

褐藻酸降解菌在海带 (*Laminaria japonica*) 幼苗藻体表面数量分布特点及其 对海带回染的初步研究*

林伟 张伟伟[†] 严小军^{††} 段德麟¹⁾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

^{††}(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

摘要 在威海泊于、崮山及荣成3家海带育苗场,采用回染实验方法对采集的海带藻体表面褐藻酸降解菌数量分布及特点进行了初步研究。结果表明,采自荣成的病烂海带幼苗上,其总异养细菌数量(1.22×10^8 cfu/g)比威海两家育苗场的正常海带幼苗上总异养细菌数量(崮山: 1.15×10^6 cfu/g及泊于: 1.11×10^6 cfu/g)高100多倍,其褐藻酸降解菌的数量(4.88×10^7 cfu/g)比后两家(崮山: 8.0×10^4 cfu/g及泊于: 4.3×10^5 cfu/g)的高100—500倍。与正常海带幼苗相比,烂苗脱落后的总异养细菌数量较高(2.42×10^7 : 1.11×10^6),而褐藻酸降解菌的数量相对更高(1.50×10^7 : 4.3×10^5);其中,脱落烂苗上的褐藻酸降解菌数量约占其总异养细菌数量的61.98%。将分离、纯化的部分褐藻酸降解菌对海带孢子体组织块进行回染实验,能引起海带组织产生绿烂现象,证明褐藻酸降解菌是海带烂苗的条件致病菌。

关键词 海带,藻体,褐藻酸降解菌,回染

中图分类号 R363

在海带人工育苗中,幼苗常出现绿烂导致掉苗,对海带育苗工作产生严重影响。前期研究表明,海带病烂与褐藻酸降解菌的大量繁殖有关系(陈驹等,1979,1981,1984,1986;丁美丽,1990)。近年来,虽然海带育苗过程中的病害问题有所控制,但由于种种原因,海带烂苗及脱苗现象依然很严重。作者认为,目前在海带育苗过程中,除了采苗密度等技术措施不当外,仍然缺乏对海带育苗系统中细菌以及特殊条件下优势菌群的数量和分布特点的深入了解,这可能是造成海带烂苗的重要原因。据此,作者对威海及荣成3家海带育苗场,进行了海带育苗系统中褐藻酸降解菌数量、分布特点进行了初步研究,在此基础上,将分离、纯化的褐藻酸降解菌对海带进行回染实验,以期探讨褐藻酸降解菌在复染海带组织产生病变

的作用,建立海带育苗中微生物的检测指标,为阐明海带幼苗防病的机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 取样

于2000年10月8—12日在威海泊于、崮山两家海带育苗场及荣成鸿洋神集团海带育苗场采集海带(*Laminaria japonica*)藻体样品,置于冰筒内立即带回,在实验室内作微生物学分析。

1.2 菌株分离培养

细菌分离培养基:(1)2216E固体培养基;(2)褐藻酸钠固体培养基:($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g; K_2HPO_4 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g; NaCl 30g; 褐藻酸钠 10g; 琼脂 15g; 蒸馏水 1L; pH=7.2—7.4。

将小海带苗称重后在无菌海水中轻度漂洗以

* 国家重点基础研究发展规划项目,G1999012004号。林伟,副研究员,E-mail:wlin@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者:段德麟,博士,研究员,博士生导师,E-mail:dlduan@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2003-10-14,收修改稿日期:2004-06-14

除去附着于藻体上的外来污物,然后放于灭菌的研磨器中磨碎,加入2ml无菌海水混匀,静置片刻,用无菌移液管取上清液0.1ml及适度稀释液涂布细菌分离培养基平板,在22℃培养7—10天。在2216E培养基平板上计数总异养细菌菌落数,在褐藻酸钠固体培养基平板上计数褐藻酸降解菌菌落数,换算为每克藻体上细菌数量。根据菌落不同形态将2216E培养基平板上的菌落挑下,分离、纯化并进行鉴定。

尽管在褐藻酸钠固体培养基平板上生长并出现透明圈的菌落可以视为褐藻酸降解菌的标志,但为了进一步验证其降解褐藻酸钠的能力,尚需将各菌株放入褐藻酸钠液体培养基(褐藻酸钠25g/L培养基,不加琼脂,其余同褐藻酸钠固体培养基)内,进一步作降解能力的比较鉴定。从计数褐藻酸降解菌菌落数的褐藻酸钠固体培养基平板中选择菌落数目适中的平板(即每个平板约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培养基试管中,于25℃培养5天,测定其对褐藻酸钠的降解能力,将可明显降解褐藻酸钠的细菌再分离、纯化。

来源于2216E培养基平板上的细菌菌株分离、纯化后分别接种到褐藻酸钠液体培养基试管中,于25℃培养5天,测定其对褐藻酸钠的降解能力,将可降解褐藻酸钠的菌株同来源于褐藻酸钠固体培养基平板上的可降解褐藻酸钠的菌株进行比较、分析。

1.3 回染实验

健康海带孢子体(长为0.8—1.0m)于2001年

3—4月采自黄岛海带养殖筏架。于海带边缘切取长、宽各1cm的小块置于无菌培养皿中,以无菌海水漂洗数次,采取将海带表面擦洗,海带表面切口,海带表面擦洗及切口等方式处理,以接种环取适量活化24h的15株褐藻酸降解菌接种到已处理的海带表面,同时接种未处理的海带表面;每组设2个平行重复实验。将接菌的各海带组织块分别置于无菌的24孔细胞培养板(COSTAR, Corning Inc. USA)中,每孔加入1ml无菌海水,置于光照培养箱培养[15℃, 26μE/(m²·s)]3天,定期观测。以藻体组织块未接菌作对照实验,其中海带表面擦洗采用灭菌的棉棒沾取无菌海水反复擦洗健康海带表面的方法进行;海带表面切口采用灭菌刀片在海带组织块上划0.5cm左右的刀口3—4处的方法进行。上述操作均按照无菌操作规则进行。

2 结果

2.1 细菌数量分析

研究发现,威海崮山海带育苗场海带幼苗生长良好,无烂苗和脱苗现象发生,幼苗大小整齐,为准备出库,正在进行育苗海水提温;威海泊于海带育苗场海带幼苗生长尚好,但前期曾有烂苗和脱苗现象发生,后期病症消失,幼苗大小有差异;而荣成鸿洋神集团海带育苗场海带幼苗生长状况最差,烂苗和脱苗现象严重。各海藻样品细菌数量见表1。

表1 不同生长状态下的海带幼苗表面细菌数量及分布特点

Tab.1 Numeral and distributional characteristics of the bacteria on the surface of *L. japonica* juvenile sporophytes with different growth states

地 点	藻体生长状况	水温(℃)	2216E 平板计数细菌数量(cfu/g)	褐藻酸钠平板计数细菌数量(cfu/g)
威海崮山	良好	7	1.15×10^6	8.0×10^4
威海泊于	较好	6.5	1.11×10^6	4.3×10^5
荣成鸿洋神	未烂苗	5	4.28×10^6	1.54×10^6
荣成鸿洋神	烂苗	5	1.22×10^8	4.88×10^7

作者又在威海泊于海带育苗场,对正常生长的海带幼苗及已脱落的苗体进行了总异养细菌与褐藻酸降解菌分布特点研究,结果如表2所示。

2.2 褐藻酸降解菌的分离与纯化

通过实验,到目前为止,共分离得到18株褐藻酸降解菌纯菌株,其特性如表3所示。

表 2 海带正常生长及脱落幼苗表面细菌数量差异

Tab.2 Difference of bacterial colonies on the surface of dropped-off *L. japonica* juvenile sporophytes at normal conditions

菌 别	正常生长幼苗	脱落幼苗
总异养细菌数量(cfu/g)	1.11×10^6	2.42×10^7
褐藻酸降解菌数量(cfu/g)	4.30×10^5	1.50×10^7

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。虽然褐藻酸钠培养基具有限制其他异养细菌生长的特点,但由于成分较为单一,不能满足所有类型褐藻酸降解菌的生长需要。为获得更多类型的褐藻酸降解菌,作者同时使用 2216E 作为补充筛选培养基。实验结果表明,从 2216E 培养基平板上分离到多株在褐藻酸钠培养基平板上未发现的可降解褐藻酸钠的菌株(表 3)。

表 3 海带幼苗表面分离的褐藻酸降解菌部分特征

Tab.3 Characteristics of alginic acid decomposing bacteria isolated from the surface of *L. japonica* juvenile sporophytes

菌株号	色素	降解能力	降解后培养基特征	降解琼脂	来 源	分离平板
1	无	强	液体清澈、淡黄色,有菌膜	+	鸿洋神好苗	2216E
2	褐	较强	液体清澈、淡黄色,无菌膜	-	崮山好苗	2216E
3	无	强	液体清澈、褐色,无菌膜	+	鸿洋神烂苗	褐藻酸钠
4	无	较强	液体清澈、无色,无菌膜	-	泊于好苗	褐藻酸钠
5	无	较强	液体清澈、灰褐色,无菌膜	+	鸿洋神好苗	2216E
6	浅红	较强	液体清澈、无色,无菌膜	-	鸿洋神烂苗	2216E
7	无	强	液体混浊、褐色,无菌膜	-	泊于好苗	褐藻酸钠
8	无	强	液体清澈、无色,无菌膜	-	鸿洋神烂苗	褐藻酸钠
9	无	较强	液体清澈、浅褐色,有菌膜	-	崮山好苗	褐藻酸钠
10	黄	较强	液体清澈、无色,无菌膜	-	泊于好苗	褐藻酸钠
11	黄	较强	液体清澈、浅褐色,无菌膜	-	鸿洋神好苗	2216E
12	无	强	液体混浊、淡黄色,无菌膜	-	泊于好苗	褐藻酸钠
13	无	较强	液体清澈、浅褐色,无菌膜	-	鸿洋神好苗	褐藻酸钠
14	无	强	液体清澈、浅褐色,无菌膜	-	鸿洋神烂苗	2216E
15	黄	较强	液体清澈、无色,无菌膜	-	崮山好苗	褐藻酸钠
16	黄	较弱	液体清澈、无色,无菌膜	-	崮山好苗	褐藻酸钠
17	黄	较强	液体清澈、褐色,无菌膜	-	泊于好苗	褐藻酸钠
18	无	强	液体混浊、褐色,无菌膜	-	鸿洋神烂苗	褐藻酸钠

注: + 表示降解, - 表示不降解

2.3 回染实验

从表 3 中,选择菌株 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、16、17、18 共 15 株褐藻酸降解菌,对海带孢子体组织块进行回染。实验结果表明,2 号、10 号及 13 号菌株回染效果较好。接菌 24h 内,处理的海带孢子体组织块(特别是海带表面擦洗及切口处理)出现绿烂现象;而未处理的海带孢子体组织块,其接菌后培养 72h 后,没有发现绿烂现象。未接菌的海带组织块,无论处理与否,均未产生绿烂

现象。这说明褐藻酸降解菌的确能引起海带组织的病烂,特别是当海带组织受到机械损伤时,回染病原微生物,所产生的病变现象更为突出,如表 4 所示。对其他 12 株褐藻酸降解菌回染的观察,所产生的病变不明显。

另外,通过离体实验,也选取了 3 株分离自海带幼苗表面但无降解褐藻酸钠能力的细菌,对海带组织块进行了回染对比实验,结果表明,这些细菌在 72h 内未使海带孢子体组织块产生绿烂现象。

表4 3株褐藻酸降解菌回染海带组织的观察

Tab.4 Observation of re-infected *L. japonica* tissues with three strains of alginate decomposing bacteria

菌株号	处理方式	回染时间(h)		
		24	48	72
2	不处理	-	-	-
	擦	+	+	+
	切	-	-	-
	擦+切	+	+	+
10	不处理	-	-	-
	擦	+	+	+
	切	-	-	-
	擦+切	+	+	+
13	不处理	-	-	-
	擦	-	-	-
	切	+	+	+
	擦+切	+	+	+
未接菌对照	不处理	-	-	-
	擦	-	-	-
	切	-	-	-
	擦+切	-	-	-

注: + 表示海带孢子体组织块绿烂; - 表示海带孢子体组织块无肉眼可见变化

3 讨论

3.1 细菌数量与烂苗的关系

从表1可以看出,所采集的各海带幼苗(处于不同生理状态)藻体表面均有褐藻酸降解菌存在,表明其是海带藻体表面的正常栖居菌群。威海崮山海带育苗场和威海泊于海带育苗场海带幼苗上的总异养细菌数量基本一致,但后者褐藻酸降解菌的数量是前者的5倍左右。荣成鸿洋神集团海带育苗场海带幼苗上的总异养细菌数量比威海崮山海带育苗场和威海泊于海带育苗场海带幼苗上的总异养细菌数量高100多倍,而其褐藻酸降解菌的数量比前两者高100—500倍。根据前期工作的结论即褐藻酸降解菌是导致海带烂苗的主要原因之一,本实验中进一步确认,海带烂苗与褐藻酸降解菌间存在着密切的相互关系,表明褐藻酸降解菌是海带烂苗的条件致病菌。

从表2可以看出,与正常生长海带幼苗相比,脱落幼苗总异养细菌数量及褐藻酸降解菌数量均较高,特别是褐藻酸降解菌的数量更高。在脱落海带幼苗上,褐藻酸降解菌数量约占总异养细菌数量的61.98%,间接表明脱落苗体可能是影响海带育苗系统内褐藻酸降解菌数量变化的重要因

素,因此,应在海带育苗过程中,将脱落苗体及时清除,防止其混入育苗循环水中,否则会使育苗海水褐藻酸降解菌数量大幅上升,产生海带幼苗腐烂的条件。

3.2 回染实验温度的选择

在样品的微生物学分析时,理想的培养条件,如温度应同现场一致。本实验中所选定的3家海带育苗场附近海域一般不会存在那些对热极为敏感,20—25℃即可阻碍其生长与代谢,主要分布于极地、深海和高纬度海洋中的嗜冷细菌。而绝大多数海洋微生物都具有在低温下生长的特性,因此海带育苗水体中存在的微生物应该是那些虽然能在5℃左右缓慢生长,但其最适生长温度却为20℃左右的耐冷细菌。同时考虑到低温培养及分离目的菌株所耗时间过久,影响实验进度,以及参考前人相关的实验方法(丁美丽,1990;陈弼等,1979,1986),将褐藻降解菌培养分离温度确定在22℃。而在进行降解能力的比较鉴定实验时,考虑到褐藻酸降解酶的产酶及活性的温度范围(陈弼等,1979;韩宝芹等,1998),将培养温度确定在25℃。

在褐藻酸菌对海带组织块回染的预实验时,将培养温度设定在6℃(模拟现场温度)。结果发现,所有的实验组与对照组培养30天均未出现绿烂现象,以后逐渐提高培养温度直至15℃,经回染的海带组织块绿烂现象出现较快,重复性及稳定性均较理想,与对照对比明显。这与丁美丽(1990)低温下的实验结果相似(但作者于15℃回染海带组织块出现绿烂的时间更短)。海带育苗现场5—7℃能出现烂苗现象,而在实验室中同温度下回染实验绿烂却无法出现,原因可能很多。如季节所限,本实验所采用的海带组织块并非来自于海带幼苗,而是取自厚成期海带。在低温条件下这些海带组织块产生的多酚类物质较多,使绿烂难以出现,或者是由于采用单菌株进行回染实验所致。而在育苗现场,低温条件下烂苗现象的出现,可能需要多种(株)褐藻酸降解菌的协同作用。

3.3 回染结果分析

分析实验结果时,作者发现了一个有趣的现象,即回染效果较好的菌株(2号、10号及13号)均分离自好苗,且在25℃下降解褐藻酸钠的能力并不很强,而分离自烂苗的,或降解褐藻酸钠能力强的回染效果并不理想(表3、表4),这可能是由诸多原因所致,除回染的海带并非幼苗外,培养条

件等也是重要原因。分离自烂苗或 25℃ 下降解褐藻酸钠能力强的菌株在 15℃ 下生长、产酶及酶活力等可能较差, 2 号、10 号和 13 号菌株正好相反。另外, 2 号、10 号和 13 号菌株菌分离自好苗, 也正说明褐藻酸降解菌为海带病烂的条件致病菌。

4 结语

目前, 虽然以往的工作证实了褐藻酸降解菌是海带的条件致病菌, 但其致病的条件及侵染机理尚不清楚。因此, 深入分析海带表面微生物区系, 探讨海带抗病变的防御机制, 对海带抗感染及产生病变的条件有重要意义。

参 考 文 献

丁美丽, 1990. 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, 12(12): 224—230

陈 馥, 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

陈 馥, 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的关系. 海洋与湖沼, 12(2): 133—137

陈 馥, 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防御措施. 海洋与湖沼, 15(6): 581—587

陈 馥, 刘秀云, 刘秀珍等, 1986. 褐藻酸降解菌的研究 IV. 褐藻酸降解菌海带栽培区中的生态分布及其重要性. 海洋与湖沼, 17(2): 137—143

韩宝芹, 戴继勋, 刘万顺等, 1998. 海藻工具酶研究 II. 褐藻酸酶的制备、性质及对裙带菜细胞的解离研究. 海洋学报, 20(3): 90—95

DISTRIBUTION AND REINFECTION OF ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA ON JUVENILE *LAMINARIA JAPONICA*

LIN Wei, ZHANG Wei-Wei[†], YAN Xiao-Jun^{**}, DUAN De-Lin

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

[†](Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;

Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

^{**}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;

Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Samples of juvenile sporophyte of *Laminaria japonica* were collected from breeding house near city of Rongcheng and Weihai, Shandong peninsula. Alginic acid decomposing bacteria were isolated from the seaweeds surface. Study on distribution and infection of the bacteria was then studied.

At 22℃, isolation and purification of the bacteria were performed. Verification and correlation analysis between the number of heterotrophic bacteria and the decayed juvenile sporophytes was carried out. Results showed that the total number of heterotrophic bacteria (1.22×10^8 cfu/g) on infected juvenile sporophyte in seeding net was 100 times higher than that from normal cultivars: $(1.11—1.15) \times 10^6$ cfu/g, and that the number of alginic acid decomposing bacteria (4.88×10^7 cfu/g) was up to 100—500 times of that of the latter [$(0.8—4.3) \times 10^5$ cfu/g]. Compared with normal *Laminaria* juvenile sporophyte, the total number of heterotrophic bacteria from infected and dead sporophyte was ten times higher, and the number of alginic acid decomposing bacteria was about 200 times higher. It is estimated that the alginic acid decomposing bacteria took about 61.98% of the total of heterotrophic bacteria.

Re-infection tests indicated that the alginic acid decomposing bacteria was insensitive to high temperature, even though the occurrence of decayed juvenile sporophytes was at 6℃. The optimal temperature for growth of the isolated alginic acid decomposing bacteria was about 20℃. It will be time consuming and laborious if only isolated at 6℃, and will hinder the normal growth of alginic acid decomposing bacteria.

Lab study on the heterotrophic bacteria behavior indicated that the decayed *Laminaria* tissues occurred at 15℃ but 6℃. Dense population of farming and complicated bacterial function could be the possible reasons.

Some alginic acid decomposing bacteria isolated from the healthy juvenile sporophyte showed a moderate ability for decomposing alginic acid sodium at 25°C but exhibited a strong ability against the infection at 15°C. While those from the decayed juvenile sporophytes or strong decomposition of alginic acid sodium at 25°C did not show the strong ability for infected the algal tissue at 15°C, this may be ascribed to the culture conditions under different temperatures and re-infected algal materials. Our re-infected tests proved that the alginic acid decomposing bacteria is opportunistic pathogen to the *Laminaria* sporophyte.

Close co-relation existed between the decay of *Laminaria* and the alginic acid decomposing bacteria, this indicated that the de-attached juvenile sporophyte will possibly result in the fluctuation of alginic acid decomposing bacteria. Therefore, it is necessary to remove the de-attached juvenile sporophyte immediately when it occurred in the breeding seawater system, otherwise, the breeding seawater contaminated with de-attached juvenile sporophyte would cause the huge increase of alginic acid decomposing bacteria, and eventually led to the decay or de-attachment of juvenile sporophyte.

Key words *Laminaria japonica*, Sporophyte, Alginic acid decomposing bacteria, Re-infection



浮动的岛屿

全球文献

Floating Islands

A Global Bibliography

with an Edition and Translation of G. C. Munz's

Exercitatio academica de insulis natantibus (1711)

By Chet Van Duzer

本书是关于浮岛这一自然奇观的详尽的信息总汇。文献包含了涉及相关选题的 20 几种不同语言的 1800 多篇著作文章;词条均有注释,并配有文字和图像的索引。本书探讨了有关浮岛的各个方面的问题,诸如:浮岛的构造、浮岛浮力的成因,它们在湖泊和湿地生态中的角色,它们的动植物群落,它们在动植物繁衍过程中扮演的角色,还有保护和利用浮岛的方法。书中也涉及人工浮岛的问题,这些人工岛被用于农业的目的,用作人类的居住地,还有野生动物的栖息地,也用于提高水土质量的用途;书中也提到了文学作品、神话传说的一些浮岛。书中还附上了一篇 G. C. 穆恩茨[G. C. Munz]写于 1711 年的关于浮岛的珍贵论文[*Exercitatio academica de insulis natantibus*]以及它的英文译稿,并有详尽的注释,书里也提供了不同浮岛的许多图片资料。

硬皮本, 27cm, 含索引和 24 幅插图共 427 页, US \$ 44.95

ISBN 0-9755424-0-0

LCCN 2004093899

即将由坎特出版社[Cantor Press]于 2004 年 9 月出版

<http://www.cantorpress.com>