

环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究

丁 美 丽

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

摘 要

海带在育苗和养殖过程中常有病烂发生, 造成很大经济损失, 病烂出现时通常伴生有褐藻酸降解菌的大量繁殖。将接种褐藻酸降解菌而引起病烂的海带切片、镜检, 观察到细菌开始侵入海带表面的分生组织, 然后进入外皮层、内皮层和髓部。还观察到在细胞间隙有大量细菌存在, 许多藻细胞游离, 部分游离细胞的细胞壁破损, 因而导致组织崩溃、变软。褐藻酸降解菌是海带藻体上的主要附生细菌, 在正常情况下并不造成危害。试验表明, 在藻体表面损伤、过于密植、水温较高等不利条件下, 藻体抗病能力下降, 褐藻酸降解菌有机会大量增殖, 病烂也就发生。因此, 由于多种原因引起的育苗系统生态环境不良, 是诱发病烂的主要原因。

海带病烂, 尤其是在苗期, 造成很大经济损失^[1, 2]。一些研究指出, 海带病烂与褐藻酸降解菌大量繁殖有关^[3, 4]。褐藻酸降解菌是海带藻体上主要附生细菌, 通常并不引起病烂。找出导致这类细菌异常增殖的原因, 对了解海带病烂的发生及防治都很有意义。

Leben Curt 报道^[5], 植物体表附生细菌菌量是受植物体年龄、生理状况及周围环境的制约。环境因素不但影响藻体生理状况, 也影响其附生细菌。我们进行了环境因子与海带病烂发生的关系, 以及细菌如何引起病烂的研究, 以期对海带病烂的防治有所裨益。

一、材料与方 法

(一) 样品

1. 海带

(1) 海带 (*Laminaria* sp.), 长度约 4—8 cm, 采自美国加州 Santa Cruz County, El Jaro Point, 简称海带 I。

(2) 海带 (日本) (*Laminaria japonica* Aresch), 长度为 5—9 cm, 由中国科

本文于1988年3月20日收到, 修改稿于1989年4月10日收到。

• 本实验的部分工作是在美国加州大学 Santa Cruz 分校海洋研究中心进行。

科学院海洋研究所遗传育种组提供，简称海带 II。

海带先用海水仔细揩洗，经抗菌素处理，再用无菌海水反复漂洗后，用作实验材料。

下述试验除病烂组织切片及温度试验只用海带 I 进行外，其余都用两种海带分别进行试验，所得结果基本一致。

2. 褐藻酸降解菌

Lo39、Lo53、Lo65、Lo67、Lo68 菌株分离自山东长岛海带育苗场病烂的海带，这些菌株都有强的分解褐藻酸盐的能力。

(二) 感染发病试验

1. 接种琼胶块：按 Andrews (1977) 方法进行，切取处在生长对数期的菌落连同琼胶培养基，贴在藻体表面，对照用无菌琼胶培养基代替。

2. 取对数生长期的细胞，制成菌悬液，接入培养海带的营养海水中，使海水中菌的浓度为 10^7 /ml，每隔 5 天换营养海水，并重新接入菌悬液。

当藻体出现病烂，从病灶中分离出细菌，作初步鉴定，确定优势菌株与接种的菌株一致，试验才能成立。

(三) 病烂组织切片

样品在 Karnofsky 固定液中固定 2 小时，用 0.1 mol/l cacodylate 缓冲液冲洗，在梯度酒精溶液中脱水，然后 JB-4 树脂渗透、包埋，用 JB-4 切片机切成 $2-3 \mu\text{m}$ ，选用 Periodic acid Schiff's 染色液染色 [6]。

(四) 损伤试验

试验海带，分别用刀尖刺伤藻体表面，然后涂布 Lo65 菌悬液。另设对照三组：一组是海带表面未经刺伤处理，在藻体表面涂菌悬液；二组是海带表面经刺伤，不接菌，另一组是海带未经刺伤，也不接菌。接菌用的菌悬液浓度为 10^9 /ml，每棵海带叶面接菌量为 0.05 ml ，培育于 7°C 下。

(五) 温度试验

试验海带经刺伤，涂布 Lo65 菌悬液，菌浓度为 10^8-10^9 /ml，在光强相同的条件下，培养于光-温梯度培养台 (light-temperature gradient table)，温度分别为 6°C 、 15°C 、 20°C 。对照组除不接菌外，其他同试验组。

(六) 密植试验

取培养皿 4 个，分别盛相同量海水，其中 2 个培养皿加入海带 6 棵，另 2 个培养皿加 2 棵为对照。在每棵海带表面均匀涂布 10^9 /ml Lo65 菌悬液，每个培养皿接菌量相同，培育于 8°C 下。

上述试验培育在 $0.29 \times 100 \text{ m}^2 \cdot \text{s}$ 光照条件下，每天光照 10 小时，并重复试验 1—2

次, 所得结果基本一致。

二、结果与讨论

(一) 感染试验

健康海带经除菌处理后, 在藻体表面分别接种长有褐藻酸降解菌Lo39、Lo53、Lo65、Lo67及Lo68菌落的琼胶块, 培养于12℃下, 经3天后, 接种上述5种菌株的藻体, 在接种处色素都消失, 变白; 经5天藻体腐烂; 7天中心部分穿孔。而接种无菌琼胶块的对照海带, 没有可见变化。腐烂的海带经固定处理后, 切片镜检, 可看到细菌开始侵入海带表面的分生组织, 然后进入外皮层、内皮层和髓部(图1、2)。在试验过程中还观察到细胞间隙处有大量细菌存在, 许多藻细胞游离, 部分游离细胞的细胞壁破损, 在破损细胞周围布满了细菌。由此可以推断, 细菌主要分解细胞间隙, 也能分解细胞壁, 因而使细胞分离, 组织崩溃, 变软, 进而使藻体穿孔。

将海带培育于 10^7 /ml褐藻酸降解菌的海水中, 作平行试验, 经12天培育, 没有出现肉眼可见的变化。

采用上述两种感染试验, 所得结果不一, 这可能主要是感染方法不同所致。

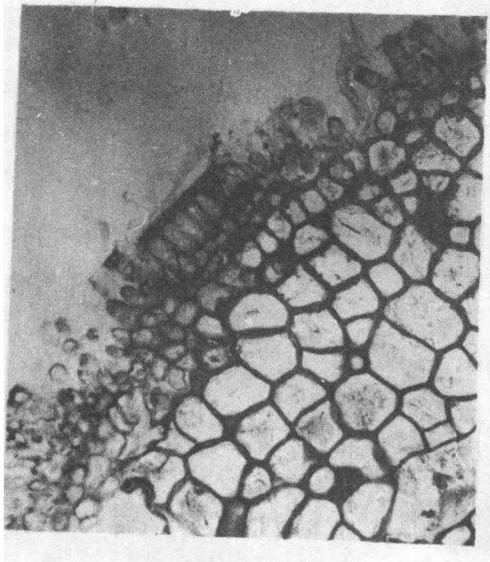


图1 海带叶片的横切面, 褐藻酸降解菌分解表皮分生组织

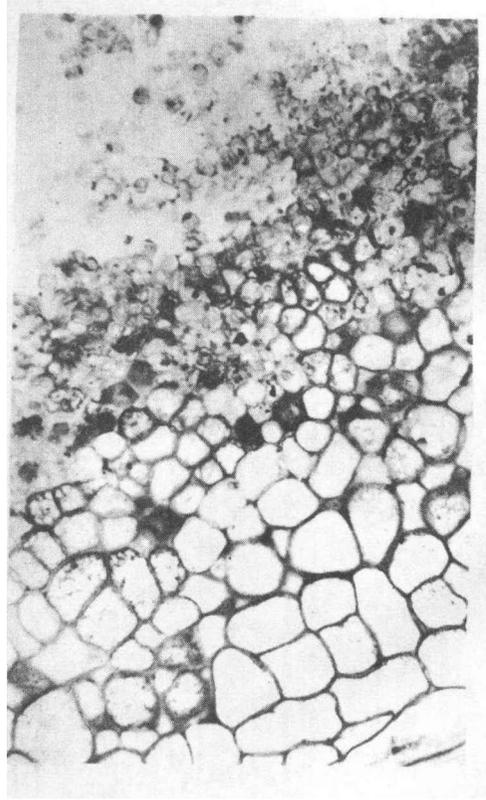


图2 海带叶片横切面, 褐藻酸降解菌侵入外皮层, 藻细胞游离

首先接种琼胶块的藻体表面覆盖着一层细菌及琼胶, 这样势必影响这部分藻体的物质交换及光的吸收, 导致代谢作用失调, 抗菌能力降低, 大量褐藻酸降解菌有机会进入藻体。海带细胞间隙主要成分是褐藻酸, 而褐藻酸降解菌能分泌褐藻酸酶^[3, 7], 因而细胞间隙

物遭到酶解，致使组织解体。

当将海带培育在接菌的海水溶液中，虽然菌浓度达到感染试验浓度，但在一定时间内并未引起病烂，这可能在试验条件下，藻体仍能进行正常代谢活动，保持抗病能力。

我们曾进行以下试验，取健康海带Ⅱ，一组经紫外线处理，将藻体杀死，另一组未经紫外线处理，分别培育于褐藻酸降解菌的海水悬液中。定时测定藻体的菌量。健康海带培育30分钟，附菌量达 $10^3/\text{cm}^2$ ，30分钟后菌量处于动态平衡，不再增多。而杀死的海带培育30分钟菌量达 $10^4/\text{cm}^2$ ，以后随着培养时间延长，附菌量逐渐增多，当培育4小时时菌量上升至 $10^5/\text{cm}^2$ 。这种现象可能与正常海带分泌一种多酚类物质，控制细菌生长有关^[8]。

(二) 损伤试验

病原菌进入植物体大都是通过天然孔道或因受伤造成的裂口^[9]。中尾报道^[10]，在实验条件下引起紫菜绿斑病的病原菌，首先是从叶状体的损伤处侵入藻体的。在自然条件下，或在海带育苗场，我们也发现受伤的藻体容易发病。将海带表面用刀尖刺伤后，涂布褐藻酸降解菌Lo65菌悬液。在8℃条件下培育，经观察：5天后，可见在损伤处微微褪色；培育12天后，损伤处及其周围基本上都变白腐烂（图3A）；以后逐渐穿孔。未经刺伤而接菌的藻体完好，仅个别部位微微变白（图3B）（这主要是用于接种的菌悬液中，存在着个别菌团，沾在藻体表面造成的）；损伤而不接菌的对照仍然生长良好，未见变化（图3C）。

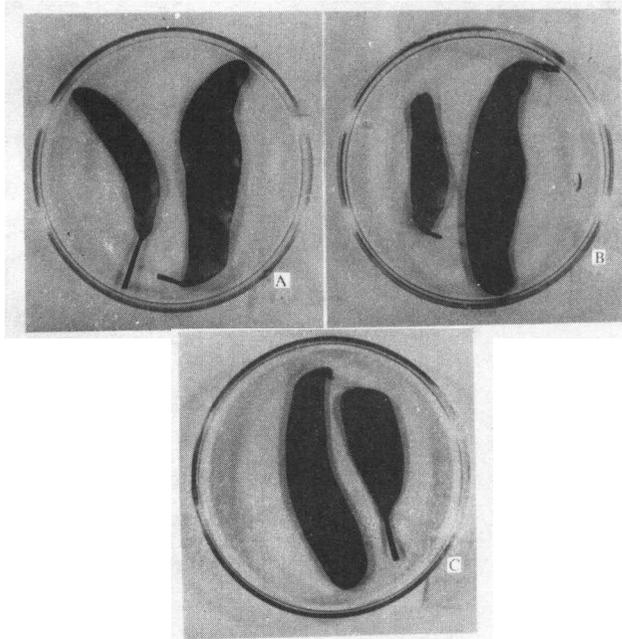


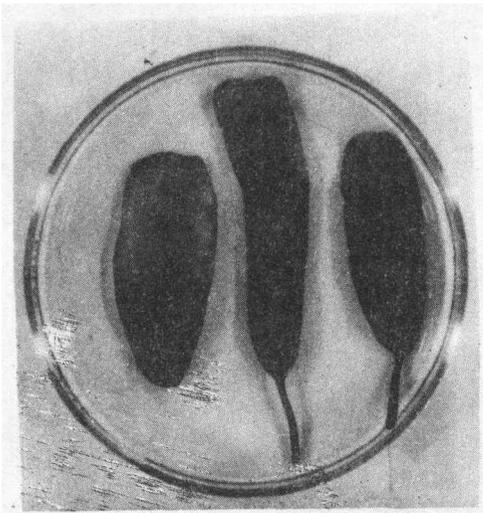
图3 A——海带经刺伤，接菌培育后，藻体病烂 B——海带未经刺伤，接菌培育后，藻体基本完好 C——不接菌，对照

通常藻体表面对海藻起着保护作用，海藻受伤后，失去了自然保护层，病菌就容易侵入。同时藻体受伤后，细胞内含物渗出。海带富含褐藻酸、甘露醇等。根据我们试验，褐

藻酸降解菌不仅能利用褐藻酸作为碳源,大都还能利用甘露醇、葡萄糖、淀粉和蔗糖等糖类作碳源。这些渗出物支持了褐藻酸降解菌的增殖,有利于它们进一步侵入。因此,藻体损伤不仅提供病菌侵入的途径,也提供了病菌增殖所需营养的物质基础,从而促进病害的发生。

(三) 密植试验

在海洋动物养殖中,已知拥挤导致病害,病害发生的危险性与拥挤成比例。在海藻养殖中也出现类似情况。在培养皿培育6棵海带的对照组,和仅培育2棵海带的对照组,在8℃条件下培育9天后,试验组藻体有些部位稍稍变白,12天后海带大面积变白软烂(图4);而对照组仅个别部位稍稍变白(类似图3B)。表明海带过于密植,容易引起病害。郭宜鏗等介绍了在海带育苗时孢子的附着量与病烂有一定关系,附着密度越高越容易引起病害[2],见表1。



后,藻体病烂(对照,类似图3B)

这种育苗环境,如果不及时改善,幼苗正常生理活动受阻,抗病能力下降,势必导致褐藻酸降解菌大量繁殖,脱苗和病烂严重发生。同样,在养成期的海带,如果栽培过密,也会发生类似的情况。

不同密度采苗试验发现,如果采苗过密,幼苗个体细长,明显小于正常苗,根部容易变白,脱苗、烂苗容易发生。在脱落的苗中,褐藻酸降解菌的数量可增至 $10^6/g$,比正常高出两个数量级。附苗过密,幼苗生长差,容易引起病害,可能主要有两个原因:一是光照受到影响,尤其是根部;其二可能与营养等其他因素有关。在幼苗生长过程中,特别当幼苗长到1cm以上时,新陈代谢旺盛,与外界物质交换增多。需要有较大水流将营养物质带入,同时将分泌物带出。而苗过密,使海水在幼苗之间流动速度减慢,单位时间水交换量减少。水流不畅,又会出现浮泥沉积,硅藻等杂藻生长,而杂藻又与幼苗争夺光和营养盐。

表1 不同采苗密度的幼苗发生、生长和病烂情况的比较*

采孢子密度	5/120×**	20/120×	50/120×	100/120×	200/120×
每厘米育苗器上的幼苗数	15	51	152	293	365
幼苗大小(cm)	1.5	1.7	1.3	1.0	1.1
病烂情况	无病烂	无病烂	点状白烂	片状白烂	片状病烂严重

*引自《海带栽培学》,1985。

**5/120×是指在120倍显微镜下,平均每个视野有5个孢子附着。

(四) 温度试验

培养于 6℃、15℃及 20℃光-温梯度培育台的接菌海带, 经 6 天, 处于 20℃的藻体, 损伤部分变白腐烂, 病烂处褐藻酸降解菌量达 $10^7/\text{cm}^2$; 培育于 15℃损伤处开始变白; 在 6℃条件下的海带未见变化, 藻体表面褐藻酸降解菌菌量为 $10^4/\text{cm}^2$ 。对照组除培育于 20℃的海带颜色稍微变浅外, 其余没有可见变化。由此可见, 较高的温度容易使海带发生病害。

温度的作用, 主要表现在两个方面: 一是细菌生长、繁殖与温度有关。一般褐藻酸降解菌最适生长温度在 20℃左右, 在较低温度条件下生长缓慢。另一方面, 温度对海带生理机能如代谢速度、抗病能力等有广泛影响。海带是冷水性藻类, 在适宜温度等条件下代谢旺盛, 且分泌一定量多酚类物质^[8], 可以控制藻体表面细菌的生长。在较高温度条件下, 生长差, 色素变浅, 且衰老加快。当生物处于衰弱状态下是容易引起疾病的。海带梢部腐烂就是一个很好的例证。另外, 如将厚成期的海带 II 从海上取回, 一组培育于 24℃左右的流动海水中, 另一组培育于 12℃左右低温室里作对照。试验组经 3 天, 由于水温较高, 海带有部分部位出现褪色, 以后逐渐变软、腐烂且病烂逐渐扩大。切下病烂部位及其周围海带, 分析其褐藻酸降解菌菌量, 病烂中心部位菌量达 $10^7/\text{cm}^2$, 占总异养菌 70%。病烂边缘部分菌量为 $10^6/\text{cm}^2$ 。病烂周围, 菌量为 $10^5/\text{cm}^2$ 。培育 15 天后, 一棵近 2 m 长的海带几乎全部烂掉, 而培育于 12℃对照组海带, 没有可见变化, 褐藻酸降解菌量仅为 $10^3/\text{cm}^2$ 。

上述结果表明: 健康海带在藻体上虽附生着一定量褐藻酸降解菌, 可是在正常条件下对藻体并不造成危害。但若条件变差, 如过于密植、损伤、温度偏高等, 这时病烂就容易发生。这与引起虾等甲壳动物病害的条件致病菌 (opportunistic pathogen)——几丁质降解菌和弧菌^[12, 13]有类似之处。在正常的寄主体上, 通常这类菌的数量不高, 它们的致病作用被动物的抗病作用阻抑, 病害没有发生。但当养殖环境恶化, 使寄主抗菌能力减弱, 细菌易于侵入和大量繁殖, 病害也就暴发。根据本试验所得结果, 可认为褐藻酸降解菌也属于条件致病菌之列。环境因子是诱发病烂的主要原因, 如果控制好养殖环境, 提供海带生长发育适宜条件, 则藻体得以健康生长, 其表面附生的褐藻酸降解菌的繁殖受到控制, 病烂也就难于发生。

参 考 文 献

- [1] 曾呈奎等, 海带养殖学, 科学出版社, 1962, 99-112, 146-154.
- [2] 曾呈奎等, 海藻栽培学, 上海科学技术出版社, 1985, 82-96.
- [3] 陈 弱等, 褐藻酸降解菌研究, I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用, 海洋与湖泊, 10 (1979), 4: 329-333.
- [4] Ando, Y. and K. Inoue (安藤方明, 井上胜弘), Decomposition of alginic acid by microorganisms IV. on the vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying laminaria, *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 27 (1961), 4: 339-341.
- [5] Leben Curt, Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, V. 3. J. G. Horsfall (ed.), Froeige Agency Tokyo, 1965, 209-230.
- [6] McCully, M. E. et al., preparation of algae for light microscopy in *Handbook of Phycological*

- Methods, Developmental and Cytological Methods*, E. Gantt(ed.), Cambridge University Press, 1980, 263—283.
- [7] Ando, Y. and K. Inoue (安藤芳明, 井上胜弘), Decomposition of alginic acid by microorganisms V, on the alginase of vibrio sp. so 20 strain, *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, **27** (1961), 4 : 342—347.
- [8] Suiburth, J. McN, The influence of algal antibiosis on the marine microorganisms, *Advance in Microbiology of Sea*, M. R. Droop (ed.), Acad. Press, 1968, 63—94.
- [9] Andrews, J. H. and L. H. Goff, *Pathology in Handbook of Phycological Methods Ecological Field Methods*, M. M. Macroalgal *et al.*, (eds.), Cambridge University Press, 1985, 574—590.
- [10] 中尾义房等, リ病害の細菌学の研究, I. 細菌による緑斑病样障害の实验的发病. 日本水产学会志, **38** (1972), 6 : 561—564.
- [11] Snieszko, S. F., The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes, *J. Fish. Biol.*, **6** (1974), 197—208.
- [12] Sinderman, C. J., *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, Elsevier Scientific publishing Company, 1977.
- [13] Tatsuo Kaneko and R. R. Collwel, Ecology of vibrio parahaemolyticus in chesapeake Bay, *J. Bact.*, **113** (1973), 1 : 24—32.
- [14] Andrews, J. H., Observation on the pathology of seaweed in the Pacific northwest, *Can. J. Bot.*, **55** (1977), 1019—1227.