

## 大连地区裙带菜绿烂病病原的研究\*

马悦欣 张泽宇 刘长发 范春江 曹善茂  
(大连水产学院, 116023)

**摘要** 使用涂布平板法测定发病期裙带菜栽培水域中的异养细菌数量、病藻带菌量。显微镜压片观察患病藻体细胞中有细菌寄生, 从病藻上分离到优势菌株4株, 人工感染试验证明为绿烂病的病原菌, 经系统分类鉴定定名为火神弧菌(*Vibrio logei*)。新霉素、庆大霉素等对该菌具有明显的抑制作用。

**关键词** 裙带菜, 绿烂病, 病原菌, 火神弧菌

裙带菜是一种经济价值较高的大型褐藻, 是大连地区大规模栽培的主要藻类之一。近几年来大连地区筏式栽培的裙带菜连续发生较重的病害, 其症状是靠近藻体的梢部叶与中肋变绿、变软、腐烂, 然后向内蔓延, 严重时大半叶片烂光, 造成巨大的经济损失。Kang<sup>[6]</sup>报道了朝鲜东南海岸海藻养殖场裙带菜绿斑病, 且从病藻中分离到 *Vibrio* 细菌, 指出了微生物成为病因的可能性。Ishikawa 和 Saga<sup>[5]</sup>报道了日本裙带菜栽培过程中出现严重的绿烂病。木村<sup>[3]</sup>认为裙带菜斑点烂病是由 *Vibrio* sp. 等革兰氏阴性细菌感染引起的。Audo 和 Inoue<sup>[4]</sup>从腐烂的海带藻体上分离到 *Vibrio* sp., 同时成功地实验了穿孔发病。中尾<sup>[2]</sup>证实, *Vibrio* 细菌能分解紫菜叶体细胞间隙物质而引起绿斑病。自1993年至1995年作者从黑石礁海区裙带菜绿烂病藻体上分离到病原细菌火神弧菌, 并对其致病性和生物学性状进行了研究。裙带菜绿烂病的研究为国内首次报道。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 裙带菜栽培水域中异养细菌计数

1993年12月至1994年2月定期在黑石礁海区裙带菜栽培水域的三个不同站位采集5米深水样, 迅速带回实验室, 稀释后涂布2216E平板, 15℃培养5~7天后计数。

#### 1.2 正常藻和病藻异养细菌计数

自黑石礁海区栽培筏上采集正常和患病裙带菜, 及时带回实验室, 分别称重10g, 用无菌海水冲洗或不冲洗放入无菌研钵中磨碎, 加入90ml无菌海水, 经系列稀释后涂布于2216E

收稿日期: 1996-12-18。

\* 大连市青年基金资助项目。

或 2216E 培养基中添加少量裙带菜浸出液平板, 15℃ 培养 7~10 天后计数。

### 1.3 病原菌的分离纯化

自养殖场取回病藻洗净, 再用无菌海水冲洗数次, 除去表面粘附的细菌, 剪取病烂部分于无菌研钵中加少许无菌海水磨碎, 取汁涂 2216E+ 裙带菜浸出液平板, 15℃ 下培养 5 天后, 挑单菌落划线纯化, 至确认为纯菌后移入 2216E 斜面保存。

### 1.4 人工感染试验

取健康裙带菜茎以上含中肋和裂叶约 8~10cm 长的一段藻体, 用过滤海水洗净, 培养于盛有营养海水的大烧杯(2 000ml, 加盖)和脸盆(10L)中, 实验菌株于 2216E 斜面培养 48 小时后进行感染试验, 观察出现的症状, 每隔 4 天换 1/2 的水。

**1.4.1 浸浴感染** 将斜面菌株用 2% NaCl 无菌水或无菌海水制成菌悬液, 加入烧杯及脸盆中, 使海水中菌的浓度为  $10^6$  cell/ml 左右, 对照组不加菌液。试验条件为室温 10~11℃, 自然光强; 低温箱 7~8℃, 光源为日光灯, 光强 2 500lx, 光照时间 12 小时/天。

**1.4.2 刺伤感染** 以接种针取斜面菌苔少许对藻体进行刺伤, 对照组不做处理, 在烧杯中进行试验, 条件为室温 8~12℃, 自然光强; 低温箱 7~8℃, 光源为日光灯, 光强 2 500lx, 光照时间 12 小时/天。

**1.4.3 注射感染** 用无菌注射器将菌悬液 ( $10^7 \sim 10^8$  cell/ml) 注入藻体内部, 注射量为 0.02ml, 对照组不做处理, 在脸盆中进行试验, 条件为室温 8~12℃, 自然光强。

### 1.5 病原菌的分类鉴定

按照文献<sup>[1]</sup>进行, 根据 Krieg 和 Holt<sup>[7]</sup>将菌株分类鉴定至种。除 NaCl (%) 胨水和 TCBS 培养基生长实验外, 培养基中加 3% NaCl 或以陈海水配制, 接种后于 18℃ 培养观察。

### 1.6 药敏试验

以纸片法在 2216E+ 裙带菜浸出液平板上进行(药敏纸片购自上海医学化验所), 经 15℃ 培养 48 小时观察抑菌圈有无与大小。

## 2 结果

### 2.1 裙带菜栽培水域中异养细菌数量

结果见表 1。从表 1 中可见发病越重, 其水中细菌数量越多。

表 1 裙带菜栽培水域中异养细菌数量

Table 1 The numbers of heterotrophic bacteria in the water of *Undaria Pinnatifida* farming

采样日期 Sampling date	水温(℃) Temperature	异养细菌数量(cFu/ml) Number of heterotrophic bacteria	备注 Note
1993 年 12 月 16 日 Dec. 16, 1993	5.8	$1.5 \times 10^3$	未发病 No disease
1994 年 1 月 10 日 Jan. 10, 1994	3.4	$4.0 \times 10^4$	发病 Disease
1994 年 2 月 24 日 Feb. 24, 1994	2.0	$1.0 \times 10^6$	发病较重 Disease severely

### 2.2 正常藻和病藻异养细菌数量

正常藻和病藻异养细菌数量测定结果为: 外观正常的裙带菜带菌量为  $3.0 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^5$  CFU/g, 多为  $10^4$  CFU/g; 有病变的裙带菜带菌量为  $7.4 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^9$  CFU/g; 多为

$10^7$ CFU/g, 比正常藻高约三个数量级。

### 2.3 人工感染试验

用 2216E + 裙带菜浸出液平板对患绿烂病藻体进行细菌分离, 优势菌明显, 选 4 株菌自 1993 年 3 月至 1994 年 3 月先后进行了三次人工感染试验, 每一次每一菌株重复 2~4 组, 结果表明 93088, 93100, 93112, 94221 4 株菌均能使健康藻发病。据实验观察, 健康藻体接种细菌 1~2 天后, 多数都没有明显的症状, 一般从第 3 天开始出现叶边或有切口的地方变绿腐烂, 如果是刺伤或注射感染的藻体, 其接种部位开始病变, 随着时间的推移, 裂叶由边缘向内或由接种部位向外逐渐变绿腐烂, 10 天左右藻体大面积腐烂, 严重者解体, 与自然病藻症状一致, 对照组裙带菜肉眼观察没有变化。当藻体病烂, 从病藻中分离出细菌, 并做初步鉴定, 其优势菌株与接种菌株一致, 证明这 4 株菌是裙带菜绿烂病的病原菌。

### 2.4 病原菌的分类鉴定

菌株 93088, 93100, 93112 为 1993 年分离, 其形态学特征基本一致, 94221 为 1994 年分离, 选代表菌 93112, 94221 进行鉴定, 得知病原菌为革兰氏阴性菌, 杆状或近球状, 丛极毛, 在不含氯化钠的蛋白胨水中不生长, 对弧菌抑制剂 0/129 敏感,  $4^{\circ}\text{C}$  生长,  $30^{\circ}\text{C}$  不生长, 还原硝酸盐, 氧化酶及过氧化氢酶阳性, 明胶酶阴性, 淀粉酶阴性, 精氨酸双解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阴性, 发酵葡萄糖、蔗糖、甘露醇产酸, 利用半乳糖、纤维二糖、葡萄糖酸钠、葡萄糖、果糖、甘露醇, 不利用海藻糖、丙酸、肌醇、乙醇。对照 Krieg 和 Holt<sup>[7]</sup> 的结论将 93112, 94221 菌定名为火神弧菌 (*Vibrio logei*)。

### 2.5 药物敏感试验

利用纸片法对 2 株裙带菜绿烂病病原菌进行了药物敏感性试验, 在所试 18 种药物中, 羧苄青霉素、青霉素、万古霉素、先锋霉素、磺胺药 + TMP、氧哌嗪青霉素、磺胺、头孢唑啉、苯唑青霉素、氨苄青霉素对病原菌无抑制作用, 卡那霉素具中等抑制作用, 新霉素、庆大霉素、氯霉素、红霉素、丁氨卡那、妥布霉素、链霉素具明显的抑制作用。

## 3 讨论

显微镜压片观察健康裙带菜细胞中没有细菌存在, 而患绿烂病的藻体中可见细菌。外观正常的裙带菜经过无菌海水冲洗后带菌量很少 ( $3.0 \times 10^2$ CFU/g), 未冲洗的藻一般为  $10^4$ CFU/g, 与 Kang<sup>[6]</sup> 的结果一致, 主要是藻体表面粘附的菌, 1994 年 2 月份重发病期正常藻带菌量达  $2.2 \times 10^5$ CFU/g, 与此水中细菌数量较多相吻合。同样在 1994 年 2 月份, 外观有病变的裙带菜, 包括藻体内部和表面粘附的异养菌数量达  $3.0 \times 10^9$ CFU/g, 比 Kang<sup>[6]</sup> 报道的  $6.8 \times 10^5$ CFU/g 高 2~3 个数量级。因此, 藻体带菌量越多, 发病程度越重。

感染试验表明火神弧菌是裙带菜绿烂病的病原菌, 组织病理研究结果也表明两者组织病理变化相同(另文报道)。生长温度试验结果表明该菌在  $4 \sim 20^{\circ}\text{C}$  时生长良好,  $30^{\circ}\text{C}$  以上不生长, 培养 7 天后测 O.D 值(文中未列出)表明随温度的不断上升, 细菌的生长状况呈下降趋势,  $20^{\circ}\text{C}$  以上急剧下降, 因此该菌属嗜冷性细菌。与海区裙带菜大面积发病时水温 ( $2 \sim 3^{\circ}\text{C}$ ) 相吻合; 感染试验也表明低温 ( $7 \sim 8^{\circ}\text{C}$ ) 比高温 ( $8 \sim 12^{\circ}\text{C}$ ) 时感染裙带菜发病重, 可见 1~2 月份的水温有利于该菌的繁殖, 在 NaCl (%) 胨水中生长试验结果表明此菌在 NaCl 含量为 30‰ 时生长最好, 与海区的盐度 32 相一致。裙带菜本身又为菌的生长提供丰富的营养物质, 当藻体生长到一定阶段通常是栽培后期, 由于自身代谢能力降低, 抵抗力减弱, 易被感染

发病,自然海区的裙带菜是由靠近梢部衰老的细胞开始发病也证明了这一点。

从分类学角度, *V. logei* 区别于弧菌属中其它种类的主要特征:2~8 根丛极毛;4℃ 生长,利用 D-葡萄糖酸,30℃ 不生长,明胶酶阴性,不利用 DL-乳酸和丙酮酸<sup>[7]</sup>。

药敏试验结果显示有 7 种抗菌药物对火神弧菌具明显的抑制作用,如果在海上大面积使用药物会出现成本过高及造成海区污染等问题,长远考虑应通过育种方法筛选抗病力强的品种,同时在栽培过程中加强管理,合理设筏,控制栽培密度、水层等。

本院毕业生苑立、张凯参加部分工作。菌种鉴定得到中国科学院北京微生物研究所周慧玲研究员的指导,青岛海洋大学徐怀恕教授对本文提出修改意见,特此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 中国科学院微生物所细菌分类组编著,1978。一般细菌常用鉴定方法,518 - 538。科学出版社(京)。
- [ 2 ] 中尾义房等,1972。ノリ病害の細菌学の細菌による绿斑样障の实验的发病。日本水产学会志,38(6):561 - 564。
- [ 3 ] 本村喬久等,1976。气仙沼湾におるワカメあなき症ならびにワカメ养殖环境の微生物学検討。东北水研报告,(36):57 - 65。
- [ 4 ] Audo, Y., K. Inoue, 1961. Decomposition of alginic acid by micro-organisms IV. On the vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 27(4): 339 - 341.
- [ 5 ] Ishikawa, Y., N. saga, 1989. The disease of economically valuable seaweeds and their pathology in Japan. Programme of the first international marine biotechnology conference IMBC'89, 30.
- [ 6 ] Kang, J. W., 1982. Some seaweed diseases occurring at seaweed farms along the southeastern coast of Korea. Bull. Korean Fish. Soc., 14(3): 165 - 170.
- [ 7 ] Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore.

## STUDY ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF GREEN DECAY DISEASE OF *UNDARIA PINNATIFIDA* IN DALIAN

Ma Yuexin Zhang Zeyu Liu Changfa Fan Chunjiang Cao Shanmao  
(Dalian Fisheries College, 116023)

**ABSTRACT** By using PC method, the numbers of heterotrophic bacteria of diseased period in the water column of *U. pinnatifida* farming and diseased seaweed were determined. The bacteria were observed in diseased kelp cell with microscope. Four strains bacteria isolated from diseased seaweed were shown to be the cause of the disease by challenge experiment. They were identified to be *Vibrio logei*. The inhibition of neomycin and gentamycin etc. to *V. logei* was obvious.

**KEY WORDS** *Undaria pinnatifida*, Green decay disease, Pathogen, *Vibrio logei*