

海带幼体畸形病的研究*

吴超元** 高难生*** 陈德成**** 周百成**

蔡培贤*** 董书喜** 温宗存** 丛仁义**

自五十年代末建立海带育苗室以来,在育苗过程中经常发生一种幼体畸形病。这种病害在我国南方和北方的一些育苗室中或轻或重时有发生,严重时幼苗大量死亡,在生产上造成一定损失。例如,福建省连江县水产综合场为了改变每年从北方调运种海带的局面,从1971年开始实验在当地选育种海带。当海面水温升高时,把海带移到育苗室系统内人工控制低温培育。孢子囊形成后,采孢子进行常规育苗。这样采孢子时间比以往培育早秋苗要早一个多月,培育出来的幼苗个体大、健壮,适应能力强。但在实验过程中连续几年发生了较为严重的病害。因此,防治这种病害已成为我国南方海带养殖事业进一步发展的关键性问题之一。

一、病症和发病特点

海带幼体病症和发病特点主要表现在以下几个方面:

1. 配子体阶段

雌配子体发病初期的症状是生长迟缓;细胞壁略厚,颜色微黑;色素体界线不清,呈灰黄色;进而原生质体收缩出现质壁分离。严重时原生质体收缩到细胞中央,形成几个透明的或黑色的小球,最后分解,剩下细胞壁空壳而死亡。配子体一般在采孢子后5—9天发病。上述初期病症可以延续几天。原生质体收缩等严重病症多出现于凌晨,来势迅速,多在一天内死亡。

雄配子体发病情况基本上和雌配子体相同。

2. 卵和卵囊形成阶段

正常情况下,雌配子体长到一定大小后,形成卵囊。在卵囊形成过程中,细胞出现一个突起,突出部分细胞壁变薄,色素体分散成粒状,最后,突起部分的细胞壁破开,少量原

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第492号。

前后参加这项工作的还有中国科学院海洋研究所陈弼同志,国家水产总局黄海水产研究所梁亚全同志和福建省连江县水产局孙平凯同志。

本文承曾呈奎教授审阅全文,海洋所微生物组提供部分菌种并协助鉴定,平仲良同志协助解决培养设备,冯明华同志绘图,宋华中、周显铜、张京浦同志协助摄影,特此致谢。

** 中国科学院海洋研究所。

*** 福建省连江县水产综合场。

**** 福建省水产研究所。

本刊编辑部收到稿件日期: 1979年2月16日。

生质外溢,随后排卵。发病的卵自突出部分收缩,或整个卵收缩,不能排出。严重时卵在卵囊中收缩成几个小球而死亡。有些卵即使排出,也不能正常附着在卵囊基部而流失,最后只残留一些空卵囊。

3. 幼孢子体

发病的受精卵在延长过程中原生质体收缩,或幼孢子体不能进行正常的细胞分裂,部分细胞增大,直径可达正常细胞的3—6倍,或分裂后细胞排列不整齐,形成畸形孢子体。畸形孢子体形状多种多样,有的几个细胞,有的多至100多个细胞,聚集一堆呈葡萄状。这些畸形孢子体都不能恢复到正常形态而逐渐死亡。

综合几年来的发病情况,病害主要出现在配子体后期、卵囊形成和排卵时期。接近死亡的配子体、收缩的卵和卵流失后的空卵囊常在凌晨大量出现。病势发展迅速,严重时,几天内幼体大部死亡。发病后,采取换水、洗刷、降温、停止施肥等措施,都不能真正控制或制止病势的蔓延。

二、病因的探讨

连江综合场在海带幼体畸形病发生后,发动群众,探索病因,通过近三年的调查研究,把各种怀疑因素逐个排除,认为病害可能是由于水质问题引起的。并根据一些实验提供的线索,在1973年秋季把疑点逐渐集中到一条从海面吸送海水到育苗室系统的铸铁管道上来。这条管道在1971年装成后,不断出现严重病害。1973年秋在夏苗再次发生严重病害后,把这条管道拆换了。拆换后,当年10月采的秋苗培育一直正常。经检查,拆换下来的管道内壁上,约有2—3毫米厚的一层质地疏松的黑色铁锈。黑色铁锈加盐酸后产生硫化氢气体。经取一段铸铁管,内放育苗用棕绳约一米,灌满海水,二头密封,二天后取水分析,硫化氢含量达0.93毫升/升。这个结果给人们提出了二个问题:(1)硫化氢是怎样产生的?(2)幼苗出现的病害是否由硫化氢引起?为此,1973年在连江综合场用铸铁管内的锈块和管内封存十余小时后在玻瓶内保存一个多月的海水进行了一些探索性实验,现举两组实验结果如下:

实验 I 1973年10月18日,将附有配子体的玻片倒封在15毫升有机玻璃小槽上,槽内注满海水不留气泡。小槽内分别放置铸铁管锈块和棕绳。棕绳是育苗用苗绳,长一厘米。槽内海水取自距岸较远的地方,每二天换海水一次。小槽放育苗池内,水温8—9℃,

表 1 铸铁管锈块培育配子体的效应

Table 1. Effect of the blackened puffy rust of the cast-iron tube on the gametophyte

处理 内 容	检查日期		
	10月21日 (第三天)	10月22日	10月23日
海 水(对 照)	正 常	正 常	正 常
铸 铁 管 锈 块	色素体淡褐色,细胞壁微黑	部分配子体死亡	部分配子体死亡
铸铁管锈块+苗绳	色素体收缩	大部分配子体死亡	全部死亡

光强 2000—3000 米烛。结果见表 1。

实验 II 1973 年 10 月 24 日,除改用 250 毫升三角瓶密封培养和另加青霉素海水处理外,其它方法、条件、材料同前。海水中青霉素含量为 1300 国际单位/毫升。实验开始后三天,随机检查,现将 10 个视野的累积结果整理为表 2。

表 2 铸铁管水培育配子体的效应

Table 2. Effect of the water from the cast-iron tube on the gametophyte

处理内容	实验结果 个体总数 (个)	配子体、孢子体的比例(%)		正常个体 (%)	发病个体 (%)
		配子体	孢子体		
海水(对照)	75	27	73	93	7
青霉素海水	87	25	75	89	11
含20%铸铁管水的青霉素海水	75	29	71	69	31
含20%铸铁管水的海水	59	42	58	19	81

上述两组实验结果表明:(1)用铸铁锈和 20% 铸铁管水培育配子体都能引起和育苗现场类似的病害;(2)用青霉素控制细菌繁殖,可以明显减轻病害,配子体发育为孢子体的速度也接近正常情况。

另外,用 100% 铸铁管水培育的配子体可引起同样的死亡,在死亡的同时在水中可检查出浓度约为 0.04 毫升/升的硫化氢;培养液中如有棕绳,毒害现象更为严重,硫化氢含量约达 0.09 毫升/升。

上述探索性试验说明,硫化氢可能是引起病害的一个原因,而硫化氢的出现,可能是产生硫化氢的细菌在培养液中活动的结果。

为了证实这些看法,从 1973 年冬到 1977 年进行了以下实验。

三、实验内容、结果和讨论

(一) 硫化氢对海带幼体的毒害作用

为了验证硫化氢是否能引起典型病征,了解硫化氢对海带幼体不同生长发育阶段的毒害作用,我们从 1973 年到 1977 年在青岛用适于幼苗生长的光强(夏苗试验 3400 米烛,秋苗试验 3800 米烛)和温度(夏苗试验 13—15℃,每组试验最大温差 1—2℃;秋苗试验 7—14℃,每组试验最大温差 3—5℃)条件下,用含不同浓度硫化氢的海水培养幼体。培养容器是密封的。经过一定时间的培养,观察硫化氢对海带胚孢子萌发、配子体的形成、生长,卵囊的形成和幼孢子体的影响,结果如下:

1. 胚孢子萌发和配子体形成

正常情况下,胚孢子附着后 4 小时开始萌发。萌发管伸长过程中,顶端逐渐膨大,三天左右出现细胞壁,形成配子体。在有硫化氢存在的情况下,胚孢子附着后萌发管形成的时间后延,或不能形成萌发管,随后脱离附着基质而流失。已经形成的萌发管,伸长速度变慢,原生质和色素体流向萌发管顶端的速度迟缓。有时在胚孢子内或萌发管的管壁上滞留一部分原生质。这样,配子体的形成时间就后延了。严重的时候,由于原生质体收缩而

造成胚孢子膜的皱缩,不能形成萌发管而逐渐死亡。

图 1 (743-B 组)是在游孢子附着后一小时移入不同浓度硫化氢海水中培养 24 小时的结果。这个试验的对照组萌发正常,萌发率达 91.3%。硫化氢浓度为 0.25 毫升/升时,萌发率仅 14%左右,萌发管极短,浓度为 0.50 毫升/升时,萌发率下降至 4.1%。

另一组实验(7411)是在平均萌发率已达 35.5%时移入不同浓度硫化氢海水中培养 24 小时的结果。对照组的萌发管长度等于胚孢子直径 3—5 倍,原生质大部分已流入萌发管中。硫化氢浓度为 0.25 毫升/升的一组,萌发管长度只有胚孢子直径的 1—2 倍,即只有对照组长度的 1/3 左右,原生质基本上没有流入萌发管。从实验 749 中还观察到,在 2.00 毫升/升浓度下,萌发管长度只有对照组的 1/5—1/10 左右。这组实验表明,硫化氢对萌发管伸长有明显影响。

硫化氢还明显地影响配子体的形成。图 2 (实验 7411)是实验开始后 3 天的观察结果。对照组的配子体形成率为 92.3%,浓度 0.25 毫升/升的降至 10.8%,0.50 毫升/升的降至 0.3%,浓度达 1.00 毫升/升时,配子体不能形成。

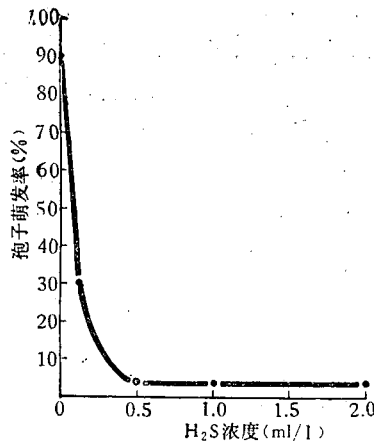


图 1. 硫化氢对胚孢子萌发的影响

Fig. 1. Effect of H₂S on the germination of the embryo spore

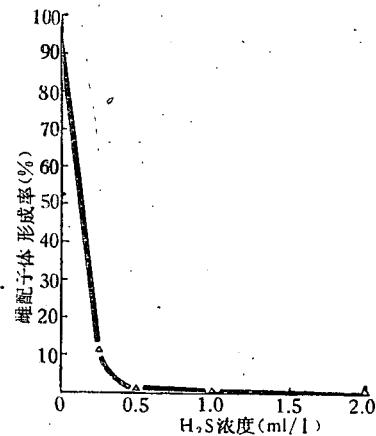


图 2. 硫化氢对配子体形成的影响

Fig. 2. Effect of H₂S on the formation of the gametophyte

上述结果说明,海带胚孢子在萌发过程中对硫化氢是非常敏感的。在胚孢子即将萌发时,只要存在 0.50 毫升/升 (0.77 毫克/升)的硫化氢,大约 96%的胚孢子的萌发就受到阻碍。此外,即使接触 0.50 毫升/升硫化氢前已有 35.5% 胚孢子萌发,处理 24 小时后又有 29.0% 萌发(总萌发率 64.5%),但到处理后第三天,配子体形成率也只有 0.3%。可以看出,硫化氢对配子体形成的抑制作用比对胚孢子萌发的影响更为明显。

2. 雌配子体

雌配子体和雄配子体对硫化氢的反应基本相同,但雌配子体个体大。为便于观察,实验以雌配子体为主要研究对象。

雌配子体受硫化氢毒害后,形态上表现基本和育苗现场出现的病害相同(照片 1—4)。较高浓度硫化氢培养的配子体,原生质体有时收缩成几块(照片 5),有的形成马蹄形或月牙形。另一种表现是色素体颜色变淡,略呈淡绿色而逐渐死亡。

从2组实验结果整理出的图3可以看出,50%雌配子体受毒害的浓度约为3.0—3.6毫升/升左右。多次重复实验结果还表明,当硫化氢浓度达到2.00毫升/升以上时,雌配子体死亡数量逐渐增加,浓度为4毫升/升时,48小时内死亡率达32%。

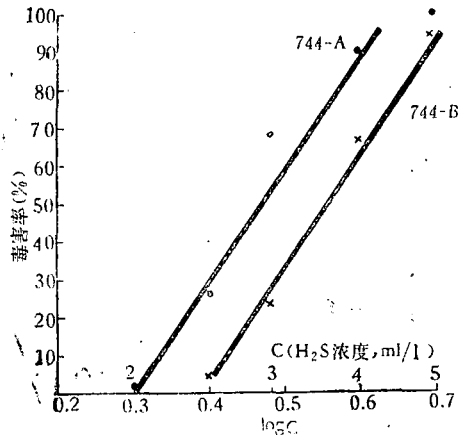


图3. 硫化氢对雌配子体的毒害作用

Fig. 3. Toxic effect of H_2S on female gametophyte

3. 卵和卵囊

硫化氢对卵和卵囊的毒害作用,基本上和育苗现场出现的病征相似(照片6—8)。卵囊形成过程对硫化氢极为敏感,极低的浓度就可以造成毒害。例如,用0.005毫升/升浓度硫化氢处理24小时后,有14%的卵收缩。图4表明,用0.018毫升/升(0.028毫克/升)的硫化氢培养24小时,就足以使50%已形成突起的卵囊受毒害。试验材料虽然是在没有气泡的密封条件下培养,但由于培养液中的硫化氢迅速被海水中的溶解氧所氧化(见图5),实际上试验材料只是在较短的时间内接触到初始浓度的硫化氢溶液。在这种情况下,仍能引起病变,这说明卵囊在较短时间内接触低浓度的硫化氢就能遭受毒害。

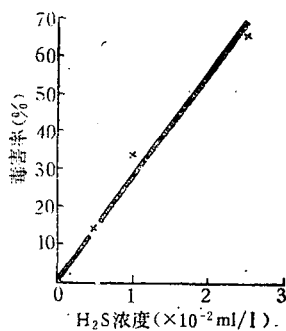


图4. 硫化氢对卵囊的毒害

Fig. 4. Toxic effect of H_2S on oogonium

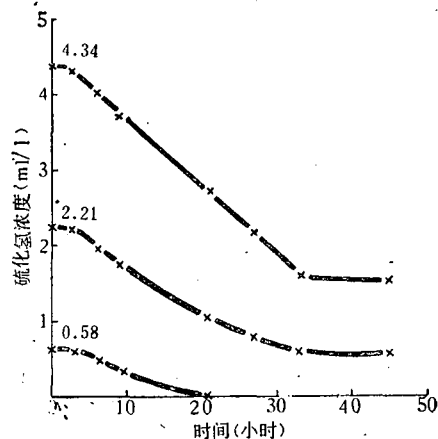


图5. 硫化氢在海水中的氧化

Fig. 5. Oxidation of H_2S in sea water

4. 幼孢子体

受精卵受硫化氢毒害后,原生质体收缩,液泡清楚可见(照片9,10),严重时不能分裂而死亡。硫化氢对孢子体的毒害也是随浓度的增加而加剧。50%个体受毒害的浓度约为1.7毫升/升左右(见图6)。由于不正常的细胞分裂(照片11—13),逐渐形成细胞大小不一,排列不整齐,从几个细胞到几十个细胞的畸形孢子体(照片11—17)。畸形孢子体形状多种多样,大多数聚集一堆呈葡萄状。这样的畸形孢子体都不能恢复正常而逐渐死亡。根据 E.Hase 等人的报道^[6],硫在藻类细胞分裂过程中起很重要的作用。畸形孢子体

的出现可能和硫的不正常代谢有关。

从上述一系列实验可以看出,卵和卵囊阶段对硫化氢最敏感,极低的浓度就可以造成伤害,50% 受毒害的浓度也低。其次是配子体形成和胚孢子萌发阶段。幼孢子体对硫化氢的忍耐力较强。配子体忍耐力更强(见图6)。可以认为,卵囊形成阶段、胚孢子萌发到配子体形成阶段是海带幼体对硫化氢最为敏感的二个阶段。

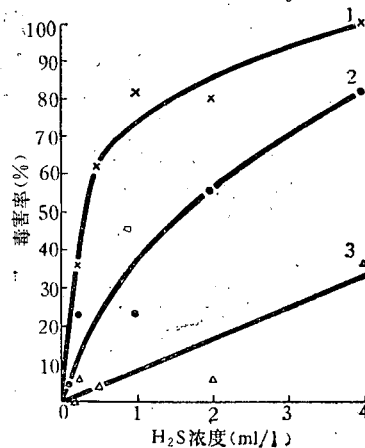


图6. 硫化氢对雌配子体、卵囊和孢子体毒害的影响

1. 卵囊 2. 孢子体 3. 配子体

Fig. 6. Toxic effect of H₂S on female gametophyte, oogonium and young sporophyte

1. Oogonium 2. Young sporophyte 3. Female gametophyte

(二) 生产现场的观察和实验

1. 病原菌的检测

1973年在育苗现场发现铸铁管内有黑色硫化铁锈层,这对我们是个重要的启示。这个锈层是由产生硫化氢的硫酸盐还原菌参与的厌氧腐蚀的产物。在这种腐蚀过程中,阳极反应是铁氧化成铁离子,阴极反应是放氢。如果氢积累起来,反应就中止。而硫酸盐还原菌能够利用氢还原硫酸盐。由于这种电化学过程中产生的氢不断被消耗,所以这个过程不断地进行下去^[9]。因此,黑色铁锈的存在证明铸铁管内已经繁殖起来这类细菌,并能产生硫化氢,这是育苗系统的一个次级菌源。连江场1973年秋把旧铸铁管换为钢管后培育秋苗成功的事实可能与换管而减少了次级菌源有关。

但在1974年,连江综合场培育的夏苗和秋苗又发生了严重的病害。这就要求我们进一步去了解病原菌繁殖场所和病害发生条件。为此,我们对连江场附近海区的底泥以及育苗系统的沉淀池水和底泥,砂滤后的海水和细砂中沉积物等样品作了硫化氢检测,并富集培养了产生硫化氢的细菌。用灵敏度很高的点滴试验法(NaN₃-I₂试剂)^{[3],1)}检测结果发现海滩污泥、沉淀池底泥、一号过滤池的细砂沉积物中都有硫化氢。富集培养结果发现海滩底泥、过滤海水和沉淀池水中都有产生硫化氢的细菌存在。例如,用硫酸钙和切碎的海

1) 据 Figgle (1964) 称,这种方法可在10毫升水中检出0.05微克硫化氢。我们的实验结果是,当试剂为3毫升水中溶解1克 NaN₃, 1克 KI 和一小粒 I₂ 时,可在5毫升水样中检出0.006微克的硫化氢,灵敏度更高。

带作硫源和有机物来源,接种海滩底泥或过滤海水后,在 28—29℃ 室温密封培养 24 小时,就有硫化氢产生,浓度约高于 1 毫升/升。48 小时后沉淀变黑,气味强烈。这说明水样和泥样中有硫酸盐还原菌。取黑色沉淀用显微镜观察见到大量弧菌。又如用牛肉汁、蛋白胨常规培养基接种连江场的沉淀池水(F-75),作有氧培养,用醋酸铅试纸检测硫化氢,经 21℃ 恒温培养 6 天,试纸变深黑色,比由科学院海洋所微生物组分离出的单种腐生菌 2643、3155 和 3266 产生的硫化氢还多。这说明水样中有产生硫化氢的腐生菌。值得注意的是种海带经过一个多月的室内培养,常在柄基部切口处、叶片基部或梢部附近形成腐烂斑点。1976 年 9 月我们从这些斑点上取样,经富集培养获得一个混合培养物。经分别在室温(25℃ 左右)和在育苗室温度(10℃ 左右)条件下作有氧培养,不到 12 小时,醋酸铅试纸就变为棕黑色,比单种 3266、3155 和从沉淀池分离出的几个菌种反应更为迅速。这种情况说明,腐烂斑点内的细菌能适应育苗系统的低温环境条件,并在具备一定营养条件的环境下,能迅速繁殖。在采孢子过程中,这些细菌经孢子水能感染到育苗器上,因此,是育苗系统的主要次级菌源。另外,在培育种海带过程中,由于育苗系统的长期使用,在这个系统内也繁殖了一定量的这类细菌。例如,我们从沉淀池水中分离出 4 株属于 *Micrococcus* 属的细菌。这些能产生硫化氢的细菌在育苗过程中也可以感染到育苗器上,因此,这是育苗系统内另一种次级菌源。

2. 传染途径和发病条件

在培育种海带过程中,由于低温培育系统的长期使用,在沉淀池、育苗室以及种海带的腐烂斑点上,都附着了能在低温条件下迅速繁殖的这类细菌。而种海带脱落的碎片,排出的代谢产物,采孢子过程中溶出的胶类,作为培养基又为这类细菌的繁殖提供了营养条件。例如,1976 年用玻瓶密封培养采孢子用的孢子水,24 小时后就可以直接嗅到硫化氢气味。这说明,孢子水中除悬有病源菌外,还具备一定营养条件。这样在采孢子过程中,病源菌就接种到育苗器上了。在配子体生长过程中,细菌迅速繁殖。当局部地区的硫化氢浓度达到一定水平时,病害就出现了。另外,在种海带放散游孢子过程中,由于过分密集,消耗了水中大量氧气,形成了缺氧状况,例如 1975 年 9 月 20 日测量,正常海水的溶解氧约 7.6 毫克/升,在密集的海带丛中,4 小时后降到 3.6—4.4 毫克/升,7 小时后再降到 1.2—3.0 毫克/升。另外,在采孢子过程中,pH 值也从 8.2 降到 7.3 左右。这些情况为硫酸盐还原菌和兼性的腐生菌的繁殖提供了有利条件^[2,15]。

从 1975 年开始,连江场对种海带培育系统和育苗系统实行隔离,并在采孢子前对育苗系统进行灭菌处理。当年未发生病害,夏苗培育成功了。在育苗过程中,我们用 $\text{NaN}_3\text{-I}_1$ 试剂对育苗室水系统作了硫化氢检测,并从 116 个水样中测出了硫化氢浓度较高的二个水样。其中一个取自育苗池进水口,在进水口附近的苗片上附有从冷却水系统带来的脏物,另一个取自棕绳表面的水样用显微镜观察也发现有结构不清的残片,周围有一些杆菌和弧菌。这些脏物和残片可能为细菌繁殖提供了营养物质,因而细菌能大量繁殖,并出现局部地区硫化氢浓度较高的现象。值得注意的是,据连江场的观察,1974 年夏苗和晚秋苗培育过程中,观察到出现病害症状的配子体或孢子体四周也都有一些脏物。这些可能是菌源又是有机物的提供者。

在纯培养中,硫酸盐还原菌只能利用少数几种有机物。但在自然条件下和在育苗系

统内是混合种群,通过和其他细菌的共同活动,互相利用彼此的代谢产物,从而可以在具有一定有机物的环境中繁殖^[2,5,6,13]。兼性或嗜氧的腐生菌混合种群,通过共同活动,也同样可以在具有有机物的环境中繁殖。这种代谢特点使这类细菌易于适应育苗系统的环境,而大量繁殖起来,成为重要的次级菌源,并造成病害。

(三) 接种实验

为了直接证实海带幼体病害和产生硫化氢的细菌的关系,我们将 1975 年从连江场沉淀池取的水样经富集培养,分别获得了嗜氧(或兼性)的腐生菌混合培养物(F-75)和硫酸盐还原菌混合培养物。之后,各分二批分别在室温(20—25℃)和育苗室温度(10—11℃)下培养,并进行接种实验。接种前把在两种条件下培养的混合培养物等体积混合,作为接种菌源。

接种实验开始于 1976 年 6 月下旬,分硫酸盐还原菌和腐生菌二组。采孢子用的棕绳和玻片灭菌后分别放入新接种过细菌的培养液中培养,7 天后,棕绳和玻片上已附有大量细菌。用灭菌海水冲洗后,7 月 7 日采孢子,次日分装在 100 毫升指管中 10℃ 恒温培养。每 90 毫升培养液中分别加入 10 毫升牛肉膏、蛋白胨培养基或硫酸盐还原菌培养基。这组(76-2 组)实验结果整理为表 3。

表 3 细菌接种实验
Table 3. Inoculation experiment

处 理 结 果 检 查 日 期	1 对 照	2 硫酸盐 还原菌	3 硫酸盐 还原菌 +培养基	4 硫酸盐 还原菌 +青霉素	5 3266 菌	6 3266 菌 +培养基	7 3266 菌 +青霉素	8 F ₇₅ 腐生 菌	9 F ₇₅ 腐生菌+培 养基	10 F ₇₅ 腐生菌+青 霉素
7 月 12 日	正常配 子体	正常配 子体	配子体 死亡	正常配 子体	配子体 死亡	配子体 死亡	配子体基 本正常	部分配子 体死亡	配子体 死亡	部分配子 体正常, 部分配子 体死亡
7 月 16 日	正常配 子体 (未检出 H ₂ S)	大部分配 子体正 常,局部 地区配子 体死亡。 (H ₂ S 约 10 ⁻³ 毫升 /升)	配子体死 亡(H ₂ S 约 10 ⁻² 毫升/升)	正常配 子体	配子体已 死亡 (H ₂ S 约 10 ⁻³ 毫升 /升)	配子体已 死亡 (H ₂ S 约 10 ⁻¹ 毫升 /升)	配子体 正常	未死配子 体正常 (H ₂ S 约 10 ⁻³ 毫升 /升)	配子体 死亡 (H ₂ S 约 >10 ⁻¹ 毫升/升)	未死配 子体正常

注 (1) 青霉素海水浓度为 1333 单位/毫升。

(2) 培养基是在实验开始后,于 7 月 9 日加入的。

(3) 硫化氢用点滴法检测,4、7、10 组由于青霉素有干扰,未检测。

(4) 检查以玻片上的材料为准。

从表 3 可以看出,接种细菌的 2、5、8 组配子体部分或全部死亡(见照片 18),病征基本相同。加培养基的 3、6、9 组,12 日检查配子体全部死亡,而且细胞壁出现凹凸不平的皱纹,玻片上的细菌很多,说明在良好营养条件下,细菌繁殖迅速,病害严重。上述情况和连江场出现的病害极为类似。加青霉素的 4、7、10 组细菌数量很少,配子体生长基本正

常,说明这是由于青霉素抑制了细菌的繁殖而未出现病害。从点滴检测的结果来看,导致生长期配子体的死亡的硫化氢浓度约为 10^{-3} 毫升/升数量级左右。

重复 6 月下旬实验的另一次接种实验,增加了一组加培养基同时又加青霉素的几个处理。培养基加入量为总水体的 2% (76-3 组)。实验结果基本和表 3 相同,新增加的几个处理,配子体生长正常,说明由于青霉素的抑制,虽有一定的营养条件,配子体仍未出现病害。

检查结果还表明,棕绳上出现病害的情况比玻片上的更为严重。这种情况和铸铁管水和铸铁锈块试验结果基本一样。厌氧的硫酸盐还原菌的适宜 pH 范围是 5.4—9.0, 最适为 7, 适宜温度为 30°C ^[15]。经测定,棕绳能使培养用水 pH 降低,溶解氧减少。例如,在育苗室条件下,苗板浸泡 24 小时溶解氧从 6.69 毫升/升下降到 3.76 毫升/升; pH 值从 8.22 下降到 6.60—7.15。这表明,棕绳为这类细菌繁殖提供了一定的条件。另外,棕绳也可能提供一定的营养物。这些都可能是棕绳上出现更为严重病害的原因。

1976 年 9 月从育苗室低温培育的种海带的腐烂斑点上取样,经富集培养获得一个能在低温条件下迅速繁殖的混合培养物。用这个混合培养物、3266 菌种以及从沉淀池分离出的几个腐生菌种在连江场育苗室的低温条件下,重复了接种试验,得到了基本相同的结果。这说明,这些能产生硫化氢的细菌是导致海带幼体畸形病的病原菌。

结论和防止措施

综合上述试验和现场调查结果,可以认为,硫化氢能导致海带幼体的畸形病。而硫化氢是某些兼性的腐生菌和硫酸盐还原菌的代谢产物。因此,这类细菌是引起海带幼体畸形病的病原菌。连江场所在的海区分布有产生硫化氢的腐生菌和硫酸盐还原菌。铸铁管道和种海带培育系统是这类细菌的繁殖场所。种海带受到局部感染形成的腐烂斑点内繁殖了大量适应低温的能产生硫化氢的细菌,这是育苗系统内的主要次级菌源。采孢子过程中,悬浮在水中的大量细菌,在具备一定营养条件的前提下,在育苗器上迅速繁殖,从而引起了海带幼体的畸形病害。由于细菌在育苗器上有一个繁殖过程,因此,病害一般在卵囊形成期发生。严重时也发生在配子体形成期。少数幸存的孢子体则出现畸形生长,最后死亡。

在这样认识的基础上,连江场从 1975 年以来采取了以下措施。

1. 把种海带培育系统和育苗系统隔离开,以免在采孢子过程中把在种海带培育系统繁殖起来的大量细菌转移到育苗系统。

2. 采孢子前,用漂白粉对育苗系统进行灭菌处理。

3. 在培育种海带过程中及时切除叶片上的腐烂斑点,消灭菌源。

经采取以上措施,从 1975 年以来,连续四年基本上消灭了这种病害,培育出了健康的海带幼苗。

参 考 文 献

- [1] 曾呈奎、吴超元主编, 1962。海带养殖学, 科学出版社, 14—33, 72—95, 336 页。
- [2] 河合章、高岛直树、杉山元产, 1975。增殖环境与微生物。海洋の生態系と微生物, 日本水产学会编, 恒星

- 社厚生阁, 112—125 页。
- [3] 费格尔, 弗. (Figgle, F.), 1954. 点滴试验 (spot tests). 第 1 卷 (vol. 1), 区祖鑑等译, 地质出版社, 1960: 316—321 页。
- [4] Andrews, J. H., 1976. The pathology of marine algae. *Biol. Rev.*, 51(2): 211—253.
- [5] Bell, W. H. and J. M. Lang, 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol. and Oceanogr.*, 19(5): 833—839.
- [6] Chester, C. G. C. and A. T. Bull, 1963. The enzyme degradation of *Laminaria*. I. The distribution of *Laminaria* among micro-organisms. *Biochem. J.*, 86(1): 28—31.
- [7] Currier, H. B., 1956. Effects of toxic compounds: stimulation, inhibition, injury and death. In W. Ruhland (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, II: 792—820. Springer-Verlag, Berlin.
- [8] Hase, E., Otsuka, H. Mihara, S. and H. Tamiya, 1959. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Biochim. et Biophys. Acta*, 35(1): 180—189.
- [9] Lewis, K., 1966. Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms. IV. Biochemical fuel cells. *Bacteriol. Rev.*, 30(1): 101—113.
- [10] Prát, Silvestr, 1934. Stimulation plasmolysis on marine algae. *Acta Adriatica*, Institute Biologico-Oceanographici Split (Jugoslavia) 4: 1—20.
- [11] Ramm, A. E. and D. A. Bella, 1974. Sulfide production in anaerobic microcosms. *Limnol. and Oceanogr.*, 19(1): 110—118.
- [12] Seifriz, W., 1955. Die strukturen der zelle und ihre chemische und physikalische konstitution. In W. Ruhland (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*. I: 383—400. Springer-Verlag, Berlin.
- [13] Tezuka, Y., 1966. A commensalism between the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* and other heterotrophic bacteria. *Bot. Mag. Tokyo*, 79: 174—178.
- [14] Thomas, M., 1951. Gas damage to plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2: 293—322.
- [15] Wiame, J. M., 1958. Le cycle du soufre dans la nature. In W. Ruhland (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, IX: 101—110.
- [16] Zobell, C. F. and S. C. Rittenberg, 1948. Sulfate-reducing bacteria in marine sediments. *J. Mar. Res.*, 7(3): 602—617.

ON THE MALFORMATION DISEASE OF LAMINARIA SPORELINGS*

Wu Chaoyuan** Gao Nansheng*** Chen Decheng****

Chou Baicheng** Cai Peixian*** Dong Shuxi**

Wen Zongcun** and Cong Renyi**

ABSTRACT

Since the late fifties, under the guidance of Prof. C. K. Tseng, we have succeeded in devising a method of summering young sporelings at low temperature by collecting the spores in early summer instead of middle or late autumn. The spores and subsequently the gametophytes and the young sporophytes are cultivated in sporeling culture

* Contribution No. 492 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

** Institute of Oceanology, Academia Sinica.

*** Lian Jiang Sporeling Culture Station, Fujian Province.

**** Institute of Marine Fisheries, Fujian Province.

stations, somewhat like a greenhouse, in a temperature of about 8—10°C. By means of changing the time of spore collection, the sporophytes, when taken out from the cultivation system and cultivated in the open sea in middle or late autumn, are already 1—2 centimeters in size and are able to grow faster, resulting in a longer frond and a higher production. Unfortunately, it happened that sometimes the sporelings died due to a destructive disease of unknown nature. In serious cases, all the sporelings died within a few days. In South China, for example, in Fujian Province, the surface sea water temperature in summer is too high for the fronds to develop sporangial sori naturally. Therefore, the sporeling culture stations have to transplant mature sporophytes with sporangial sori from Qingdao or Dalian to collect spores every year. In order to solve the problems of expensive transplantation, the sporeling culture station tried to cultivate mature sporophytes in bays nearby the station, and soon after the surface sea water temperature raised to about 20°C, the sporophytes were taken into the sporeling cultivation system with lowered temperature. After a period of cultivation in a temperature not more than 13°C, the sporangial sori were formed on the surface of the thallus and subsequently spore collection may be carried out. The sporeling ropes were cultivated in the same system. But they failed due to the same destructive disease happened in the first few years. The disease was serious, sometimes destroying virtually the entire crop.

Symptoms

The symptoms appeared in the different stages of the sporelings are described as follows:

(1) Gametophyte

Changes such as delayed growth, increment of wall thickness, degeneration of the chloroplast are the initial morphological appearances of the typical symptoms. Sometimes, vacuolar contraction and balling of the cytoplasm take place, and in some serious cases, chloroplasts and protoplasmic lipids collect into transparent or dark droplets in the center of the cell (Lipophanerosis), accompanying the necrotic process finally.

(2) Oogonium

In general, as the female gametophyte reaches about 20 μ in size, the plant approaches maturity. The sign of approaching maturity is the appearance of a papilla-like protrusion from the wall and the wall of the protrusion getting thinner and thinner, through which some cytoplasm is eventually pressed out. Under favourable conditions, the egg is forced out but remains attached to the apex of the oogonium. The injured egg shrinks inside the oogonium and cannot extrude off. With increasing injury, the egg contracts to form several droplets in the center of the oogonium and dies gradually. Some of the eggs may even be able to extrude off, but they lose the ability of attaching and drop off from the apex of the oogonium.

(3) Young sporophyte

The fertilized egg, when diseased, commonly exhibits a concave plasmolysis, and abnormal cell division occurs too, resulting in the appearance of very big cells with a diameter of 3—6 folds than the ordinary one. These lead up to the abnormal cell arrangement and eventually to the malformation of the young sporophytes which shows the typical feature of this disease. The grape-like malformed sporophytes so formed,

are composed from several to even some hundred cells. Such a phenomenon is believed to be a kind of irreversible injury and consequently the malformed sporophytes die.

In brief, it is concluded that in the sporeling culture station the disease appears mainly during oogonium formation as well as in the several celled young sporophyte stages. In serious cases, one can find many empty oogonia at mid night and consequently most of the sporelings die within one or two days. Protective measures such as refreshing the sea water, washing the sporeling ropes, decreasing the water temperature or stopping fertilizer application are known to be of no effect in preventing the dissemination of the disease.

Causality and Etiology

Since the destructive disease happened, we had found, from the inner side of cast-iron tubes which constitute the pipe line of the water supply system, some blackened puffy rust, and by adding hydrochloric acid, H_2S was given off. Experiments showed that *Laminaria* sporelings are injured in much the same way as have happened in the culture stations by cultivating the gametophytes with a small piece of cast-iron rust in a small chamber within 3 days. In the meantime, H_2S is found in the cultivating sea water. The fact that the percentage of injured individuals might be decreased to a great extent by adding penicillin (1300 international units per ml. of sea water) in the cultivation sea water elucidates that the disease is presumably caused by H_2S producing bacteria. So far as we know, the black rust is the product of anaerobic corrosion of iron in the presence of sulfate-reducing bacteria. Briefly, the anodic reaction is the oxidation of active metal to metal ions and the cathodic reaction is the evolution of hydrogen. If hydrogen accumulated, the cathodic reaction would stop. Because the bacteria utilize H_2 to reduce sulfate to H_2S , this process allow the corrosion reaction to proceed. Therefore, the presence of the black rust indicates that there is a secondary origin of sulfate-reducing bacteria inside the pipe. Some mixed cultures of sulfate-reducing bacteria and H_2S producing saprophytic bacteria, for example, *Micrococcus* spp. were obtained through enriched cultivations from the rotted spots of *Laminaria* blade, water of cultivation system, marine mud nearby the station respectively. The mixed cultures obtained from the rotted spot are capable of multiplying rapidly in culture station temperatures (10—12°C) and produce much more H_2S than any one of the pure cultures isolated by the Section of Bacteriology of the Institute of Oceanology, Academia Sinica. Inoculation experiments showed that both the mixed and the pure cultures can induce the disease of similar symptoms as has happened in the culture station.

In order to verify if the symptoms are specific to H_2S , experiments of toxic effects of H_2S on the sporelings of different developmental stages were performed. Experimental results showed that typical symptoms may be induced by H_2S even in extremely low concentrations. In the presence of H_2S , the formation and elongation of the germination tubes are delayed or even completely inhibited. The sluggish migration of the cell contents into the enlarged end of the tube thereafter retards the formation of the gametophyte. 96% of germination is inhibited in a concentration of 0.50 ml/L whereas 50% of gametophyte formation is delayed in a concentration of 0.13 ml/L. High concentrations cause the death of the gametophytes, for example, lethal dose of 32% gametophyte is 4 ml/L. A concentration as low as 0.005 ml/L may cause the shrinkage

of the egg whereas the half toxic dose of oogonium is about 0.018 ml/L. The injured fertilized egg exhibits a concave plasmolysis accompanied with the appearance of large vacuole. It is obvious that the oogonium formation and the pre-gametophyte stages are the most sensitive ones in the period of the young sporeling.

Conclusion and control

Based on the results obtained it is concluded that H_2S is found to be able to induce malformation disease. Since H_2S is produced as one of the metabolites of sulfate-reducing bacteria and certain saprophytic bacteria. Therefore, these bacteria which are commonly found in the vicinities of the station are the pathogen of the malformation disease. The bacteria multiply in the cultivation system as well as in the rotted spots of the Laminaria blade and are inoculated onto the sporeling ropes in the course of spore collection. Under favourable conditions, the bacteria multiply promptly and malformation disease is thus induced.

Since 1975, preventive measures have been taken. The first step is to separate the sporeling cultivation system from the mature sporophyte cultivation system and secondly the sporeling cultivation system is sterilized with bleaching powder before spore collection. Timely removal of the rotted spots from the blade is another but more effective measure to reduce the secondary origin of the bacteria. Thereafter, cultivation of the healthy summer sporelings in Fujian Province which have one more month of growth than the usual autumn sporelings resulting in an increased production has been proceeding rapidly since 1975.

图版 (Plate) I

1. 正常♀配子体(对照); 2. 死亡的♀配子体, 原生质体收缩, 有清楚的大液泡, 原生质中有球状小粒(1.84 毫升/升 H_2S 处理); 3. 死亡的♀、♂配子体, 色素体球状, 原生质体缩于一侧, 有大液泡(1.84 毫升/升 H_2S 处理); 4. 死亡的♀配子体, 色素体成小球状(1.84 毫升/升 H_2S 处理); 5. 收缩死亡的♀配子体(5.5 毫升/升 H_2S 处理); 6. 正常的卵和卵囊(对照); 7. 收缩的卵(0.01 毫升/升 H_2S 处理); 8. 未排出的死亡的卵, 色素体呈球状, 集中于卵中央(1.84 毫升/升 H_2S 处理); 9. 正常 1 个细胞孢子体(对照); 10. 1 个细胞孢子体, 原生质体收缩(0.05 毫升/升 H_2S 处理)。

Explanation of plates

Plate I

1. Normal female gametophyte (control)
2. Dead female gametophyte, showing the shrinkage of the protoplasm (1.84 ml/l H_2S treated)
3. Dead male and female gametophytes (1.84 ml/l H_2S treated)
4. Dead female gametophytes. Chloroplasts and protoplasmic lipids collect into transparent droplets in the center of the cell (1.84 ml/l H_2S treated)
5. Dead female gametophyte, showing the contraction of the chloroplast
6. Normal oogonium and the egg
7. An injured egg shrinks inside the oogonium (0.01 ml/l H_2S treated)
8. Dead egg (1.84 ml/l H_2S treated)
9. Normal 1-celled sporophyte
10. An injured 1-celled sporophyte, showing the shrinkage of the protoplasm (0.05 ml/l H_2S treated)

图版 (Plate) II

11. 正常 2 个细胞孢子体, 细胞分裂刚完成(对照); 12. 不正常的 2 个细胞孢子体, 色素体分散, 顶部的一个细胞小(0.005 毫升/升 H_2S 处理); 13. 不正常的 2 个细胞孢子体, 细胞大小差别悬殊, 色素体分散(0.005 毫升/升 H_2S 处理); 14. 正常 7 个细胞孢子体(对照); 15. 不正常的 7 个细胞孢子体, 细胞大小不同, 排列不整齐(0.005 毫升/升 H_2S 处理); 16. 畸形孢子体, 7 个细胞(0.05 毫升/升 H_2S 处理); 17. 畸形孢子体, 3 个细胞(0.05 毫升/升 H_2S 处理); 18. 接种 F_7 , 混合菌种后, 配子体原生质体收缩到细胞中部。

Plate II

11. Normal 2-celled sporophyte just after cell division
12. Abnormal 2-celled sporophyte (0.005 ml/l H_2S treated)
13. Abnormal 2-celled sporophyte (0.005 ml/l H_2S treated)
14. Normal 7-celled sporophyte (control)
15. Malformed 7-celled sporophyte, showing the abnormal cell arrangement (0.005 ml/l H_2S treated)
16. Malformed 7-celled sporophyte (0.05 ml/l H_2S treated)
17. Malformed 3-celled sporophyte (0.05 ml/l H_2S treated)
18. Injured female gametophyte after inoculation of the mixed culture F_7

