

大连地区裙带菜斑点烂病病原菌的研究*

马悦欣 张泽宇 范春江 曹善茂

(大连水产学院, 116023)

摘要 从裙带菜斑点烂病典型病藻上分离出多株细菌, 其中三株经感染健康藻得到与病藻相同的症状, 证明所分离菌是裙带菜斑点烂病的病原菌, 经系统分类鉴定定名为优美德利菌(*Deleya venusta*)。

关键词 裙带菜, 斑点烂病, 病原菌, 优美德利菌

近几年来随着裙带菜栽培规模的不断扩大, 病害屡屡发生。1992年大连南部海域栽培的裙带菜发生了斑点烂病, 发病藻体首先出现斑点状烂孔, 进而整个叶片的斑点由小变大, 病烂部分变绿腐烂脱落, 最后整个叶片呈筛网状, 严重时病烂扩延至中肋及孢子叶, 使裙带菜失去了商品价值, 造成了极大的损失。日本木村^[7]研究认为斑点烂病是由革兰氏阴性细菌感染而引起的。朝鲜 Park^[13]认为斑点烂病是由 harpacticoid copepod (*Amenophia orientalis*) 寄生引起的。作者从黑石礁海域斑点烂病藻体上分离到病原细菌并对其致病性和生物学性状进行了研究, 经分类鉴定为优美德利菌(*Deleya venusta*)。德利氏菌属细菌作为裙带菜病害的致病菌尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 病藻来源

1992年3月、4月从大连黑石礁海区栽培浮筏上采的具有典型病症的裙带菜, 其个体大小约1m。

1.2 健康藻来源

1992年6月、1993年3月、1994年3月采自大连水产学院室内人工培育的幼苗在浮筏上栽培的裙带菜, 个体大小约60cm。

1.3 病原菌的分离纯化

自海区浮筏上取回病藻, 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, 剪取病烂部分于无菌研钵中, 加少许无菌海水研碎, 取汁涂布下列平板: ①营养琼脂, ②2216E, ③2216E + 0.5% 褐藻酸钠, 15℃ 恒温培养, 5天后挑取单菌落进行划线纯化, 直至确

收稿日期: 1996—05—02。

* 大连市青年基金资助项目。

认为纯菌后移入 2216E 斜面保存。

1.4 人工感染试验

取健康藻,剪取茎以上含中肋裂叶约 8~10cm 一段藻体,用过滤海水洗净,培养于盛有营养海水的大烧杯(1 000ml 或 2 000ml,加盖)中。实验菌株于 2216E 斜面 15℃ 培养 48h 后进行试验,观察出现的症状,隔 4~5 天换水一次。

1.4.1 浸泡感染 将斜面菌株用 2% NaCl 无菌水制成菌悬液,接入培养裙带菜的营养海水中,使海水中菌的浓度为 10^6 cell/ml 左右,对照组不加菌液。分二次进行,每次每株菌设 2~4 个平行组,1992 年 6 月在低温箱中试验,温度设定为 10℃,光源为日光灯,光强 2 500Lux,光照时间为 12h/日。1993 年 3 月在室温条件下试验,温度为 10~11℃,自然光强。

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。1994 年 3 月分二组试验,一组在低温箱中进行,温度设定为 8℃,光源为日光灯,光强为 2 500Lux,光照时间为 12h/日;另一组为室温 8~12℃,自然光强。

1.5 病原菌的分类鉴定

按照常规方法^[1]进行,根据文献^[11,12]将菌株分类鉴定至种。除 NaCl(%)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。

2 结果

2.1 人工感染试验

1992 年 6 月至 1994 年 3 月选从自然病藻中分离的 11 株细菌先后进行三次人工感染试验,结果表明 9212, 9226, 9227 三株菌能使健康裙带菜发病,被感染的藻体经 3~5 天后叶片上出现局部绿变,然后向外扩展,并可看到最初的绿变部位腐烂破碎,7~10 天后形成穿孔,与自然病藻症状一致,对照组裙带菜没有可见变化。两种不同感染方法所得结果基本相似,只是刺伤感染最初绿变为刺伤部位。当藻体病烂,从病灶中分离出细菌并做初步鉴定,其优势菌株与接种菌株一致。

2.2 病原菌的分类鉴定

菌株 9212, 9226, 9227 的形态学及生理生化特征如下:三株菌均为革兰氏阴性球杆菌,周生鞭毛。氧化酶阳性,过氧化氢酶阳性,葡萄糖代谢类型为产碱型,可还原硝酸盐为亚硝酸盐。产生吡啶阴性,利用 H_2 生长阴性。精氨酸双解酶阴性,明胶酶阴性,淀粉酶阴性。利用葡萄糖、乳酸,不利用阿拉伯糖、半乳糖、丙二酸钠和酒石酸钠。4℃ 下生长。根据文献^[11,12]将菌株 9212, 9226, 9227 定名为优美德利菌(*Deleya venusta*)。

3 讨论

用显微镜压片观察患斑点烂病的裙带菜可以看到病藻细胞中有细菌存在。用三种不同平板对病藻进行了细菌分离,结果从数量上看褐藻酸钠培养基(2216E + 0.5% 褐藻酸钠)上最多,2216E 次之,营养琼脂上最少,说明寄生或粘附在裙带菜上的细菌多数需要在含一定量氯化钠的培养基上生长,褐藻酸钠培养基成分较接近藻体的组成成分,因此,藻体上的菌对褐藻酸钠具明显的选择性和趋化性,故该平板上的细菌数量最多,选择致病菌的机会高,自病藻上分离到细菌 11 株,经感染试验证明 9212, 9226, 9227 三株菌是斑点烂病的病原菌,而它们恰好都是由褐藻酸钠平板分离所得。

木村等^[7]研究认为裙带菜斑点烂病是由 *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp. 和 *Flavobacterium* sp. 等革兰氏阴性菌感染而引起的。Ando and Inoue^[8] 从与裙带菜同目的海带患病藻体上分离到 *Vibrio* sp., 经感染健康藻可引起穿孔绿烂病。陈弱等^[4] 认为一定条件下海带藻体上褐藻酸降解菌(*Pseudomonas*)的异常增殖可以导致海带幼苗出现脱苗和烂苗现象。中尾等^[6]研究证实 *Pseudomonas* 属和 *Vibrio* 属细菌能分解紫菜叶体细胞间隙物质, 结果造成绿斑病。以上表明某些细菌能感染不同种类的海藻而使之发病。1992 年作者从患斑点烂病的裙带菜中分离到优美德利菌并通过感染试验证明所分离菌株可引起健康裙带菜发生斑点烂病, 该菌的适宜生长温度为 4~15℃, 与发病时期(3 月底至 4 月初)的水温相吻合。在盐度为 30 时生长良好, 与海区盐度 32 相一致, 加上裙带菜本身又为其生长提供丰富的营养物质, 在藻体生长趋停止的栽培后期, 藻体代谢能力降低, 抵抗力减弱, 加之栽培密度过大导致水域环境恶化, 促使该菌大量繁殖, 进而相互感染造成大规模发病, 特别是内湾区域发病严重。丁美丽等^[2]研究了环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂的影响, 证明在藻体表面受伤、过于密集、水温较高等不利条件下, 藻体抗病能力下降, 褐藻酸降解菌有机会大量繁殖, 病烂也就发生。逢少军等^[5]认为裙带菜斑点烂病的发生可能和栽培密度过大有关。随着裙带菜的大规模栽培, 海区的环境恶化是不言而喻的。优美德利菌致病究竟受哪些环境条件的影响还有待于研究。

褐藻酸降解菌产生的褐藻酸酶对海带藻体的酶解作用是引起海带腐烂的主要机制^[3,9]。优美德利菌的致病机制是否也是由于其本身所产生的某种酶对裙带菜藻体的作用值得进一步研究。

关于优美德利菌的分类位置, 在文献^[12]中为 *Alcaligenes venustus*, 分离自海洋环境, 在海水营养琼脂和补充 2% NaCl 的营养琼脂培养基中生长, 但除了形态学和鞭毛形成外, 其表型特征与产碱菌属典型种(*A. faecalis*)有很大不同。因此 Baumann 等^[10]对产碱菌属的海洋种类(*A. aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus* 和 *A. venustus*)和假单胞菌属的一种(*D. marina*)的进化关系进行了深入研究, 将其归于一新属德利氏菌属(*Deleya*), *D. venusta* 区别于 *D. aestus*, *D. pacificus* 和 *D. cupidus* 的特征是可在 4℃ 下生长, 区别于 *D. marina* 是周毛, 而后者是极毛^[10]。伯杰氏细菌鉴定手册中正式定属名 *Deleya*^[11], 以利用 D-葡萄糖、D-葡萄糖酸和甘油区别于 *Pseudomonas* 的海洋种类 *P. doudoroffii* 和 *P. nautica*, 以细胞内积累聚 β-羟基丁酸盐区别于 *Altermonas*, 以最适生长需要至少 75mM NaCl 区别于陆地上的 *Pseudomonas* 和 *Alcaligenes* 中的种类^[10,11]。

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。科学技术出版社。
- [2] 丁美丽, 1990。环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究。海洋学报, 12(2): 224-230。
- [3] 陈弱等, 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。
- [4] 陈弱等, 1981。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。海洋与湖沼, 12(2): 133-137。

本院葛慕湘、张凯毕业生参加部分工作。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。

- [5] 逢少军, 吴超远, 1994. 我国裙带菜人工育苗技术的现状和展望. 海洋科学, 6: 25 - 27.
- [6] 中尾义房等, 1972. のり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発症. 日本水产学会志, 38 (6): 561 - 564.
- [7] 本村喬久等, 1976. 气仙沼湾におけるワカメあなき症ならびにワカメ养殖環境の微生物的検討. 东北水研報告, 36: 57 - 65.
- [8] Ando, Y. and K. Inoue, 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms IV. on the vibrio - type bacteria, newly isolated from the decaying Laminaria. Bull. Jap. Soc. Scienc. Fish., 27(4): 339 - 341.
- [9] Ando, Y. and K. Inoue, 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms V. on the alginase of *Vibrio* sp. so - 20 strain. Bull. Jap. Soc. Scienc. Fish., 27(4): 342 - 347.
- [10] Baumann, L., et al., 1983. Description of *Deleya* gen. nov. Created to accommodate the marine species *Alcaligenes aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus*, *A. venustus* and *Pseudomonas marina*. Int. J. syst. Bacteriol. 33(4): 793 - 802.
- [11] Holt, J. G. et al., 1994. Bergey's manual of determinative Bacteriology 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- [12] Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984. Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol 1. Williams and wilkins, Baltimore.
- [13] Park, T. S., et al., 1990. A harpacticoid copepod parasitic in the cultivated brown alga *Undaria pinnatifida* in korea. Bull. Korean Fish. Soc., 23(6): 439 - 442.

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

Ma Yuexin Zhang Zeyu Fan Chunjiang Cao Shanmao

(Dalian Fisheries College, 116023)

ABSTRACT Many strains of bacteria were isolated from spot decay diseased seaweed of *Undaria pinnatifida*. Three of them were shown to be the cause of the disease by challenge experiment. The symptom was similar to that of natural incidence. The pathogenic bacteria were identified to be *Deleya venusta*.

KEYWORDS *Undaria pinnatifida*, Spot decay disease, Pathogen, *Deleya venusta*