

褐藻酸降解菌的筛选及其生长条件

王艳玲, 唐学玺, 杨 震

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛, 266003)

摘 要: 采用安藤芳明选择性培养基从自然发病明显的海带幼苗上分离出8株褐藻酸降解菌。研究表明, 8株菌能够不同程度地降解褐藻酸钠, 菌株A1和A2表现出较强的降解能力, 接种1d后液体培养基即变清。温度是该菌大量繁殖的决定性因子, 其生长的最适温度为20℃, 最适pH7.5。褐藻酸钠质量分数为0.5%~0.6%时, 不同氮源和碳源对菌体生长的影响不同, 其中有机氮和铵态氮有利于菌体生长, 尿素和硝酸钠抑制菌体生长; 只有在培养基中含有褐藻酸钠时, 菌体才能正常生长。

关键词: 褐藻酸降解菌; 生长条件; 海带

中图分类号: S917.1; Q93.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8737(2003)1-051-04

海带 (*Laminaria japonica*) 以其工业价值和药用价值促进了沿海经济的发展。但是随着养殖规模的不断扩大, 海带病害时有发生, 造成了重大经济损失^[1-3]。一些研究指出, 褐藻酸降解菌与海带病烂有密切的关系, 褐藻酸降解菌的大量增殖是海带病烂的重要原因^[4-5]。因此找出该致病菌异常增殖的原因, 并对其生长规律进行研究, 从根本上对海带病害加以预防和防治是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 藻体来源

2000年10月从烟台海带养殖场采集病烂严重的海带幼苗, 藻体长5~7cm。同时取长度一致的健康藻体作为对照。

1.2 病原菌的分离

1.2.1 分离纯化培养基 采用安藤芳明^[6]选择性培养基。配方如下: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, K_2HPO_4 0.2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, NaCl 25g, 褐藻酸钠 5g, 琼脂 15g, 自来水 1000mL, pH7.4。

1.2.2 分离纯化 自海区取回病藻, 先用过滤海水洗净, 再用无菌海水反复漂洗, 除去表面粘附的细菌。用接种环从海带病烂处取菌, 进行平板划线纯

化, 至确认为纯菌后移入斜面保存。

1.3 人工感染实验

取健康海带苗, 置无菌海水中用无菌棉球正反面反复擦洗。此操作在3个无菌培养皿中依次进行后, 用无菌海水冲洗, 然后置无菌培养皿中。实验菌株斜面培养24h后进行感染实验。感染时将海带用无菌刀片轻轻切开1~2mm, 接入一环菌, 加入无菌海水, 置于室温10~15℃, 在非直射光的自然条件下培养, 对照组不作处理。每一菌株重复3组。

1.4 褐藻酸降解菌降解能力分析

参照陈驷等^[7]的方法进行。取保存的菌株分别接种到装有已灭菌的褐藻酸钠液体培养基的试管中, 接种的初始密度均为 $3 \times 10^6/\text{mL}$ 。接种后于20℃培养观察, 通过培养基澄清的时间长短来判断它们的降解能力, 筛选出高降解能力的菌株。

1.5 褐藻酸降解菌生长条件实验

1.5.1 生长基础培养基 在分离纯化培养基中添加海带浸出液(1g干海带于100mL自来水中煮沸10min, 上清液即海带浸出液)2mL。

1.5.2 液体菌种培养 接一环菌种A1于装有20mL液体培养基的100mL三角瓶中, 20℃下培养24h。

1.5.3 生长条件实验 每一实验组均在100mL三角瓶中装入30mL液体培养基, 按2%(体积比)接入液体菌种, 20℃下培养, 并定期振摇, 72h后测定菌液的生物量。

1.5.4 生物量的测定 用721型分光光度计于620

收稿日期: 2002-04-15。

基金项目: 国家重点基础研究专项经费资助(G1999012004)。

作者简介: 王艳玲(1971-), 女, 硕士研究生, 从事海藻学研究。

nm 处测定细菌培养液的光密度值,同样的培养基为对照。该方法参照 Sawabe 等^[8]的方法。

本实验共分离出 8 株菌,其特性如表 1 所示。

2 结果

2.1 褐藻酸降解菌的分离

表 1 8 株褐藻酸降解菌的特征

Table 1 Characteristics of eight strains of alginic acid decomposing bacteria						
菌株编号 Strain No.	菌落形态 Clone morphometrics	5d 后菌落大小/nm 5d Size	颜色 Color	光泽 Sheen	个体形态 Cell morphometrics	革兰氏染色 GD
A1	圆形,周缘整齐,大,半透明,湿润,中心有一白斑,周缘半透明,外有透明圈且明显	4	乳黄	有	杆形,顶端圆形,长 0.95 μm,宽 0.31 μm	阴性
A2	圆形,周缘整齐,小,半透明,湿润,中心近透明,其外有一暗圈	2	乳白	有	杆形,顶端圆形,长 1.24 μm,宽 0.43 μm	阴性
A3	圆形稍长,周缘整齐,中,不透明,湿润,中心暗,外有透明圈	3×4	乳黄	有	杆形,顶端圆形,长 1.57 μm,宽 0.38 μm	阴性
A4	圆形,周缘整齐,大,不透明,湿润,中心有一白斑,其外有一暗圈,外缘半透明,外有透明圈	4	乳白	有	杆形,顶端圆形,长 1.96 μm,宽 0.54 μm	阴性
A5	圆形,周缘整齐,中,不透明,湿润,中心暗,外有透明圈	3	乳黄	有	杆形,顶端圆形,长 1.98 μm,宽 0.87 μm	阴性
A6	圆形,周缘整齐,中,半透明,湿润,中心颜色浅,外有透明圈	3	乳黄	有	杆形,顶端圆形,长 1.56 μm,宽 0.36 μm	阴性
A7	圆形,周缘整齐,小,半透明,湿润,外有透明圈,且透明圈明显	2	乳白	有	杆形,顶端圆形,长 1.22 μm,宽 0.32 μm	阴性
A8	圆形稍长,周缘整齐,小,隆起,半透明,湿润,菌落中央有白斑,外有透明圈	1.2	乳白	有	杆形,顶端圆形,长 1.68 μm,宽 0.43 μm	阴性

2.2 感染实验

感染实验发现 8 株褐藻酸降解菌均能使健康藻发病,其中菌株 A1 和 A2 感染效果明显,有较强的致病力。观察发现,健康藻接种细菌 1 d 后,多数没有明显的症状,而接种 A1 和 A2 的受伤部位稍有萎缩,经 2~3 d 受伤部位明显萎缩,褐色开始脱去,经过 5 d,斑点继续扩大,8 d 后藻体刺伤处开始大面积腐烂,而对照藻体色泽正常,未出现肉眼可见的明显

变化。最后从病烂最为严重的藻体上取菌,进行菌落形态和细胞形态观察,其优势菌株与接种菌株一致,证明该 8 株菌是海带病烂的主要病原菌。

2.3 降解能力分析

将 8 株菌接种于液体培养基中,结果见表 2。8 株菌都有降解褐藻酸钠的能力,其中菌株 A1 和 A2 降解能力最强,接种 1 d 后液体培养基即变清。

表 2 8 株褐藻酸降解菌液体培养观察结果

Table 2 Observation of liquid culture for eight strains			
编号 Strain No.	液体培养观察结果 Observation of liquid culture	最早透明时间/d Clarification time	降解强度 Degrading ability
A1	液体表面无菌膜,上部呈雾状,液体澄清,培养 4 d 后,液体转为黄色	1	+++
A2	液体表面无菌膜,上部呈雾状,液体澄清,培养 4 d 后,液体转为黄色	1	+++
A3	液体表面无菌膜,液体明显分层,上层似雾,中部清澈,底部约 0.2 cm 浑浊,培养 5 d 后液体转为黄色	2	++
A4	液体表面无菌膜,液体明显分层,上层似雾,中部清澈,底部约 0.2 cm 浑浊,培养 5 d 后液体转为黄色	2	++
A5	液体表面无菌膜,液体明显分层,上层似雾,中部清澈,底部约 0.2 cm 浑浊,培养 5 d 后液体转为黄色	2	++
A6	液体表面无菌膜,液体明显分层,上层似雾,中部清澈,底部约 0.2 cm 浑浊,培养 5 d 后液体转为黄色	2	++
A7	液体表面有菌膜,液体明显分层,上层似雾,浑浊,下层浅浊	3	+
A8	液体表面无菌膜,液体明显分层,上层似雾,浑浊,下层浅浊	3	+

2.4 培养条件对菌体生长的影响

图1所示。结果表明,适合该菌生长的温度是 15~25 ℃,而最适温度是 20 ℃,在该温度下菌体密度达

2.4.1 培养温度 不同温度对菌体生长的影响如

最大值。

2.4.2 培养基初始 pH 不同的培养基起始 pH 对菌体生长的影响如图 2 所示。结果表明菌体对 pH 的要求不十分严格,在 pH 7.0~8.5 菌体都能良好地生长,最适 pH 7.5。

2.4.3 培养基初始褐藻酸钠 培养基不同褐藻酸钠质量分数对菌体生长的影响如图 3 所示,随着培养基中褐藻酸钠浓度的提高,菌株 A1 的生物量逐渐上升。当培养基初始褐藻酸钠质量分数提高到 0.5%~0.6% 时,生物量达最大值,表明该菌生长的最适褐藻酸钠质量分数为 0.5%~0.6%。

2.4.4 细菌生长动态 实验对该菌在不同温度下的生长曲线进行了比较(图 4),结果发现,20℃ 褐藻酸降解菌生长迅速,3 d 生物量即达阈值。15℃ 生长相对较慢,6 d 达阈值。10℃ 时生长缓慢,8.2 d 达阈值。由此可见,温度是该菌大量繁殖的决定性因子。

2.4.5 氮源 实验研究了不同氮源对菌体生长的影响(表 3)。在含 0.5% 褐藻酸钠的生长基础培养基中,添加浓度均为 0.5% 的不同含氮化合物。结果为在含有蛋白胨、牛肉膏及 NH_4Cl 的培养基中菌体均生长迅速,而 NaNO_3 和尿素不利于菌体的生长。

2.4.6 碳源 实验研究了不同碳源对菌体生长的影响(表 3)。在含 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的生长基础培养基中,添加浓度均为 0.5% 的不同含碳化合物。结果表明,只有在培养基中含有褐藻酸钠时菌体才能正常生长。在葡萄糖和甘露醇中有较慢的生长,在山梨醇、蔗糖和纤维素中无法生长。

3 讨论

褐藻酸降解菌是一类能够产生褐藻酸酶,降解褐藻酸的细菌,它们广泛地分布在近岸的海水中,特别是在海带养殖区内。由于这类细菌能够分解海带藻体内的褐藻酸,对藻体有很强的破坏力,因而对海带养殖造成很大危害。本次实验共分离出 8 株菌,感染实验表明,8 株菌均能引起藻体病烂、坏损,证明褐藻酸降解菌是海带病烂的病原菌。在液体实验中,8 株菌都能不同程度地降解褐藻酸钠,其中菌株 A1 和 A2 降解能力最强,仅 1 d 液体培养基即变澄清,并且菌体降解褐藻酸钠的能力同其对藻体的破坏能力呈正相关性。

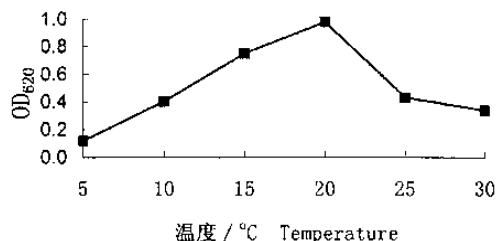


图 1 温度对菌体生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on growth of bacteria

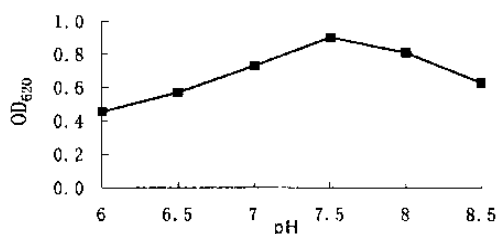


图 2 培养基起始 pH 对菌体生长的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on growth of bacteria

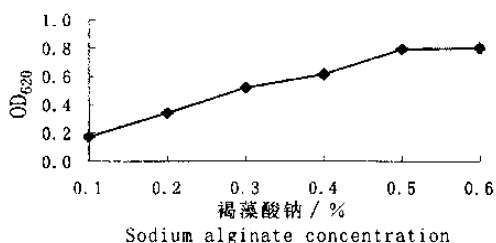


图 3 培养基褐藻酸钠对菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of sodium alginate concentration on growth of bacteria

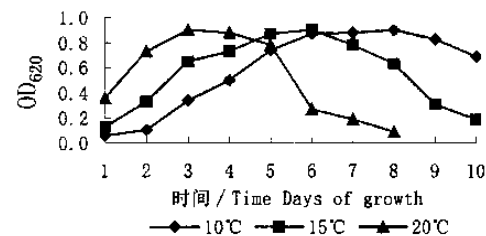


图 4 菌体生长动态图

Fig. 4 Growth graph of bacteria vs culture time

表3 氮源和碳源对菌体生长的影响

Table 3 Effects of different nitrogen sources and carbon sources on growth of bacteria

氮源 Nitrogen sources	生物量(OD ₆₂₀) Biomass
蛋白胨 Peptone	0.97
牛肉膏 Beef extract	0.96
尿素 Carbamide	0.65
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.85
NaNO ₃	0.65
NH ₄ Cl	0.93
碳源 Carbon sources	生物量(OD ₆₂₀) Biomass
葡萄糖 Glucose	0.215
甘露醇 Mannitol	0.094
山梨醇 Sorbitol	0.043
蔗糖 Sucrose	0.031
纤维素 Cellulose	0.035
褐藻酸钠 Sodium alginate	0.089

通过对褐藻酸降解菌生长条件的研究表明,温度是导致该菌大量繁殖的决定性因子,其最适生长温度是20℃,当温度低于10℃时,菌体生长缓慢,病害不易发生。当温度高于20℃时,较短的时间内菌体生物量即达阈值,极易发生爆发性病害。而20℃对海带的生长非常不利,曾呈奎等^[9]报道,一直培养在水温20℃或以上条件下的海带配子体,始终不能发育、形成孢子体。丁美丽^[10]研究认为,培养于6、15及20℃条件下接菌的海带,经6d,只有20℃下的藻体部分变白腐烂。可见温度作为环境因子,直接影响着育苗系统中海带幼苗和褐藻酸降解菌的生长与代谢。海带是冷水性藻类,高温会影响其生长和抗病能力,而有利于细菌的生长与繁殖,增强了

对藻体的破坏力。并且褐藻酸降解菌对褐藻酸钠具有明显的选择性和趋化性,一定的褐藻酸钠浓度是其生长所必需的。在氮肥的利用方面,有机氮和铵态氮有利于其生长,而尿素和硝酸钠对其生长有抑制作用。

参考文献:

- [1] 孙国玉,陈世阳.养殖海带的病害[J].海水养殖,1983(1):21-25.
- [2] 曾呈奎,王素娟,刘思俭.海藻栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,1985.82-96.
- [3] 周丽,宫庆礼,俞开康,等.海带的病害[J].海洋湖沼通报,1996,15(3):81-86.
- [4] 陈颢,林光恒,沈世泽.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[J].海洋与湖沼,1979,10(4):329-333.
- [5] Sawabe T, Makino H. Pseudoalteromonas is the causative agent red spot disease of *Laminaria japonica* [J]. International Journal of Syst Bact, 1998, 48(3/4): 769-774.
- [6] Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganisms. IV. On the Vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria* [J]. Nipp Suis Gakk, 1961, 27(4): 339-341.
- [7] 陈颢,刘秀云,刘秀珍.褐藻酸降解菌的研究Ⅲ.海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施[J].海洋与湖沼,1984,15(6):581-589.
- [8] Sawabe T, Ezura Y, Kimura T. Characterization of an alginate-degrading marine bacterium from decaying rishiri-kombu *Laminaria japonica varochotensis* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1992, 58(1): 141-145.
- [9] 曾呈奎,吴超元,任国忠.温度对海带配子体生长发育的影响[J].海洋与湖沼,1962,4(1-2):22-28.
- [10] 丁美丽.环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究[J].海洋学报,1990,12(2):224-230.

Screening of alginic acid decomposing bacteria and its culture conditions

WANG Yan-ling, TANG Xue-xi, YANG Zhen

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Eight strains of alginic acid decomposing bacteria were isolated from decaying thalli *Laminaria* and all the strains had the ability to degrade sodium alginate in varying degrees. Among them two strains (A1 and A2) showed higher degrading intensity that the culture medium became clear only one day after the inoculation. The main affecting factor for the reproduction of the strains was temperature. The bacteria had a maximum biomass when the liquid media contained 0.5% sodium alginate and 0.5% organic nitrogen, pH 7.5 and temperature 20℃ after 72 h incubation.

Key words: alginic acid decomposing bacteria; culture conditions; *Laminaria*