

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*

陈 驷 林光恒 沈世泽

(中国科学院海洋研究所)

海带人工育苗是发展我国海带养殖事业的一个重要环节^[1]。在人工培育海带幼苗过程中,时常出现烂苗或掉苗现象。多年来,这个问题在南方或北方都存在,严重时甚至可以使整个育苗工作陷入困境,给育苗和供苗工作带来严重威胁。过去,有关育苗单位力图从管理措施上严加控制。但由于对烂苗或掉苗的基本原因缺乏认识,工作难免盲目,预防效果也极不显著,至今尚未获得妥善解决办法。烂苗或掉苗现象,是一个复杂的问题。但微生物作用是不可忽视的重要因素之一。在前文中,我们曾报道褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体作用的问题^[2]。本文着重论述褐藻酸降解菌与海带烂苗或掉苗问题的相关性及其在实践中的重要性,并企图从微生物学观点提供预防措施。

一、材料与方法

1. 试验菌种

发病接种试验菌株是从海带藻体上分离出来的褐藻酸降解菌 A-2 菌株。它具有特征性的菌落外形: 菌落大而圆,乳色,表面有皱褶,能在褐藻酸钠培养基上迅速生长,菌落周围有明显的透明区和晕圈。根据伯吉细菌鉴定手册,初步鉴定为 *Pseudomonas* 属^[3]。

2. 试验用的海带幼孢子体

用玻片和棕绳同时采苗,于 5—10℃ 培养 60 天后的海带幼孢子体供作发病接种试验材料。幼孢子体长度平均在 0.1—0.3 毫米左右。

3. 接种发病试验方法

从斜面上刮取经活化的 A-2 菌株菌苔,用无菌海水稀释成悬浮菌液,分别取不同量的悬浮菌液加入到常规的培育海水中(天然海水经瓷滤器过滤后另加营养盐: $\text{NO}_3\text{-N}$ 2—4 ppm; $\text{PO}_4\text{-P}$ 0.2—0.4 ppm)配制成含菌量为 4.8×10^7 , 12×10^7 , 24×10^7 , 36×10^7 , 48×10^7 和 60×10^7 细菌数/毫升等处理组,对照组为不接菌的常规培育海水。各组海水分装在玻片缸内。附着有海带幼孢子体的各组玻片或棕绳分别放入玻片缸内进行接触发病试验,在光强 1500 米烛,室温 5—10℃ 的条件下培养,定期镜检观察各处理组幼孢子体脱落情况。

4. 幼孢子体上褐藻酸降解菌的计数

用无菌不锈钢小铲从 1 平方厘米面积的玻片上刮取附着的海带幼孢子体,加入到装有无菌海水和小玻璃珠的三角瓶中,连续振荡 15 分钟,稍停片刻待藻体下沉后,吸取上清

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 607 号。本文承曾呈奎所长、吴超元副所长审阅。
本刊编辑部收到稿件日期: 1979 年 12 月 12 日。

液作不同稀释度悬浮液,取 0.1 毫升不同稀释度悬浮液涂布于褐藻酸钠平板上,培育 5—7 天后,分别计数褐藻酸降解菌的菌落数。

二、结 果

我们采用上述人工接触发病方法,在试验室条件下观察褐藻酸降解菌 A-2 菌株对海带幼孢子体脱落过程的作用。玻片在接菌的海水中处理 3 天以后,显微观察发现,接菌处理各组玻片上海带幼孢子体的颜色普遍变淡,其中尤以接菌量多者更为突出,几乎呈浅黄绿色。而对照组玻片上的幼孢子体保持深褐色。处理一周以后,在接菌处理各组的培养海水中,肉眼可观察到脱落后飘浮或下沉的海带幼孢子体。吸取脱落的幼孢子体作显微观察时,除发现小苗颜色有不同程度变浅外,并未发现有其它异常现象。但在玻片显微检查时,发现在接种量较高的处理组中,幼苗密度已经变得稀疏,可观察到圆点状或丛状脱落的痕迹,处理二周以后各处理组玻片之间差异较大。对各组玻片观察 100 个视野并统计其平均存苗率,结果见表 1 和图 1。

从表 1 中可以很清楚地看出人工接种褐藻酸降解菌的数量与存苗率之间存在着密切

表 1 人工接种褐藻酸降解菌 A-2 菌株对海带幼孢子体在玻片上存苗率的影响¹⁾

组 别	培育海水中加入的褐藻酸降解菌量 (菌数/毫升)	处理 14 天后玻片上幼孢子体存苗率 ²⁾ (%)
1	4.8×10^7	93.6
2	12×10^7	88.1
3	24×10^7	80.7
4	36×10^7	78.9
5	48×10^7	51.4
6	60×10^7	45.0
7	0 (对照组)	100

1) 供试验的玻片材料系采苗后在 5—10℃ 培育 60 天的海带幼孢子体;

2) 观察视野数为 100。

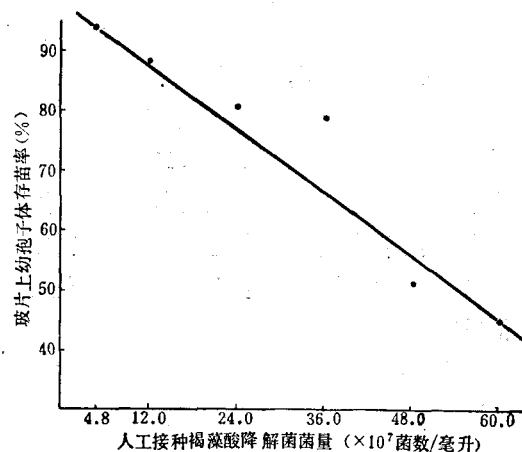


图 1 人工接种褐藻酸降解菌菌量与海带幼孢子体存苗率关系

的相关性。褐藻酸降解菌的接种量越大,存苗率就下降得越明显。如果以不接种对照组中的存苗率为 100,那么,第一组即接菌量为 4.8×10^7 的处理玻片,海带幼孢子体的存苗率为 93.6%。但是,当接菌量增加到 60×10^7 时,存苗率急剧下降到 45% (第 6 组)。图 1 的直线表示随着褐藻酸降解菌的接菌量增多,海带幼孢子体的存苗率有着近似直线的下降趋势。在同样的试验处理中,棕绳上观察到的掉苗情况更为严重;处理二周以后,棕绳上的海带幼孢子体几乎已全部脱落。显微观察还发现,玻片上海带幼孢子体最初呈点状或丛状脱落,以后逐步扩大联接成片,在掉苗处迅速出现单细胞杂藻丛生。未接菌的对照组玻片和棕绳上的海带幼孢子体生长正常。

为了进一步验证人工接种的褐藻酸降解菌 A-2 菌株与海带幼孢子体脱落之间的因果关系,从处理 9 天后的玻片上按本文“材料与方法 4”刮取一平方厘米面积藻体作褐藻酸降解菌的平板涂布分离和计数。表 2 表示人工接种 A-2 菌株 9 天以后,从海带幼孢子体上分离出的褐藻酸降解菌计数的结果。

表 2 人工接种褐藻酸降解菌 A-2 菌株后海带幼孢子体上菌落计数结果¹⁾

培 养 基	平 板 上 菌 落 平 均 数 (个)	
	未 接 菌 对 照	接 种 A-2 菌
瓦克斯曼培养基	1.3	136.7
安藤芳明培养基	1.3	158.7

1) 从玻片上刮取 1 厘米²面积的海带幼孢子体,用 100 毫升无菌海水振荡制成悬浮液,再取稀释 10 倍的悬浮液 0.1 毫升涂布在平板上,于 22℃ 培育 7—10 天后,进行菌落计数。

微生物分析结果表明,在处理的玻片中刮取每平方厘米藻体可以分离出约 150 万个褐藻酸降解菌。值得提出的是,平板分离所出现的全部菌落其培养特征与接种的 A-2 菌株完全一样,而对照组玻片藻体上只能分离出个别的褐藻酸降解菌。

上述发病试验结果证明,接种的褐藻酸降解菌可以在海带幼孢子体上定居、发展并引起掉苗。

三、讨 论

据报道从腐烂的海带藻体上分离到褐藻酸降解菌^[4],本文的第一篇试验报告证明褐藻降解菌是我国养殖区海带藻体上的一种重要定居者,并阐明了褐藻酸降解菌以其所产生的褐藻酸酶作用于藻体^[2]。我国海带人工育苗系统中所出现的烂苗或掉苗问题曾引起有关方面的注意,其原因可能是较为复杂的问题。我们的人工接种发病试验结果证明,褐藻酸降解菌在人工育苗系统中的发展是引起掉苗的重要原因之一。在试验室条件下,人工接种褐藻酸降解菌所引起的掉苗现象与海带人工育苗系统中所观察到的情况极为相似。褐藻酸降解菌作用于海带幼孢子体的不同部位,可以表现为不同的症状。如果它集中作用于海带幼孢子体的某一局部叶片上,那么叶片上将出现腐烂现象,即烂苗现象。如果它集中作用于幼苗固着器或柄部,那就很容易引起掉苗。二者所表现的形式虽然完全不同,但均可归结于褐藻酸降解菌作用的结果。

我国南北沿海海带育苗中出现的掉苗问题是较为常见的,严重者可使整个育苗工作

归于失败,但经常出现的倒是局部性的烂苗或掉苗问题,由于对它们的发生和发展规律了解甚少,措施不力,仍然给育苗工作带来严重威胁。本文的试验结果对于解释海带人工育苗中的掉苗问题具有一定的指导意义。褐藻酸降解菌不仅是海带藻体上的一种重要定居者,而且在特定条件下参与海带的腐烂过程,导致烂苗或掉苗。这样,在人工育苗中如何控制褐藻酸降解菌的发展,便成为一个值得重视的问题。

在我国南方,当种海带从养殖海区移入人工育苗系统时,难免带着相当数量的褐藻酸降解菌。如果处理方法不当,势必助长褐藻酸降解菌在人工育苗系统中的发展,造成严重后果。因此,在采苗前严格挑选种海带,及时清理病烂藻体,严格处理用水,对于防止褐藻酸降解菌的发展和确保育苗成功都是积极的措施。

考虑到褐藻酸降解菌在养殖海区内分布广泛,特别是在脱落的腐烂藻体上分布更为集中,因此,从微生物学的观点来看,目前某些育苗单位采用的各种措施,如:严格海水处理和过滤,适当控制幼孢子体的附着密度,及时清洗养殖藻体上的积污,去除脱落的藻体,增强海水循环速度等等,对于控制褐藻酸降解菌的发展,防止或减少烂苗、掉苗都有一定程度的效果,但要根本上解决掉苗或烂苗问题尚有待进一步从多方面加以研讨。

此外,考虑到在人工育苗系统的海水中,经常需要补充氮素等营养,因此,合理施肥也是值得重视的一个问题。我们的预备性试验证明,一定浓度的尿素对褐藻酸降解菌的生长有一定的限制作用,而其他铵盐(包括 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl 和 NH_4NO_3) 则无此作用。鉴于上述原因,在生产上选用尿素取代其他铵盐作补充氮素营养,看来是比较理想的。

参 考 文 献

- [1] 曾呈奎、吴超元等,1962。海带养殖学,科学出版社。
- [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] Buchan, R. E. and N. E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., The Williams and Wilkins Company/Baltimore. U.S.A.
- [4] 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. Scient. Fish.* 27 (4): 339—341.

STUDIES ON ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA

II. ROT DISEASE OF *LAMINARIA* SUMMER SPORELINGS CAUSED BY ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA*

Chen Dou, Lin Guangheng and Shen Shize

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

ABSTRACT

The young sporelings of *Laminaria japonica* are cultivated in Sporeling Culture Station at a temperature of about 8—10°C. Unfortunately, it often happens that the young sporophytes die of a destructive disease of unknown nature. In some serious cases, all the young sporophytes die or drop off within a few days.

This paper deals with the relationship between the alginic acid decomposing bacteria and the rot disease of *Laminaria* summer sporelings. The cultures of alginic acid decomposing bacteria A-2 strain were inoculated on the young sporelings at laboratory at a temperature of about 5—10°C. The sporophytes of *L. japonica* were quickly infected by these bacteria. At first, the affected portions of sporophytes, either blades or stripes, turned soft and then dropped off. After two weeks a great number of A-2 strain bacteria could be easily isolated from infected sporophytes. The inoculation experiments show that the alginic acid decomposing bacteria can induce the disease of similar symptoms as happened to the Sporeling Culture Station. These bacteria belong to the genera *Pseudomonas*. Preventive measures for this disease are discussed in the paper. The urea which has certain inhibitory action to the alginic acid decomposing bacteria is considered to be a better fertilizer than $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl and NaNO_3 for the cultivation of *Laminaria* young sporeling.

*Contribution No. 607 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.