

1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌

闫咏¹, 马家海¹, 许璞², 孙其焕¹, 王汉清²

(1. 上海水产大学 渔业学院, 上海 200090;
2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

摘要:从栽培海区采回的发病条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)上共分离筛选出51株菌株,全部进行人工感染,其中17[#]菌株发病症状最典型,而感染对照组没有可见变化。初步确定,17[#]菌株是条斑紫菜绿斑病的主要致病菌。17[#]菌株为短杆状、极生单鞭毛可运动的革兰氏阴性菌,产生紫褐色色素,可水解明胶、酪蛋白、淀粉等大分子物质。葡萄糖氧化发酵试验(O/F)为氧化性、氧化酶阳性、ONPG反应阳性、V-P反应阴性,生长需Na⁺等生化特性,G+C含量40.5 mol%,脂肪酸主要成分为C17:1 ω 8c和C16:1 ω 7c。基于16S rRNA的系统进化分析均表明,从患绿斑病的条斑紫菜叶状体上分离到的致病菌株17[#]与柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)为同种的不同菌株。

关键词:条斑紫菜;绿斑病;柠檬假交替单胞菌
中图分类号:S946.21 **文献标识码:**A

文章编号:1005-8737(2002)04-0353-06

随着条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)栽培规模的不断扩大,其病害问题表现得越来越突出。多年来的大量研究表明,紫菜的病烂由多方面原因引起的,致病原因也非常复杂,其中微生物因素是不可忽视的重要原因之一^[1]。齐藤雄之助^[1]在1968年首次报道并命名了紫菜绿斑病,其后中尾义房^[2]、须藤俊造^[3]等研究了条斑紫菜绿斑病,并从患病紫菜叶状体中分离出微球菌(*Micrococcus* sp.)或假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)以及弧菌属(*Vibrio*)的细菌。陈弼等^[4]也指出紫菜绿烂病因多数是属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。本研究通过实验分离、确证条斑紫菜绿斑病的主要致病菌是柠檬假交替单胞菌(根据Gauthier等^[5]对假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)属的描述,该属是1995年建立起来的有别于假单胞菌属(*Pseudomonas*)和交替单胞菌属(*Alteromonas*)的新属,日本已有报道*Pseudoalteromonas bacteriolitic*引起栽培海带孢子体红点

病^[6],*Pseudoalteromonas elyakovii*引起养殖海带孢子体孔烂症^[7]。本文对条斑紫菜绿斑病病原菌柠檬假交替单胞菌的研究和确证,旨在为条斑紫菜病害的防治提供理论依据,也对海藻病害的研究方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病藻与健康藻 患病条斑紫菜采自江苏南部一海区。供感染的健康条斑紫菜采自江苏沿海未发病海区。

1.1.2 培养基 分离培养基使用ZoBell2216E培养基^[8]。紫菜牛肉膏蛋白胨培养基:新鲜紫菜叶状体样品按5%重量加入到过滤海水中,煮沸15 min,经过滤取紫菜浸出汁,制成紫菜汤。量取紫菜汤1 000 mL,加入牛肉膏3.0 g、酵母膏1.0 g、蛋白胨10.0 g、琼脂18.0 g,调节pH 7.0-7.2。琼脂为唯一碳源的合成培养基^[8]。紫菜汤培养基:紫菜汤1 000 mL,NaCl 15.0 g、琼脂粉18.0 g,调节pH 7.0-7.2。

1.2 病原菌分离

在三角烧瓶中分装100 mL海水和小玻璃珠若干,灭菌后待用。从发病海区采回的病藻中选取症

收稿日期:2001-10-16.

基金项目:农业部、财政部首批农业科技跨越计划项目(1999-20).

作者简介:闫咏(1976-),女,硕士研究生,从事海藻病害研究.

E-mail:yyongsh@sohu.com

通讯作者:马家海.

状典型的叶状体称取 10.0 g, 先用消毒的毛笔轻轻刷洗, 除去附着在藻体表面的杂物, 再经无菌海水漂洗数次后, 放入上述三角烧瓶中。涡漩震荡 15 min, 静置片刻, 用无菌移液管吸取上层悬浮液, 稀释成不同浓度的菌悬液。从不同浓度的菌悬液中分别吸取 0.1 mL 涂布于 2 种分离培养基平板上, 培养纯化后转接到紫菜牛肉膏蛋白胨培养基斜面备用, 将所获得菌株进行编号。

1.3 人工感染试验

严格挑选色泽正常, 生长健壮的紫菜叶状体, 用毛笔刷洗干净, 在 1% 柠檬酸海水溶液中润洗片刻, 再清除叶状体表面的柠檬酸液。在培养皿中加入 30 mL PES^[9] 无菌海水, 放入清洗过的健康藻体, 吸取一定体积的菌液加到上述培养皿中, 测定海水中的菌体含量为 3.3×10^7 /mL, 在 15 ℃, 光照周期 L:D=14:10 条件下培养。

1.4 形态观察

将纯化的菌株分别接种于紫菜汤牛肉膏蛋白胨培养基的试管中和平板上, 培养 24 h, 观察其生长情况及菌落特征, 测量大小, 革兰氏染色、芽孢染色等均按常规方法进行^[10]。电镜标本的制备参照文献^[11]的方法。

1.5 生理生化试验

生理生化试验按照文献^[8, 10, 12-14]进行。

1.6 脂肪酸成分分析

使用美国 MIDI 公司 Sherlock 全自动细菌鉴定系统进行菌体脂肪酸成分分析, 分析方法参照文献^[15]的方法。

1.7 DNA 中 G+C mol% 的测定

按照热变性温度法(熔链温度法)^[8]测定 G+C mol%。回收对数生长期的细菌, 提取总 DNA^[16], 溶于 $0.1 \times$ SSC 标准溶液中, 通过 DU-7 Beckman 紫外分光光度计检测 DNA 的热变性温度(T_m), 根据公式 $(G+C)\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ 计算其 G+C mol%。

1.8 16S rRNA 扩增和测序

提取总 DNA 后, PCR 扩增 16S rRNA, 使用的引物如下, Primer 1: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Primer 2: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。扩增条件: 96 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 30 个循环。

PCR 产物连接到 pGEM-T Vector(Promega)上, 转化大肠杆菌, 进行测序。

1.9 系统发育树

根据感染试验结果, 将 17[#] 菌株的 16S rRNA 序列与 Genebank 数据库 16S rRNA 序列进行比较, 获取与其相近的 16S rRNA 序列。采用 CLUSTALW (1.74) 软件包对 17[#] 菌株及其相关序列进行多序列匹配排列。系统进化距离用 Kimura two-parameter calculation 模型计算, 序列中的插入和缺失不作计算。系统进化树的构建通过 TREECON(1.2) 中的 Kimura two-parameter calculation 模型和 neighbor-joining 模型进行。

2 结果

2.1 病原菌分离与感染试验

实验获得 51 株细菌, 其中杆菌 94% (革兰氏阴性杆菌 82%, 革兰氏阳性杆菌 12%), 球菌 6%。所有被测试的革兰氏阳性杆菌及球菌对紫菜叶状体都不表现出任何致病能力, 被接菌的紫菜叶状体与未接菌的对照组一样仍然保持色泽正常, 无任何异常症状出现。而在被测试的革兰氏阴性杆菌菌株中, 则有 21.43% 的菌株对紫菜叶状体具有不同程度的致病能力, 其中以 17[#] 菌株发病症状尤为明显, 症状与自然海区病菜症状一致。感染 24 h 后藻体颜色变淡, 在叶状体上部出现直径 1 mm 左右的红色小点, 隆起变脆, 而后发展成绿色小圆斑, 绿色斑点逐步发展, 很快相连成片, 最后藻体组织腐烂分解。对照组叶状体生长正常, 无可见病变。

2.2 细菌形态及营养特征

2.2.1 细菌形态特征 17[#] 菌株短杆状, 两端钝圆, 菌体宽 0.5~0.7 μm, 长 1.5~2.0 μm, 极生单鞭毛(图 1), 运动活跃, 革兰氏阴性, 无芽孢。在紫菜汤牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 18 ℃ 培养 24 h, 菌落大小 1.5~2.0 mm, 圆形、隆起、边缘整齐、光滑、湿润、不透明, 分泌紫褐色水溶性非荧光色素, 略有异味, 菌落周围培养基凹陷。

2.2.2 细菌营养特征 17[#] 菌株在以琼脂为唯一碳源的合成培养基上生长较缓慢, 产生水溶性紫褐色色素, 菌落较小, 菌落周围呈明显的透明圈(图 2); 在紫菜汤琼脂平板上生长良好, 产生玫瑰红色水溶性色素。

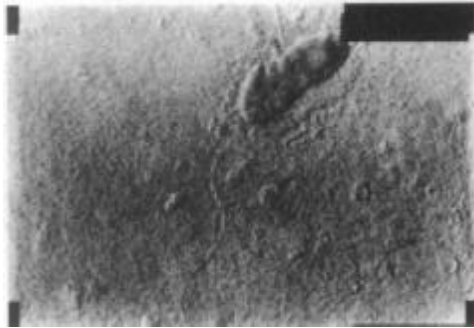


图1 17#菌株的电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of 17#

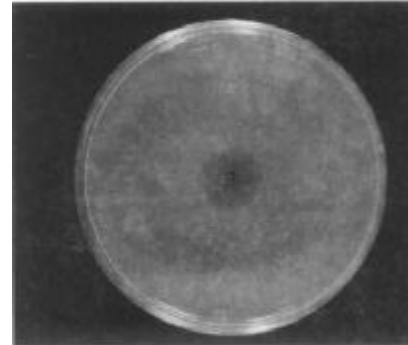


图2 17#菌株在琼脂板上水解琼脂的透明圈

Fig.2 Growth result of 17# on agar media

17#菌株在这2种培养基上生长情况说明,该菌株能利用不被绝大多数细菌(尤其是陆生性及淡水水生性细菌)作为碳源利用的琼脂,可见具有水解琼脂多糖的酶,这种酶是一种诱导酶,它产生较缓慢,因此细菌在以琼脂为唯一碳源的合成培养基上生长较缓慢,使琼脂产生凹陷,出现透明圈。细菌水解琼脂的性能与它破坏藻体结构中酸性多糖有相似的作用,致使藻体出现绿烂症状^[4];紫菜中所含的营养物质完全可以满足17#菌株的营养需求而生长良好,这是它成为藻体叶状体致病菌的基本条件。

2.3 生理生化特征

17#菌株生长温度4~35℃,最适温度12~18℃,最适NaCl质量分数2.0%~3.0%;葡萄糖氧化发酵试验(O/F)为氧化性,氧化酶阳性,接触酶阳性,ONPG反应阳性,水解明胶、酪蛋白、淀粉,H₂S生成试验为阳性。G+C含量是40.5 mol%。17#菌株的生化反应测定结果见表1。

2.4 脂肪酸测定结果

测定17#菌株脂肪酸含量。在17#菌株的脂肪酸组成中C17:1 ω 8c、C16:1 ω 7c、C15:0、C15:1 ω 8c脂肪酸含量最丰富。脂肪酸测定结果列于表2。

由表2可知,17#菌株细胞膜成份中不饱和脂肪酸含量很高,其中C17:1 ω 8c是构成该菌株细胞膜的主要脂肪酸成分,占脂肪酸成份的22.43%,其次为C16:1 ω 8c,占14.81%,这2种不饱和脂肪酸约占整个细胞不饱和脂肪酸成分的37.24%。上述说明,17#菌株细胞膜能在低温下保持流动性,有效进行物质交换和信号传导,这与该菌生长在该海域环

境中有关。

2.5 系统进化分析

17#菌株与柠檬假交替单胞菌的16S rRNA相似性最高,为99.4%。它们的形态及生理生化特征也较为一致,因此认为17#菌株与柠檬假交替单胞菌为同一种的不同菌株。

3 讨论

关于条斑紫菜病害的研究起步较晚,研究结果也不一致。对绿斑病的病因目前尚没有统一的认识。中尾义房^[2]研究认为绿斑病是由于假单胞菌属(*Pseudomonas*)和弧菌属(*Vibrio*)类细菌侵入藻体受伤部位并增殖,菌体分泌酶破坏叶状体组织引起的。须藤俊造^[3]认为水温偏高,陡降大雨,河道中过多的有机质流入养殖海区也是引起紫菜绿斑病的原因。另外藻体代谢失常也是引起绿斑病的原因之一^[23]。本研究通过人工感染,生理生化反应以及16S rRNA序列分析等,认为绿斑病主要致病菌是柠檬假交替单胞菌。虽然温度、盐度、pH等环境因子的改变在很大程度上影响绿斑病的发生,但该病的发生最终还是由于病原菌感染引起的,因此病原菌是决定藻体发病的直接因素。

由于栽培海区环境因子难以人工控制,且利用药物杀菌也不实际,在此本文推荐使用冷藏网技术^[9]把幼苗出齐的紫菜苗网从海上收回放在陆地上的冷库中储存起来,待需要时出库张挂在海上栽培,以获得优质紫菜。

表1 17[#]及其相关菌株形态及生理生化的比较^[5-7, 17-22]

Table 1 Phenotypic characteristics comparison of strain 17[#] and the related strains

特性 Characteristic	17 [#]	柠檬假交替单胞菌 <i>P. citrea</i>	河豚毒素假交替单胞菌 <i>P. haloplanktis</i> sub sp. <i>haloplanktis</i>	反硝化假交替单胞菌 <i>P. denitrificans</i>	麦氏假交替单胞菌 <i>P. macleodri</i>	水螅假交替单胞菌 <i>P. undina</i>	红色假交替单胞菌 <i>P. rubra</i>	橙色假交替单胞菌 <i>P. aurantia</i>
4℃生长 Growth at 4℃	+	+	-	-	-	d		+
35℃生长 Growth at 35℃	+	+	d	d	+	-	+	-
色素利用 Pigment Utilization	+	+	-	-	-	-	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	+	ND	-	-	+	+
蔗糖 Sucrose	+	-	+	-	+	+	-	-
麦芽糖 Maltose	-	-	+	+	+	+	-	d
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
果糖 Fructose	+	+	d	-	+	-	-	+
柠檬酸 Citrate	-	-	+	-	-	-	-	-
甘油 Glycerol	-	-	-	-	+	-	-	-
半乳糖 Galactose	-	-	d	-	+	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	+	-	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	-	-	d	-	-	-
海藻糖 Trehalose	+	+	-	ND	+	+	+	+
肌醇 Inositol	-	-	d	ND	-	-	-	-
L-脯氨酸 L-PRO	-	-	d	+	-	d	ND	-
L-组氨酸 L-HIS	-	-	d	ND	-	-	ND	d
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
G+C含量/% G+C content	40~41	41~45	41~45	37	43~44	43~44	46~48	38~43

注 Note: "+"—阳性 positive; "-"—阴性 negative; "ND"—未定 Unidentified; "d"—11%~89%为阳性 Positive rate 11%~89%.

表2 17[#]菌株的脂肪酸成分

Table 2 Fatty acid profiles of Strain 17[#]

脂肪酸 Fatty acid	脂肪酸质量分数/% Percent of fatty acid	脂肪酸 Fatty Acid	脂肪酸质量分数/% Percent of fatty acid
C9:0	0.29	C12:0 3OH	3.99
C11:0	2.38	C15:1 ω8c	8.27
C10:0 3OH	0.63	C15:1 ω6c	4.50
Unknown 11.798*	8.52	C15:0	9.08
C12:0	1.11	C16:1 ω7c	14.81
C11:0 iso 3OH	0.84	C16:0	3.37
C11:0 3OH	13.24	C17:1 ω8c	22.43
C13:0	1.27	C17:0	5.28

* 不详部分总和 . Total amount of unknown section.

致谢:上海水产大学1996届毕业生杨小勇参加部分工作,渔业学院张敏老师协助拍摄部分照片,在此深表谢意。

参考文献:

[1] 日本水产学会. 紫菜病害[M]. 上海:农业出版社,1984.
 [2] 中尾义房. ノリ病害の細菌学の研究-I. 細菌による緑斑病様障害の实验的发病[J]. 日水志, 1972, 38(6):561-564.
 [3] 须藤俊造. アサクサノリの[アナグサレ病](新称)について[J]. 日水志, 1954, 19:1176-1178.
 [4] 陈 勇, 于义德, 杨肇惠. 栽培紫菜叶状体绿烂病因的研究[A]. 第一届中国藻类学术讨论会论文集[C]. 1983. 35-44.

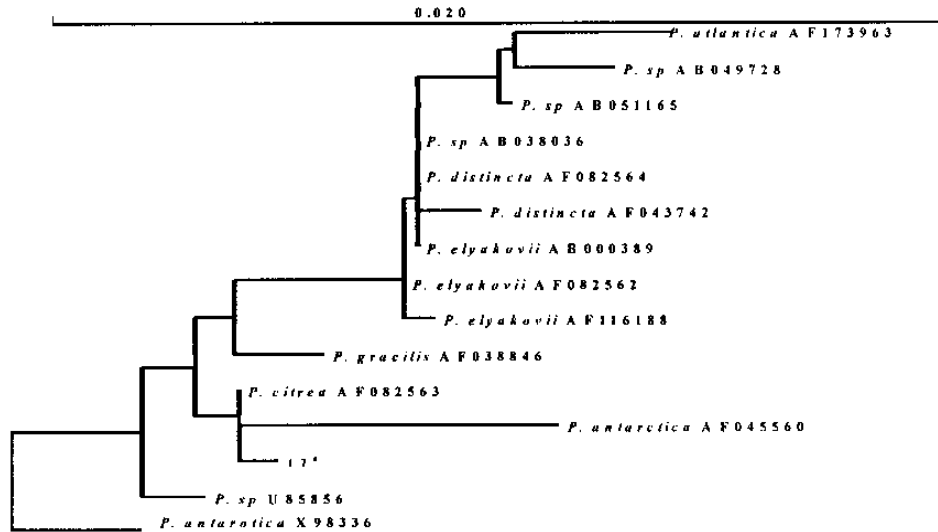


图 3 17* 菌株及其相近菌株的 16S rRNA 系统进化树

Fig.3 Phylogenetic of 16S rRNA sequences showing the relationship between Strain 17* and the related strains

- [5] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45:755-761.
- [6] Sawabe T, Makino H, Tsumi, et al. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48:769-774.
- [7] Tomoo Sawabe, Reiji Tanaka, Mohamed Mahabubu Lqbal, et al. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162^T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the description of the species[J]. Int J Syst Bacteriol, 2000, 50:265-271.
- [8] Philip Gerhardt. 普通细菌学方法手册[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1989.
- [9] 马家海, 蔡守清. 条斑紫菜的栽培与加工[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 生物学中的电子显微镜技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1983. 73-79.
- [12] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [13] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- [14] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1984.
- [15] 宋亚军, 杨瑞颖, 郭兆彪, 等. 若干需氧芽孢杆菌脂肪酸成分分析[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1):23-28.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆试验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [17] Bowman. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48:1 037-1 041.
- [18] Carola Holmstrom, Sally James, Neilan B A, et al. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48:1 205-1 212.
- [19] Ivanova E P, Kiprianova E A, Mikhailov V V, et al. *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48:247-256.
- [20] Ivanova E P. Reclassification of *Alteromonas distincta* Romanenko as *Pseudoalteromonas distincta* comb. Nov[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50:141-144.
- [21] Sarwar G, Sakata T, Kakimoto D. Isolation and characterization of carrageenan-decomposing bacterium from marine environment[J]. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29:145-155.
- [22] Venkateswaran, Dohmoto. *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50:565-574.
- [23] 资源协会大岛泰雄. 浅海养殖[M]. 日本东京: 大成出版社, 1996.

Pseudoalteromonas citrea, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis*

YAN Yong¹, MA Jia-hai¹, XU Pu², SUN Qi-huan¹, WANG Han-qing²

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China)

Abstract: The *Porphyra yezoensis* samples with green-spot disease were collected from the southwest coast of Jiangsu Province. From the diseased lavers, 51 strains were separated and infected to the health ones artificially, among which a strain named Strain 17 had the most typical disease symptom like the natural diseased lavers. Strain 17 is aerobic and gram-negative with polar flagella, which can produce some dark-brown pigment and hydrolyze gelatin, casein and starch. The strain is also positive for oxidase ONPG and negative for V-P, and Na⁺ is essential for it to grow. The content of G + C in this strain is 40.5 mol % and C17:1 ω 8c and C16:1 ω 7c dominant the total lipid acids. The tree in terms of 16S rRNA systematic analysis indicates that Strain 17 has a close relationship with *Pseudoalteromonas citrea* that they have a sequence similarity of 99.4%. It is concluded that the Strain 17 belongs to *P. citrea* but different strain.

Key words: *Porphyra yezoensis*; green-spot disease; *Pseudoalteromonas citrea*

Corresponding author: MA Jia-hai.

欢迎订阅《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊, 主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业, 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 88 页, 双月出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 84 元(含邮费)。邮发代号: 18 - 250, 国内统一刊号: CN11 - 3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005 - 8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期刊, 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本, 欢迎购买。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号, 邮政编码: 100039, 联系电话: 010 - 68673921, 传真: 010 - 68673931; E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net