

几种海洋微藻的无菌化培养*

AXENIZATION OF SEVERAL MARINE MICROALGAL CULTURES

林 伟

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 海洋微藻, 抗生素, 除菌

 纯种培养对研究海洋微藻的营养学、生理学及生物化学等是必不可少的。迄今国内研究和水产养殖中应用的海洋微藻藻种基本上未经无菌化, 不是纯种, 这使得研究工作难以深入, 是造成在上述领域研究中同国际存在差距的原因之一。因此, 无菌纯藻种的获得, 具有重要的现实意义。笔者利用微藻比细菌具有更强的抗生素耐受性的特点, 以抗生素为工具排除微藻培养液中的细菌, 成功获得了几种无菌海洋微藻纯藻种, 并对除菌中应注意的问题进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养方法

供除菌用藻种于1994年7月至1999年3月取自本所种质库及环保室, 系中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*)、锥状斯克利普藻 (*Sciphiella trochoidea*)、褐胞藻 (*Phaeocystis pouchetii*)、前沟藻 (*Amphidinium* sp.) 及扁藻 (*Platymonas* sp.) 1040 品系。

微藻培养液为 L_1 ^[2], 灭菌后备用。培养温度为 20 ± 1 °C, 光照度为 3 000 lx, 光暗比为 L:D=14 h:10 h。在藻种传代及培养过程中, 均严格遵循无菌操作规则。

1.2 微藻培养液中细菌排除方法

1.2.1 抗生素选择 (1) 抗生素对待除菌微藻生长影响的实验: 将青霉素、氯霉素、链霉素、庆大霉素及卡那霉素以藻培养液内 50, 100, 500, 1 000 IU/ml 的浓度分别加入各为 50 ml 的处于生长初期的待除菌微藻培养液内, 培养 6 d, 利用血球计数器计数藻细胞密度。同时以未加抗生素的微藻为对照。选取对微藻生长无明显影响的进行下一步实验。(2) 微藻培养液中细菌对抗生素敏感性实验: 将处于指数生长期

的各微藻适度稀释后, 取 0.1 ml 涂布于 2216 E 平板, 20 °C 培养 15 d。从涂布每种微藻的平板上挑取具有不同形态特征的菌落划线纯化后于 2216 E 斜面培养 48 h (22 °C)。将这些菌株以无菌海水制成菌悬液 (约 10^7 个/ml), 取 0.1 ml 涂布于 2216 E 平板, 将各含青霉素、链霉素、庆大霉素及卡那霉素的纸片 (直径 5.5 mm, 抗生素浓度为 25 IU/片) 平贴于平板表面, 平板置于 15 °C 过夜, 22 °C 培养 3 d。记录纸片周围抑菌圈直径。选择抑菌圈直径 ≥ 20 mm 的抗生素为除菌工具。

1.2.2 抗生素除菌 根据 1.2.1, 选取合适的抗生素按两种程序对各微藻进行无菌化处理。(1) 抗生素逐种加入: 100 ml 处于指数生长后期的各微藻培养液内加入青霉素 (藻培养液内最终浓度为 1 000 IU/ml), 培养 3 d; 将 10 ml 青霉素处理过的微藻加入 90 ml 无菌 L_1 培养液内, 按藻培养液内 1 000 IU/ml 加入庆大霉素, 培养 3 d; 将 10 ml 经上述两种抗生素处理过的微藻加入 90 ml 无菌 L_1 培养液内, 按藻培养液内 1 000 IU/ml 加入卡那霉素, 培养 3 d; 然后转无菌 L_1 培养液培养, 观察微藻生长状况。在每种抗生素处理 3 d 后, 取 1 ml 微藻培养液加入 5 ml 2216 E 内作细菌培养检测 (20 °C 培养 30 d)。(2) 抗生素混和加入: 将青霉素、庆大霉素及卡那霉素同时加入 100 ml 处于指数生长后期的各微藻中 (各种抗生素最终浓度均为 500 IU/ml), 培养 3 d; 将 10 ml 经抗生素处理过的微藻加

* 国家自然科学基金资助项目 39870574 号, 农业部重点科研项目渔 9513-96-06-06 号;

中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4012 号。

收稿日期: 2000-04-12; 修回日期: 2000-04-29

入 90 ml 无菌 L₁ 培养液内, 追加上述组合抗生素一次, 培养 3 d; 3 d 后转无菌 L₁ 培养液培养, 观察微藻生长状况。每次抗生素处理 3 d 后, 做细菌培养检测(方法同上)。

1.3 无菌检验

经两种除菌程序处理的各微藻通过细菌培养初步认定无菌后, 再经 5 次传代培养(按 1: 9 接种, 各代培养 10 d), 彻底消除残留抗生素影响, 进行无菌检验。

1.3.1 培养法 (1) 取已排除抗生素影响的微藻培养液 0.1 ml 涂布 2216 E 及真菌培养基平板(每种微藻涂布三板), 密封平板, 20 ℃ 培养 30 d, 观察有无细菌及真菌菌落出现。(2) 将上述微藻培养液 1 ml 加入各为 5 ml 的液体的改进 L₁, 2216 E 及真菌培养基内, 20 ℃ 培养 30 d, 观察培养液是否混浊(同未加藻液的微生物培养基对比)。

1.3.2 镜检法 取 1 ml 已排除抗生素影响的微藻培养液用吡啶橙染色 3 min(吡啶橙最终浓度为 0.01%), 抽滤于直径 25 mm 孔径为 0.2 μm 的无菌无颗粒的黑色核孔滤膜上。将滤膜置于载玻片上, 滴加一滴无自发荧光的显微镜油, 加盖玻片, 以落射荧光显微镜镜检有无细菌及真菌存在迹象。

1.4 微生物检测培养基

1.4.1 细菌检测培养基 2216 E 固、液体培养基; 改进 L₁ 培养基: 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.2 g, L₁ 培养液 1 000 ml。

1.4.2 真菌检测培养基 葡萄糖酵母膏固、液体培养基^[3]。

2 结果与讨论

2.1 微藻除菌

2.1.1 抗生素选择 实验结果表明, 氯霉素在 50 IU/ml 时, 即对 6 种微藻的生长产生明显影响(藻细胞密度均为对照的 10% 以下); 而其他 4 种抗生素即使在 1 000 IU/ml 时也对各待除菌微藻的生长影响不大(藻细胞密度都为对照的 75% 以上), 可用于微藻除菌中。通过平板分离纯化方法, 获得 26 株与微藻共存的细菌, 其中扁藻 1040 培养液内 4 株(A1 ~ A4), 中肋骨条藻培养液内 4 株(B1 ~ B4), 微小原甲藻培养液内 5 株(C1 ~ C5), 锥状斯克利普藻培养液内 4 株(D1 ~ D4), 前沟藻培养液内 4 株(E1 ~ E4), 褐胞藻培养液内 5 株(F1 ~ F5)。它们对抗生素的药敏测试的结果表明(见表 1), 链霉素抑菌圈直径无一超过 20 mm, 弃之。而青霉素、庆大霉素及卡那霉素均可对每种微藻培养液内至少一株细菌具有明显的抑制作用(抑菌圈直径 ≥ 20 mm), 选择它们做为排除微藻培养液内细菌的工具。

表 1 微藻培养液内细菌菌株的药敏测试

抑菌圈直径 (mm)	菌株			
	青霉素	链霉素	庆大霉素	卡那霉素
≥20	A1, A4, B2, B3, C1, C3, D3, E1, F1	无	A1, A3, B4, C1, C5, D1, E1, F3	A2, A4, B1, B3, C3, C5, D2, E2, E4, F4
11~19	A2, C5, E3, F3	A4, B4, C1, C2, D4, E4, F1, F3	B2, C4, D2, D4, E4, F2, F4	A3, B4, D1, D4, E3, F3, F5
≤10	A3, B1, B4, C2, C4, D1, D2, D4, F2, F4, F5	A1~A3, B1~B3, C3~C5, D1~D3, E1~E3, F2, F4, F5	A2, A4, B1, B3, C2, C3, D3, E2, E3, F1, F5	A1, B2, C1, C2, C4, D3, E1, F1, F2

2.1.2 细菌排除 (1) 抗生素逐种加入: 实验结果表明, 仅经青霉素、庆大霉素处理的 6 种微藻内都有细菌存在(褐胞藻加入庆大霉素 3 d 后立刻进行细菌培养检测, 发现无细菌存在迹象; 传代 3 次后, 细菌培养检测却表明藻培养液内又出现了细菌); 只有在加入卡那霉素后, 经细菌培养才可初步认为微小原甲藻、前沟藻及褐胞藻已无菌化, 其他 3 种微藻培养液

内仍有细菌存在; 6 种微藻生长良好。(2) 抗生素混和加入: 实验结果表明混合抗生素只处理一次, 6 种微藻培养液内都有细菌存在; 处理两次后, 经细菌培养检测初步认定扁藻 1040、中肋骨条藻、锥状斯克利普藻、微小原甲藻及前沟藻已无菌化; 微小原甲藻生长受到严重抑制(培养 40 d, 未发现藻生长迹象), 其他 5 种微藻生长良好。褐胞藻在混和抗生素连续处理 3 次



后(每隔3 d加混和抗生素于未传代的同一培养液),其培养液内细菌仍未有效排除。以上情况表明,高浓度的抗生素合用后对微小原甲藻的生长影响很大(虽然抗生素逐种加入过程中,微藻细胞也会遭遇不止一种抗生素,但先加入的抗生素经微藻传代而被稀释,且已过了数日,可能使抗生素协同抑制藻生长的能力大大下降);抗生素的合用也使排除褐胞藻培养液内细菌的能力下降,后经过补充实验发现各为1 000 IU/ml的上述3种抗生素合用不能将褐胞藻培养液中的细菌完全排除,进一步表明抗生素间确实存在相互拮抗;只有前沟藻可以经两种除菌程序处理为无菌藻种。

2.2 无菌检验

各微藻经抗生素处理初步认定无菌并经培养排除残留抗生素的影响后,微生物培养及镜检均表明6种微藻培养液内无细菌及真菌存在,6种微藻无菌化获得成功。另外,在除菌前,作者曾对待除菌的微藻进行了真菌培养检验(真菌培养基中加入浓度各为100 IU/ml的青霉素及庆大霉素),结果表明6种微藻培养液中均无真菌,否则要利用制霉菌素或两性霉素B等排除真菌。

2.3 微藻无菌化中应注意的问题

2.3.1 关于除菌用抗生素 理想的抗生素应具备两个特征:(1)具有高效抑(杀)菌活性;(2)对微藻细胞毒性低。由于抗生素的抗菌谱存在差异以及各微藻液中细菌群落结构特征不同,决定了不可能存在一种可用于所有微藻除菌的抗生素。因此为了提高除菌效果,尽量降低耐药菌株出现的机率,有必要采用药敏测试方法选择除菌抗生素。其次,还应该进行待除菌微藻对除菌抗生素耐受性实验,否则在除菌过程中会发生微藻细胞受到损伤及其生长被抑制的情况。总之,要选择合适的抗生素浓度及处理时间,如作者在此次微藻除菌实验时即采用藻细胞可耐受的较高的抗生素浓度(500~1 000 IU/ml)及较短的处理时间(3 d)以免出现耐药菌株和影响微藻生长。

2.3.2 关于抗生素除菌方法 青霉素通过抑制细胞壁的合成引起溶菌,它对生长旺盛的细菌有明显效果,而对静息细胞不明显;庆大霉素及卡那霉素则通过干扰蛋白质合成抑制细菌生长,此类抗生素在高浓度时也具有杀菌效果^[1]。Cottrell等1993年认为作用机制的不同可能导致合用抗生素间产生拮抗,因此他们在微藻除菌中采用了逐种抗生素加入法:根据青霉素的作用特性,将其做为第1种加入微藻培养液

的抗生素;而干扰细菌蛋白质合成的,如庆大霉素及卡那霉素等氨基环醇类抗生素应后加。根据这一技术路线,他们成功获得无菌的微藻 *Microcystis pusilla* 藻种。虽然如此,仍有许多文献报道不同作用机制的抗生素合用也可以有效地排除微藻培养液内的细菌(如 Droop, 1967; Divan 等, 1982; Boczar 等, 1988; Douglas 等, 1993; Chinain 等, 1995 所报道的)。因此,当抗生素逐种加入法除菌效果不理想时,可以考虑采取抗生素合用法。作者通过实验即发现抗生素逐种加入不能获得无菌的扁藻 1040、中肋骨条藻及锥状斯克利普藻,而同样的抗生素合用后这些藻培养液内的细菌可被完全排除,未发现抗生素间相互拮抗及抗生素合用后对微藻细胞毒性的增强。但抗生素合用于某些微藻,如褐胞藻时确实存在其除菌功能被削弱的现象。另外,微小原甲藻对合用抗生素耐受性的下降,也表明这种方法有其不足之外。总之,由于各微藻间以及以微藻为基础的各细菌群落间存在的差异,表明不可能有一种应用于所有微藻的有效除菌方法,具体情况应具体分析。

2.3.3 关于无菌检验 目前尚无一种通用的无菌检验方法。在做微生物培养检验时,应采用多种培养基同时进行,以增加发现未除掉的微生物的机率。最新研究结果表明,抗生素可“钝化”微藻培养液内某些细菌,使其处于一种不可培养状态;当消除抗生素的影响后,这类细菌会恢复生长 (Ferguson G. M. J. et al.. In: Harmful Algal Blooms (Abstracts). Tasmania, 2000, 115)。作者在对褐胞藻除菌时也发现了类似情况,因此,在无菌检测前应通过多次传代培养以完全排除残留抗生素,为可能存在的已“钝化”的细菌恢复生长创造条件。即便如此,经抗生素处理后的微藻培养液中仍然可能存在着不能培养的细菌,还必须进行镜检。荧光显微镜因能有效地检测出经吖啶橙染色后水样中的细菌,成为无菌镜检的首选。总之,应采取多种方法进行无菌检验,确保实验结果准确可靠。

参考文献

- 1 王 岳,方金瑞. 抗生素. 北京:科学出版社,1988. 76~116
- 2 Guillard, R. R. L.. Culture methods. In: Hallegraeff, G. M., et al., Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris: UNESCO's Workshops, 1995. 45~62
- 3 Kohlmeier, J. and Kohlmeier, E.. Marine Mycology. New York: Academic Press, 1979. 20

(本文编辑:张培新)