

褐藻酸降解菌的研究

IV. 褐藻酸降解菌在海带栽培区中的生态分布及其重要性*

陈弼 刘秀云 刘秀珍 王青峡

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 按月分析栽培区海水和海带藻体样品中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量, 其结果表明, 栽培区中褐藻酸降解菌数量与异养细菌总量的比值波动为 30—80%, 两者的数量高峰同步出现在海带生长期内。随着海带生长期的推进, 不同类型的褐藻酸降解菌交替出现。生理生化试验结果证明, 绝大多数褐藻酸降解菌能利用各种有机物。来自海带的分离株中, 降解原油的菌株百分数可高达 84%。这些微生物在促进栽培区海水油污净化和有效营养再生等方面起积极作用。

关于大面积栽培海带所引起的生态效果问题至今尚未见有研究报告。本研究工作的前文阐述了褐藻酸降解菌和褐藻酸酶对海带藻体的作用以及褐藻酸降解菌在海带育苗系统中引起病害等问题^[2,3]。本文着重研究海带栽培区褐藻酸降解菌的生态分布及其重要性。

一、材料与方法

1. 取样

1982年—1983年期间在青岛栈桥海带栽培区按月定点采集海水样品。在海带生长期间每月采集海带藻体样品, 新鲜样品立即带回试验室作微生物学分析。

2. 异养细菌总量和褐藻酸降解菌计数

在分析海水样品时, 吸取 0.1ml 海水样品或经适度稀释的海水稀释液, 分别在蛋白胨-牛肉汁琼脂培养基和褐藻酸钠琼脂培养基上平板涂布。于 25°C 室温培育 5 天后, 在蛋白胨-牛肉汁平板上计算总异养细菌菌落数, 在褐藻酸钠平板上计数褐藻酸降解菌菌落数, 并获得每毫升海水样品中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量^[2]。

在分析海带藻体样品时, 按本研究工作前文报告中所述的稀释法处理海带藻体样品。藻体稀释液在上述不同培养基上平板涂布, 并获得每平方厘米海带藻体上异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量^[2]。

3. A/H 比值的测定

* 中国科学院海洋研究所调查报告第 1269 号。

收稿日期: 1983年11月5日。

从异养细菌总量计数平板中选择菌落数目适中的平板(每个平板约 30—50 个菌落),从中逐一挑取出全部单菌落,分别接种到褐藻酸钠液体试管中,测定其对褐藻酸钠的降解能力^[2]。于 25℃ 室温培育 5 天后,观察和计数降解褐藻酸钠阳性的菌株数。根据上述计数结果,求得各个海带藻体或海水样品中褐藻酸降解菌分离株数(A)与总异养细菌分离株数(H)之间的比值(A/H)。

4. 降解原油能力的测定

原油培养液制备 预先配制基础培养液(NH₄Cl 2g, K₂HPO₄ 0.7g, KH₂PO₄ 0.3g, NaCl 30g, 蒸馏水 1000ml, 调节 pH 到 7.0) 和供试原油(胜利油田原油与柴油按 1:4 重量配制)。先装入 10ml 基础培养液于试管中,再加入 0.2ml 供试原油 8 磅灭菌 40 分钟后备用。

测定方法 被试分离株经预先活化,分别接种到上述原油培养液中,并设置不接菌对照。于 25℃ 室温摇动培养一个月后,定期观察原油被降解情况。试管中的原油经细菌降解后,出现不同程度乳化状态者,均记录为降解原油阳性的结果。

5. 细菌生理生化特性的测定

按常规试验方法测定不同分离株对牛乳、明胶、淀粉以及各种糖类等的利用情况^[1]。

二、结果与讨论

1. 褐藻酸降解菌在自然海区海水中的分布

褐藻酸降解菌是一种异养细菌,它与其他异养细菌的主要区别是具有降解褐藻酸钠的能力。褐藻酸钠培养基具有限制其他异养细菌生长的优点,因此,采用这种培养基计数自然海区中褐藻酸降解菌是一种简便的方法。只是由于这种培养基成分较为单调,不能完全满足所有类型褐藻酸降解菌的生长需要,因此菌落计数结果往往偏低。

关于褐藻酸降解菌在海洋中生态分布的研究现尚未见到报道。只有少数研究报告谈及从腐烂藻体、沿岸海水或底泥中发现褐藻酸降解菌^[5,6]。本研究工作较系统地调查研究了褐藻酸降解菌在海洋环境中的分布规律。在青岛胶州湾及邻近海岸带水域设置 12 个微生物调查站,采用前述方法 2 调查了各站海水样品中异养细菌和褐藻酸降解菌的数量

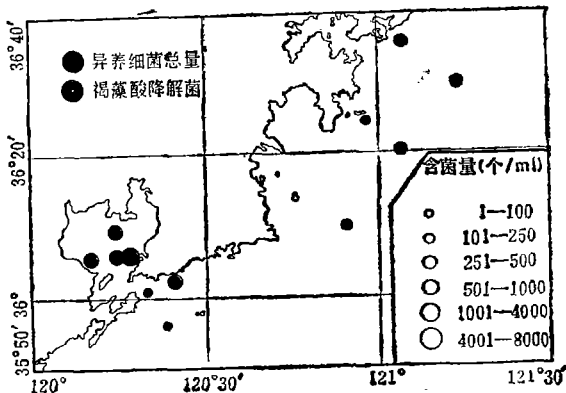


图 1 青岛沿岸海水中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布(1981.8)

变动情况。调查结果绘于图 1 和图 2。从图中可以看出,在胶州湾或海带栽培区内的海水样品中很容易分离出可观数量的褐藻酸降解菌。如果把褐藻酸降解菌和异养细菌总量平板计数的结果相比较就可发现,在这些水域中,8 月份褐藻酸降解菌的数量约占异养细菌总量的 13—23%,而在 11 月份约占 60—68%。这些结果除了说明褐藻酸降解菌在胶州湾或海带栽培区内有相当数量的分布外,也说明它在异养细菌总量中占有相当高的比例。我国沿海各地栽培海带已有几十年的历史,褐藻酸降解菌已成为海带栽培区中的优势菌群,这是长期大量栽培海带的直接结果

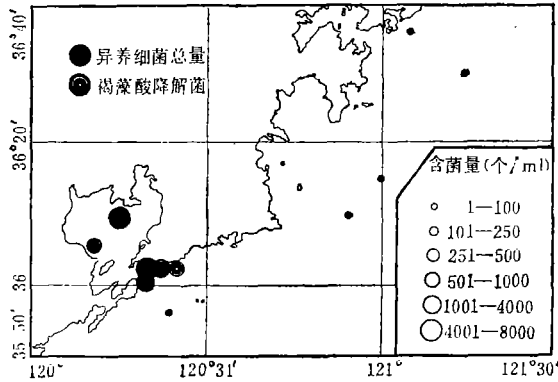


图 2 青岛沿海水域中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布(1981.11)

从图中还可以看出,不论在 8 月或 11 月份,从胶州湾以外或远离海带栽培区的海水样品中,一般都难于分离得到褐藻酸降解菌。这与来源于东海大陆架海域的一百多株异养细菌分离株的测试结果很相似。在所有被测试的大陆架分离株中,没有一株具有降解褐藻酸的能力。由此可以判断,褐藻酸降解菌显然不可能是外海海水中本源的菌群。

2. 褐藻酸降解菌在海带栽培区中的分布

为了进一步了解海带栽培区中微生物区系结构的特点以及褐藻酸降解菌的分布规律,特在青岛栈桥海带栽培区设站进行微生物调查。周年定点采集海水和海带藻体样品。按照前述方法 3 分析样品中异养细菌总量,并从计数平板上逐一挑取单菌落,测定其对褐藻酸钠的降解能力。根据上述计数结果,获得每一个样品中褐藻酸降解菌菌株数与异养

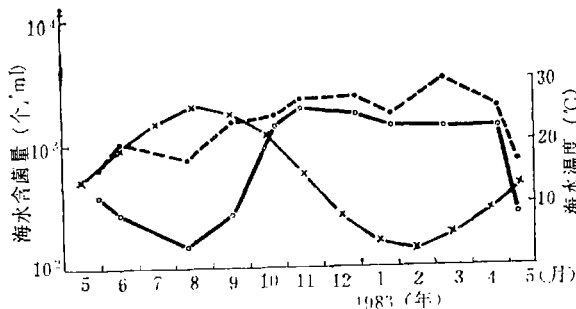


图 3 海带栽培区海水中异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布

●——异养细菌总量; ○——褐藻酸降解菌; ×——海水温度

细菌总菌株数之间的比值。现将结果分述如下。

在海水中 从图 3 可以看出, 海带栽培区海水中异养细菌总量和褐藻酸降解菌的数量变动几乎是同步起落, 而且两者数量的高峰期几乎同时出现。异养细菌总量的增长始于 10 月份以后, 并延续到次年 4 月份, 此时每毫升海水中异养细菌总量可达到 10^3 以上。褐藻酸降解菌的数量高峰期与前者相似, 在此期间每毫升海水中褐藻酸降解菌数量亦可达到 10^3 。4 月份以后, 两者数量都开始进入低峰期, 并一直延续到 9 月份, 在此期间每毫升海水中两者菌量均在 10^2 以上。如果把栽培区海水中微生物数量周年变动情况与栽培海带的生长期作比较观察, 就可清楚地发现两者间存在着一定的联系。从 11 月到次年 4 月份为栽培海带的生长前期。在这期间, 移入海中的大量海带幼苗, 为褐藻酸降解菌的发展提供了有利的条件。褐藻酸降解菌不但在数量上占优势, 而且已成为栽培区海水中异养细菌的主要组成部分。在海带生长季节以外的其他月份里 (6—10 月), 异养细菌总量明显地随着褐藻酸降解菌数量的减少而相应下降。微生物分析结果表明, 在海带生长季节, 栽培区海水中褐藻酸降解菌的数量较其他月份普遍增多。即使在微生物数量低峰期内, 栽培区每毫升海水中褐藻酸降解菌的数量也保持在 10^2 以上。上述结果说明褐藻酸降解菌不仅是海带栽培区海水中常住的优势菌群, 而且在周年内始终保持相当稳定的数量优势。

海水温度对海域中微生物数量变动的的影响作用是值得重视的问题。从图 3 可以看出, 栽培区海水中菌量的增长与水温上升成负相关, 这显然不能反映出客观存在的因果关系。由于海带人工育苗技术在生产上已得到全面推广和应用, 因此海带栽培面积不断地扩大, 在栽培区内人工栽培海带可以在极短的时间内形成强大的藻群优势。这种优势的

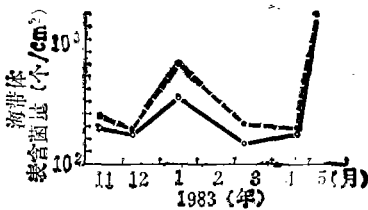


图 4 海带藻体表面异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量分布

- 异养细菌总量;
- 褐藻酸降解菌数量

出现完全改变了栽培海区中的生物组成结构。在这种环境中, 海水温度对微生物数量变动的的影响作用显然已退居次要的位置。此外, 人工施肥可能对栽培海区微生物数量的增长有着一定的影响, 值得进一步探讨和研究。

在海带藻体上 从图 4 可以看出, 异养细菌总量和褐藻酸降解菌的第一次数高峰均出现在海带生长前期, 即 1 月份前后, 在此期间每平方厘米海带藻体表面积上异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量略低于 10^3 , 2 月份以后虽略有下降, 但 4 月份以后又出现另

一次数量高峰期。在 5 月份每平方厘米海带体表面积上异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量都超过 10^3 。这个高峰期的出现对于加速分解海带生长后期的残存藻体具有重要作用。海带藻体上异养细菌总量和褐藻酸降解菌数量变动规律与海水中的数量变动规律不但在时间上吻合, 而且几乎是同步起落。据上述分析可以认为, 栽培区海水中微生物种类组成和数量变动情况是以栽培海带藻体上的微生物种类组成和数量变动情况为转移的。

海水中和海带藻体上 A/H 比值 在分析海水样品或海带藻体样品时, 褐藻酸降解菌数量在异养细菌总量中所占的比例数用 A/H 比值来表示。这种比值关系可以更客观地反映出水域中或藻体上微生物区系组成的特点。从图 5 可以看出, 海带栽培区海水

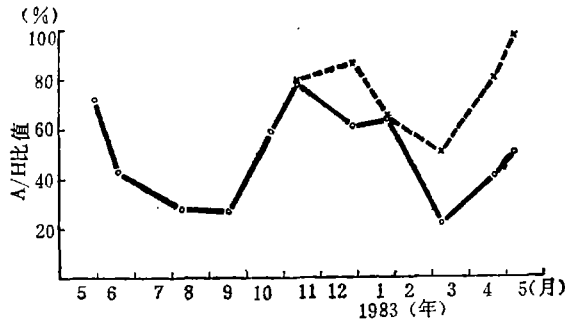


图5 海水与海带藻体样品中褐藻酸降解菌数量(A)与异养细菌总量(H)比值(A/H)
×——海带上A/H比值; ○——海水中 A/H 比值

中 A/H 比值的最低值为 30%, 其最高值可达到 80%; 在海带藻体上, 其最低值为 35%, 其最高值为 90%。这说明不论在栽培区海水或海带藻体上褐藻酸降解菌数量至少占异养细菌总量的 30% 以上。其次, 栽培区海水中 A/H 比值在一年中有两次高峰, 第一次在 11 月份到次年 1 月份, 第二次在 5—6 月份。这种现象与海带藻体上出现的两次数量高峰时期基本一致。由此不难发现, A/H 比值的两次高峰与海带的生长发育阶段密切相关。再者, 海水和海带藻体的 A/H 季节变动曲线也有同步起落的趋势。根据上述结果可归结如下两点: 首先, 人工大面积栽培海带是引起褐藻酸降解菌在栽培区中数量增长的最主要原因; 其次, 褐藻酸降解菌已从数量上取代其他异养细菌成为栽培区中的优势菌群, 并起着重要作用。

不同类型褐藻酸降解菌的季节交替现象在海带藻体上的反映 从海带藻体上分离

得到的褐藻酸降解菌菌株, 按其菌落形态和色素特征大体可划分为三种类型: (1) 无色菌株; (2) 褐色色素菌株; (3) 黄色色素菌株。在整个海带生长期间, 按月分析海带藻体上不同类型褐藻酸降解菌菌株的数量变动情况。从图 6 可看出, 两者比值 (A/H) 的变动情况差异悬殊。在海带生长初期, 海带栽培区藻体上具有较多样化的褐藻酸降解菌菌落类型, 其中以褐色色素分离株占优势, 其 A/H 比值为 40—50%, 无色菌株次之, 其 A/H 比值为 20—30%。此外, 还有黄色色素分离株, 其 A/H 比值在 10% 以内。2 月份以后, 无色菌株数量开始增多, 褐色和黄色色素分离株数量迅速下降。5—6 月份, 无色菌株几乎完全取代

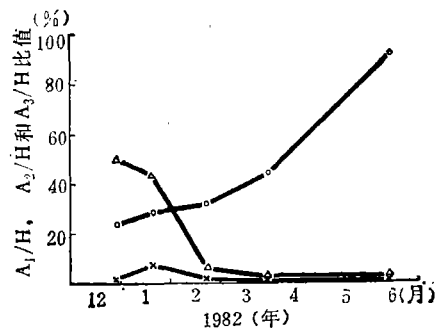


图6 海带体表不同类型褐藻酸降解菌数量 (A_1, A_2 , 或 A_3) 与异养细菌总量 (H) 的比值 ($A_1/H, A_2/H$ 和 A_3/H)

○—— A_1/H 比值 A_1 ——无色菌株数;
△—— A_2/H 比值 A_2 ——褐色菌株数;
×—— A_3/H 比值 A_3 ——黄色菌株数

全部有色素分离株, 一跃而成为占绝对优势的菌群, 其 A/H 比值可达到 90%, 此时有色素分离株已基本不出现。在海带生长发育的不同阶段, 褐藻酸降解菌数量的季节变动特点和不同类型褐藻酸降解菌季节交替现象说明, 在海带栽培区藻体上微生物区系结构的

变化除了和栽培海藻类别以及藻群数量分布有关外,藻体的不同生长发育阶段的代谢产物以及微生物自身生理代谢特点也是不可忽视的。有关这方面的工作尚有待进一步深入研究。

3. 海带体表细菌降解原油能力

从海带体表分离获得 441 株异养细菌,经测试其中有 332 株是褐藻酸降解菌,约占异养细菌总分离株数的 75%。从栽培区海水中分离获得的 124 株异养细菌,其中有 58 株是褐藻酸降解菌,约占异养细菌总分离株数的 47%。分别测试上述全部分离株降解原油的能力,测试结果见表 1。据表 1 可看出,来源于海带体表的褐藻酸降解菌,其降解原油的菌株比数(84%)高于海水(60%)。来源于海带体表的其它异养细菌,其降解原油的菌株比数(72%)也高于海水(64%)。为什么来源于海带体表的细菌具有较高的降解原油菌株比数?其原因尚待进一步调查研究,但是可以肯定,这些细菌在海洋油污自净化过程中起着积极的作用。

表 1 降解原油细菌在海带藻体和栽培区海水中的分布

菌株来源	褐藻酸降解菌			其他异养细菌		
	被试菌株数	降解原油菌株数	降解原油菌株百分数(%)	被试菌株数	降解原油菌株数	降解原油菌株百分数(%)
海带叶片	332	280	84	109	79	72
海水	58	35	60	66	42	64

注: 样品来自青岛海带栽培区。

此外,菌株生理生化试验结果表明,大多数褐藻酸降解菌分离株具有较强的生理生化活性。它们除了积极降解褐藻胶和海带藻体外,还普遍具有胨化牛乳、液化明胶、水解淀粉以及利用各种糖类等生理特性。这些特性有助于促进栽培区中有机物的分解和有效营养再生的速率。关于这些褐藻酸降解菌的分类问题将另文阐述。

大规模发展海带栽培事业,可视为人工改变特定海区生物区系组成结构的一种特殊手段。本调查研究结果说明,由于长期栽培海带的结果,某些自然海区中所固有的微生物区系组成多样化的特色已被褐藻酸降解菌的优势所取代。随着海带栽培事业的不断发展,栽培区中已形成一个以褐藻酸降解菌为主体的微生物区系。传病接种试验结果和实践经验说明,褐藻酸降解菌是一种机会致病菌,它在一定条件下能引起海带藻体病烂^[2-4]。近年来,由于管理不当,海带幼苗放入海区后时常出现病烂脱苗问题,在某些水流不畅通的近岸海湾也发现成体海带病烂。为了进一步弄清上述问题,深入研究海带栽培区中的褐藻酸降解菌分类及生理生态特点对生产具有现实的指导意义。生产实践证明,合理规划栽培海带的布局是一项重要的防病措施。只要布局得当,即不会产生不利的生态效果,但是如果不加限制地扩大海带栽培面积或过渡密植,势必引起病害。从生态平衡的观点来看,应该提倡在一定范围的海区内,合理安排多种类型的养殖或栽培生物,使海洋农牧区中微生物区系结构特点保持相对稳定的多样化格局,使栽培区中物质循环和营养更新的途径处于积极而多样化的状况,这是值得认真研究和讨论的重要问题。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社, 135—194 页。
- [2] 陈弼、林光恒、沈世泽, 1979。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。
- [3] 陈弼、林光恒、沈世泽, 1981。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关系。海洋与湖沼 **12**(2): 133—137。
- [4] 陈弼、刘秀云、刘秀珍等, 1984。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。海洋与湖沼 **15**(6): 581—589。
- [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] Laycock, R. A., 1974. The detrital food chain based on seaweeds. I. Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. Marine Biology **25**: 223—231.

STUDIES ON ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA
IV. DISTRIBUTION OF ALGINIC ACID DECOMPOSING
BACTERIA IN *LAMINARIA* FARM AND ITS
ECOLOGICAL SIGNIFICANCE*

Chen Dou, Liu Xiuyun, Liu Xiuzhen and Wang Qingxia

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

So far as known, only a few studies had made on the effect of the cultivation of *Laminaria* on the ecosystem. *Laminaria* blades and sea water samples collected monthly in 1982—1983 were analysed for the total number of heterotrophic bacteria (*H*) and number of alginic acid decomposing bacteria (*A*). The abundance peaks of both kinds of bacteria coincide with the period of the cultured blades of *Laminaria*, although at that time the mean monthly temperature of sea water is minimum for the year. The ratio of (*A*) to (*H*) varied from 30% to 80% in different months of the year. Different types of alginic acid decomposing bacteria occurred successively with the growth of the *Laminaria* blade.

About 1000 strains of alginic acid decomposing bacteria were isolated and analysed for biochemical reaction and oil-degradation activity. Most of them actively utilized many kinds of carbohydrates and organic matter. The percentage of oil-degradation bacterial isolates from *Laminaria* farm is twice that of isolates from waters of the open sea. These bacterial population concurrent with cultivated *Laminaria* may play an important role in the mineralization of sea water as well as purification of oil-polluted coastal waters. Thus, large-scale cultivation of *Laminaria* can produce beneficial effects on the marine ecosystem.

* Contribution No. 1269 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.