

# 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻 生长特点比较\*

林伟 陈驹 刘秀云

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于1995年4—12月在中国科学院海洋研究所进行微藻除菌及比较除菌与自然带菌微藻生长特点的研究。经平板培养排除霉菌后,利用组合抗生素(青霉素+卡那霉素+链霉素+庆大霉素)获得除菌球等鞭金藻、三角褐指藻及小球藻,对抗生素处理前后的微藻生长特点进行比较研究。结果表明,与未除菌时相比,除菌后的球等鞭金藻及小球藻不易老化(可保持良好悬浮30d以上);回加细菌于除菌藻,藻细胞下沉附底,说明细菌可促使微藻细胞老化。无维生素时,除菌后的球等鞭金藻生长更差,暗示未除菌的球等鞭金藻培养液内可能存在产(类)维生素细菌。除菌后三角褐指藻细胞形态发生一定变化,回加细菌后藻细胞形态有部分恢复。与未除菌时相比,除菌后三角褐指藻更能耐受高温(如30℃)。另外,某些抗生素能够刺激球等鞭金藻的生长。

**关键词** 微藻除菌 延迟老化 细菌作用

**学科分类号** Q938.8

微藻是海洋初级生产力的重要组成部分,是影响水产养殖的关键因素之一。以往该领域中研究的藻种实际上多为微藻和细菌(共存或污染)的混和体,不能准确地研究藻菌间相互作用,特别是不能探索藻细胞与某一特定细菌的相互关系。而以无菌藻为材料进行藻菌相互作用研究,因排除其他微生物的干扰,则可以真实反映藻类细胞与特定海洋细菌,特别是与藻密切相关的细菌及其群落的相互关系。因此,获得除菌微藻,是研究藻菌关系的关键。

由于藻和细菌对抗生素的敏感性有一定差异,因而可以利用抗生素除去与藻共存或污染的细菌(Spencer, 1952; Droop, 1967; Jones *et al*, 1973; Divan *et al*, 1982; Cottrell *et al*, 1993)。本文选取海水养殖中常用的几种饵料微藻为材料,以抗生素为工具排除微藻培养系统内细菌,维持无菌培养,研究比较微藻除菌前后生长特点,为今后探讨微藻和细菌的相互关系打下基础,以便更深入地研究利用饵料微藻资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种来源及培养方法

实验用藻种于1994年7月取自本所种质库,系球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)3011

\* 农业部重点科研项目合同资助项目,渔95-13-96-06-06号。林伟,男,出生于1963年12月,副研究员, E-mail: czhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1998-07-01,收修改稿日期:1999-06-17

品系、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)2038 品系及小球藻(*Chlorella* sp.)1061 品系。

微藻培养液按照大规模培养常用营养配方配制。金藻培养液营养盐组成为:在 1L 海水中加入  $\text{NaNO}_3$  60mg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.45mg、维生素  $\text{VB}_1$  100 $\mu\text{g}$ 、 $\text{VB}_{12}$  0.5 $\mu\text{g}$ 。三角褐指藻培养液营养盐组成为:在 1L 海水中加入  $\text{NaNO}_3$  60mg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.45mg、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot\text{XH}_2\text{O}$  0.45mg;小球藻培养液营养盐组成为:在 1L 海水中加入  $\text{NaNO}_3$  60mg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4mg、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  18mg、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.45mg;灭菌后备用。在藻种传代及培养过程中,均严格遵循无菌操作规则。培养温度为  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照度为 3000 lx,光暗周期比为 14h:10h。

## 1.2 微藻除菌方法

### 1.2.1 污染霉菌排除方法

按微藻培养营养配方配制藻营养盐琼脂(1.2%)培养基平板。利用血球计数器计数藻细胞,适度稀释微藻培养液(处于生长指数后期),吸取 0.1ml 稀释液涂布培养基平板,密封平板防止水分蒸发。荧光灯光照培养 30d,选取无霉菌平板,挑取藻落于新配制无菌微藻培养液中培养。

### 1.2.2 微藻除菌

(1)微藻培育系统内细菌对不同抗生素敏感测试-药敏纸片法 将多种抗生素均稀释至 10 000U/ml,然后用灭菌微量进样器各吸取 10 $\mu\text{l}$  分别加到预先准备的灭菌烘干圆形滤纸片(直径 5.5mm)上。

吸取 0.1ml 处于生长指数后期微藻培养液(小球藻)或稀释 10 倍后吸取 0.1ml(球等鞭金藻及三角褐指藻)涂布 2216E 琼脂培养基平板,将含有抗生素的圆形滤纸片贴在平板表面。将平板置于 4 $^\circ\text{C}$  冰箱过夜。25 $^\circ\text{C}$  培养 7d,培养过程中定期观察结果。

(2)不同抗生素对微藻细胞生长影响的测试方法 根据(1)测试结果,初步选取青霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、氯霉素等 5 种抗生素做为微藻除菌工具。将上述抗生素以合适浓度(在藻培养液内为 25U/ml)分别加入各为 100ml 处于生长指数后期的微藻培养液内,以后逐日追加一次,3 天后停加。同时观察微藻生长状况。

(3)利用抗生素除菌方法 根据(2)实验结果,选取青霉素、卡那霉素、庆大霉素、链霉素等 4 种抗生素作为微藻除菌工具(由于氯霉素强烈抑制微藻生长,弃之)。

将 4 种抗生素稀释至 10 000U/ml 后,混和加入处于生长指数后期的微藻培养液中,使每种抗生素最终浓度均达到 25U/ml。2d 后将微藻转移到新配制的无菌培养液内(接种量为 1:3),同时加入抗生素,6d 后,转到新鲜配制无菌培养液内(接种量为 1:3),培养数代,消除残留抗生素影响。在微藻经抗生素处理过程中,定期用 2216E 培养基作细菌培养检测,直到未发现细菌存在迹象时为止。处理过程均严格遵循无菌操作规则。

采用荧光显微镜(吡啶橙染色)(Hobbie *et al.*, 1977)镜检经抗生素处理后微藻培养液是否无菌。采用细菌培养法检测微藻培养液是否无菌。

检测细菌培养基:2216E(固体及液体)培养基及藻营养盐琼脂固体培养基(加有 0.5% 蛋白胨,0.5% 酵母膏)。

## 1.3 未除菌及除菌微藻生长曲线比较

微藻培养液摇晃混匀后,定期吸取少量微藻培养液计数藻细胞密度。采用血球计数

板计数。取样时均严格遵循无菌操作规则。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微藻除菌过程中某些现象的探讨

在利用抗生素处理微藻培养液几天后,发现培养液中有大量絮状物出现,经 2216E 培养基培养及光镜直接镜检为霉菌,说明待除菌微藻培育系统中均污染了霉菌,抗生素处理前,大量细菌使霉菌生长受到拮抗,而细菌经抗生素处理急剧减少时,霉菌则迅速繁殖。因此微藻除菌,首先要除去霉菌,实验中首先选用了抗真菌抗生素两性霉素 B 作为消除霉菌工具。经实验发现即使在很低浓度下(2U/ml),两性霉素 B 也能严重影响微藻生长,甚至杀死藻细胞,而霉菌却并不能被有效去除。推测可能由于霉菌及微藻均系真核生物,两性霉素 B 不能有效地区分霉菌及微藻。因此,选用平板涂布培养藻细胞法排除霉菌。

经 2216E 琼脂培养基平板涂布培养,发现小球藻培养液中细菌含量明显低于其它二种微藻(球等鞭金藻和三角褐指藻)中的细菌含量;而达到生长指数后期至稳定期时,小球藻细胞密度则高于其培养液中细菌密度。从图 1 中可以看出,只有小球藻细胞密度高于其培养液中细菌密度。在利用含藻的营养盐固体培养基平板涂布排除霉菌实验过程中,发现小球藻藻落能够独立于细菌菌落存在(因其藻细胞密度高于细菌密度)。藻落经仔细挑取培养后,经 2216E 液体培养基培养,出现混浊现象,表明有细菌生长迹象。经荧光显微镜仔细镜检,发现有细菌存在迹象(粘附于藻细胞表面),表明直接采用平板法无法分离得到无菌的小球藻。由于球等鞭金藻及三角褐指藻培养液中,细菌含量均高于藻细胞含量,经荧光显微镜检测,发现藻细胞表面粘附有细菌,因此只能采用抗生素排除细菌。

将经过除菌步骤处理的微藻经镜检,藻细胞表面及周围无细菌存在迹象;经细菌培养检测,无细菌生长迹象,因此获得除菌的球等鞭金藻、三角褐指藻及小球藻藻种。

### 2.2 除菌微藻与自然带菌微藻生长特点比较

除菌球等鞭金藻 3011 经长期传代培养,排除残留抗生素影响。与自然带菌金藻相比,除菌金藻具有独特生长特点。在对数生长期,二者生长速率基本一致,达到稳定期后藻细胞最大密度也相仿。但在自然带菌金藻细胞开始下沉,悬浮藻细胞的密度不断下降时,除菌金藻仍能保持明显上浮。当自然带菌金藻细胞几乎全部下沉,凝聚成片,上层培养液基本澄清时,除菌金藻仍未出现老化现象(图 2)。观察结果表明,除菌金藻持续培养 30d 以上时仍未出现老化现象,说明某些细菌在金藻生长过程中,可能起着促使老化作用。未经抗生素处理金藻培养 10d 开始老化时,采用  $0.65\mu\text{m}$  滤膜滤除藻细胞,过滤液再经  $0.2\mu\text{m}$  滤膜过滤,将细菌滞留于膜上,将此带菌滤膜加入培养 10d 的除菌金藻培养液

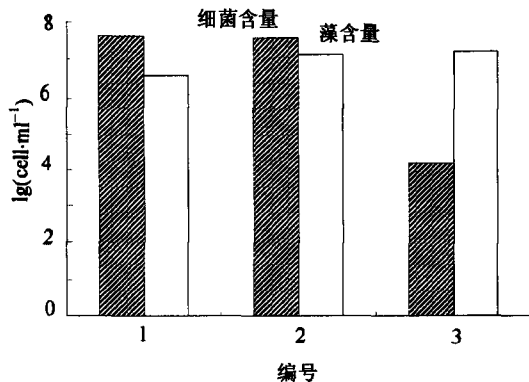


图 1 微藻培养液中细菌与藻细胞的含量对比

Fig. 1 Comparison between bacterial and algal contents in microalgal cultures

1. 球等鞭金藻; 2. 三角褐指藻; 3. 小球藻

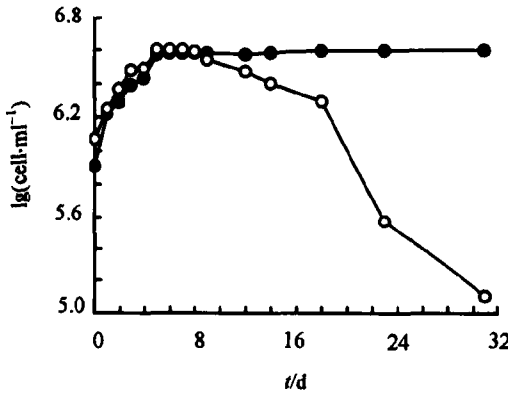


图2 未除菌与除菌后的球等鞭金藻生长曲线比较

Fig. 2 Comparison of growing curves between nonaxenic and axenic *Isochrysis galbana*  
● 除菌藻; ○ 未除菌藻

菌的球等鞭金藻在4种培养液中生长状况,其最高藻细胞密度对比情况如图3所示。从图3中可以看出:当培养液中均含有维生素时,不同藻均生长良好;由于自然海水中含有其它营养成分,故比在人工海水中生长略好(1.04:1)。但当缺乏维生素时,藻的生长受到严重影响,尤其是除菌的藻。由于自然海水中存在痕量维生素,故二者生长状况均比在人工海水中略好。从图3中还可以看出,在不加维生素时,未除菌藻生长状况均好于除菌藻,尤以在人工海水中为甚。说明金藻培育系统内可能有产维生素(或类似物质)的细菌。当培养液中含有维生素时,其作用被掩盖,反之其作用凸现。当未除菌的球等鞭金藻经人工海水培养液(无维生素)长期传代培养后,2216E平板涂布发现其细菌含量与在自然海水培养液(加有维生素)时相比有上升现象(培养6d:  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml;  $1.1 \times 10^6$  cfu/ml),暗示可能因为产维生素(或类似物)细菌数量增多所致。

除菌后的三角褐指藻与其未除菌时的生长特点基本一致。长期培养后,均出现细胞下沉现象,经摇动后,细胞能够浮起。但当培养温度超过其最适温度范围时,二者生长差异显现出来。如在室温30℃时,除菌三角褐指藻最高藻细胞密度可达  $8.5 \times 10^6$  cell/ml,且

中,48h后藻细胞开始下沉附底,进一步说明金藻培育系统内,确实存在促使金藻细胞老化的细菌。

将培养6d除菌及未除菌的球等鞭金藻(藻细胞密度基本一致,均为  $5.2 \times 10^6$  cell/ml)转入加有营养盐(缺维生素B<sub>1</sub>、B<sub>12</sub>)的人工海水中,连续传代3次,消除维生素影响。藻的细胞最大密度急剧下降,其中除菌藻细胞密度下降尤甚( $6.0 \times 10^4$  cell/ml:  $1.8 \times 10^5$  cell/ml)。然后同时分别转入下列4种培养液中:(1)自然海水+营养盐(有维生素);(2)自然海水+营养盐(无维生素);(3)人工海水+营养盐(有维生素);(4)人工海水+营养盐(无维生素)。测定除菌及未除菌

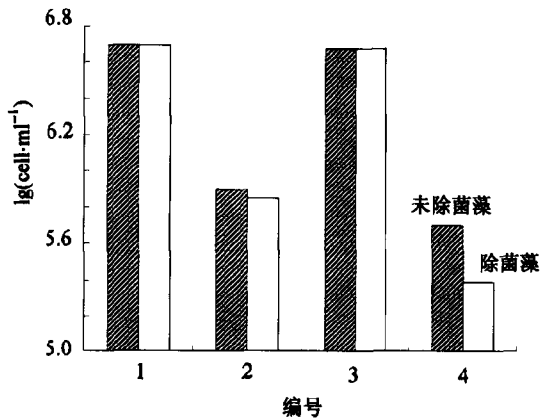


图3 未除菌及除菌的球等鞭金藻3011在不同培养条件下生长状况比较(培养8d)

Fig. 3 Comparison of growing conditions between nonaxenic and axenic *Isochrysis galbana* 3011 (cultured 8 days)  
1. 自然海水中(加维生素); 2. 自然海水中(无维生素);  
3. 人工海水中(加维生素); 4. 人工海水中(无维生素)

能维持较长时间;而其自然带菌藻在此温度下藻细胞密度只能达到  $4.0 \times 10^6$  cell/ml,且易老化。经镜检发现,未除菌的三角褐指藻藻细胞形态均一;而除菌后藻细胞大小不一,与未除菌藻相比有明显差异。将未经抗生素处理的三角褐指藻(培养7d)经  $0.65\mu\text{m}$  滤膜过滤,除去藻细胞,过滤液再经  $0.2\mu\text{m}$  滤膜过滤,将细菌滞留于膜上。将此滤膜加入培养7d的除菌三角褐指藻中培养数代。经显微镜观察发现其细胞形态渐趋一致,与未处理时相似,但个体均比未除菌藻细胞小,表明某些细菌可能影响藻细胞的形态。除菌的三角褐指藻细胞形态发生变化也可能由于抗生素处理时受损伤所致,此种现象需进一步深入研究。

除菌后的小球藻与未除菌时的生长速度基本一致,达到稳定期后,最大细胞密度也基本一致。但培养数天后,未除菌小球藻少量细胞开始下沉,并粘附于培养器皿底部,摇动时不易浮起。而除菌小球藻经长期培养出现少量细胞下沉现象,摇动时易浮起。采用  $0.65\mu\text{m}$  及  $0.2\mu\text{m}$  滤膜获得藻培育系统内细菌,加入除菌小球藻内,2—3d后出现藻细胞下沉附着现象,表明某些细菌能刺激小球藻细胞附着,促使老化。

在微藻除菌过程后期,停加抗生素后,发现除菌的球等鞭金藻生长旺盛。与未除菌时相比,二者的生长速度基本一致,但在未除菌的藻细胞密度达到最高峰后,除菌藻仍能够维持生长(1d左右),使得除菌藻细胞最大密度明显高于未除菌藻(1.30:1)。随着藻的培养传代,抗生素影响渐渐消失,除菌的球等鞭金藻生长逐渐恢复正常,但老化明显延迟,说明某些抗生素可能刺激其生长。

以无菌微藻为材料研究藻菌关系,特别是特定细菌与藻之间相互作用是必不可少的。除菌微藻的获得,为以后多领域深层次的研究提供了便利的条件。关于藻菌相互之间,特别是特定的影响微藻生长的细菌的筛选及细菌对微藻形态影响等工作有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- Cottrell M T, Suttle C A, 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J Phycol*, 29:385—387
- Divan C L, Schnoes H K, 1982. Production of axenic *Gonyaulax* cultures by treatment with antibiotics. *Appl Environ Microbiol*, 44:250—254
- Droop M R, 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br Phycol Bull*, 3:295—297
- Hobbie J E, Daley R, Jasper S, 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 33:1225—1228
- Jones A K, Rhodes M E, Evans S C, 1973. The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae. *Br Phycol J*, 8: 185—196
- Spencer C P, 1952. On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J Mar Biol Ass U K*, 31:97—106

## MARINE MICROALGAL AXENATION AND COMPARISON OF GROWTH CHARACTERISTICS BETWEEN NATURAL AND AXENIC MARINE MICROALGAE

LIN Wei, CHEN Dou, LIU Xiu-yun

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** Study on microalgal axenation and comparison of nonaxenic and axenic marine microalgae in some characteristics of growth was carried out. After mould-free algae strains were obtained by selecting algal colony on the plates (algal nutrients contained) without mould, bacteria-free cultures of three algae (*Isochrysis galbana* 3011, *Phaeodactylum tricoratum* 2038 and *Chlorella* sp. 1061) were produced by initially determining effects of several antibiotics on the algae and the co-occurring bacteria, and then using proper antibiotic mixtures (penicillin, gentamycin, kanamycin and streptomycin, all are 25 U/ml in the mould-free algal cultures) to eliminate associated bacteria. Growth characteristics of antibiotic treated and untreated microalgae were compared. Results showed that axenic *Isochrysis galbana* 3011 and *Chlorella* sp. 1061 could maintain good condition for one month (compared with nonaxenic algae 3011 and 1061, which began aging after 10 days culturing), some algae-concomitant bacteria could cause aging of algae 3011 and 1061. Bacteria in nonaxenic algae 3011 can produce vitamin(s) (or analogues) and stimulate growth of the algae. Cell shape changes after *Phaeodactylum tricoratum* 2038 becomes bacteria free, but the shape returns to normal to some extent if the algae-concomitant bacteria meets the algae again. Axenic algae 2038 can tolerate relatively high environmental temperature (30°C, for example) which inhibits growth of the nonaxenic algae seriously. In addition, some antibiotics can stimulate growth of the algae 3011.

**Key words** Microalgae axenation    Delayed aging    Bacterial influence

**Subject classification number**    Q938.8