

褐藻酸降解菌对海带感染能力差异性分析*

刘成圣 王丽丽 王蒙 唐学玺**

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

摘要 对分离得到的 5 株褐藻酸降解菌进行了感染海带的实验, 确定 5 株菌均为海带病烂的致病菌。对其降解能力和感染能力的实验表明, 5 株菌对褐藻酸钠的降解能力存有差异, 它们对海带感染能力的差异与其对褐藻酸钠的降解情况相类似。在褐藻酸降解菌的感染下, 海带光合速率下降, 感染能力强的菌株对光合作用的影响明显大于感染能力弱的菌株。

关键词 海带, 褐藻酸降解菌, 光合作用

在我国海带养殖事业中, 苗种几乎全部都是由人工育苗提供的, 海带人工育苗是发展我国海带养殖事业的一个重要环节^[1-2]。在人工培育海带幼苗过程中, 海带病害较为突出, 主要集中在苗期病烂和幼苗脱落上^[3]。这一问题严重时甚至可以使整个育苗工作陷入困境, 人们将无法得到苗种, 给育苗和供苗工作带来威胁, 给海带栽培事业的发展带来巨大损失。过去, 有关育苗单位力图从管理措施上严加控制, 但由于对烂苗或掉苗的基本原因认识不足, 工作有些盲目, 效果也不够理想。烂苗或掉苗是一个复杂的问题, 原发因素不外乎微生物的、生理的或生态的(与培养技术有关), 其中养殖水系中致病微生物的大量繁殖及其作用是引起海带病烂的不可忽视的重要因素^[4-7]。研究表明, 海带病烂, 尤其在育苗期出现的病烂与褐藻酸降解菌的大量繁殖有关^[7]。褐藻酸降解菌是海带藻体上的主要附生细菌。在正常的情况下, 由于藻体保持着较高的抗感染能力, 限制了褐藻酸降解菌的大量繁殖及其对藻体的侵袭, 从而在藻-菌间形成一种动态平衡关系, 这时并不能引起病烂的发生^[3]。但是, 如果养殖水体恶化、水温过高、养殖密度过大或出现机械损伤时, 往往造成海带的抵抗力下降, 细菌易于侵入并大量繁殖而导致病害^[3]。本文对海带病烂的主要致病微生物——褐藻酸降解菌的降解能力、对海带感染能力以及对海带光合作用的影响进行了研究, 以期对海带病烂的防治和海带养殖业的健康发展提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 海带的选择

实验选择日本真海带 (*Laminaria japonica*), 取自

烟台育苗厂, 苗体长为 4.0~6.0 cm。

1.2 菌株的选择及培养基

选用青岛海洋大学海洋生命学院生化室分离保存的 5 株褐藻酸降解菌, 筛选培养基及其配方参照丁美丽的方法进行^[7]。根据伯杰氏手册将 5 株褐藻酸降解菌定为埃氏交替单胞菌 (*Alteromonas espejiana*)。其特性如表 1。

1.3 回染

将 5 株褐藻酸降解菌回染到海带上, 观察其能否引起病烂。具体操作如下: (1) 取菌划斜面, 25℃培养 24 h, 菌长出后待用。(2) 取小片海带置于无菌海水中用无菌棉球正反面反复擦洗。此操作于 3 个灭菌培养皿中依次进行后, 用无菌海水冲洗, 然后置于灭菌培养皿中。(3) 将海带表面用刀尖刺伤一小口, 然后取菌接种到刺伤处, 接着加入无菌海水, 置于室内非阳光直射处培养。

1.4 回染后菌株的验证

若回染后的海带在刺伤处发生病烂, 则从该处取菌接种到平板上, 待菌长出后, 观察优势菌的菌落形态, 并对其进行液体培养基检测、革兰氏染色及细胞形态观察。

1.5 褐藻酸降解菌降解能力的分析

* 国家重点基础研究专项经费资助项目 G1999012004 号

第一作者: 刘成圣, 出生于 1967 年, 工程师, 从事海洋生物活性物质研究。电话: 0532-2032586

** 通讯联系人

收稿日期: 2001-11-15; 修回日期: 2002-04-08

将褐藻酸降解菌接种到含有褐藻酸钠的液体培养基上,使其培养基中菌的含量相同(2×10^6 个/ml),培养一段时间后观察培养基的透明度判断其降解能力。

1.6 褐藻酸降解菌感染能力的分析

用灭过菌的棉球沾取无菌海水擦洗海带小苗反复多次,并经无菌海水冲洗后,置于灭菌培养皿中待用。取灭过菌的小刀在海带片上划 2 mm 左右的刀口,然后取褐藻酸降解菌悬液(浓度为 2×10^7 个/ml) 2 μ l 接种到海带刺伤处,加入适量的无菌海水并置于无光线直射处静置培养。在感染的过程中每隔一段时间取划伤部位用于光合作用的测定,并在感染后的第

7 天统计肉眼可见的已被感染的海带片数,感染能力 (%) = (感染的片数/总片数) \times 100 %。

1.7 光合作用的测定

光合作用的测定采用黑白瓶法,将处理后的藻体(2 g) 分别放入 500 ml 的黑白瓶中,用虹吸的方法充满海水,把所有的空气赶出后,将白瓶和黑瓶密闭。在 12 ± 2 $^{\circ}$ C,光照 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的条件下反应 2 h,用定氧法分别测定光合前后黑白瓶中溶解氧的浓度。根据溶解氧浓度的变化,光合时间及藻体的鲜重求出海带的净光合速率。相对光合速率(%) = (处理组光合速率/对照组光合速率) \times 100 %。

表 1 5 株菌株的特性

Tab.1 The characteristics of 5 strains

序号	菌落形态	细胞形态	革兰氏染色
1	圆形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央有一白点,其外依次为半透明,乳白色环,半透明,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.88 μm , 宽 0.56 μm	阴性
2	圆形,大,黄色,不透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央为黄色,外圈呈乳黄色,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 2.06 μm , 宽 0.36 μm	阴性
3	橄榄形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央半透明,其外有一乳白色环,外为半透明状,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.24 μm , 宽 0.40 μm	阴性
4	橄榄形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央为一白斑,接着为半透明,乳白色环,半透明,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.22 μm , 宽 0.26 μm	阴性
5	圆形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央半透明,其外有一乳白色环,外为半透明状,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.12 μm , 宽 0.32 μm	阴性

表 2 重新分离的 5 株菌株的特性

Tab.2 The characteristics of 5 strains which obtained by isolation again

序号	菌落形态	细胞形态	革兰氏染色
1	圆形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央有一白点,其外依次为半透明,乳白色环,半透明,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.88 μm , 宽 0.56 μm	阴性
2	圆形,大,黄色,不透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央为黄色,外圈呈乳黄色,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 2.06 μm , 宽 0.36 μm	阴性
3	橄榄形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央半透明,其外有一乳白色环,外为半透明状,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.24 μm , 宽 0.40 μm	阴性
4	橄榄形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央为一白斑,接着为半透明,乳白色环,半透明,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.22 μm , 宽 0.26 μm	阴性
5	圆形,大,浅乳白色,半透明,隆起,湿润,边缘整齐,菌落中央半透明,其外有一乳白色环,外为半透明状,外有透明圈。	杆状,顶端圆形,长 1.12 μm , 宽 0.32 μm	阴性

表 3 5 菌株的降解能力分析

Tab.3 The analysis of decomposing activity of 5 strains

序号	状态	降解强度
1	液体表面无菌膜,上部菌形成雾状,液体清澈,培养 4d 后液体颜色由无色变为黄色	+ + + +
2	液体表面无菌膜,上部菌形成雾状,液体清澈,培养 4d 后液体颜色由无色变为黄色	+
3	液体表面有菌膜,上部菌形成雾状,液体清澈,培养 4d 后液体颜色由无色变为黄色	+ + +
4	液体表面有菌膜,上部菌形成雾状,液体清澈,培养 4d 后液体颜色由无色变为黄色	+ +
5	液体表面无菌膜,上部菌形成雾状,液体清澈,培养 4d 后液体颜色由无色变为黄色	+ + +

表 4 5 菌株对海带感染能力分析

Tab.4 The analysis of infection activity of 5 strains

菌株序号	1	2	3	4	5
感染能力(%)	74.2 ± 6.9	27.1 ± 7.6	32.7 ± 8.9	49.6 ± 9.4	49.6 ± 9.4

2 结果与讨论

2.1 回染后菌株的验证

比较表 1 和表 2 不难发现,通过回染实验从回染海带上重新分离出来的 5 菌株与回染前菌的菌落形态及细胞形态相同,且海带的病烂症状相似,那么就可证明这 5 菌株均为海带病烂的主要致病菌(表 2)。回染效果与接菌量多少、菌降解能力强弱、海带自身的生理状况等有关。在反接实验中,要力求接菌量一致,并选用新鲜海带的相似部位、相似厚度和色泽等,从而使实验结果具有对比性。回染效果好的,经 3~4 d 培养后,刺伤处变绿,后变白腐烂掉。回染实验中对海带片的清洗不能达到完全彻底,其表面可能留有杂菌,因此在对菌进行验证时只对优势菌进行观察。

2.2 降解能力分析

将上述 5 菌株接种到液体培养基上,测定其降

解强度。表 3 显示,1 号菌株对褐藻酸钠的降解能力最强,其次为 3 号和 5 号菌株,2 号菌株对褐藻酸钠的降解能力最低。

2.3 感染能力分析

通过对海带的感染实验证明,1 号菌株对海带的感染能力最强,2 号最弱,3 号、5 号和 4 号居中。这一结果与它们对褐藻酸钠的降解情况相类似(表 4)。

2.4 褐藻酸降解菌感染对海带光合作用的影响

褐藻酸降解菌感染能够抑制海带的光合作用,且随着感染时间的延长,光合速率逐渐下降。5 株菌株间的比较发现,感染能力强的菌株(1 号)对海带的光合作用影响较大,而感染能力弱的菌株(2 号)影响较小(图 1)。光合作用是指示海带生理状态好坏的一个重要的生理指标,光合速率的降低说明海带在褐藻酸降解菌的感染下受到了不同程度的伤害。

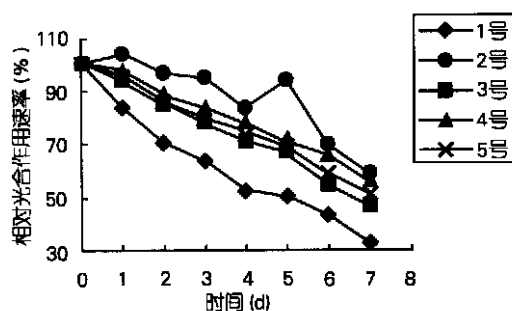


图 1 褐藻酸降解菌感染对海带光合作用的影响

Fig.1 The effect of infection by alginic acid decomposing bacteria on photosynthesis in *Laminaria japonica*

参考文献

- 杨震等.褐藻酸降解菌引起海带病烂的组织学研究,海洋科学,2000,24(12):3~5
- 索如瑛等.海带养殖.北京:农业出版社,1985. 22~38
- 周丽等.海带的病烂,海洋湖沼通报,1996,4:38~43
- 陈驹等.海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系,海洋与湖沼,1981,12(2):133~136
- 陈驹等.海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施,海洋与湖沼,1984,15(11):581~587
- 韩宝芹等.褐藻酸降解菌的发酵培养及褐藻酸酶对褐藻细胞的解离作用,海洋科学,1997,1:39~43
- 丁美丽.环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究,海洋学报,1990,12(2):224~229

研究报告 *REPORTS*

DIFFERENCE ANALYSIS OF INFECTION ACTIVITY OF ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA INFECTING *Laminaria japonica*

LIU Chengsheng WANG Li-li WANG Meng TANG Xue-xi

(College of Marine Life Sciences , Ocean University of Qingdao , 266003)

Received : Nov ., 15 , 2001

Key Words : *Laminaria japonica* , Alginic acid decomposing bacteria , Photosynthesis

Abstract

The experiments of *Laminaria japonica* infected by alginic acid decomposing bacteria were carried out , and the five strains of alginic acid decomposing bacteria were demonstrated to be pathogenic bacteria resulting *Laminaria japonica* in rot disease . The decomposing activity of five strains of alginic acid decomposing bacteria showed difference , and their infection activity exerting on *Laminaria japonica* also exhibited the same difference regulation . The photosynthesis of *Laminaria japonica* decreased under the infection of alginic acid decomposing bacteria , the strains which had high infection activity showed heavy affection on photosynthesis , on the contrary , the strains which had low infection activity exhibited light affection on photosynthesis .

(本文编辑 :张培新)