

褐藻酸降解菌的研究

III. 海带育苗系统中脱苗和烂苗原因 分析及其预防措施*

陈 勇 刘秀云 刘秀珍 于义德 杨肇惠

(中国科学院海洋研究所)

邱 淑 怀

(福建省三沙渔业公司育苗室)

海带人工育苗工作是发展海带栽培事业的一个重要环节,在人工控制的循环海水系统中,确保大量密集海带幼苗的正常生长乃是一项复杂的任务,其中病害问题尤为重要^[1,2]。近年来,全国不少育苗单位在育苗过程中普遍发生脱苗和烂苗现象,时常影响正常供苗。在严重的情况下,可以发展成为毁灭性灾难,甚至使整个育苗工作完全失败,往往因为苗源不足给海带栽培事业的发展带来损失。本研究工作的前两篇报告阐述了褐藻酸降解菌是海带藻体上的主要定居者和优势菌群,即使在不附加任何其他营养的条件下,这些细菌也能以海带藻体作为基质良好地生长。我们前期工作还证明,由褐藻酸降解菌产生的褐藻酸酶对海带藻体的酶解作用是引起海带腐烂的主要机制^[3-5]。室内人工传病接种试验结果也证明,在一定条件下海带藻体上褐藻酸降解菌的异常增殖可以导致海带幼苗出现脱苗和烂苗现象^[4],为了进一步弄清脱苗与烂苗问题的原因,深入研究海带育苗系统中微生物区系特点,特别是褐藻酸降解菌的分布状况及其消长规律在生产实践上具有相当重要的意义。为此,特在福建三沙海带育苗室系统地进行了微生物的调查与分析。本文着重研究和讨论海带育苗系统中微生物区系结构特点以及褐藻酸降解菌成为优势菌群的条件和原因等问题,并为脱苗和烂苗问题提供预防措施和建议。

一、材料与方 法

1. 样品采集

1980年8月至11月在三沙海带育苗系统的不同地段分别采集了海水样品:包括自然海区海水,沉淀过滤海水、苗槽培养海水、苗槽泡沫海水以及循环回路海水等。并在不同时期从苗槽的不同位置采集藻体样品,包括正常海带幼苗和脱落的幼苗样品。共分析样品100多个。

1981年3月在青岛栈桥海带栽培区采集海带藻体和海水样品4个。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1073号。

本文承曾呈奎、吴超元教授审阅,特此致谢。

收稿日期:1983年1月17日。

上述样品立即放在灭菌的玻璃器皿中,两小时内完成样品处理和微生物的分离工作。

2. 菌株分离与计数

采用安藤芳明培养基分离褐藻酸降解菌^[5]。采用蛋白胨-牛肉膏海水培养基分离异养细菌。

样品按本研究工作第一篇报告中的稀释法处理,在上述培养基中进行褐藻酸降解菌与异养细菌的分离与计数工作^[5]。从计数的平板中分别挑取单菌落菌株转入斜面,经纯化后获得褐藻酸降解菌纯菌株约 400 个。

3. 菌落形态观察和降解褐藻酸钠能力的测定

在褐藻酸钠平板上观察褐藻酸降解菌菌落形态、色素及其菌落周围呈现透明区或晕圈等特点。在褐藻酸钠液体培养基中测定其对褐藻酸钠的降解强度^[3]。培育温度为 25℃。

4. 温度对褐藻酸降解菌生长和降解褐藻酸钠速率的影响作用

选择降解褐藻酸钠能力强的菌株 50 株,分别接种在褐藻酸钠液体培养基中,分别于 4℃, 8℃, 12℃ 和 20℃ 条件下培育,定期观察其对褐藻酸钠降解情况。

褐藻酸降解菌菌株 No. 326 接种在蛋白胨-牛肉膏海水培养液中,分别在不同温度条件下培育、用分光光度计波长 590m μ 处定期测定其光密度值,绘出其在不同温度条件下的生长曲线。

二、结果与讨论

1. 褐藻酸降解菌的分布规律

海带与褐藻酸降解菌之间的普遍而密切的关系,反映出二者之间的某种内在联系。褐藻酸降解菌在海带藻体腐烂过程中的作用是无可非议的。但是作为附生海带上的细菌在海带生长过程中的作用尚未有论述^[7]。在海带栽培区的环境条件下,因生态平衡的结果,从每克新鲜海带藻体上一般只能分离到 3×10^3 个菌落。在自然海区中如此数量的褐藻酸降解菌对海带生长未发现不良影响。但如果条件突然改变,引起褐藻酸降解菌在海带藻体上出现异常增殖现象,那就可能对海带生产造成危害^[3,4]。

人工育苗系统中的环境条件显然极大区别于自然海区的情况。人们为了满足大量海带幼苗生长的需要而被迫采取一系列强化措施,为了争取高额生产量而不适当地提高育苗的密度等。图 1 为育苗室海水循环系统的示意图。整个育苗系统循环海水的总体积以千吨计,为了经常使苗槽海水温度恒定保持在 6—8℃ 的范围内,必需不断地补充新鲜的冷却海水以更替苗槽中的海水。考虑到育苗管理的经济效果,排出的海水量约有 1/3—1/2 经回路循环系统再次被冷却后重新使用,其中难免夹杂大量脱落苗体、腐烂藻体和褐藻胶等。总之,在建立一系列育苗管理措施时,并没有把微生物作为一个重要因素加以考虑,因此也无法预先估计到育苗系统中微生物菌群结构到底会发生什么样的变化。从上述图 1,表 1 中均可看出,不论在培苗海水或海带藻体样品中,上述两种菌群的数量都有相当可观的增长。异养细菌的总量虽略高于褐藻酸降解菌的数量,但二者之间的差距不超过一个数量级。这里还应该考虑到,褐藻酸降解菌是一种异养细菌,其中绝大部分都可以在异养细菌计数的培养基上生长。也就是说,样品中异养细菌总量计数的数字,实际上包括褐

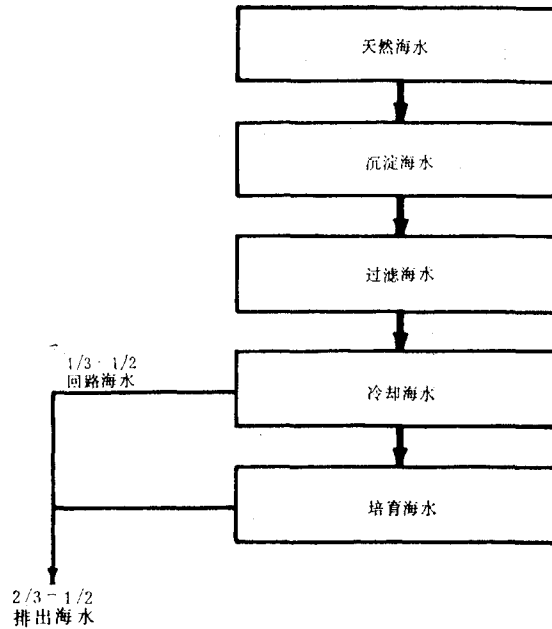


图 1 育苗系统中循环海水示意图

表 1 海带育苗系统中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布概况

菌 别	菌量 ¹⁾	样 品					
		天然海水	沉淀过滤海水	培育海水	正常苗	脱落苗	泡沫状海水
异养细菌		1.3×10^5	10^2	1.33×10^4	4.25×10^5	1.4×10^7	3.9×10^8
褐藻酸降解菌		2×10^2	3×10	3.2×10^3	7.33×10^4	1.57×10^6	7.3×10^7

1) 每毫升海水或每克鲜藻中细菌细胞数

藻酸降解菌的数目在内。只是由于褐藻酸钠培养基营养成分的限制，往往不能充分地反映

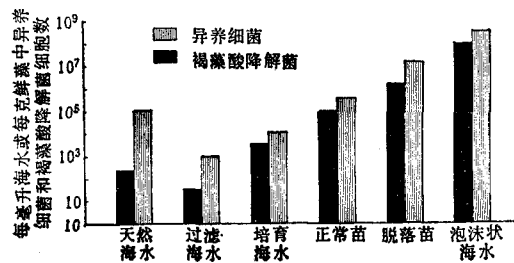


图 2 育苗系统中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布比较示意图

反映出样品中褐藻酸降解菌的实际数量。因此，褐藻酸钠平板计数的结果显然要偏低得多。尽管如此，微生物分析的结果仍然可以反映出两种菌群数量同步增长的趋势。这种趋势在图 2 中看得更为清楚。

为了更确切地了解育苗系统中异养细菌总量和褐藻酸降解菌之间的数量比例关系，在分析育苗系统中海带幼苗样品时，从一个异养细菌计数平板上挑出全部单菌落共 15 株异养细菌菌株。将其分别接种在

褐藻酸钠液体培养基中，测定其对褐藻酸钠的降解能力，测定结果发现，其中只有 4 株不

具有降解褐藻酸钠的能力,而 70% 以上的异养细菌菌株都具有积极降解褐藻酸钠的能力。因此,可以得出结论:在人工育苗系统中微生物结构的特点是褐藻酸降解菌已发展成为数量上压倒优势的菌群。

从表 1 中还可以观察到,褐藻酸降解菌在育苗系统中的分布状况明显地表现出微区分布的特点。自然海区的海水经沉淀过滤处理后,每毫升海水中褐藻酸降解菌计数只有 30 个菌落,这是微不足道的数目,但是这些海水经再次冷却进入苗槽后,褐藻酸降解菌的数量迅速上升到 3.2×10^3 个/ml。微生物分析结果证明,苗槽中大量的褐藻酸降解菌主要集中分布于海带幼苗藻体上。在正常的幼苗上,其数量可达每克鲜藻 7.33×10^4 个细胞。在脱落的幼苗上,其数量可超过 10^6 个/g 鲜藻。在苗槽搅拌器附近积聚起来的泡沫状海水中,褐藻酸降解菌的数量甚至可高达 10^7 个/ml。这数字实际上已接近于人工传病接种试验时所采用的接种量^[4]。如将上述泡沫状海水稀释一百倍作为育苗海水,海带幼苗在其中停留 24 小时,藻体就很快出现绿烂现象。这一结果充分说明,由于育苗系统中的某些薄弱环节构成有利于褐藻酸降解菌异常增殖的微区环境,这就为海带脱苗和烂苗问题的发生和蔓延提供条件,据上述结果分析,可以认为褐藻酸降解菌在育苗系统中出现数量高峰和形成优势菌群的主要来源是海带藻体本身,而不是外源海水。积存于苗槽底部或循环海水系统中的脱落苗体或褐藻胶是影响褐藻酸降解菌数量消长的重要因素。因此,在整个育苗过程中,及时清除脱落苗体褐藻胶及泡沫状污物等。严格禁止其混入循环海水回流系统中,再辅以定期清洗冷却系统和冷水库等办法,是一项极重要的防病措施。

在南方为了培育夏苗,采苗前种海带必需移到育苗系统的低温海水中渡夏培育一个多月。尽管采取了一切必要的措施:使种海带培育水与育苗系统循环海水严格隔离;加大循环海水流量;采苗前彻底洗净种海带,使每平方厘米藻体表面褐藻酸降解菌的数目几乎接近于零。但是一旦种海带开始放散孢子,孢子囊破裂后,大量脱落的藻体表皮以及褐藻胶等伴随孢子散入海水中。放散 12 小时的采苗水微生物计数结果发现,每毫升采苗水中褐藻酸降解菌的数目猛增到 5.9×10^5 个。值得注意的是渡夏成熟种海带孢子器带菌问题是引起早期苗烂的潜在威胁。为此,采苗时预先剔除过度成熟或腐烂的种海带藻体,排弃第一次放散的孢子水,而宁可采用第二次放散出来的孢子水采苗。看来这是一个可取的防病措施。

2. 海带育苗系统中褐藻酸降解菌优势菌群形成的原因

根据微生物计数结果分析,褐藻酸降解菌与海带之间的密切关系是一种普遍现象。在自然海域的海带藻体上,褐藻酸降解菌是作为微生物区系结构中的一员,在相互制约的环境中保持相对稳定。但在人工育苗系统中,某些环境条件的改变显然更有利于褐藻酸降解菌的生长与发展。没有认识和掌握这种变化规律,在育苗工作中就无法提出可供遵循的指导思想与防病措施。目前有不少育苗单位因缺乏这种认识,管理措施不力,在防止脱苗与烂苗问题上存在很大盲目性,有的育苗系统实际上已沦为一个微生物恒化器(指褐藻酸降解菌而言)^[8]。在一定条件下,通过长时间的富集作用,育苗系统中的褐藻酸降解菌不但在数量上迅速增长,而且逐渐发展形成特殊的优势菌群。从自然海区海带藻体上分离出褐藻酸降解菌菌株一般都具有较多多样化的菌落形态和培养特征,其中有色素的菌株约占 40%,在其菌落周围可观察到明显的透明区,只有少数菌株对褐藻酸钠具有极强的

表 2 不同来源褐藻酸降解菌菌株降解褐藻酸钠速率统计表¹⁾

菌株来源	不同降解力的菌株百分数(%)			参加试验菌株数
	+++	++	+	
三沙育苗系统	95.62	2.90	1.45	275
青岛海带养殖区	15.45	66.36	18.00	110

1) 菌株接种于褐藻酸钠液体培养基中,于 25℃ 培育三天。

+++——全部降解

++——部分降解

+——微弱降解

降解能力。而从人工育苗系统中分离出的褐藻酸降解菌菌株,其菌落形态和培养特征较为划一:无色素,菌落周围出现明显的晕圈以及多数菌株都能强烈地降解褐藻酸钠和海带藻体等特点。表 2 表示不同来源的褐藻酸降解菌菌株在褐藻酸钠液体培养基中培育 3 天后降解速率的统计表。从表中可以看出,在育苗后期从育苗系统中分离出的 275 株褐藻酸降解菌中有 95.6% 的菌株对褐藻酸钠有较强的降解能力,而从海带栽培区分离出的褐藻酸降解菌菌株中,则只有 15.45% 的菌株具有同等强度的降解能力。从上述结果的比较观察中得到证实,育苗系统中褐藻酸降解菌不仅在数量上占优势,而且在菌群组成方面也发生巨大变化。这种优势菌群的主要特点即在于降解褐藻酸钠和海带藻体的能力较自然海区分离株有质的提高。其形成过程显然要求一定的条件。首先是育苗系统特有的环境,如单纯划一的海带幼苗群体和具有恒定温度和一定营养水平的循环海水系统等,都为褐藻酸降解菌优势菌群的形成和发展创造了有利的条件。其次是这些褐藻酸降解菌对褐藻酸钠具有明显的选择性和趋化性。再者即是在育苗系统中,大量海带幼苗群体和占优势的褐藻酸降解菌菌群的代谢产物对其他类群微生物的生存与发展也有相当的限制作用^[9]。生产实践证明,在这种条件下,随着育苗时间的延续,褐藻酸降解菌数量的迅速增长,优势菌群逐渐形成,一旦时机成熟,脱苗和烂苗问题也就日益严重地发展和蔓延起来。

3. 温度对褐藻酸降解菌生长和降解褐藻酸钠速率的影响作用

育苗系统中海带幼苗和褐藻酸降解菌是处在同一环境中,温度作为环境因子直接影响着它们各自的生长与代谢。育苗生产采用的培育海水温度一般控制在 6—10℃ 范围内。显然,选择这一温度范围是从海带幼苗生物学特点和栽培学的要求出发。鉴于褐藻酸降解菌在海带幼苗脱落和烂苗问题中的重要作用,进一步了解不同温度对褐藻酸降解菌生长与代谢的影响作用是有现实意义的。在育苗的实际环境中,褐藻酸降解菌的代谢活动要对海带藻体构成有影响的威胁,必需依赖其群体的存在为基础。温度在其中当然起着重要作用。试验结果说明,大多数褐藻酸降解菌菌株的最适生长温度为 15—25℃,在

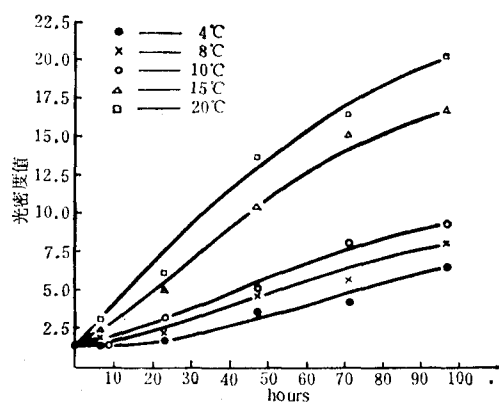




图 3 褐藻酸降解菌 No.326 菌株在不同温度条件下的生长曲线

表 3 不同温度对褐藻酸降解菌降解褐藻酸钠速率的影响作用

菌株号	温度		4℃					8℃					12℃				15℃			20℃					
	天数		1	3	5	10	13	25	1	3	5	7	10	13	1	3	5	6	1	3	4	1	2		
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
19																									
20																									
33																									
34																									
43																									
71																									
119																									
125																									
130																									
135																									
143																									
144																									
150																									
153																									
155																									
158																									
163																									
166																									
167																									
172																									
173																									
175																									
178																									
187																									
195																									
200																									
226																									
235																									
240																									
245																									
263																									
264																									
265																									
270																									
273																									
274																									
280																									
288																									
291																									
295																									
298																									
300																									
317																									
320																									
342																									

 全部或部分降解
 不降解或只有降解痕迹

4—8℃ 条件下只能缓慢地生长。图 3 表示 No. 326 菌株在不同温度条件下的生长曲线。比较观察图中 8—20℃ 的生长曲线时发现, 它们在光密度值之间存在明显的差异。8℃ 以下的培育海水温度对褐藻酸降解菌的生长有明显的限制作用。从表 3 中可以看出, 在 12℃ 温度条件下, 接种后第 1 天褐藻酸钠就开始被降解, 第 6 天全部被降解澄清。在 15℃ 温度条件下, 接种后第 4 天已全部被降解澄清。在 8℃ 的温度条件下, 接种后第 3 天开始出现降解现象, 第 7 天大部分被降解, 第 13 天全部被降解澄清。只有个别低温菌株在接菌后第 1 天就开始降解, 到第 10 天即出现全部被降解的现象。这种适应低温环境而积极生长与代谢的菌株的危害性应当引起足够的重视, 上述结果表明, 在 8℃ 温度的培育海水中育苗, 每次换水、洗苗和清槽的周期以不超过 3—4 天为宜。如果发现患有发病的征兆, 就应相应缩短大清洗的周期。在 4℃ 温度条件下, 接菌后第 5 天才出现降解现象, 在 10 天内其降解情况一直保持微弱水平, 第 13 天则大部分被降解, 第 25 天才全部被降解澄清。这结果说明, 在 4℃ 温度条件下褐藻酸降解菌要在 10 天内构成对海带幼苗藻体有影响的菌群代谢活动是受到限制的。但是在生产实践中, 控制 4℃ 的培育水温度实际上是很困难的。综上所述, 可以认为温度作为褐藻酸降解菌生长与代谢的影响因子对育苗生产也有一定指导意义。如果把育苗系统培苗海水温度严格控制在 6—8℃ 范围内, 再辅以其他有效管理措施, 对于防止脱苗和烂苗问题的发生与蔓延会起到理想的防病效果。

此外, 试验室实验结果发现, 低剂量的 (5 单位/ml 海水) 红霉素和庆大霉素对褐藻酸降解菌有良好的抑制效果, 因此有希望作为一种补充的防病手段应用于生产, 此项研究结果将在另外的报告中阐述。

参 考 文 献

- [1] 曾呈奎、吴超元等, 1962 年。海带养殖学。科学出版社, 99—112, 146—154 页。
- [2] 吴超元、高难生、陈德成等, 1979 年。海带幼体畸形病的研究。海洋与湖沼 10(3): 238—250。
- [3] 陈驹、林光恒、沈世泽, 1979 年。褐藻酸降解菌的研究 I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用。海洋与湖沼 10(4): 329—333。
- [4] 陈驹、林光恒、沈世泽, 1981 年。褐藻酸降解菌的研究 II. 海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系。海洋与湖沼 12(2): 133—137。
- [5] Ando, Y. and K. Inoue (安藤芳明, 井上胜弘), 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms. IV. On the Vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying Laminaria. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 27 (4): 339—341.
- [6] Ando, Y. and K. Inoue (安藤芳明, 井上胜弘), 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms. V. On the alginase of Vibrio sp. So-20 strain. *ibid.* 27 (4): 342—347.
- [7] Andrews, J. H., 1976. The pathology of marine algae. *Biol. Rev.* 51 (2): 211—253.
- [8] Jannach, H. W. and R. I. Mateles, 1974. Experimental bacterial ecology studies in continuous culture. *Adv. Microbiol. Physiol.* 11: 165—212.
- [9] Suiburth, J. McN, 1968. The influence of algal antibiosis on the marine microorganisms. In: M. R. Droop (ed.) «Advances in Microbiology of the Sea» Acad. Press. pp. 63—94.

STUDIES ON ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA

III. THE CAUSE OF THE ROT DISEASE AND DETACHING OF *LAMINARIA* SPOROPHYTES IN SPORELING CULTURE STA- TIONS AND THEIR PREVENTIVE MEASURES*

Chen Dou, Liu Xiuyun, Liu Xiuzhen, Yang Zhaohui

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

and

Qiu Shuhuai

(*Sansha Sporeling Culture Station, Fujian Province*)

ABSTRACT

The young sporophytes of *Laminaria* are cultivated in sporeling culture station at a temperature of about 8—10°C. It happened sometimes that the sporophytes died or fell off from the cords due to a destructive disease, especially in the later stage. In serious cases the disease virtually destroyed the entire crop. For a long time the main cause of this disease was unknown and production of sporelings always suffered severely from this disease for the lack of preventive measures. We found that the alginic acid decomposing bacteria were the dominants on cultivated *Laminaria*. Evidence showed that many isolates could grow well on the living blades of *Laminaria* without any additional nutrients and degrade the blades by enzymatic action. Contact infection experiment showed that the rotting and detaching of young sporophytes could be resulted from the inoculation of these bacteria in a density of 10^8 cells per ml sea water. It has proved that in certain cases the alginic acid decomposing bacteria can infect cultivated young sporophytes and even detach them from the stalk. Owing to inefficient management, some *Laminaria* sporeling culture systems had actually changed into microbial chemostat. The flourishing growth of these bacterial populations depends on enrichment conditions, such as the presence of an abundance of *Laminaria* sporophytes, constant temperature, suitable nutrients and circulating sea water system, etc. These bacteria were mostly concentrated on the sporophytes and had become important members of the microbial flora in the culture system.

About 400 strains of alginic acid decomposing bacteria isolated from culture systems were studied. All of them are characterized by having a similar appearance of colony with a cloudy zone around it, producing no pigment and degrading alginate actively. Most of them belong to genus *Pseudomonas* and are very different from strains isolated from natural sea water. They can grow well at 15—25°C, but retard at 4°C.

It is important to prevent the multiplication of these bacteria in culture system.

* Contribution No. 1073 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

In case of spore collection and cultivation of sporelings, it is necessary to select the healthy mature sporophytes, to discard the decayed parts of the blades carefully, to keep a suitable density of sporelings on cords, to maintain the temperature at about 6—8°C constantly, to filter culture sea water completely, to remove any falling sporophytes in time, to wash the sporelings, culture pools and circulating system thoroughly and to replace the culture sea water twice a week without delay. The addition of erythromycin at 5 o.u./ml to the sea water showed obviously inhibitory effect on these bacteria, therefore it is possible to prevent *Laminaria* sporophytes from the rot disease by this kind of antibiotic.