数: $m = CV^a$; 这里的 m 是生物量, V 是体积, C 是单位体积 (V = 1) 与生物量之间的换算系数。a 是标度因子。前面两个模式是异速生长模式的特例, 即当 a = 1 时为比率常数模式, a = 0 时为生物量常数模式。但过去细菌的 a 值研究结果也不尽相同, Simon 和 Azam (1989) 实验得出的 a 值是 0.59, 后重新计算得为 0.72; Norland 等提出的 a 值是 0.91 ± 0.02, Loferer-Köss 提出的 a 值是 0.86, 换算系数也受到细菌种类、生长条件、测定方法与测定过程等因子的影响^[3,12,15]。

表 1 不同方法测定不同生长环境下细菌的生物量

细菌的来源	分析方法	细胞体积 (μm ³)	每个细胞 C 浓度 (fg C cell ⁻¹)	参考文献
美国 Long Island 海滩表面	显微镜 + CHN 分析仪	0.036 ~ 0.073	20 ± 0.8	[14]
分离的海洋细菌培养:	库尔特计数器	0.13	13.3*	[5]
Cycloclasticus oligotrophus	+ 流式细胞仪	0.16	16.8*	
		0.24	19.4*	
		0.25	27.1*	
日本 Otsuchi Bay 和 Tokyo Bay 的近岸海水	高温催化氧化法	—	30.2 ± 12.3	[6]
大洋海区	高温催化氧化法	—	12.4 ± 6.3	[6]
挪威的近岸水	电子显微镜 + XRMA	0.15 ~ 0.6	15 ~ 42	[10]
大西洋百慕大海区连续站	电子显微镜 + XRMA	0.025 ~ 0.062	4.0 ~ 9.8	[9]
站点				

* 由流式细胞仪测定的干重 (dry weight) 乘以 47% 得到

总之, 模式的提出、换算系数的确定皆是为了更加准确、方便的估算出水体中的细菌生物量; 而模式是以测定的数据为基础的, 而数据的来源于测定。因此, 选择合

适的测定方法,降低方法本身与操作过程造成的误差显的尤为关键。测定方法的有效性和适用性、结果的重现度将直接影响模式是否能够广泛的应用、测定结果的可信度。

5 不同方法测定细菌的生物量的比较

细菌的生物量的研究已经有较长的一段历史,已经积累了许多数据,但研究的方法和海域的不同,所测定的结果也完全不同(见表1)。从表格中数据可以得出海洋细菌细胞的碳含量,近岸细菌的碳含量为 $15\text{--}42\text{ fg C cell}^{-1}$,也有的文献报道近岸的测定 C cell^{-1} 值区间为 $15\text{--}53.3\text{ fg C cell}^{-1}$ 。而大洋中细菌细胞的碳含量低的多,Fukuda 等(1998)在亚热带太平洋测定得来的估算细菌是 13 fg C cell^{-1} 。Caron 等(1994)得到 Sargasso 海区细菌细胞的碳含量为 15 fg C cell^{-1} 。不同海区细菌细胞即使一样大小,碳含量也不同所以,在估算海洋碳通量中,细菌的碳量计算使用单一的换算系数是不合适的,其将导致计算的结果与实际值之间存在着很大的误差。

6 展望

虽然目前准确的测定细菌生物量还存在的突出问题,但随着方法的创新,仪器的改进和推广使用、多种方法的共同研究,必将推动它们的研究。目前,流式细胞术测定自然生态中的细菌种群生物量还不是很普遍,且技术不是十分成熟;但随着流式细胞仪测定的方法和技术的提高,流式细胞仪将成为细菌体积测定普遍应用的方法之一。在检测水样中的细菌体积和数量时,流式细胞术的优势是快速、准确,而 X-射线微量分析法能够直接准确的测定单个细菌间的碳含量和体积,但速度慢;二者相结合将使得细菌生物量的测定更加准确、快速,并将是今后的一个发展方向,将可以准确、快速的测定不同水域中细菌的生物量;经过长期的数据积累,将可提出更加完善的细菌体积换算成生物量的模式和得到更为精确的换算系数,从而使得生物量估算的更为准确、简便。

参考文献

- [1] Sherr B, Sherr E, Giorgio P D. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press Ltd, 2001, **30**: 129 ~ 159.
- [2] Zubkov M V, Fuchs B M, Eilers H, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 3251 ~ 3257.
- [3] Norland S. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, 303 ~ 307.
- [4] Koch A L, Robertson B R, Button D K. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, **27**: 49 ~ 61.
- [5] Robertson B R, Button D K, Koch A L. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3900 ~ 3909.
- [6] Fukuda R, gawa H O, Nagata T, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3352 ~ 3358.
- [7] Heldal M, Norland S, Turnayr O. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **50**: 1251 ~ 1257.
- [8] Norland S, Fagerbakke K M, Heldal M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 1357 ~ 1362.
- [9] Gundersen K, Heldal M, Norland S, *et al.* *Limnology and Oceanography*, 2002, **47**: 1525 ~ 1530.
- [10] Tuomi P, Fagerbakke K M, Brathak G, *et al.* *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, **16**: 123 ~ 124.
- [11] Fagerbakke K M, Heldal M, Norland S. *Aquatic Microbiology Ecology*, 1996, **10**: 15 ~ 27.
- [12] Simon M, Azam F. *Marine Ecology Progress Series*, 1989, **51**: 201 ~ 213.
- [13] Brathak G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **51**: 1488 ~ 1493.
- [14] Lee S, Fuhrman J A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53**: 1298 ~ 1303.
- [15] Loferer-Krö Ssbacher M, Klima J, Psenner R. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 688 ~ 694.