

饵料微藻培育系统内海洋弧菌生长特点*

林 伟 陈 刘秀云

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于 1995 年 1—3 月在中国科学院海洋研究所进行饵料微藻培育系统内海洋弧菌生长特点的研究。选取来自对虾及扇贝体内 4 株弧菌,研究其在 4 种饵料微藻培育系统内的生长特点,同时进行无菌海水内弧菌菌株生长对照实验。结果表明,与对照实验(弧菌菌株生长良好)相比,处于生长指数后期至静止期的微藻培育系统能够强烈排斥弧菌。处于生长初期的微藻培育系统排斥弧菌的能力相对较弱,随着藻细胞密度的增加而增强。长期培养的微藻培养系统,球等鞭金藻 3011 和扁藻 1040 由于老化严重,排斥弧菌能力相对减弱;而三角褐指藻 2038 及小球藻 1061 由于老化程度相对较弱,仍然具有强烈排斥弧菌能力。据此认为,饵料微藻培育系统可排斥弧菌。本文结果对采用生态调控防治疾病具有重要意义。

关键词 饵料微藻培育系统 排斥弧菌 生态控制

学科分类号 Q938.8

弧菌是海水养殖业中流行疾病的重要致病菌之一,对养殖业发展造成重大威胁。作者研究发现,海洋环境中虽然有广泛的弧菌分布,但在饵料微藻大面积培育系统中却很少检测到弧菌(Cheng, 1992)。作者在前期工作“弧菌在对虾育苗系统中的变化规律”中发现,在不使用药物的情况下,对虾蚤状期投喂饵料微藻过程中,水体中弧菌数量降至最低点;至糠虾期以动物性饵料代替微藻后,弧菌数量回升(Cheng, 1992)。这表明微藻饵料可能限制弧菌生长。目前国内外尚未见到有关饵料微藻培育系统具有排斥弧菌能力的研究报道。本文报告海洋弧菌在微藻饵料培育系统中生长特点的研究结果,以期为深入研究其作用机理,并为水产养殖中的疾病防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养方法

实验用 4 种微藻藻种于 1994 年 7 月取自本所种质库,系球等鞭金藻(*Isodrysis galbana*) 3011 品系;三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) 2038 品系;扁藻(*Platymonas* sp.) 1040 品系;小球藻(*Chlorella* sp.) 1061 品系。

微藻培养液按照大规模培育常用营养配方配制,见表 1。灭菌后备用。在藻种传代及培养过程中均严格遵循无菌操作规则。培养温度为 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,光照度为 3000lx,光暗周期比为 14h: 10h。

* 农业部重点科研项目合同资助项目,渔 95-13-96-06-06 号。林伟,男,出生于 1963 年 12 月,硕士, Email: zhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 1996-06-19, 收修改稿日期: 1998-09-16

表 1 饵料微藻培养液营养配方(1L 海水内)

Tab.1 Composition of media used for feeding microalgae (in 1L seawater)

藻 种	NaNO ₃ (mg)	KH ₂ PO ₄ (mg)	FeC ₆ H ₅ O ₇ (mg)	(NH ₂) ₂ CO (mg)	Na ₂ SiO ₃ XH ₂ O (mg)	维生素 B ₁ (μg)	维生素 B ₁₂ (μg)
球等鞭金藻	60	4	0. 45	—	—	100	0. 5
三角褐指藻	60	4	0. 45	—	0. 45	—	—
扁藻	60	4	0. 45	18	—	—	—
小球藻	60	4	0. 45	18	—	—	—

1.2 弧菌菌株来源及培养方法

弧菌菌株共 4 株, 其中副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) 2 株, 溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 1 株, 鳃弧菌(*V. anguillarum*) 1 株, 见表 2。细菌培养基为弧菌选择性硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS) 培养基。

表 2 实验用 4 种弧菌菌株

Tab. 2 Four experimental *Vibrio* strains

编号	菌种	分离年份	来源	编号	菌种	分离年份	来源
10- 1	副溶血弧菌	1990	中国对虾病虾肝脏	87- 1	副溶血弧菌	1990	中国对虾病虾心脏
21- 1	溶藻弧菌	1990	中国对虾病虾肝脏	65#	鳃弧菌	1989	海湾扇贝幼体

1.3 微藻及细菌计数方法

采用血球计数器计数微藻细胞密度, 单位为 cell/ ml。采用 TCBS 平板涂布计数弧菌菌落, 单位为 cfu/ ml。

1.4 饵料微藻培育系统对弧菌生长的影响

本实验进行前, 对选用的 4 种饵料微藻培育系统内细菌组成特征进行了初步研究, 对培养 6d 的微藻取样做 2216E 平板涂布计数, 系统内异养细菌数量分别为: 球等鞭金藻 7.0×10^6 cfu/ ml 左右、三角褐指藻 3.0×10^6 cfu/ ml 左右、扁藻 1.0×10^6 cfu/ ml 左右、小球藻 3.0×10^6 cfu/ ml; 而采用 TCBS 平板涂布, 发现 4 种微藻培育系统内细菌均不能在其上生长。因此采用 TCBS 平板涂布计数法, 可以方便有效地检测实验用弧菌菌株在饵料微藻培育系统内生长状况。

1.4.1 处于生长指数后期至静止期微藻培育系统对弧菌生长的影响 经 2216E 液体培养基活化二代的 4 株弧菌菌株适度稀释后, 分别加入各为 100ml 的 4 种饵料微藻培养液内(即每株弧菌菌株只加入一种微藻培养液中, 每株弧菌菌株最终密度都大约为 3.0×10^3 cfu/ ml), 此时微藻已培养 6d, 正处于生长指数后期至静止期, 此时藻细胞密度最大, 分别为: 球等鞭金藻 4.6×10^6 cell/ ml、三角褐指藻 1.2×10^7 cell/ ml、扁藻 5×10^5 cell/ ml、小球藻 2.3×10^7 cell/ ml。按方法 1.1 培养 5d, 每隔 24h 吸取 0. 1ml 液体做 TCBS 平板涂布, 于 25℃培养 2d, 计数平板菌落数目。

1.4.2 处于生长期微藻培育系统对弧菌生长的影响 培养 8d 微藻转入新配制培养液内(按 1: 5 接种), 因稀释使藻密度分别下降至: 球等鞭金藻 0.9×10^6 cell/ ml、三角褐指藻 0.24×10^7 cell/ ml、扁藻 1×10^5 cell/ ml、小球藻 0.47×10^7 cell/ ml, 按 1.4.1 所述方法实验观

察微藻培育系统对弧菌生长影响,同时计数微藻细胞密度,观察微藻生长状况。以后加有弧菌菌株的微藻继续培养至 30d,每隔 48h 检测其培养液内弧菌菌株生存状况。同时进行不加弧菌菌株的微藻生长对照实验。

1.4.3 培养 1 个月后微藻培育系统对弧菌生长影响 培养 1 个月后的 4 种微藻相互间肉眼观察其生长状况有较大差异。球等鞭金藻经显微计数密度为 7.6×10^4 cell/ml,与其最大密度相比下降了 98%,扁藻密度为 5×10^4 cell/ml,与其最大密度相比下降了 90%。此时肉眼观察可发现球等鞭金藻及扁藻细胞下沉严重并粘附在培养瓶底部,即使摇动也不能浮起,而培养液几近澄清。已培养一月的三角褐指藻及小球藻都基本保持其最大密度,即使略有下沉,经摇动也能浮起。按 1.4.1 所述方法加入弧菌菌株,观察各微藻培育系统对弧菌菌株生长影响。

实验过程中,同时用 121℃ 灭菌海水(0.2μm 滤膜预先过滤)分别培养 4 株弧菌菌株供作对照,以上实验步骤均严格遵循无菌操作规则。实验采用一次性培养法进行。

2 结果

2.1 处于生长指数后期至静止期微藻培育系统对弧菌生长的影响

实验结果见图 1。由图 1a、b、c 可知,菌株 10-1、87-1、21-1 在 4 种微藻培养液中数量均在 24h 内降至 10cfu/ml 以下;而菌株 65# 略有不同,其在加入球等鞭金藻后 24h 尚有 3.0×10^2 cfu/ml,迟至 48h 数量才降至 10cfu/ml 以下,在另外 3 种藻中生长状况与其它 3 株弧菌菌株相似(图 1d)。4 株弧菌菌株密度降至 10 cfu/ml 以下后,经跟踪检测始终未能回升。在对照实验中,4 株弧菌菌株在海水中生长良好,培养 24h 密度均可高达 2.51×10^5 cfu/ml 以上,在第 5 天仍可维持较高水平。

2.2 处于生长期微藻培育系统对弧菌生长的影响

随培养时间延续,藻细胞密度增多,4 株弧菌菌株在 4 种微藻培养液中密度均呈下降趋势。4 株弧菌菌株在处于生长期 4 种微藻培养液内由 3.0×10^3 cfu/ml 降至可检测水平以下(< 10cfu/ml)所需时间见表 3。

表 3 4 株弧菌菌株在处于生长期 4 种微藻培养液内由 3.0×10^3 cfu/ml 降至可检测水平以下(< 10cfu/ml)所需时间(d)

Tab. 3 The time (d) that the densities of four *Vibrio* strains in four growing microalgal cultures decreased from 3.0×10^3 cfu/ml to undetectable level (< 10cfu/ml)

菌株	球等鞭金藻	三角褐指藻	扁藻	小球藻
10- 1	2	1	3	3
87- 1	3	2	2	2
21- 1	3	2	2	2
65#	4	2	5	5

加有弧菌的 4 种微藻与未加弧菌的 4 种微藻生长速度一致,藻细胞密度均在第 4—5 天达到高峰。弧菌生长对照实验中,4 株弧菌菌株在海水中生长良好。加有弧菌微藻继续培养至 30d,其间未发现弧菌存在迹象(即< 10cfu/ml)。

2.3 培养一月后微藻培育系统对弧菌生长的影响

在球等鞭金藻培养液中,菌株 10-1 加入后 2d 内逐步降至 10cfu/ml 以下;而菌株 65

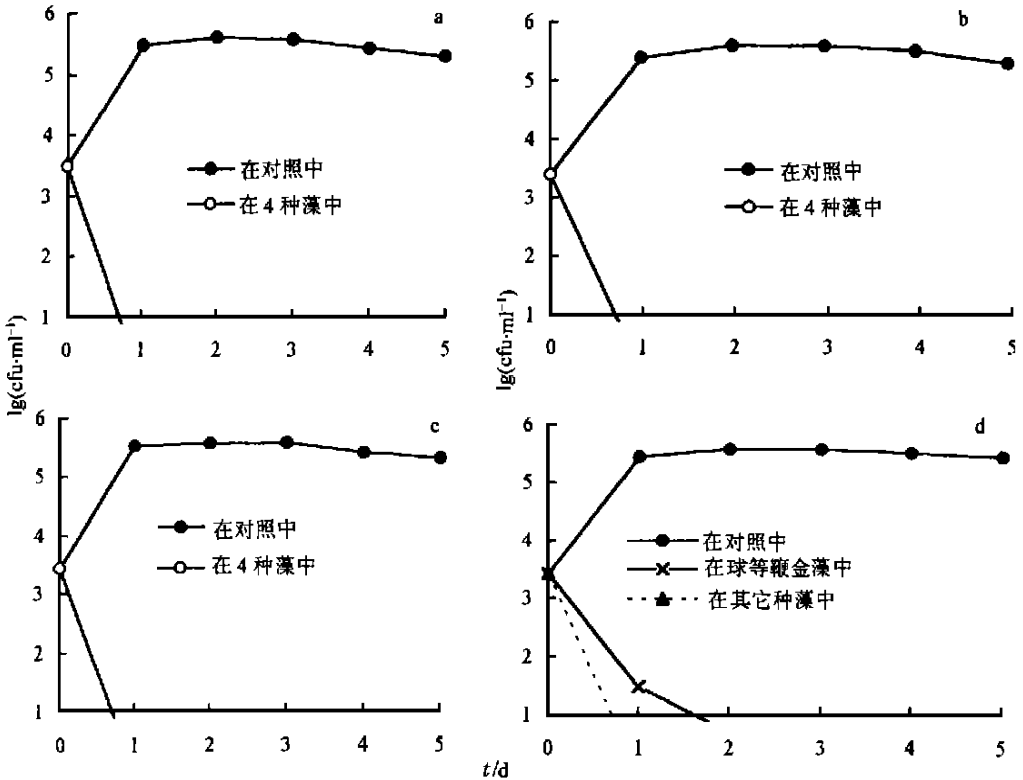


图1 弧菌菌株 10-1(a)、21-1(b)、87-1(c)和 65# (d) 在 4 种微藻培养液 (指数后期至静止期) 及海水对照中的生长结果

Fig.1 Growth feature of the *Vibrio* strains 10-1(a), 21-1(b), 87-1(c) and 65# (d) in four microalgal cultures (late exponential and static phase) and seawater (control)

及菌株 87-1 加入后 2-3d 维持原水平不变, 至第 5d 降至 10cfu/ml 以下; 菌株 21-1 加入后, 至第 5 天仍可维持 10cfu/ml 。球等鞭金藻培养 1 个月后, 下沉严重, 细胞凝聚成片, 密度仅为 $7.6 \times 10^4\text{ cells/ml}$ 以下(而其最大密度可达 $4 \times 10^6\text{ cells/ml}$ 以上)。

弧菌在三角褐指藻及小球藻培养液中的生长状况类似, 菌株 10-1、87-1 和 21-1 均在加入 24h 内降至 10cfu/ml 以下; 菌株 65# 则在加入 48h 内逐步降至 10cfu/ml 以下。此二种藻从外观看与其在生长指数后期至静止期相仿, 藻细胞虽然略有下沉, 但经摇动仍能上浮。培养 1 个月后, 扁藻的藻细胞下沉严重, 凝聚成片, 悬浮藻细胞密度仅为 $5 \times 10^4\text{ cell/ml}$, 菌株 10-1 加入 3d 内降至 10cfu/ml 以下, 而其它 3 株弧菌数量均能稳定维持一段时期, 其中菌株 65# 在加入后 48h 内还略有生长, 加入至第 5 天的数量为 $1.78 \times 10^3\text{ cfu/ml}$, 菌株 87-1 和 21-1 在第 5 天的密度为 $7.6 \times 10^2\text{ cfu/ml}$ 左右。4 株弧菌菌株密度在 4 种微藻培养液内均比加入时的密度($3.0 \times 10^3\text{ cfu/ml}$)低, 而对照实验中的 4 株弧菌菌株生长良好。

3 讨论与结语

本文研究了不同培养时期饵料微藻培育系统对弧菌生长的影响。实验结果表明, 与

无菌海水弧菌生长对照实验相比, 弧菌在 4 种微藻培育系统内生长均很弱, 实验采用微藻培育系统能够排斥弧菌。但是不同藻, 处于不同生长时期, 对不同弧菌排斥效果有一定差异。在藻培养处于生长指数后期至静止期, 藻细胞密度达到高峰时, 排斥弧菌能力最强; 处于培养初期时, 排斥能力相对较弱。随着藻的生长, 藻细胞密度增加, 弧菌生长逐渐受到限制。在培养后期, 当某些藻细胞活动力下降、下沉严重以至凝集成片时, 排斥弧菌能力相对减弱(如球等鞭金藻和扁藻), 但与对照相比, 限制弧菌生长能力仍然较强。三角褐指藻和小球藻能够维持较长时间, 虽然藻细胞也有下沉现象, 但经摇动还能上浮, 培养液中有大量悬浮藻细胞, 仍有很强的排斥弧菌能力。

实验用的 4 种微藻中, 三角褐指藻及小球藻的密度相对较高, 排斥弧菌能力较强。上述现象表明排斥弧菌能力大小似乎同藻细胞密度高低有一定关系。4 株弧菌菌株中, 65# 在微藻中生长能力最强, 87-1 及 21-1 次之, 10-1 最弱, 表明 65# 能够更好地利用饵料微藻培育系统中的某些物质, 抗排斥能力较强。

选取具有代表性的海水养殖中常用的 4 种饵料微藻培养系统, 经实验证明均能有效限制 4 株(分属三个种)弧菌菌株的生长, 表明饵料微藻培育系统排斥弧菌可能具有普遍规律。

众所周知, 目前所用饵料微藻培育系统是藻-菌混和体, 由于藻、菌营养需求及能产生互相促进或抑制生长物质(Jones, 1982; Ammerman *et al.*, 1985; Ohta *et al.*, 1993; Fraleigh *et al.*, 1988; Imai *et al.*, 1993; 张成武, 1992), 因此, 经双向选择, 就可以产生以微藻为基础的特定的细菌群落。饵料微藻培育系统内即存在此与藻相关细菌群落, 因此饵料微藻培育系统内藻、菌都有可能具有排斥弧菌能力, 例如藻、菌可能产生一些能拮抗弧菌的代谢产物。排斥弧菌能力也可能需要藻、菌协调作用, 缺一不可, 如微藻培育系统内与藻共存细菌群落可能具有排斥弧菌能力, 但此特定细菌群落构成必需由微藻介导。饵料微藻培育系统排斥弧菌的机制的研究工作正在继续进行。

弧菌广泛存在于海洋环境中, 是水产养殖中的重要致病菌。目前各养殖场主要采用药物控制防治对虾弧菌病, 但防病效果并不理想。因此, 改善现有养殖管理技术, 强调研究新型防治技术, 特别是应用生态或生物控制防治弧菌病, 是很有必要的。作者通过实验发现, 以微藻为基础的微小生物群落对绝大多数海水养殖生物体内外常见的弧菌菌群具有普遍排斥作用, 因此, 可以进一步研究以微藻为基础的微小生物群落结构功能的特点, 并以此为根据, 发展生态调控防病技术, 取代单纯依赖药物的防病技术。

参 考 文 献

- 张成武, 1992. 微藻中的生物活性物质. 中国海洋药物, 3: 20—29
- Ammerman J W, Azam F, 1985. Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science*, 227: 1338—1440
- Cheng Dou, 1992. An Overview of the Disease Situation, Diagnostic Techniques, Treatments and Preventives Used on Shrimp Farms in China. In: Fulks W ed. *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Honolulu: The Oceanic Institute, 47—55
- Fraleigh P C, Bumham J C, 1988. Myxococcal predation on cyanobacterial population: nutrient effect. *Limnol Oceanogr*, 33 (3): 476—483
- Imai I, Ishida Y, Hata Y, 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the

coastal sea of Japan. Mar Biol, 116: 527—532

Jones A K, 1982. The Interaction of Algae and Bacteria. In: Bull A T ed. Microbial Interactions and Communities. London: Academic Press, Vol. 1: 189—227

Ohta S, Chang T, Ikegami N *et al*, 1993. Antibiotic substance produced by a newly isolated marine microalga, *Chlorococum* HS 101. Bull Environ Contem Toxicol, 50: 171—178

GROWTH FEATURE OF VIBRIOS IN MICROALGAE CULTURAL SYSTEMS

LIN Wei, CHEN Dou, LIU Xiu-yun

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

Abstract There are more and more diseases related to the marine aquacultured animals. Curative effects of the chemicals (include disinfectants, antibiotics and other substances) are unsatisfactory because these drugs can pollute environment and induce drug resistant bacteria. It is necessary to develop ecological controlling techniques to prevent the diseases to ensure the sustainable development of the marine aquaculture. Investigations were conducted into the effect of 4 marine unicellular algae cultural systems (mixtures of the algae and algae concomitant bacteria), *Isochrysis galbana* 3011 strain, *Phaeodactylum tricornutum* 2038 strain, *Platymonas* sp. 1040 strain and *Chlorella* sp. 1061 strain cultural systems on growth of 4 marine *Vibrio* spp, *V. alginolyticus* 21-1, *V. anguillarum* 65#, *V. parahaemolyticus* 10-1 and 87-1. Batch culture method was adopted. Control test of vibrios growth in sterilized seawater (0.2 μ m membrane filtered and autoclaved) was carried out simultaneously. Compared with control test (the vibrios grew well, all above 2.5×10^5 cfu/ml), cultural systems of these microalgae which are between the late exponential phase and the static phase of growth can effectively expel the vibrios. Densities of the vibrios decreased to 10 cfu/ml or lower from initially high (3.0×10^3 cfu/ml, respectively) within 24 hours (the 65# decreased to 10 cfu/ml within 48 hours in algae 3011 culture). Expelling efficiency of the cultural systems in the beginning phase of the growth weakens (because algal and algae concomitant bacterial densities decreased after the algae were transferred to new media), but it increased with algal growing (densities of the algal cell rise). The systems with long culture time (about one month) had less efficiency of restriction on growth of the vibrios when the algae (3011 and 1040, for example) aged obviously (cell sunk to bottom of the glass flasks and suspended algal cell densities decreased vehemently, algae 3011 cell density decreased from 4×10^6 cell/ml to 7.6×10^4 cells/ml, for example), but some cultural systems of algae (2038 and 1061) had high expelling efficiency because they had relatively high suspended algal cell densities. It seems that there is certain relationship between the suspended algal densities and expelling efficiency to vibrios. We suggest that the universal law that growth of vibrios are restricted by cultural system of microalgae may exist. Our results can provide theoretical foundation to prevent disease with ecological controlling technique.

Key words Microalgae cultural systems Expel vibrios Ecological control

Subject classification number Q938.8