

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181104002

http://www.yykxjz.cn/

张艳楠, 王印庚, 刘福利, 廖梅杰, 李彬, 张正, 梁洲瑞, 于永翔, 荣小军. 养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 135-144

Zhang YN, Wang YG, Liu FL, Liao MJ, Li B, Zhang Z, Liang ZR, Yu YX, Rong XJ. Etiology of black-brown disease in cultured *Caulerpa lentillifera*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 135-144

## 养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究\*

张艳楠<sup>1,2</sup> 王印庚<sup>2</sup> 刘福利<sup>2</sup> 廖梅杰<sup>2</sup> 李彬<sup>2</sup>  
张正<sup>2</sup> 梁洲瑞<sup>2</sup> 于永翔<sup>2</sup> 荣小军<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究从大连某养殖场发生黑褐病的长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*)分离得到1株优势菌株CL2017070801002。采用该菌株浓度为 $10^3\sim 10^8$  CFU/ml的菌液浸泡感染长茎葡萄蕨藻,在7d内,每个感染实验组的藻体都出现了不同程度的黑褐色典型发病症状,人工感染实验结果表明,CL2017070801002对长茎葡萄蕨藻有致病性。扫描电镜观察发现,藻体细胞壁表面聚集大量细菌,随着侵染时间加长,细胞组织破裂死亡。研究表明,CL2017070801002为本次发现的长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原。结合革兰氏染色、生理生化特征和16S rDNA序列进化树分析结果,将该菌株鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。药敏实验结果显示,该菌株对氯霉素、四环素、氟罗沙星、强力霉素和氟苯尼考等药物高度敏感,对庆大霉素、克拉霉素等药物中度敏感,对青霉素、头孢氨苄、头孢拉定等药物不敏感。本研究为长茎葡萄蕨藻的细菌性病害防治提供了有益参考。

**关键词** 长茎葡萄蕨藻; 黑褐病; 溶藻弧菌

**中图分类号** S946.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0135-10

长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*),又名凸镜状蕨藻,属于绿藻门(Chlorophyta)、羽藻纲(Bryopsodophyceae)、羽藻目(Bryoposodales)、蕨藻科(Caulerpaceae)、蕨藻属(*Caulerpa*)。长茎葡萄蕨藻的外观为浑圆饱满的绿色球状小枝,犹如串串葡萄,俗称“海葡萄”(郭辉,2014)。长茎葡萄蕨藻主要分布于太平洋的热带和亚热带(30°N~30°S)的潮间带海区,多生长在水流较缓的沙地或礁石区域(Titlyanov *et al*, 2012)。

长茎葡萄蕨藻具有极高的营养与保健价值:富含人体所需的多种氨基酸与维生素(Saito *et al*, 2010),蛋白质含量为10.41%,总脂肪含量为1.6%~3.7%

(Matanjun *et al*, 2009),还含有 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸(Niwano *et al*, 2009),其食用口感类似鲑鱼卵,却没有鱼腥味,被誉为“绿色鱼子酱”。目前,长茎葡萄蕨藻的市场售价约为200~250元/kg,养殖及相关产品的加工利用利润较高(张颖等,2016)。在日本、越南和菲律宾等国家,长茎葡萄蕨藻的养殖技术较为成熟(梁洲瑞等,2016)。近年来,我国的福建、海南、辽宁和山东等地开启了该藻的养殖热潮。海南地区可整年进行长茎葡萄蕨藻的养殖,福建沿海每年的长茎葡萄蕨藻养殖周期一般为9~10个月,而辽宁和山东等北方海区一般可在5~9月时开展长茎葡萄蕨藻室

\* 现代农业产业技术体系(CARS-50)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50)].  
张艳楠, E-mail: 1519056881@qq.com

① 通讯作者: 荣小军, 研究员, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-11-04, 收修改稿日期: 2018-12-10

内养殖,养殖周期较短。虽然北方海区养殖周期短,但可以利用高温期时闲置的养殖车间,从而提高车间使用率。如海参行业下滑,大连沿海有大量闲置的海参育苗车间,对这些闲置车间进行屋顶改造(改为可透光的),开展长茎葡萄蕨藻等名贵藻类的室内养殖是一个可提高渔民收入的有效途径。随着我国长茎葡萄蕨藻养殖业的快速发展,病害问题日益突出,成为制约其健康可持续发展的重要因素之一,如大连地区近2年进行的小规模长茎葡萄蕨藻养殖过程均受困于病害问题,产量及质量均受到严重的影响,导致该地区的长茎葡萄蕨藻养殖产业停滞不前。

目前,国内外大部分学者对长茎葡萄蕨藻的研究集中在其生物学特性和人工养殖技术方面,例如,在解析适宜的水温、光强、营养盐浓度及盐度等环境因子对长茎葡萄蕨藻生长的影响,确定长茎葡萄蕨藻养殖的适宜密度,比较不同类型附着基的养殖效果等方面取得了一定的进展(黄建辉,2012)。然而,有关该藻的病害防治技术鲜有报道,仅Kudaka等(2008)关于副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引起长茎葡萄蕨藻腐败变质的病例分析,并提出了可以在藻类培养过程中通过紫外杀菌来预防该病的方法。

我国是海藻养殖第一大国,但在藻类病害的研究方面相对薄弱,关于藻类病原菌的微观形态描述和致病机理研究较少。

本文对大连某养殖场2017年7月暴发的一种长茎葡萄蕨藻病害(病症为藻体表面由翠绿色变成黑褐色)进行了较为系统的研究。从发病率高达30%的长茎葡萄蕨藻发病藻体黑褐色病灶部位分离到一株优势菌,采用柯赫氏法则(Evans,1976)对该菌进行了鉴定,并通过回接感染实验确定该菌为病原菌。同时,对处于不同感染阶段的病藻藻体进行了扫描电镜观察,解析在病原感染藻体过程中的微观病理特征。本研究结果为长茎葡萄蕨藻的健康养殖以及细菌性病害防控提供了有益参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 患病长茎葡萄蕨藻** 患病长茎葡萄蕨藻于2017年7月,采自大连某海藻养殖场,养殖场水温为26℃~27℃,常温保存运回实验室,在24h内进行分析。

**1.1.2 健康长茎葡萄蕨藻** 健康长茎葡萄蕨藻采自大连室内养殖水池,在实验室条件下进行培养,培养温度为28℃,盐度为30,光照为3000~5000 lx,光暗

周期为L:D=12:12,充气培养,每隔3d更换1次过滤海水,选取生长状态良好的长茎葡萄蕨藻用于实验。

**1.1.3 长茎葡萄蕨藻培养液成分**  $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度为15 mg/kg,  $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度为4 mg/kg。

**1.1.4 试剂及固定液配方** 实验所用细菌TSA平板、TCBS琼脂平板和细菌生化反应微量鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司;革兰氏染色液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。电镜固定液为2.5%戊二醛(体积比为25%的戊二醛溶液:20×PBS缓冲液:ddH<sub>2</sub>O=1:5:4)。

**1.1.5 仪器设备** YXQ-LS-SII电热压力蒸汽灭菌锅,SPX-250B-Z型生化培养箱,Centrifuge 5804R低温冷冻离心机,NanoDrop 1000紫外分光光度计,Nikon E800光学显微镜,JEM-1200EX型透射电子显微镜,VEGA3 TESCAN扫描电镜。

### 1.2 病原菌的分离和纯化

选取患病症状明显的长茎葡萄蕨藻,现场剪切匍匐茎、直立枝组织,用无菌海水漂洗3次后,取患病藻体的典型病灶部位,并以健康藻体的组织为对照同步取样,进行常规水浸片,在光学显微镜下观察。同时,在无菌的条件下,用剪刀把病灶处藻体组织剪下,置于无菌的研钵中研磨匀浆,匀浆液用灭菌海水梯度稀释,每个稀释度吸取100 μl稀释液分别涂布于TSA平板和TCBS琼脂平板,在28℃生化培养箱中培养12~36 h。观察菌落生长和形态,挑取形态一致的优势菌落在新鲜培养基上重复划线纯化3次以上,直至分离到单菌落,分离纯化后的菌株置于-80℃保存。

### 1.3 人工回接感染实验

将从患病长茎葡萄蕨藻病灶处分离得到的优势菌用于人工回接感染实验。刮取培养皿中分离纯化的优势菌置于500 ml TSB培养液,37℃培养24 h后,培养液6000 r/min离心10 min,收集菌体。用灭菌海水洗涤细菌,将菌株用灭菌海水配制成终浓度为 $10^8$  CFU/ml的菌悬液(采用酶标仪和平板计数法结合计算),10倍浓度梯度稀释后备用。设6个浓度组A1~A6,对应浓度分别为 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 和 $10^8$  CFU/ml,每个浓度各设3个平行组。采用浸浴的方式进行回接感染:500 ml菌悬液分装至1000 ml锥形瓶中,每个锥形瓶中放入1.5 g藻体。设置不加菌液的灭菌海水培养液为对照组,每组实验设置3个重复(B1、B2和B3)。放置于光照培养箱中养殖(温度为28℃,光强为3000~5000 lx,光周期为12 h/12 h;培

养液中  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度为 15 mg/kg,  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度为 4 mg/kg。实验期内, 每 2 d 更换 1 次菌悬液。每天观察并记录藻体健康情况, 发现实验组藻体出现黑褐色典型发病特征时, 切取病灶部位进行细菌分离和鉴定。

#### 1.4 扫描电子显微镜切片的制备与观察

选取藻体出现颜色变化的感染部位, 剪取大小约为  $1\text{ mm}^3$  的组织块, 放入含 2.5%戊二醛的电镜固定液中固定, 用于扫描电子显微镜观察。

将用 2.5%戊二醛的电镜固定液固定的组织块在  $4^\circ\text{C}$  条件下固定 24 h 后, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 1%的锇酸固定 1.5 h; 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 将固定好的材料用梯度浓度的乙醇脱水, 再用醋酸戊酯作为中间介质, 置换脱水剂, 然后在临界点干燥器中用固体  $\text{CO}_2$  等置换剂置换中间介质, 进行临界干燥; 将干燥的样品用导电性好的粘合剂或其他粘合剂粘在金属样品台上, 然后放在真空蒸发器中喷镀一层 50~300 Å 厚的金属膜, 样品用扫描电镜观察、拍照。

#### 1.5 病原菌的形态学观察与生理生化特性测定

将分离菌株在 TSA 和 TCBS 琼脂平板上接种划线, 观察菌落形态、大小。挑取单一菌落, 采用革兰氏染色液试剂盒对细菌进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察。同时挑取新鲜菌落, 2.5%戊二醛固定, pH7.0 的 2%磷钨酸负染色液染色, 进行透射电镜观察。并在无菌条件下挑取单一菌落, 制备菌悬液, 依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)和《常见细菌系统鉴定手册》(Holt, 1994; 东秀珠等, 2001), 用生化鉴定管测定细菌生理生化指标。

#### 1.6 细菌 16S rDNA 序列测定

**1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备** 用灭菌枪头挑取单菌落悬浮于 50  $\mu\text{l}$  无菌去离子水中,  $100^\circ\text{C}$  水浴 10 min, 12000 r/min 离心 2 min, 取 1  $\mu\text{l}$  上清液作为 PCR 反应所用模板 DNA(范文辉等, 2005)。

**1.6.2 PCR 扩增与测序** 利用扩增 16S rDNA 序列通用引物, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGG-CCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTA-CCTTGTACGACTT-3'。PCR 反应体系见表 1(许燕, 2017)。PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $60^\circ\text{C}$  复性 40 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 40 s, 30 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 20 min,  $4^\circ\text{C}$  保存。将扩增得到的 PCR 产物送至上海生工生物科技有限公司进行测序。根据测序结果, 在 GenBank 中使用 BLAST ([http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

[ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast))进行同源性比较, 在网站(<http://www.bacterio.net/vibrio.html>)搜集下载与该菌株同属且相似度较高的其他菌株序列信息, 采用 MEGA 6 软件进行序列同源性分析和系统发育树构建。

表 1 PCR 反应体系(许燕, 2017)

Tab.1 Reaction system of PCR amplification(Xu, 2017)

反应体系 Reaction system	体积 Volume ( $\mu\text{l}$ )
ddH <sub>2</sub> O	18.5
10×Buffer	2.5
dNTP mixture	2
27F	0.5
1492R	0.5
Taq DNA 聚合酶 <i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase	0.2
DNA 模板 DNA replication	1

#### 1.7 药敏实验

将菌株在 TSB 固体培养基平板上培养 24 h 后, 用 1.5%无菌生理盐水冲洗稀释, 制成  $10^8$  CFU/ml 的菌悬液, 取 100  $\mu\text{l}$  均匀涂布于 TSA 固体培养基平板, 将药敏纸片贴于该培养基上, 每个培养基上贴 5 片,  $28^\circ\text{C}$  培养 16 h 后, 测定抑菌圈直径, 记录其大小, 根据美国临床实验室标准化协会 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)标准, 判定细菌对该抗生素是高度敏感(Susceptible, S)、耐药(Resistant, R)、中度敏感(Intermediate, I) (苗鹏飞等, 2018)。

## 2 结果与分析

### 2.1 患病藻体临床症状

患病长茎葡萄蕨藻病灶部位整体呈黑褐色, 触感软、粘, 严重感染的匍匐茎呈明显的深黑褐色, 顶端藻体出现溃烂(图 1A); 在光学显微镜下观察发现, 患病的长茎葡萄蕨藻表面黏附很多簇虫、线虫, 且有许多杂藻附着在长茎葡萄蕨藻藻体上(图 1B); 正常藻体透明翠绿、表面光滑(图 1C, 图 1D)。

### 2.2 病原菌株培养形态

从患病藻体的病灶组织分离到 1 种优势菌, 在 TSA 和 TCBS 琼脂平板上培养 18~24 h, 观察 TCBS 琼脂平板, 形成规则圆形、中间隆起、表面光滑且呈黄色的菌落(图 2A)。在 TSB 培养液上培养 16 h 后, 菌液呈浑浊的淡黄色。经革兰氏染色后, 光学显微镜下观察发现, 细菌被染为红色, 两端钝圆、菌体直或少弯曲、短杆状(图 2B), 确定为革兰氏阴性菌。透射电镜下可见该菌有一根细长的端生鞭毛, 无荚

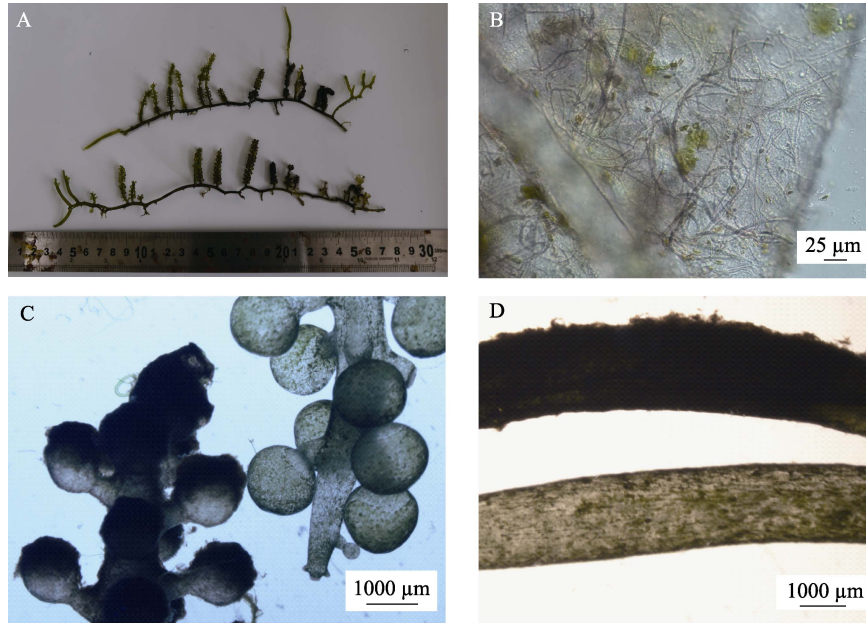


图1 患病的长茎葡萄蕨藻

Fig.1 The syndrome of infected *C. lentillifera*

- A: 感染黑褐病的长茎葡萄蕨藻外观; B: 簇虫、线虫和杂藻附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面;  
C 和 D: 对照组颜色翠绿, 病烂组出现黑褐色病变(体式显微镜)
- A: Syndrome of *C. lentillifera* infected black-brown disease; B: Gregarina, Nematode and miscellaneous algae attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; C and D: The color of the control group was green, and the infected group showed dark brown lesions (stereo microscope)

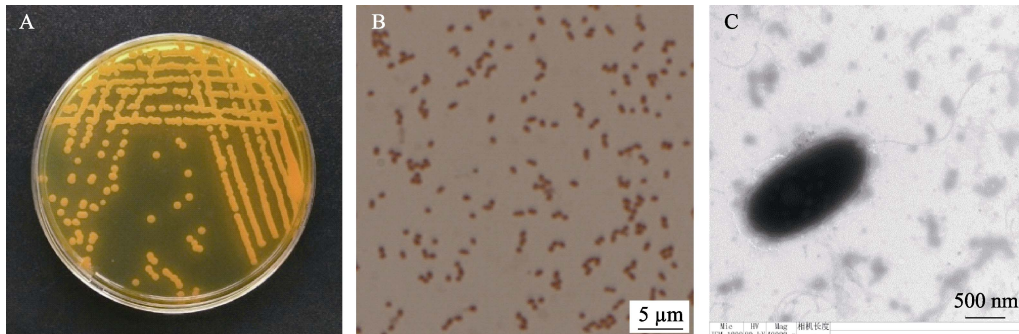


图2 患病长茎葡萄蕨藻分离出的优势菌 CL2017070801002 的形态

Fig.2 Morphological features of strain CL2017070801002 isolated from infected *C. lentillifera*

- A: TCBS 琼脂平板上的菌落; B: 革兰氏染色; C: 透射电镜图
- A: Colony on TCBS medium; B: Gram stain; C: Transmission electron microscope figure

膜, 无芽孢(图2C)。将分离到的菌株编号为 CL2017070801002。

### 2.3 人工感染实验结果

用不同浓度的 CL2017070801002 菌悬液感染健康的长茎葡萄蕨藻, 除对照组外, 每个感染实验组都出现不同程度的感染症状, 其中,  $10^8$  CFU/ml 组 2 d 出现黑褐色典型症状,  $\leq 10^5$  CFU/ml 的实验组 7 d 后出现感染。另外, 感染用的菌液浓度越高, 患病藻体的感染面积越大(图3)。

以浓度为  $10^8$  CFU/ml 的 CL2017070801002 菌悬液感染长茎葡萄蕨藻, 感染后的第 2~3 天, 可肉眼观察到藻体顶端呈黄色; 从第 4 天开始, 养殖水体浊度明显增加, 藻体颜色加深, 由黄色逐渐变为红褐色, 最后, 整个藻体病变直至溃烂。实验期间, 对照组没有出现病变, 感染组出现明显的红褐色病变。从患病藻体分离得到的菌株编号为 CL2017070801002A。CL2017070801002A 的菌落形态与 CL2017070801002 相同, 通过 16S rRNA 分析, 与 CL2017070801002 为同一种细菌。



2.4 感染藻体扫描电镜观察

图4所示, 对照组的直立枝球状体部分形态正常, 表面光滑且无其他生物附着, 结构完整(图4A); 感染组在接种菌株CL2017070801002的前期, 创伤处明显可见少量丝状物粘附, 且附着少量细菌(图4B);

感染后期, 患病藻体的直立枝球状体表面有大量细菌, 表面形态变得极不规则, 组织结构被破坏(图 4C); 患病藻体中粘附大量丝状物, 充斥整个藻体(图 4D); 同时, 在患病藻体表面还发现许多异物附着(图 4E); 藻体感染后直至溃烂的过程中, 均有大量的丝状物等

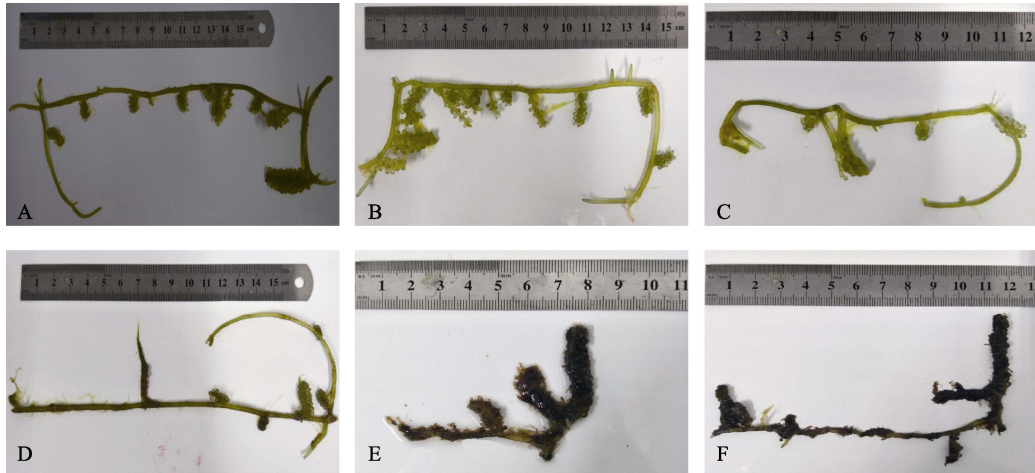


图 3 感染菌株 CL2017070801002 后的长茎葡萄蕨藻发病症状(感染第 7 天后)

Fig.3 Symptoms of the *C. lentillifera* infected with different dose of CL2017070801002 (infection group on 7th day)

A.  $10^3$  CFU/ml; B:  $10^4$  CFU/ml; C:  $10^5$  CFU/ml; D:  $10^6$  CFU/ml; E:  $10^7$  CFU/ml; F:  $10^8$  CFU/ml

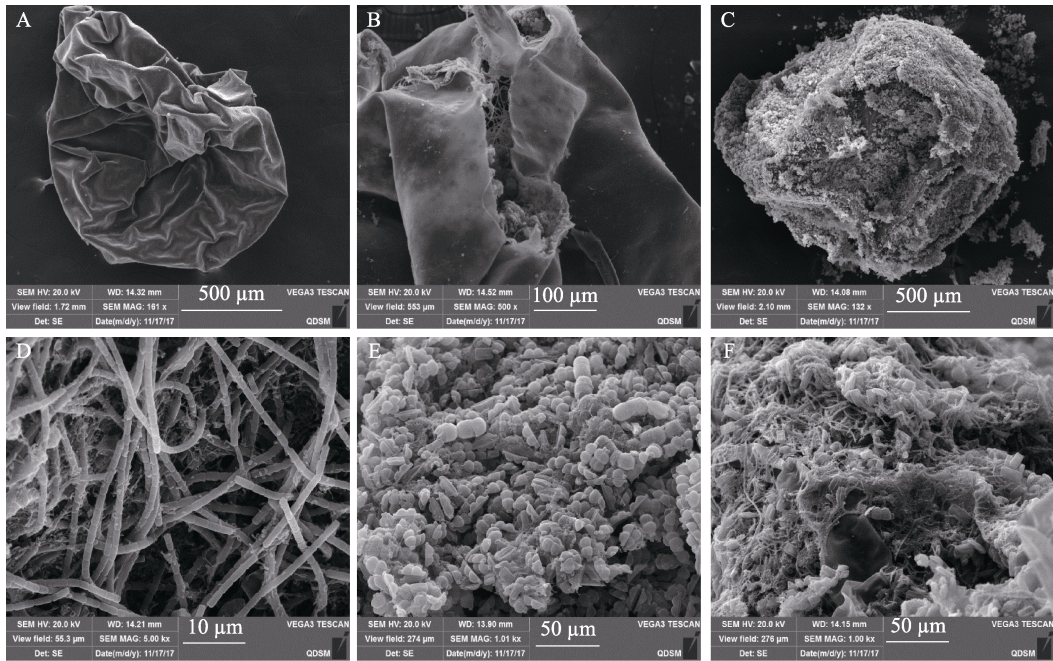


图 4 病烂长茎葡萄蕨藻扫描电子显微镜观察

Fig.4 Observation of diseased *C. lentillifera* by scanning electron microscopy

A: 健康的长茎葡萄蕨藻; B: 接种病原菌后, 感染前期, 少量的细菌附着在长茎葡萄蕨藻创伤伤口处; C: 感染后期, 患病藻体表面聚集大量菌, 组织结构被破坏; D: 丝状物附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面; E: 未知物附着在病烂长茎葡萄蕨藻表面; F: 感染后溃烂的长茎葡萄蕨藻(包含众多丝状物和未知物)

A: Healthy *C. lentillifera*; B: After inoculation, early infection, a small amount of bacteria attached to the *C. lentillifera* wound; C: Late infection, a large number of bacteria got around, and the tissue structure is destroyed; D: Filaments attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; E: Unknown attached to the surface of diseased *C. lentillifera*; F: Late infection, fester *C. lentillifera* (Contains many filaments and unknowns)

附着(图 4F)。

## 2.5 病原菌生理生化特性

对分离菌株 CL2017070801002 进行革兰氏染色, 光学显微镜观察显示, 菌株为革兰氏阴性短杆菌。生理生化特征分析结果显示: 氧化酶反应阳性, 鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶反应阳性, 精氨酸双水解酶和 MR-VP 反应阴性, 能利用蔗糖、甘露醇, 不能利用乳糖、山梨醇、肌醇、鼠李糖等, 其余特征见表 2。

## 2.6 16S rDNA 扩增结果及系统发育分析

PCR 扩增病原菌 CL2017070801002 的 16S rDNA,

经琼脂糖电泳检测表明片段大小为 1400 bp 左右, 将该序列在 GenBank 数据库进行 BLAST 同源比对分析, 发现与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的同源性最高, 相似度为 99%, 从 NCBI 数据库中下载与该菌株序列相似度较高的 16S rDNA 基因序列, 利用 MEGA6 软件构建系统发育树(图 5), 结果显示, 该菌与溶藻弧菌聚为一簇, 确认菌株 CL2017070801002 为溶藻弧菌。

## 2.7 药敏实验

在实验的 36 种药物中, 该菌对氯霉素、四环素、氟罗沙星、强力霉素和氟苯尼考等药物高度敏感, 对庆大霉素、克拉霉素等药物中度敏感, 对青霉素、头孢氨苄、头孢拉定等药物不敏感(表 3)。

表 2 病原菌 CL2017070801002 和 CL2017070801002A 形态特性及生理生化特征  
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of strain CL2017070801002 and CL2017070801002A

项目 Items	CL2017070801002	CL2017070801002A
革兰氏染色 Gram staining	-	-
无盐胰胨水 No salt tryptone water	-	-
3% NaCl 胰胨水 3% Tryptone water	+	+
6% NaCl 胰胨水 6% Tryptone water	+	+
10% NaCl 胰胨水 10% Tryptone water	+	+
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl glucose	-	-
3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose	-	-
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl mannitol	+	+
3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl arabinose	-	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-
苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
肌醇 Inositol	-	-
氧化酶反应 Oxidase	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-
3% NaCl 尿素酶 3% NaCl urease	+	+
木糖 Xylose	-	-
3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine decarboxylase	+	+
3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase	+	+
3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl arginine dihydrolase	-	-
3% NaCl MR-VP	-	-
3% NaCl 明胶 3% NaCl gelatine	+	+
西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	+	+
3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl hydrothion produce	-	-
半固体琼脂 Semi-solid agar	-	-

注: “-”: 阴性; “+”: 阳性

Note: ‘-’: Negative; ‘+’: Positive

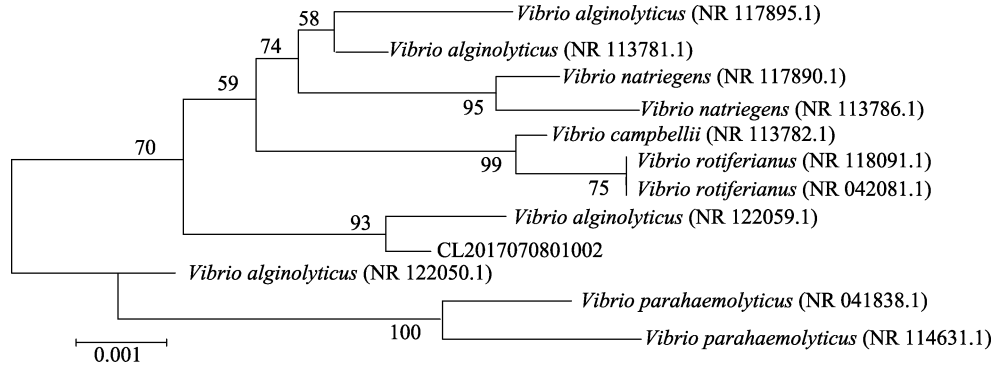


图 5 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 CL2017070801002 的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of CL2017070801002 and *V. alginolyticus* based on 16S rDNA sequence

表 3 菌株 CL2017070801002 对抗菌药物的敏感性

Tab.3 Sensitivity of the strain CL2017070801002 to antibacterial drugs

药物 Drug	剂量 Contents per piece (μg)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感度 sensitivity	药物 Drug	剂量 Contents per piece (μg)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)	敏感度 sensitivity
青霉素 Penicillin	10	0	R	氟罗沙星 Fleroxacin	5	27	S
氯霉素 Chloramphenicol	30	22	S	克拉霉素 Clarithromycin	15	15	I
菌必治 Ceftriaxone	30	22	S	阿米卡星 Amikacin	30	12	R
利福平 Rifampicin	15	22	S	庆大霉素 Gentamycin	10	14	I
红霉素 Erythrocin	15	16	I	阿奇霉素 Azithromycin	15	20	S
新霉素 Neomycin	30	12	R	新生霉素 Novobiocin	30	24	S
链霉素 Streptomycin	10	8	R	卡那霉素 Kanamycin	30	12	R
吡哌酸 Pipemidic	30	17	R	二甲胺四环 Minocycline	30	27	S
萘啶酸 Nalidixic acid	30	24	S	强力霉素 Doxycycline	30	21	S
四环素 Tetracycline	30	22	S	苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	24	S	氨苄青霉素 Ampicillin	10	0	R
头孢他啶 Ceftazidime	30	20	S	多粘菌素 B Polymyxin B	300U	0	R
氟哌酸 Norfloxacin	10	24	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	18	R
头孢氨苄 Cefalexin	30	0	R	头孢氨噻 Cefotaxime	30	21	S
头孢唑林 Cefazolin	30	14	R	罗美沙星 Lomefloxacin	18	24	S
头孢唑肟 Ceftizoxime	30	22	S	恩诺沙星 Enrofloxacin	10	23	R
头孢拉定 Cefradine	30	0	R	氟苯尼考 Florfenicol	30	23	S

注：“R”：耐药；“M”：中度敏感；“S”：高度敏感

Note: ‘R’: Resistance; ‘M’: Intermediate; ‘S’: Sensitivity

### 3 讨论

本研究从患黑褐病长茎葡萄蕨藻中分离得到1株优势菌 CL2017070801002, 在 TCBS 琼脂平板上为黄色, 边缘透明, 中间隆起, 有黏性, 革兰氏染色为阴性; 经电镜负染, 观察到菌株呈短杆状, 端生单鞭毛; 氧化酶反应阳性。经人工回接感染, 藻体出现与自然患病相同的症状, 证实该菌对长茎葡萄蕨藻具有较强的致病力。综合生理生化特征分析, 16S rDNA 基因序列比对分析等方法将该菌株鉴定为溶藻弧菌。

由弧菌引起的海洋生物疾病, 流行面积广, 发病率高, 给养殖业造成了巨大危害, 长期以来是水产领域研究的一大热点(杨少丽等, 2005)。溶藻弧菌具有较强的致病力, 林业杰等(1998)报道了溶藻弧菌含有多种致病因子, 近年来, 在养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鱼类和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中发现有溶藻弧菌感染的病例(金珊等, 2003; 姜燕等, 2016; 苗鹏飞, 2018), 本研究首次报道了在长茎葡萄蕨藻养殖过程中溶藻弧菌作为潜在的致病菌感染藻体的案例, 溶藻弧菌感染范围正不断扩大, 应当引起重视。细菌粘附于宿主细胞表面是机体感染致病的先决条件(戴卓捷等, 2001)。利用扫描电镜观察溶藻弧菌对长茎葡萄蕨藻的侵染过程, 发现感染初期, 藻体的细胞壁表面出现少量的细菌; 随着感染加重, 藻体细胞壁表面聚集大量细菌, 细胞壁逐渐被破坏, 同时给线虫、簇虫和杂藻等附着物提供有利环境, 使其快速生长繁殖, 导致藻体细胞组织逐渐破裂, 直至死亡。

细胞壁是抵抗病原菌入侵的第一道屏障, 在养殖环境中, 线虫、簇虫和杂藻等附着物对藻体造成的机械损伤可能是该菌株侵染的先决条件。韩宝芹等(1997)报道海带配子体的细胞壁中含有大量的褐藻胶及各种多糖类物质, 褐藻酸降解菌会产生褐藻酸酶, 可以分解利用作为细胞壁填充物质的褐藻胶, 使细胞间质变得松弛, 并导致藻体软化。彭艳婷(2012)研究发现, 细菌首先侵染海带配子体细胞的细胞壁, 破坏细胞壁后侵入原生质体, 并利用其中的营养物质进行生长和繁殖, 当配子体细胞内的营养物质不足以维持其生长繁殖时, 便从细胞壁中涌出, 寻找新的营养物质, 最后导致配子体细胞的破碎、死亡。

Zanetti 等(2000)研究发现, 溶藻弧菌可粘附在上皮细胞(Hep-2 和 Caco-2)上。Baffone 等(2001)研究了20株溶藻弧菌对 Hep-2 细胞的粘附情况, 其中, 有11株菌对其有较强的粘附作用。大多数革兰氏阴性菌在宿主细胞上的粘附受体是糖蛋白或糖脂, 其受体

特异性部位往往是其中的糖类残基(陈强等, 2006), 而长茎葡萄蕨藻中多糖含量较为丰富(姜芳燕等, 2014), 与其容易受到溶藻弧菌的感染密切相关。本研究结果证实, 藻体受到创伤后, 创伤部位先出现大量病原菌粘附和繁殖, 进而造成藻体组织严重损害, 最终导致整个藻体死亡溃烂。由此推断, 藻体细胞壁的多糖含量较为丰富, 容易遭受细菌粘附, 随着感染时间的加长, 细菌首先侵染藻体细胞壁, 抵抗病原菌入侵的第一道屏障被破坏, 细菌会继续寻找藻体中新的营养物质进行生长繁殖, 最后导致藻体细胞的破碎、死亡。

综上所述, 对于溶藻弧菌引起的长茎葡萄蕨藻黑褐病防控要重点从控制养殖系统中的病原菌数量入手。在实验室条件下,  $10^5$  CFU/ml 浓度溶藻弧菌感染长茎葡萄蕨藻, 第10天即可导致出现明显病变, 浓度越高, 发病时间越短, 发病程度越大。因此, 可在长茎葡萄蕨藻养殖生产中监控溶藻弧菌等病原的数量在  $10^4$  CFU/ml 以下, 如果监测到其病原的数量在  $10^4$  CFU/ml 以上, 可采取紫外处理水体、使用一些安全的消毒剂等手段(刘志轩等, 2006)及时预防黑褐病的发生。对于藻体病害, 正确选择和使用消毒剂尚待深入研究, 以期得到最佳消毒效果。

### 参 考 文 献

- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, *et al.* Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001, 18(5): 479-488
- Chen Q, Yan QP, Ma S. Progress on pathogenicity research of *Vibrio alginolyticus*. *Marine Sciences*, 2006, 30(8): 83-89 [陈强, 鄢庆彬, 马旻. 溶藻弧菌致病性研究进展. *海洋科学*, 2006, 30(8): 83-89]
- Dai ZJ, Yang GM, Wang ZQ. Molecular structure and assembly mechanism of bacterial adhesins. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2001, 29(3): 55-59 [戴卓捷, 杨光明, 汪正清. 细菌粘附素的分子结构和装配机制. *微生物学免疫学进展*, 2001, 29(3): 55-59]
- Dong XZ, Cai MY. Common bacterial system identification manual. Beijing: Sciences Press, 2001, 107-116 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 107-116]
- Evans AS. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 1976, 49(2): 175-195
- Fan WH, Huang J, Wang XH, *et al.* Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 665-670 [范文辉, 黄



- 健, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2005, 45(5): 665–670]
- Guo H. Effect of temperature, irradiance on the growth of the green alga *Caulerpa lentillifera*, (Bryopsidophyceae, Chlorophyta). Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences University, 2014 [郭辉. 海葡萄(*Caulerpa lentillifera*) 切断组织再生培养及发育条件研究. 中国科学院大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Han BQ, Liu WS, Dai JX, *et al.* Culture conditions of alginate-degrading bacteria and the separation of cells of brown algae by alginase. Marine Sciences, 1997, 21(2): 39–43 [韩宝芹, 刘万顺, 戴继勋, 等. 褐藻酸降解菌的发酵培养及褐藻酸酶对褐藻细胞的解离作用. 海洋科学, 1997, 21(2): 39–43]
- Hang JH. Effects of concentrations of nitrogen and phosphorus and different culture methods on the growth of *Caulerpa lentillifera*. Journal of Fujian Fisheries, 2012, 34(5): 416–419 [黄建辉. 氮磷浓度及培养方式对长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*)生长的影响. 福建水产, 2012, 34(5): 416–419]
- Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition. US: Lippincott Williams and Wilkins, 1994, 482–484
- Jiang FY, Song WM, Yang N, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient content of *Caulerpa lentillifera*. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(24): 356–359 [姜芳燕, 宋文明, 杨宁, 等. 海南长茎葡萄蕨藻的营养成分分析及评价. 食品工业科技, 2014, 35(24): 356–359]
- Jiang Y, Cui XC, Zhang Z, *et al.* Epizootic and aetiological study on the enteritis disease in cultured *Scophthalmus maximus*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(17): 123–126 [姜燕, 崔晓翠, 张正, 等. 养殖大菱鲆肠炎病的流行病学和病原学研究. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 123–126]
- Jin S, Cai WQ, Yu H, *et al.* Studies on cell pathology of *Vibrio alginolyticus* disease to large yellow croakers. Marine Sciences, 2003, 27(2): 59–62 [金珊, 蔡完其, 於宏, 等. 大黄鱼溶藻弧菌病细胞病理变化的初步研究. 海洋科学, 2003, 27(2): 59–62]
- Kudaka J, Itokazu K, Taira K, *et al.* Investigation and culture of microbial contaminants of *Caulerpa lentillifera* (Sea grape). Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2008, 49(1): 11–15
- Liang ZR, Wang X, Wang FJ, *et al.* The key technology of factory culture of *Caulerpa lentillifera*. Scientific Fish Farming, 2016(2): 42–43 [梁洲瑞, 王欣, 王飞久, 等. 长茎葡萄蕨藻的工厂化养殖关键技术. 科学养鱼, 2016(2): 42–43]
- Lin YJ, Dong XP, Ou JM, *et al.* Study on pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*. Strait Journal of Preventive Medicine, 1998(4): 1–2 [林业杰, 董新平, 欧剑鸣, 等. 溶藻弧菌的致病性研究. 海峡预防医学杂志, 1998(4): 1–2]
- Liu ZX, Wang YG, Zhang Z, *et al.* Germicidal effect of several disinfectants on the pathogenic bacteria of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 112–119 [刘志轩, 王印庚, 张正, 等. 几种消毒剂对凡纳滨对虾致病性弧菌的杀灭作用. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 112–119]
- Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, *et al.* Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(1): 75–80
- Miao PF, Yang Y, Tan SW, *et al.* Identification and antibiotic susceptibility of pathogenic bacterium *Vibrio alginolyticus* from diseased giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries Science, 2018, 37(3): 384–388 [苗鹏飞, 杨映, 谭淑雯, 等. 罗氏沼虾致病性溶藻弧菌的鉴定及药敏分析. 水产科学, 2018, 37(3): 384–388]
- Niwano Y, Beppu F, Shimada T, *et al.* Extensive screening for plant foodstuffs in Okinawa, Japan with anti-obese activity on adipocytes *in vitro*. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64(1): 6–10
- Peng YT. Bacterial pathogen infecting gametophytes of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [彭艳婷. 一种海带配子体新病害的病原性质及侵染规律的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Saito H, Xue CH, Yamashiro R, *et al.* High polyunsaturated fatty acid levels in two subtropical macroalgae, *Cladosiphon okamuranus* and *Caulerpa lentillifera*. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 665–673
- Titlyanov EA, Titlyanova TV, Pham VH. Stocks and the use of economic marine macrophytes of Vietnam. Russian Journal of Marine Biology, 2012, 38(4): 285–298
- Xu Y. Study on etiology, histopathology of dark-body diseases in cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) and variance of microbial community structure under antibiotic intervention. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [许燕. 养殖斑石鲷黑身病的病原病理学及药物干预下肠道菌群结构分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Yang SL, Wang YG, Dong SG. Progress of research on vibriosis in marine cultured fish. Marine Fisheries Research, 2005, 26(4): 75–83 [杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75–83]
- Zanetti S, Deriu A, Volterra L, *et al.* Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità, 2000, 12(6): 487–491
- Zhang Y, Lin B. "Green caviar" industry prospects. New Rural Technology, 2016(10): 41–42 [张颖, 林冰. “绿色鱼子酱”产业前景看好. 农村新技术, 2016(10): 41–42]

## Etiology of Black-Brown Disease in Cultured *Caulerpa lentillifera*

ZHANG Yannan<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2</sup>, LIU Fuli<sup>2</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>,  
LIANG Zhourui<sup>2</sup>, YU Yongxiang<sup>2</sup>, RONG Xiaojun<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pilot National Laboratory for Marine Sciences and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** *Caulerpa lentillifera* is a seaweed species with increasing large-scale economic value due to its nutritional and health benefits. With the expansion of farming scale, problems associated with various diseases are becoming more common and severe. However, few research focusing on this topic have been published. In this study, the strain CL2017070801002 was isolated from *C. lentillifera*, which was diagnosed with black-brown disease in Dalian's breeding farm. Following infection of healthy *C. lentillifera* with this strain at a concentration of  $10^3\sim 10^8$  CFU/ml, each experimental group developed different black-brown lesions within 7 days. Under scanning electron microscopy, a large number of bacteria were accumulated on the cell surface of the alga, and the cells ruptured and died over time. These results indicated that CL2017070801002 was the causative pathogen of black-brown disease of *C. lentillifera*. Using gram staining as well as physiological and biochemical characteristics based on a 16S rDNA phylogenetic tree, the strain was identified as *Vibrio alginolyticus*. CL2017070801002 was highly sensitive to chloramphenicol, tetracycline, fleroxacin, doxycycline, and florfenicol; moderately sensitive to gentamicin and clarithromycin; and not sensitive to penicillin and cephalosporin. These results will provide useful information for the prevention and control of bacterial diseases of *C. lentillifera*.

**Key words** *Caulerpa lentillifera*; Black-brown disease; *Vibrio alginolyticus*

① Corresponding author: RONG Xiaojun, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn