

段魏魏,申 慧,魏冬梅,等. 鱼类水霉病病原菌 LY04 对环境及营养的适应性[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):190-194.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.033

鱼类水霉病病原菌 LY04 对环境及营养的适应性

段魏魏,申 慧,魏冬梅,王咏星

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:以标准菌株 ATCC 26116 为对照组,采用单因素试验方法分别探讨菌株 LY04 对温度、pH 值、盐度的环境适应性以及对碳源、氮源的营养适应性。结果显示,菌株 LY04 与对照株在 10~30 ℃ 的温度范围、5~9 的 pH 值范围内均可生长,但二者在相同环境条件下生长速率差异显著,LY04 较对照株对温度、pH 值的适应性差,盐度适应性优于对照株;二株菌对营养的要求差异显著,在相同营养条件下,LY04 菌株生长速率显著快于对照株,试验株对寡营养适应性优于对照株; $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 在质量浓度 0.1%~0.3% 范围内对二株菌生长均有促进作用, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 对菌株 LY04 的生长有抑制作用,在 0.1% 质量浓度下可以促进对照株的生长,其余浓度也表现出明显的抑制作用。综上,菌株 LY04 具有很好的环境适应性和营养适应性,这些适应性都与新疆独特的水域环境相适应。

关键词:水霉;病原菌;环境;营养;适应性

中图分类号: S941.43⁺¹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0190-04

水霉病是各种水产养殖中广泛存在的一种寄生性疾病,是防治难度最大的鱼类病害之一,每年给养殖业带来巨大的经济损失^[1-2]。由于其特效防治药物孔雀石绿的禁用,其危害更加普遍和严重^[3-4]。目前,硫酸铜、臭氧、福尔马林、重氢硫酸盐等各种化学试剂及各种中草药、微生物抗菌剂广泛用于水霉病防治,但大多只起到预防作用^[5-11]。在寻找水霉病防治的有效途径时,了解其病原是必须的。研究认为,水霉病的病原常见的有水霉、绵霉和腐霉^[12-13],具有多样性,对寄主无严格选择性。

国内外大量学者对水霉病病原菌生理特性的研究表明,其环境适应范围广,5~32 ℃ 温度范围^[14-16]、4~11 的 pH 值范围^[17-18]、3.5% 以内的氯化钠^[14,19-21]含量条件下均可生长。新疆独特的气候特点使鱼类在历经严冬后的初春易患水霉病,鱼类水霉病的病情较我国其他地区更为严峻,而目前未见相关研究见诸于众。本研究对新疆五家渠地区水霉病病原菌的环境适应性进行探讨,以期了解病原进而找到合适的防治水霉病药物提供数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 菌种:LY04,从五家渠患水霉病鲢鱼肌肉及体表分离获得,根据形态学及生理学特征鉴定为水霉目、水霉科、水霉属^[22];标准菌株,多子水霉(*saprolegnia fex*) ATCC 26116,购自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖培养基(pH 值 7.0),用于水霉的培养及环境适应性试验;沙堡氏琼脂培养基(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,琼脂 15 g,纯净水 1 000 mL,pH 值 5.6±0.2),用于营养适应性试验。

1.2 试验方法

1.2.1 环境适应性试验方法

1.2.1.1 温度对水霉菌生长的影响 用微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上,轻轻打取长势较旺的水霉菌菌落后重新接种在新的 PDA 培养基中央。然后分别置于 10、15、20、25、30 ℃ 下恒温培养 72 h,用十字交叉法测量菌落直径(mm),计算生长率(%)。每组重复 3 次,用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。

1.2.1.2 pH 值对水霉菌生长的影响 配制 PDA 培养基,常规灭菌后,用 3 mol/L HCl 和 3 mol/L NaOH 调节 pH 值分别为 5、6、7、8、9。采用微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上,轻轻

收稿日期:2018-12-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560047)。

作者简介:段魏魏(1985—),女,甘肃人,博士研究生,主要从事微生物学研究。E-mail:371900188@qq.com。

通信作者:王咏星,硕士,副教授,主要从事水生生物研究。E-mail:wyxing65@126.com。

打取长势较旺的水霉菌菌落后重新接种在灭过菌的不同 pH 值的 PDA 培养基中央。然后置于 25 ℃ 下恒温培养 72 h。用十字交叉法测量菌落直径 (mm), 计算生长率 (%)。每组重复 3 次。用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。

1.2.1.3 盐度对水霉菌生长的影响 用微生物平板打孔器在培养有水霉菌 PDA 培养基上, 轻轻打取长势较旺的水霉菌菌落后, 分别接种于含 NaCl 质量分数为 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的 PDA 平板中央, 然后置于 25 ℃ 恒温培养 48 h 后, 用十字交叉法测量菌落直径 (mm), 计算生长率 (%)。每组重复三次, 用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。

1.2.2 营养条件适应性试验方法

1.2.2.1 葡萄糖对水霉菌生长的影响 采用灭过菌的微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上, 轻轻打取长势较旺较一致的水霉菌菌落后, 接种在葡萄糖质量浓度为 0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的沙堡氏琼脂培养基 (去掉了葡萄糖组分) 中央。然后置于 25 ℃ 温度条件下恒温培养, 分别观察 24、48、72 h 的生长情况并用十字交叉法测量菌落直径, 每组 3 个平行。

1.2.2.2 蛋白胨对水霉菌生长的影响 采用灭过菌的微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上, 轻轻打取长势较旺较一致的水霉菌菌落后, 接种在蛋白胨质量浓度为 0.0%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9% 的沙堡氏琼脂培养基 (去掉了蛋白胨组分) 中央。然后置于 25 ℃ 下恒温培养, 分别观察 24、48、72 h 的生长情况并用十字交叉法测量菌落直径, 每组 3 个平行。

1.2.2.3 硫酸铵对水霉菌生长的影响 采用灭过菌的微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上, 轻轻打取长势较旺较一致的水霉菌菌落后, 接种在含硫酸铵质量浓度为 0.0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的沙堡氏琼脂培养基中央, 后置于 25 ℃ 下恒温培养, 分别观察 24、48、72 h 的生长情况并用十字交叉法测量菌落直径, 每组 3 个平行。

1.2.2.4 硝酸钾对水霉菌生长的影响 采用灭过菌的微生物平板打孔器在培养有水霉菌的 PDA 培养基上, 轻轻打取长势较旺较一致的水霉菌菌落后, 接种在含硝酸钾质量浓度为 0.0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的沙堡氏琼脂培养基中

央。然后置于 25 ℃ 下恒温培养, 分别观察 24、48、72 h 的生长情况并用十字交叉法测量菌落直径, 每组 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 环境适应性结果

2.1.1 温度对水霉菌生长的影响 微生物的生长繁殖有其适宜的温度范围, 培养温度过高或过低, 都会造成微生物生长缓慢, 甚至导致微生物的死亡。温度对 2 株水霉菌生长的影响见图 1。由图 1 可知, 菌株 LY04 及标准菌在 10 ~ 30 ℃ 范围内均可生长。菌株 LY04 在 25 ℃ 达到最大生长速率, 标准菌株在 20 ℃ 和 25 ℃ 时生长最好且其生长速率在同温度下高于菌株 LY04。

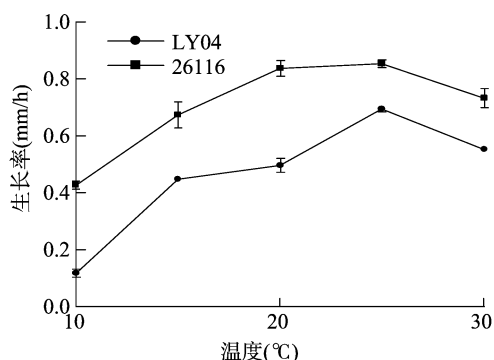


图1 温度对水霉菌生长的影响

2.1.2 pH 值对水霉菌生长的影响 pH 值对微生物的影响是多方面的, 它不仅影响微生物对物质的吸收能力, 还可以影响酶的活性。过酸或过碱的环境会导致微生物生长缓慢甚至导致微生物死亡。pH 值对 2 株水霉菌生长的影响见图 2。由图 2 可知, 菌株 LY04 和标准菌在 pH 值 5 ~ 9 范围内均可生长, 对于酸碱环境的适应性较强, 菌株 LY04 在 pH 值 = 7 时生长最好, 标准菌在 pH 值 = 6 时生长最好。在相同 pH 值条件下, 标准菌株的生长速率高于菌株 LY04; 但试验菌株对酸碱变化更敏感。

2.1.3 盐度对水霉菌生长的影响 海水中鱼类水霉病的发生率很低, 如受水霉菌感染的鳟鱼, 当回到海水时, 水霉病症状逐渐消失, 说明水霉病原菌对盐度敏感。盐浓度对 2 株水霉菌生长的影响, 由图 3 可知, 菌株 LY04 在 NaCl 质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 时生长被促进, 而在 NaCl 质量分数为 2.5% 时生长被抑制, 最适 NaCl 质量分数为 1.5%; 标准菌株在 NaCl 质量分数为 0.5% ~ 2.0%

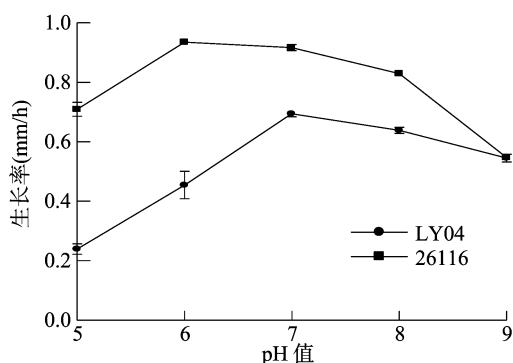


图2 pH值对水霉菌生长的影响

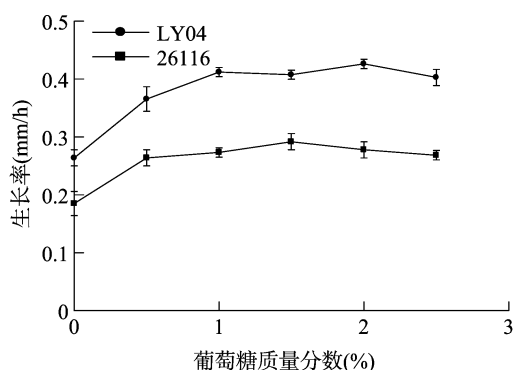


图4 葡萄糖对水霉菌生长的影响

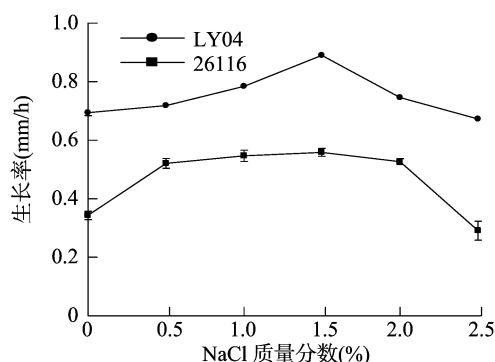


图3 渗透压对水霉菌生长的影响

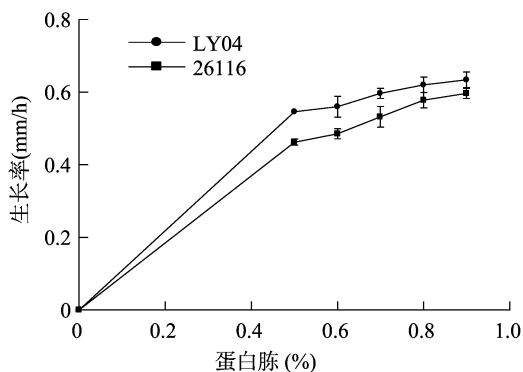


图5 蛋白胨对水霉菌生长的影响

范围内生长几乎不受影响,当盐度达 2.5% 时生长显著被抑制。在相同盐度条件下,试验株的生长速率显著高于对照株。

2.2 营养条件适应性试验结果

2.2.1 葡萄糖对水霉菌生长的影响 葡萄糖不仅为生物的生长提供细胞的碳架,还提供细胞生命活动所需要的能量。在微生物的培养基中一般都过量添加葡萄糖,但过量的葡萄糖对微生物的生长是有影响。葡萄糖对 2 株水霉菌生长的影响见图 4。由图 4 可知,在不添加葡萄糖时蛋白胨中的碳源就可使 2 个菌株生长,在有蛋白胨的培养基中只需添加少量葡萄糖即可使水霉菌生长旺盛(0.5% 与对照相比 $P < 0.05$)。在相同条件的同一葡萄糖浓度下,菌株 LY04 的生长较标准菌株旺盛。

2.2.2 蛋白胨对水霉菌生长的影响 氮是微生物必需的营养物质之一,蛋白胨主要作为氮源用于微生物的培养。蛋白胨对 2 株水霉菌生长的影响见图 5。由图 5 可知,2 株菌在不添加蛋白胨时均不生长;菌株 LY04 在 0.5% 的蛋白胨下,生长速率显著提高,0.8% 时达到饱和;标准菌在 0.7% 的蛋白胨下,生长速率显著提高,0.8% 时达到饱和。在相同条件的同一低浓度蛋白胨下,菌株 LY04 生长较标准菌旺盛。

2.2.3 硫酸铵对水霉菌生长的影响 众多研究表明,真菌生长时对不同形态的氮盐利用效率不同。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 以还原态形式存在,添加在培养基中主要增加还原态的氮。硫酸铵对 2 株水霉菌生长的影响见图 6。由图 6 可知,0.1% ~ 0.3% 浓度范围的硫酸铵对 2 株菌的生长起促进作用,硫酸铵浓度高于 0.5% 时开始抑制菌株生长,即 2 株菌在一定浓度范围内对铵态氮有偏好。相同条件同一浓度硫酸铵条件下,2 株菌生长差异不明显。

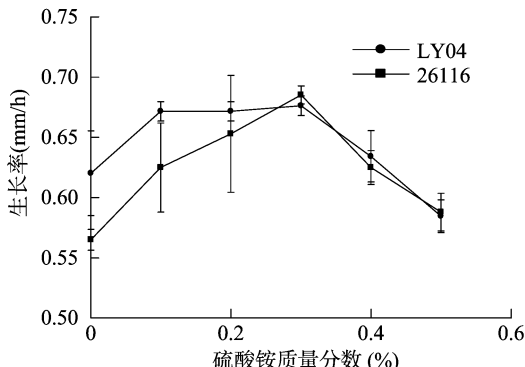


图6 硫酸铵对水霉菌生长的影响

2.2.4 硝酸钾对水霉菌生长的影响 硝态氮是氮元素的另外一种存在形式,为氧化态氮。在培养基中添加硝酸钾,主要增加氧化态的氮。硝酸钾对 2 株水霉菌生长的影响见图 7。由图 7 可知,添加硝

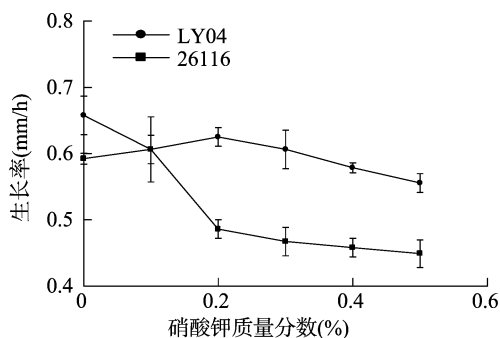


图7 硝酸钾对水霉菌株生长的影响

酸钾菌株 LY04 的生长受到抑制;标准菌株仅在 0.1% 的硝酸钾条件下生长稍有促进,增加浓度其生长被抑制菌。

3 讨论

3.1 水霉病原菌的环境适应性

试验菌株 LY04 在 10 ~ 30 ℃ 温度范围、5 ~ 9 的 pH 值范围内均可生长,对温度和 pH 值的适应性较广。与标准菌株相比,温度、pH 值对试验菌株 LY04 影响更大,在相同的温度、pH 值条件下,试验菌株的生长速率要慢于标准株,当温度达到适温时,试验菌株生长迅速增快,这与鱼类水霉病的发生有对应关系,说明试验菌株对新疆独特的水域环境有高度的适应性。在初春时节,鱼类由于越冬时的冻伤易感水霉病,但病情发展缓慢,这与此时温度较低,水霉菌生长缓慢相关;初夏时节,在鱼类繁殖期,水霉菌大量侵袭鱼卵,造成水霉病暴发,此时池塘水温恰与水霉菌最适生长温度一致。在相同的外界条件下,菌株 LY04 对盐度较标准菌有更好的忍耐性,生长速率均好于标准株,说明试验菌株对盐度也有更好的适应性。新疆的气候条件导致新疆水域环境较高的盐碱度,从分离获得的菌株来看,新疆水霉病原菌都具有良好的盐碱抵抗力,因而在新疆鱼类水霉病的防治难度更大。

3.2 水霉病原菌的营养适应性

水域环境条件对于微生物生长来讲应该属于贫营养,通过营养条件适应性试验发现,水霉病原菌对营养条件的要求确实较低,2 株菌在不存在任何形式的糖时仍可生长;对氮源的要求也很低,低浓度的蛋白胨就可以使 2 株菌迅速生长,说明 2 株菌对贫营养的适应性都较好,相对而言,试验菌株 LY04 在相同营养条件下生长速率明显高于标准菌株,说明试验菌株在贫营养环境中更易生长。新疆水域由于盐碱度较大,生物丰富度相对小,因此水

域的营养条件相对贫瘠,试验菌株对贫营养的耐受恰好与此吻合。

3.3 不同形式氮源的存在对水霉病原菌的影响

氮作为地球上存在最多的元素,可以氧化态、还原态、氧化-还原态多种形式存在。许多研究都表明,生物可以利用不同形式的氮源。对于水霉病原菌而言,尚未见此方面的研究报道。本研究在添加了蛋白胨的培养基中分别添加硫酸铵、硝酸钾,以便探讨试验菌株对不同形式的氮的利用情况。由结果可知,2 株菌都表现出了对铵态氮的更好利用,硝态氮则表现出了抑制作用。水域环境由于溶解氧的限制,一般处于还原状态,2 株菌都能更好地利用还原态氮——铵态氮,也说明水霉病原菌对水环境的良好适应性。

综上所述,发现试验菌株具有很好的环境适应性和营养适应性,这些适应性都与新疆独特的水域环境相适应;对照菌株也表现出了较强的适应性,这也许是鱼类水霉病广泛发生的主要原因。

参考文献:

- [1] Tampieri M P, Galuppi R, Carelle M S, et al. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica* [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2003, 41 (8) : 584 - 591.
- [2] 孟思好, 孟长明, 陈昌福. 鱼类水霉病的发生原因与预防措施 [J]. *渔业致富指南*, 2016 (15) : 60 - 61.
- [3] 王发荣. 水库鱼种水霉病综合防治 [J]. *农业与技术*, 2017, 37 (14) : 112.
- [4] 黎姆梅. 水产养殖中水霉病的防治 [J]. *科学养鱼*, 2017 (2) : 91.
- [5] Forneris G, Bellardi S, Palmegiano G B, et al. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegnias incidence [J]. *Aquaculture*, 2003, 221 (1/2/3/4) : 157 - 166.
- [6] Straus D L, Farmer B D, Ledbetter C K, et al. Use of copper sulfate to control egg saprolegnias at a commercial sunshine bass hatchery [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2016, 78 (3) : 243 - 250.
- [7] Giesecker C M, Serfling S G, Reimschuessel R. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253 (1/2/3/4) : 120 - 129.
- [8] Ali E H. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action [J]. *Mycopathologia*, 2005, 159 (2) : 231 - 243.
- [9] 宋学宏, 陈葵, 王永玲, 等. EM 及重氢硫酸盐对黄颡鱼卵孵化中水霉的抑制作用 [J]. *淡水渔业*, 2007, 37 (1) : 9 - 12, 18.
- [10] 刘永涛, 艾晓辉, 杨秋红, 等. 15 种中草药超临界 CO₂ 流体萃取物对 2 种水霉菌的抑制作用研究 [J]. *淡水渔业*, 2015, 45 (3) : 40 - 45.

李诗琴,于洪柱,刘艺杉,等. 混合盐碱胁迫对 16 个紫花苜蓿品种萌发期的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):194-198.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.034

混合盐碱胁迫对 16 个紫花苜蓿品种萌发期的影响

李诗琴^{1,2}, 于洪柱¹, 刘艺杉³, 王志锋¹

[1. 吉林省农业科学院, 吉林公主岭 136100; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林长春 130118;
3. 克劳沃(北京)生态科技有限公司, 北京 100000]

摘要:采用培养皿纸上发芽法,用 3 个浓度的混合盐碱溶液(30、40、50 mmol/L)以及对照对 16 个紫花苜蓿品种进行萌发试验,测定其发芽率、发芽势、胚芽和胚根长度,并通过隶属函数标准差赋予权重法进行综合评价。结果表明,盐碱浓度 40 mmol/L 为紫花苜蓿受盐碱胁迫萌发的临界浓度;盐碱浓度 50 mmol/L 为紫花苜蓿萌发的极限浓度;供试紫花苜蓿的发芽率、发芽势、胚芽和胚根长度随着盐碱浓度的增加而不断降低,4 个指标与紫花苜蓿耐盐碱性相关性大小依次为发芽势 > 发芽率 > 胚根 > 胚芽;16 个紫花苜蓿品种的耐盐碱强弱依次为公农 1 号 > 惊喜 > 金皇后 > WL343HQ > 北极熊 > 公农 5 号 > 旱地 > 斯贝德 > 3010 > 阿尔冈金 > 先行者 > MT4014 > 巨能 2 > 驯鹿 > 巨能 7 > 英斯特。

关键词:紫花苜蓿;混合盐碱胁迫;萌发期;隶属函数值;权重法;耐盐碱;相关性;综合评价

中图分类号: S541⁺.103.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0194-05

土壤盐渍化已经成为了全球环境及农业发展的重要问题,我国约有盐碱地 667 万 hm^2 ^[1]。盐碱土中的可溶性盐主要分为中性盐与碱性盐,主要成分包括 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 等阳离子,及 CO_3^{2-} 、

HCO_3^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等阴离子^[2]。通常将中性盐胁迫称为盐胁迫,而将碱性盐胁迫称为碱胁迫,由 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 等碱性盐所造成的碱胁迫对植物所造成的危害远大于中性盐胁迫^[3]。因其土壤中的阴离子 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 会导致土壤 pH 值升高,是植物不仅受到盐胁迫,还会受到高 pH 值胁迫^[4]。

紫花苜蓿是一种优良的豆科牧草,叶片具有排盐机制,耐盐碱性较强,培育与筛选耐盐碱苜蓿品种是改良与利用盐碱地的重要措施^[5]。据报道,紫花苜蓿品种间耐盐性差异较大,在种子萌发期对盐

收稿日期:2018-12-24

基金项目:吉林省科技发展规划(编号:20160203011NY);吉林省农业科技创新工程研究生基金。

作者简介:李诗琴(1994—),女,四川成都人,硕士研究生,从事饲草种质资源利用与评价研究。E-mail:leemumu2016@163.com。

通信作者:王志锋,研究员,博士,从事牧草资源研究。E-mail:wzf1223@163.com。

[11]宋增福,范斌,余林荣,等. 一株具水霉抑制特性的芽孢杆菌筛选及其分子生物学鉴定[J]. 淡水渔业,2012(3):28-31.

[12]Hcaeva H M,李永芳. 鱼类的霉菌病[J]. 国外水产,1993(3):13-16.

[13]王立宝,刘文霞,左万星,等. 松萝酸对 3 种水霉病致病菌的抑菌作用[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2017,41(4):354-357.

[14]Hatai K, Willoughby L G, Beakes G W. Some characteristics of saprolegnia obtained from fish hatcheries in Japan[J]. Mycological Research, 1990, 94(2):182-190.

[15]Koeypudsa W, Phadee P, Tangtrongsripiros J, et al. Influence of pH, temperature and sodium chloride concentration on growth rate of *Saprolegnia* sp. [J]. Journal of Scientific Research at Chulalongkorn University, 2005, 30(2):123-130.

[16]甄珍,王获,刘红柏,等. 山女鳟水霉病原的分离鉴定及其

生物学特性[J]. 江西农业大学学报,2015,37(2):333-338.

[17]熊刚,尹思璐,梁永增,等. 河鲈水霉病原菌的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(8):3411-3413,3439.

[18]夏文伟,曹海鹏,王浩,等. 彭泽鲫卵源致病性水霉的鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报,2011,38(1):57-62.

[19]杨伟杰,薛鹏伟,邵伟,等. 大西洋鲑水霉病盐浴治疗初步研究,河北渔业 2017(2),37-39

[20]Hussein M M A, Hatai K. Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreak of salmonid saprolegniosis in Japan[J]. Fisheries Science, 2002, 68:1067-1072.

[21]张书俊,杨先乐,李 聃,等. 施氏鲟水霉病原的初步研究[J]. 中国水产科学,2009,16(1):89-96.

[22]熊刚,黄奕童,王咏星. 新疆五家渠水霉病原菌多样性的初步研究[C]//第九届全国微生物学青年学者学术研讨会论文集. 武汉,2012.