

无菌短藻丝体钝顶螺旋藻藻株的获得^{*}

徐增富 刘晓勤 曹吉祥 邱国华 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要 采用平板涂布的方法分离筛选到一种短藻丝体 (2~ 3 个螺旋) 钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 藻株. 该藻株在液体培养基中能生长成均匀分散的培养物, 因而便于进行平板涂布、光密度测定以及定量取样等操作. 进一步采用植物组织培养中常用的消毒试剂次氯酸钠处理藻丝体, 获得了无细菌污染的纯培养物, 可用于分子生物学和基因工程研究. 另外, 提供了一种成份比较简单易得的培养基, 可用于钝顶螺旋藻的实验室常规培养.

关键词 钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis*, 短藻丝体藻株, 无菌培养物, 简化培养基

分类号 Q 948. 8, Q 949. 221

近年来藻类分子遗传学和基因工程研究越来越受到人们的重视^[1, 2]. 钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 是一种高蛋白的丝状蓝藻, 有很高的经济价值. 但由于钝顶螺旋藻无菌培养困难, 平板效率低以及内源限制酶活性等原因至今尚未建立稳定的遗传转化系统^[3]. 钝顶螺旋藻在培养时大多形成很长的藻丝体, 相互缠绕而成团块状 (这在生产上便于收获), 很难进行平板涂布、光密度测定 (A_{560} , 可确定生长量) 以及定量取样等操作; 而且大多数藻种都有细菌污染, 不能直接用于分子生物学和基因工程研究. 获得在液体培养基中能均匀分散地生长并且无细菌污染的藻株是进行钝顶螺旋藻的分子生物学和遗传转化研究的前提. 采用 Ogawa & Terui^[4]的方法虽可获得无菌的纯培养物, 但操作较繁琐、工作量大、周期长、效率低, 尤其是采用紫外线照射杀死细菌这一步骤较难掌握. 本研究采用平板分离筛选的方法并借鉴植物组织培养研究中采用的消毒技术, 成功地获得了无菌的短藻丝体 (2~ 3 个螺旋) 钝顶螺旋藻纯培养物.

1 材料与方法

1.1 培养基 钝顶螺旋藻培养基 (XS 培养基) 的大量元素采用文献 [4] 的配方, 微量元素采用 MS 培养基^[5]的成份. 为了避免灭菌过程中产生沉淀, NaHCO_3 和 K_2HPO_4 应与其它大量元素分开灭菌, 微量元素也单独灭菌, 混合后 pH 为 9.4~ 9.6. 细菌培养基分别用 pH 为 7.0 和 9.0 的 LB 培养基^[6]以及含 0.2% 酵母提取物^[4]的 XS 培养基. 固体培养基含 15 g / L 琼脂粉.

1.2 藻种来源 钝顶螺旋藻 (CCCFA314) 购于中国科学院水生生物研究所藻种室.

1.3 短藻丝体藻株的分离 藻种接于 XS 液体培养基中于 28℃ 光照培养 2 周, 挑出团块状培养物, 在剩下的培养物中取 100 μ L 涂于 XS 平板上, 于 28℃ 光照培养 2~ 3 周, 挑出藻

* 收稿日期: 1997-01-06 徐增富, 男, 32 岁, 讲师

落于 XS 液体培养基中培养。

1.4 长藻丝体的机械剪切 用带有 6 号针头的无菌注射器反复抽吸长藻丝体多次,直至显微镜下观察到大部分藻丝体片段为 2~3 个螺旋。

1.5 短藻丝体藻株的无菌化 接种短藻丝体藻株于 XS 液体培养基中培养至 A_{560} 为 0.1 左右,取 1 mL 于 Eppendorf 管中 (同时做 2~4 管),离心收集藻丝体,用培养基洗涤 (3×1 mL),离心收集藻丝体,加入 1 mL 5% NaClO 处理 2~6 min,离心弃去 NaClO,用培养基洗涤 3 次,用 1 mL 培养基悬浮,混匀,各取 $50 \mu\text{L}$ 接于 20 mL XS 液体培养基中 (每个处理重复 3 次),在 28°C 下光照培养 1~2 周。

1.6 污染细菌的检查 同时采用平板和液体培养方法。取上述灭菌处理后长出的藻培养物 $20 \mu\text{L}$ 点于 LB (pH 7.0 和 9.0) 和 XS 平板上,同时取 $100 \mu\text{L}$ 接种于 LB (pH 7.0 和 9.0) 和 XS 液体培养基中,分别于 28°C 或 37°C 培养 2 周,观察有无细菌生长。

2 结果与讨论

原藻种培养物在液体培养基中呈不均一的团块状,在光学显微镜下观察可见这种团块状物是由很长的藻丝体相互缠绕而成。但挑出团块状物后,剩余的培养物中有一些较短的藻丝体 (图 1)。这些较短的藻丝体可在平板上形成藻落,将这些藻落接种于液体培养基中培养,得到的培养物呈均匀分散的状态。在光学显微镜下观察,这种分散均匀的培养物中的藻丝体很短,一般为 2~3 个螺旋 (图 2)。这种短藻丝体藻株经多次接种 长时间培养,在培养液中一直保持均匀分散的生长状态。另一方面,那些长藻丝体经机械剪切处理虽可得到较短的片段,但经过一段时间 (1 周左右) 的培养,又长成很长的藻丝体。这些结果说明,我们分离到的短藻丝体藻株 (命名为 SP51 藻株) 不是由于操作过程中的机械剪切导致长藻丝体的断裂而形成的;也不是由于培养时间短,藻丝体尚未充分生长而出现的现象;而是存在于原藻种中的一种生长特性稳定的短藻丝体藻株。此外,还观察到有直藻丝体变异株的存在。

附着在钝顶螺旋藻粘蛋白荚膜上的细菌很难去除^[4]。在藻培养过程中,由于培养基的成份不合适,这些污染的细菌不能大量繁殖,但却能一直存活,一遇到合适的生长条件,便会大量繁殖。本研究采用植物组织培养中常用的消毒试剂 NaClO 处理藻丝体,获得了无菌的纯培养物。为减少污染细菌数量,制备用于无菌处理的藻培养物时接种量要尽量小 (0.1% 或以下),藻丝体密度也要控制在 A_{560} 为 0.1 左右。另外用平板或液体培养基检查污染细菌时,必须长时间培养 (2 周左右)。因为有些污染细菌培养 1 周时尚未见到其生长,但继续培养则会明显繁殖起来。对于有些细菌污染比较严重的藻种,经一次消毒有时不能完全达到无菌,此时可对第一次消毒处理后长出的培养物再进行一次灭菌处理,一般就可获得彻底无菌的纯培养物。

实验室中培养钝顶螺旋藻一般用 Zarrouk 培养基^[7]。但该培养基配方中的微量元素成份很复杂,含有 NH_4VO_3 , $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ 等多种很少使用、来源困难的化合物。本研究所用的 XS 培养基成份比较简单易得,长期使用的效果表明可用于钝顶螺旋藻的实验室常规培养。

本研究分离得到的短藻丝体钝顶螺旋藻无菌藻株 SP51,由于其可在培养液中形成分散均一的状态,因而较易进行平板涂布、光密度测定以及定量取样等一系列的实验室操作。另外,无细菌污染的纯培养物对于进行遗传转化研究也是必需的。有学者^[1]曾认为钝顶螺旋藻对氨基青霉素不敏感,不能作为转化用的选择标记。但在本实验中观察到虽然有些未经

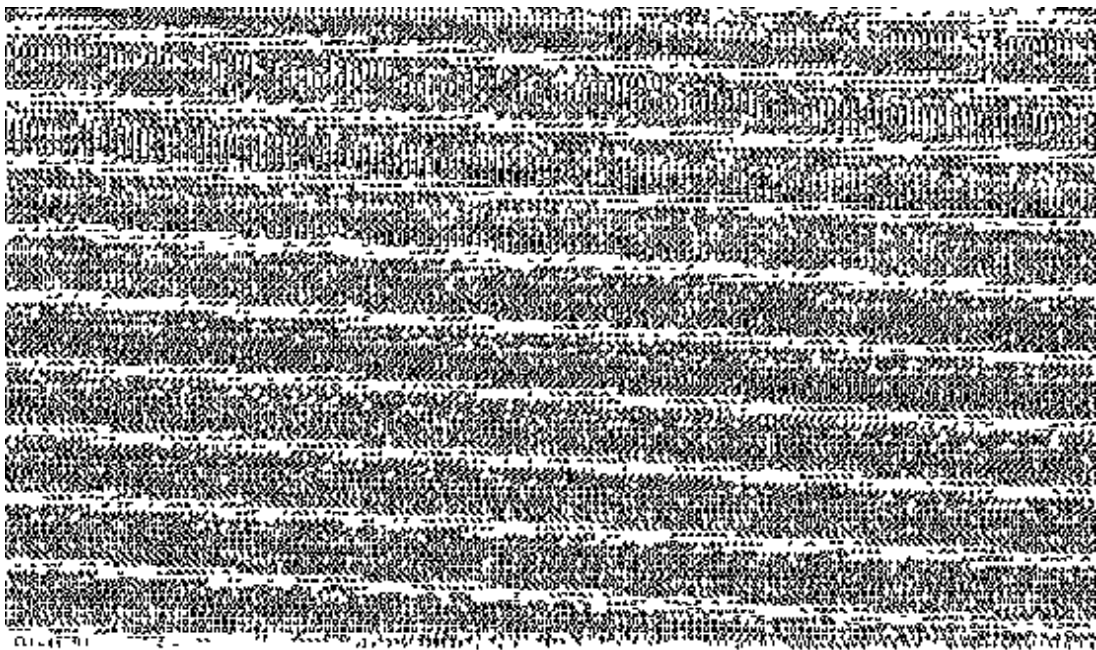


图 1 钝顶螺旋藻原藻种培养物
(示长丝体中有少量短藻丝体, $\times 300$)

Fig. 1 Original culture of *S. platensis*

图 2 分离到的钝顶螺旋藻短藻丝体 SP51 藻株
(约 2~3 个螺旋, $\times 300$)

Fig. 2 Short filament SP51 strain of *S. platensis*
isolated from original culture

灭菌处理的藻培养物确实对氨基青霉素不敏感,但经无菌处理后 50 mg/L 的氨基青霉素可完全抑制其生长;而分离出来的污染细菌可在含氨基青霉素 (50 mg/L) 的平板上生长,若将其加到对氨基青霉素敏感的无菌藻株中,则又会导致藻培养物对氨基青霉素的抗性。所以,有细菌污染的钝顶螺旋藻之所以对氨基青霉素不敏感可能是由于其中的细菌将氨基青霉素解毒而使得藻得以生长。因此,为了获得可靠的实验结果,进行钝顶螺旋藻的分子生物学和基因工程研究时,必须使用无细菌污染的藻株。

参 考 文 献

- 1 秦松,严小军,曾呈奎. 第五届国际藻类学大会反映的藻类生物技术的最新进展. 生物工程进展, 1995, 15 (4): 2~4
- 2 秦松,严小军,曾呈奎. 藻类分子生物技术两年评——基因工程及上游——分子遗传学. 海洋与湖沼, 1996, 27 (1): 103~111
- 3 Elhai J. Genetic techniques appropriate for the biotechnological exploitation of cyanobacteria. J of Appl Phycol, 1994 (6): 177~186
- 4 Ogawa T, Terui G. Studies on the growth of *Spirulina platensis* (L.) On the pure culture of *Spir-*

- ulina platensis*. J Ferment Technol, 1970, 18 (6): 361~ 367
- 5 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant, 1962, 15 473~ 497
- 6 Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiological Reviews, 1983, 47 (4): 551~ 578
- 7 何连金. 螺旋藻的培养方法和应用效果的初步探讨. 福建水产, 1988 (2): 16~ 23

Isolation and Sterilization of Short Filament Strain of the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*

Xu Zengfu* Liu Xiaoqin Cao Jixiang Qiu Guohua Li Baojian

Abstract A short filament strain (ca. 2~ 3 spirals) of the blue-green alga *Spirulina platensis* was isolated by plating. The short filament strain grows into homogeneous culture which make it possible to be manipulated in laboratory such as plating, optical density measurement and quantitative transfer. Axenic cultures of the short filament strain, which is essential to the study of molecular biology and genetic engineering of *S. platensis*, was obtained by treatment with sodium hypochlorite, a commonly used disinfectant for plant tissue culture. In addition, a simplified formula of medium for routine culture of *S. platen-sis* in laboratory was developed.

Keywords *Spirulina platensis*, short filament strain, axenic cultures, simplified medium

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275