

研究报告

螺旋藻的纯化*

甘旭华 唐欣昀** 刘广金 史成颖 汪本凡

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

摘要: 观察了螺旋藻生长过程中藻丝和杂菌的生长规律, 发现中性细菌和碱性细菌的数量始终是藻丝的 $10^5 \sim 10^6$ 倍。采用常规的稀释平板法、毛细管法和挑单藻法均无法可靠地获得无菌纯藻。设计用低速离心法洗涤下沉性藻丝, 用过滤法洗涤上浮性藻丝, 对藻丝进行预处理洗去大量杂菌; 对迁移性和非迁移性藻株分别采用夹层法和平板法纯化藻株, 使得单根藻丝在平板上形成藻落, 获得无菌纯藻。

关键词: 螺旋藻, 纯化技术, 单藻落

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0001-04

Purification of *Spirulina* sp. *

GAN Xu-Hua TANG Xin-Yun** LIU Guang-Jin SHI Cheng-Ying WANG Ben-Fan

(Anhui Agricultural University, Life Science College, Hefei 230036)

Abstract: Growth patterns of trichome and contaminative bacteria in *Spirulina* sp. liquid culture were observed, and it was found that the number of neutral and alkalophilic bacteria was always $10^5 \sim 10^6$ times of that of *Spirulina* sp. trichome. It would be very difficult to get real pure *Spirulina* sp. strain by classical methods of dilution plate, capillary and single trichome selecting methods. A great deal of contaminative bacteria was washed out by two pre-treatment processes. Low speed centrifugation was designed to wash the strains which usually deposit at bottom, and filtration method was designed to treat the strains usually floating at surface. Sandwich plate and dilution plate were designed for the purification of the mobile strains and non-mobile strains, respectively. A lot of strains were purified by the above processes and pure single trichome formed pure colonies on plates.

Key words: *Spirulina* sp., Purification technique, Pure colony

螺旋藻 (*Spirulina*) 是具有重要开发应用价值的原核生物, 由于一系列技术上的困难, 螺旋藻遗传学研究进展缓慢, 困难之一就是藻的无菌纯化。实验室保存的很多单藻是螺旋藻与大量异养及自养细菌的混合培养物, 而混合物是无法进行分子生物学研究。在一般情况下, 藻丝浓度最大可达 10^5 / mL, 而杂菌数可达 $10^9 \sim 10^{10}$ / mL, 无法采用普通的稀释平板法纯化分离获得纯藻。Ogawa 等^[1] 采用过滤洗涤、紫外线照射、添加抗生素、稀释微量接种法等方法进行纯化, 该法过于繁琐, 工作量大, 成功率仅为 1% ~ 2%, 而且使用紫外线, 易造成藻丝损伤和诱变, 不能保证筛选自然状态的藻株。徐增富等^[2] 采用离心洗涤, 辅以消毒剂杀死杂菌, 获得纯藻, 其成功也基于个别藻丝偶尔逃避了消毒

* 安徽省科技厅自然科学基金资助 (No. 99042130)

安徽省教育厅自然科学基金资助 (No. 97JL052)

** 通讯作者 Tel: 0551-2823795-3129, E-mail: tangxinyun@21cn.com.

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-10-30

剂的作用。龚小敏^[3]、秦 松等^[4]采用毛细管法或挑单藻法获得了单藻，江志平等^[5]采用随机取样分离法纯化螺旋藻，但这些方法均无法去除可能附着在藻丝上的杂菌。需要指出的是，到目前为止均无单根藻丝可以在平板上形成藻落的报道，很多研究者也没有注意到不同螺旋藻藻丝在平板上存在迁移性和非迁移性的区别，而迁移性是造成纯化的困难之一。本文报道了快速、简便、可靠的纯化螺旋藻的方法。

1 材料与方法

1.1 藻株

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 90048，中国科学院武汉植物研究所胡鸿钧先生惠赠；HEP 和 R 藻株由意大利 Pavia 大学 Cifferi 教授惠赠；其余藻株本室保存 (表 1)。

表 1 参试藻株特性

藻株	上浮性	迁移性
90048	+	-
HEP	+	+
R	-	-
C, D, E, F, N, W	+	+

1.2 培养基和培养条件

Zarrouk 培养基^[1]，NaHCO₃、K₂HPO₄ 与其他大量元素分开灭菌，微量元素溶液 A5、B6 分开灭菌，灭菌后定量混合，固体培养基中加 1.5% 纯化琼脂粉。光照培养箱，28℃ ~ 30℃，3,000 Lux。

1.3 生长的测定

将 90048 藻株接进培养液，定时用微量取样器取 20 μL 藻液至载玻片上，解剖镜下统计藻丝根数，测定的螺旋藻生长。杂菌生长测定的方法如下：在 pH7.2 ~ 7.4 的牛肉膏蛋白胨平板上涂平板测定中性细菌数量；在添加 0.1% 蛋白胨的 Zarrouk 平板上涂平板测定嗜碱性细菌数量。按公式 $G = (t/n) = (t \times \lg 2) / (\lg N_2 - \lg N_1)$ 计算代时。(G, 代时；N₁, t₁ 时刻微生物数量；N₂, t₂ 时刻微生物数量；t = (t₂ - t₁)；n, 世代数。)

1.4 藻丝预处理

用离心法洗涤下沉性藻株，方法如下：500 r/min 低速离心藻液 5 min，倾上清液，加无菌培养液洗涤，重复 8 ~ 10 次，以去除大量杂菌。用过滤法洗涤上浮性藻株：用绸布或滤纸收集藻丝，用无菌培养液反复冲洗 8 ~ 10 次，挑取少量藻泥，制成藻液。

1.5 藻株纯化

夹层平板法纯化迁移性藻丝：取预处理的藻液，调整藻丝浓度至 2×10^3 根/mL。先用约 5 mL 刚配好的固体培养基，覆盖平板底部；待凝固后，取 0.1 mL 藻液至平皿，加入约 10 mL 50℃ 的固体培养基混平板，凝固后再倒上约 5 mL 50℃ 的固体培养基，制成夹层平板。非迁移性藻株的纯化采用稀释平板法：取 0.1 mL 藻液 (约 200 根藻丝) 在 Zarrouk 平板上涂布。所有平板均用 parafilm 封口保湿。用解剖镜逐日观察平板，待藻丝明显卷曲生长、藻丝根数增加后，用微型接种环 (直径 0.5 mm)、微型接种针在解剖镜下无菌操作挑取微藻落。

待挑取的单藻在培养液中充分生长后，将藻液分别在 Zarrouk、Zarrouk + 0.1% 蛋白胨、Zarrouk + 葡萄糖、牛肉膏蛋白胨平板上划线检查纯化效果。

2 结果

2.1 螺旋藻的生长

螺旋藻 90048 藻株接进新鲜培养液 ($10^3/\text{mL}$) 1.5 d 内生长缓慢, 处于延滞期, 2 d 后藻丝浓度才增加至约 $2 \times 10^3/\text{mL}$ 。1.5 ~ 3.5 d 内藻丝的数量呈对数增长, 处于生长最快时期, 以这一段时间的参数计算得到该藻株的代时 (以藻丝数为指标) 约为 14 h (图 1)。显然这个数值与一般细菌的代时相比是太长了。4 d 后藻丝的增长速度显著降低, 至 15 d 达到最大值 ($1.3 \times 10^5/\text{mL}$)。

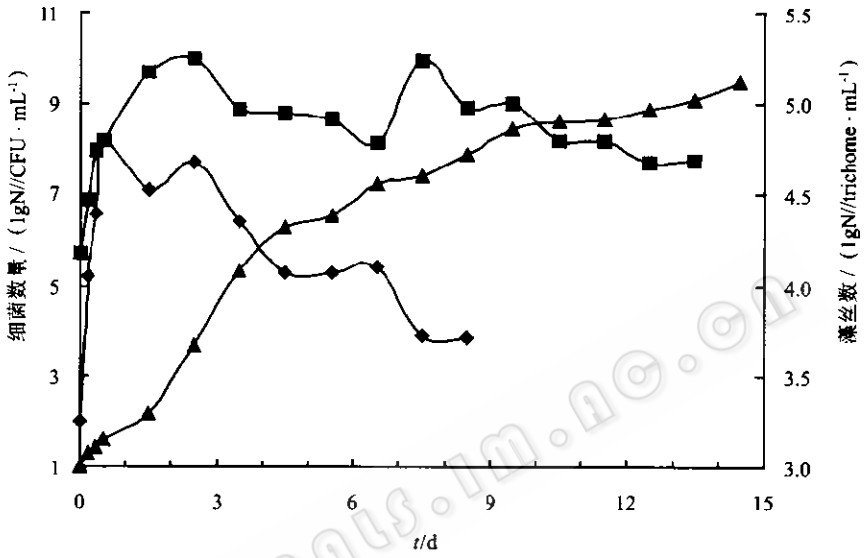


图 1 螺旋藻和杂菌的生长曲线

◆ 中性培养基中细菌数, ■ 碱性培养基中细菌数, ▲ 藻丝数

2.2 杂菌的生长

与螺旋藻一道接进培养基的中性细菌 (中性培养基上测定) 接种时浓度较低 (约 $10^2/\text{mL}$), 但细菌数量迅速增加, 12 h 就增加到约 $1.6 \times 10^8/\text{mL}$; 平均代时为 35 min。碱性细菌 (碱性培养基上测定) 接种时浓度较高 ($5 \times 10^5/\text{mL}$), 但生长速度稍慢, 12 h 后也增加到约 $1.5 \times 10^8/\text{mL}$, 平均代时为 87 min。在接种初期, pH 值约为 8.0, 从藻液中带进的中性细菌迅速增长。随着 pH 值逐渐上升 (数据未显示), 中性细菌数量迅速下降, 碱性细菌数量稳步上升, 在长时间内维持在 $10^9/\text{mL}$ 。藻液中的杂菌总数始终约是螺旋藻藻丝数量的 $10^3 \sim 10^6$ 倍。显然在这样的体系中是无法采用常规的稀释平板法来纯化螺旋藻, 更无法用毛细管法或挑单藻法来纯化螺旋藻。

2.3 预处理的效果

接种 6 ~ 8 d (对数后期) 的螺旋藻活性最高, 容易成活, 而此时杂菌数约是藻丝数的 $10^4 \sim 10^6$ 倍。因为下沉性的藻丝细胞内无气泡, 低速 (500 r/min) 即可使藻丝快速沉降, 而细菌体积微小, 仍悬浮在液体中, 倾去上清液即可去除大部分杂菌, 离心洗涤效率见图 2。对上浮性的藻丝不能采用离心法, 只能使用过滤法。若每次离心洗涤或过滤洗涤的效率是 90%, 处理 8 ~ 10 次应该可以使得杂菌的数量降到和藻丝相仿的数量级。实际上本文设计的预处理方法经多次实践证明是可行的, 取经过预处理的藻

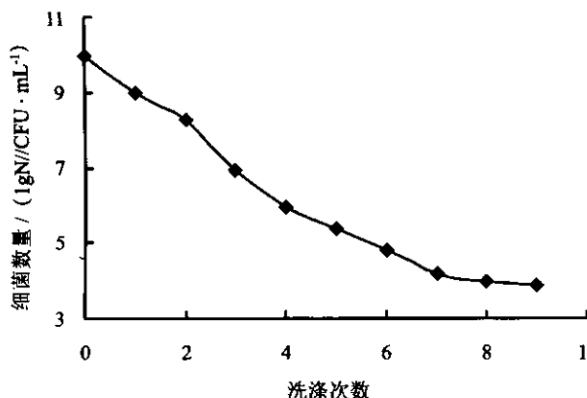
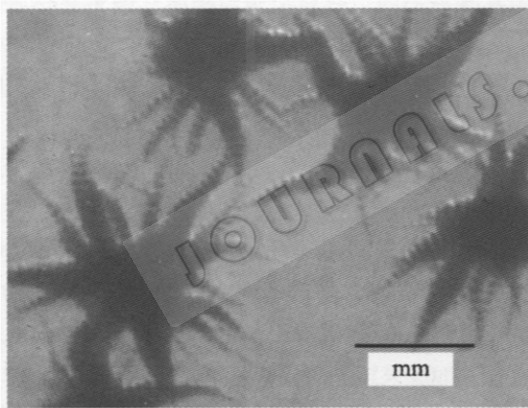


图2 离心洗涤效率

若包埋技术恰当, 3~5 d 的平板仍可用来进行纯化, 但处理不恰当, 1~2 d 后藻丝即可出现迁移, 其后果是杂菌污染严重, 使得预处理失去意义, 无法纯化螺旋藻。因此技术的关键在于, 平板制备后用解剖镜逐日观察, 待藻丝明显卷曲生长、或藻丝根数增加后, 在超净台上用微型接种环 (直径 0.5 mm)、微型接种针在解剖镜下无菌操作挑取微藻落。对于迁移性藻株, 最好在杂菌刚形成微型菌落 (1 d), 藻丝活性尚未完全恢复, 没有出现迁移前, 直接从平板上挑取单根藻丝进行纯化。

图3 90048 藻株在平板上形成的纯藻落 ($\times 15$) 前^[6]

螺旋藻的遗传学研究一直徘徊不前^[6], 主要原因可能是很多实验室使用的藻株不是无菌纯藻, 也很难使得单根藻丝在平板上形成纯藻落, 这种情况制约着研究的进展。本文针对螺旋藻的生理特征, 报道纯化螺旋藻的详细技术方法, 并获得了大量的纯藻株, 这将为螺旋藻的理论研究提供可靠的技术基础。

参考文献

- [1] Ogawa T, Terui G. J Ferment Technol, 1970, 48 (6): 361~367.
- [2] 徐增富, 刘晓勤, 曹吉祥, 等. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (5): 123~126.
- [3] 龚小敏, 胡鸿钧. 武汉植物学研究, 1996, 14 (1): 58~66.
- [4] 秦松, 童顺, 崔武, 等. 海洋与湖泊, 1994, 25 (5): 560~562.
- [5] 汪志平, 贾小明, 傅俊杰, 等. 浙江农业学报, 1998, 10 (5): 275~277.
- [6] 唐欣昀. 微生物学通报, 1997, 24 (5): 300~302.

液涂平板或倒夹层平板, 平板上的杂菌菌落数量将不超过螺旋藻藻丝 (藻落) 的数量。

2.4 螺旋藻的纯化

由于螺旋藻形成藻落的时间较长 (7~15 d), 螺旋藻形成藻落之前杂菌菌落 (1~2 d) 已长得很大, 并可连片, 同时时间过长也难免被包埋的迁移性藻丝出现移动, 此时再来挑取藻落纯化难度很大。对非迁移性的藻株, 纯化难度较小, 与此相比, 迁移性藻株的纯化较难。

将挑取的大量样品分别在 Zarrouk、Zarrouk + 0.1% 蛋白胨、Zarrouk + 葡萄糖、牛肉膏蛋白胨等 4 种不同的平板上划线检查纯化效果, 去除少量 (试验者熟练程度而不等) 带杂菌的样品, 获得了所有参试菌株的大量的无菌纯藻藻株。将无菌纯藻稀释涂平板获得的单藻落见图 3, 使单根螺旋藻藻丝在平板上高效形成单藻落的技术是对螺旋藻进行深入研究的重要基础。

螺旋藻的遗传学研究一直徘徊不前^[6], 主要原因可能是很多实验室使用的