

常见海洋微藻培养技术

MEL种质中心

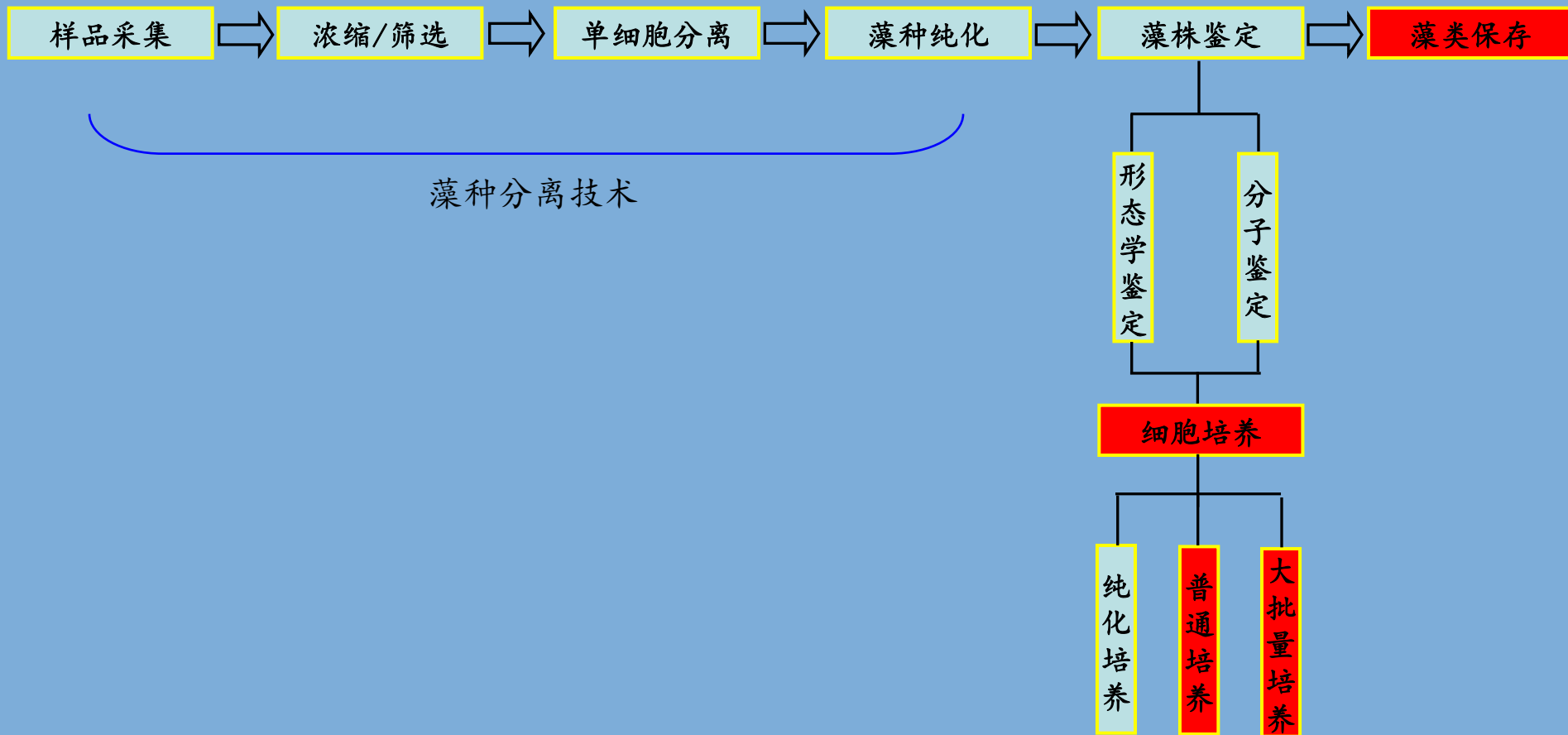
高越

2012/12/03 15:00 PM 海洋楼B206

内容

- ◆ 藻种分离技术流程
- ◆ 藻种分离技术
- ◆ 藻株鉴定
- ◆ 范例（以2012年6月苏澳米氏凯伦藻赤潮为例）
- ◆ 藻类的保存技术
- ◆ 藻种室常用藻类
- ◆ 微藻的培养技术
- ◆ 微藻培养注意事项及常见问题分析
- ◆ 藻种室日常运行说明及藻种室开放规定

一、藻种分离技术流程

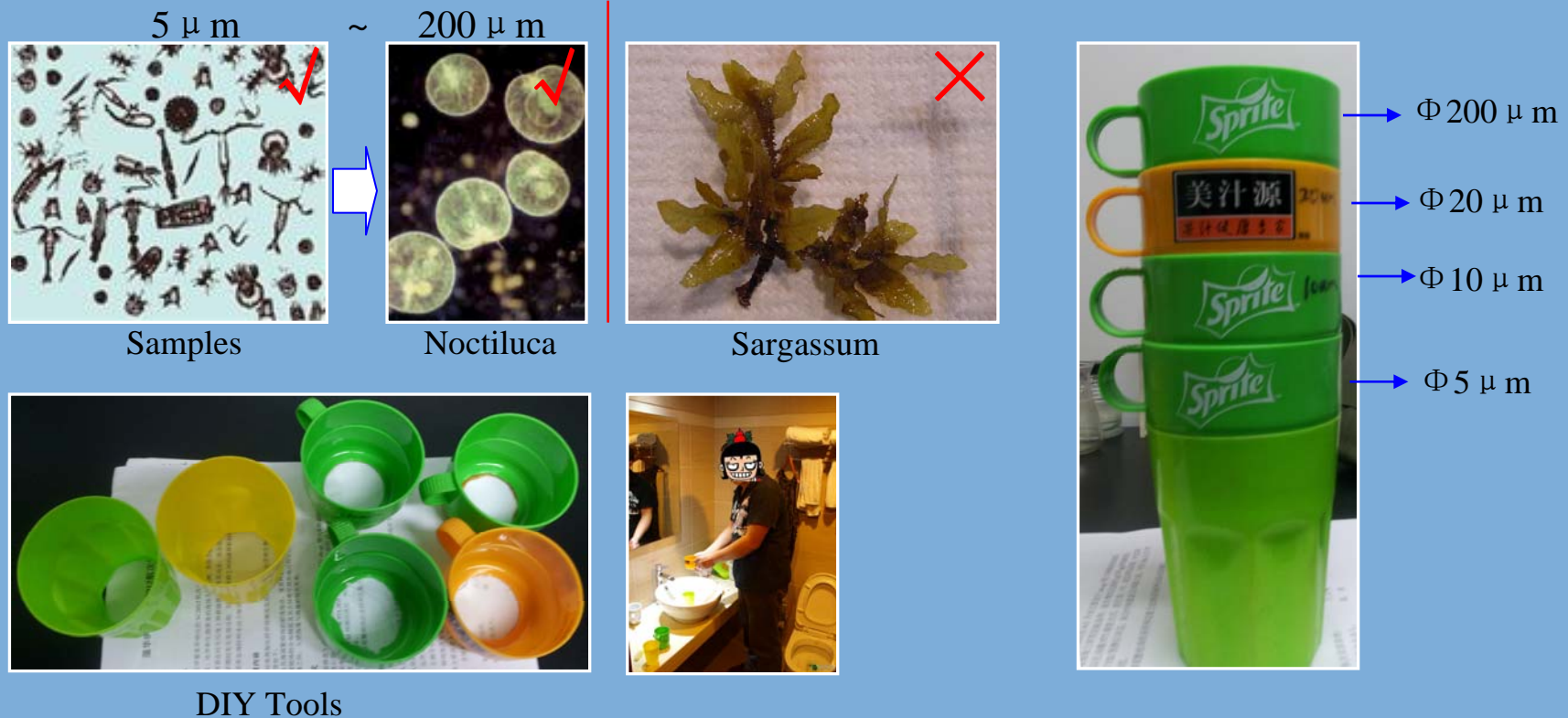


二、藻种分离技术

1. 样品采集

- ◆ 水样：海水；海湾、码头等；滩涂、养殖场、盐场的小水洼；
- ◆ 水样体积：50~2000毫升。（保留**原位海水**）
- ◆ 现场参数：测定水样的温度和盐度，供分离、培养时参考。

2. 样品浓缩、筛选



3. 单细胞分离

◆ 微吸管分离法

玻璃管在酒精灯上拉成直径0.08~0.16毫米的微管

◆ 平板分离法

合适的培养液，加入1~1.5%的琼脂，倒平板，划线培养。

◆ 水滴分离法

藻液稀释，分成若干小水滴，显微镜筛选单细胞水滴

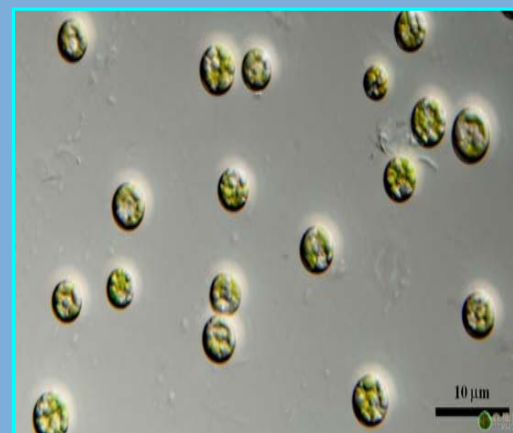
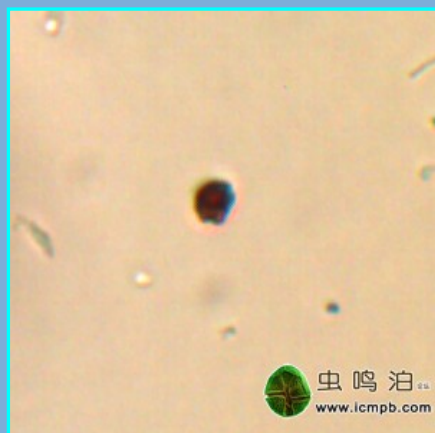
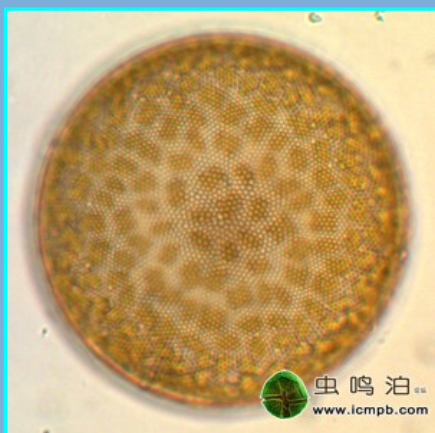
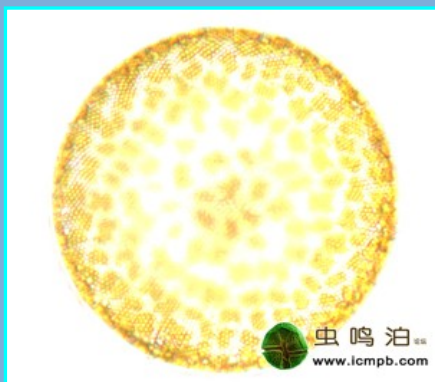
◆ 稀释分离法

用过滤后原位海水稀释，细胞分布均匀，直接用10 μL移液枪挑取到单细胞，水滴清洗。



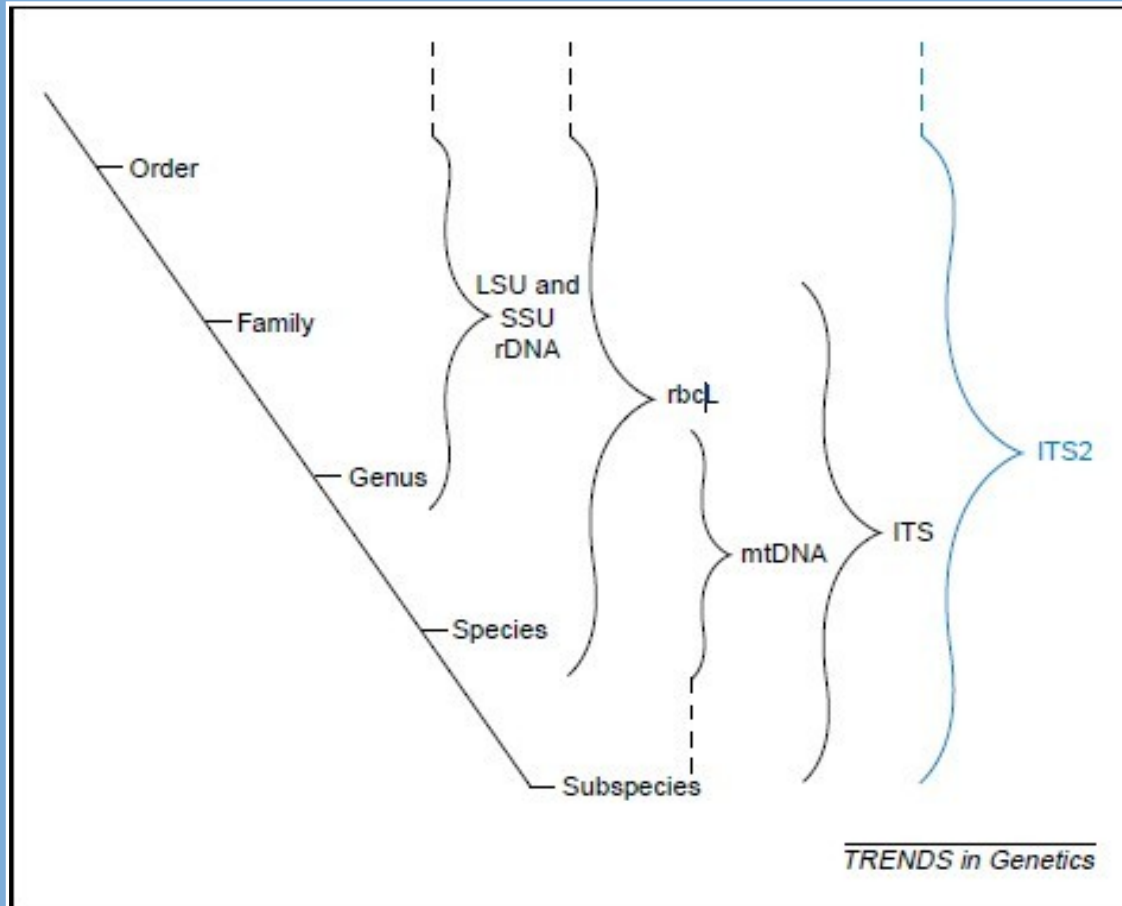
三、藻株鉴定

1. 形态学鉴定



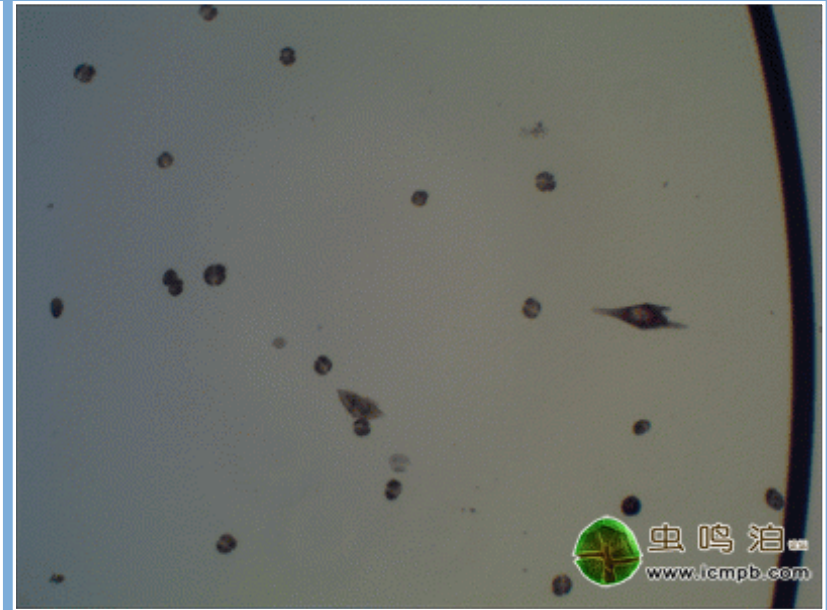
2. 分子鉴定

- ◆ 现代分子技术能够快速，便捷的判断种类的范围，是传统形态学分类的重要补充。
- ◆ 目前主要用于藻类分类的有：核糖体 SSU rDNA, LSU rDNA, ITS1+5.8s+ITS2.
- ◆ 对于特定的种类某些基因有其特别的分类意义。如mitochondrial cytochrome b, 和chloroplast 23S 在共生藻属B系群种类区分上的重要意义。
- ◆ 近年ITS2二级结构在藻类分类上的运用成为一个新的热点



- ◆ SSU具有很好的保守性，通常用于属和属意思的分类单元。
- ◆ LSU各个区间的保守性不同，有些区间保守性好（如D1区）有些区间变异性高（如D2区），通常用于属间和种间区分。
- ◆ ITS变异性高，通常用于种间和种内分类单元的区分。
- ◆ ITS2二级结构保守性很好，可用于大范围分类单元。

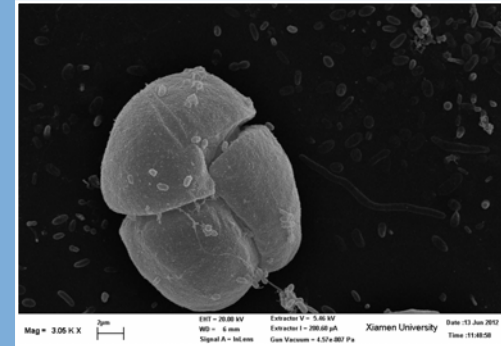
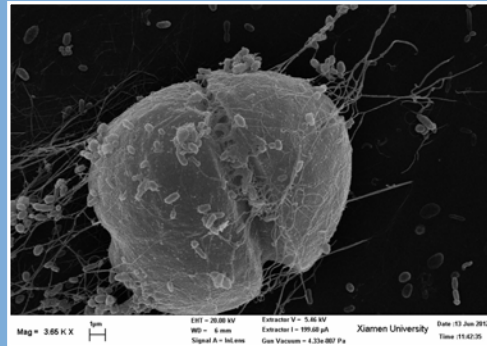
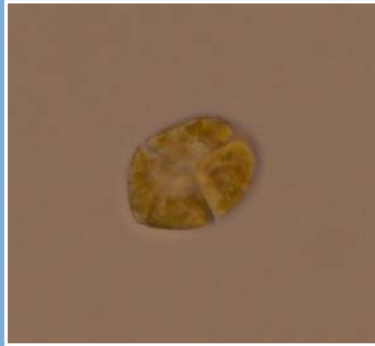
四、范例（以2012年6月苏澳米氏凯伦藻赤潮为例）



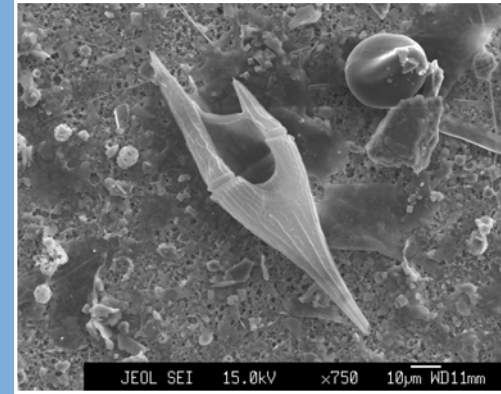
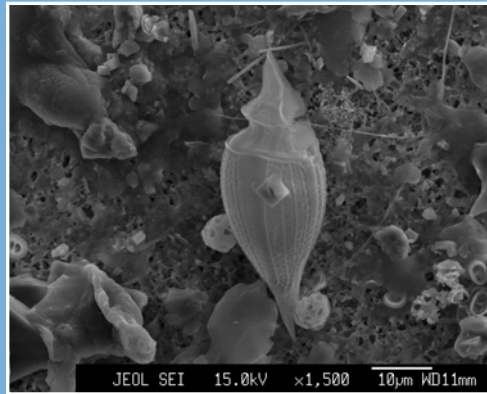
- ◆ 采样位置：黄岐半岛鲍鱼养殖区
- ◆ 水样：渔排上海水
- ◆ 水样体积：2 L。
- ◆ 原位海水 10L（培养用）
- ◆ 现场参数：温度26~28℃，盐度 28‰
- ◆ 实验室分析
- ◆ 群落构成及密度(cells/mL)：米氏凯伦藻/东海原甲藻/红色裸甲藻/叉角藻

形态分析

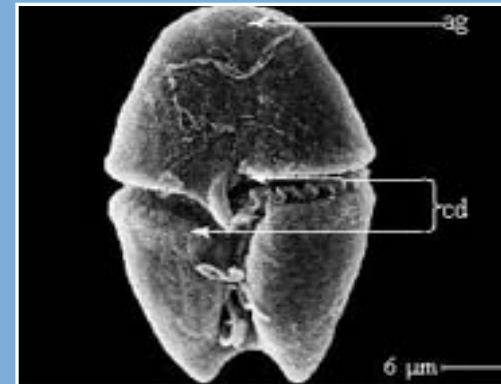
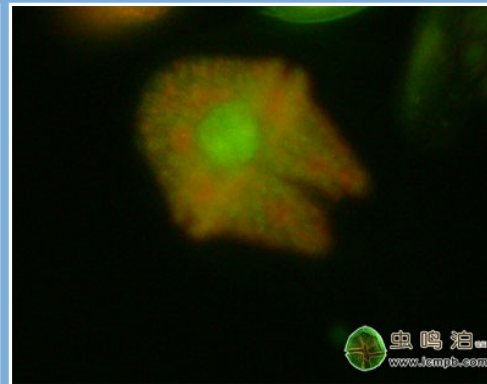
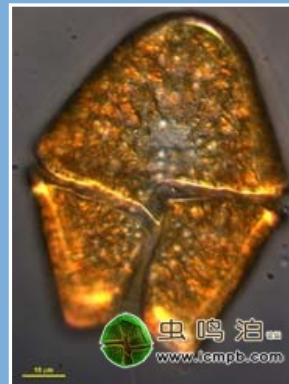
米氏凯伦藻 *Karenia mikimotoi*



叉角藻属 *Ceratium furca*



血红哈卡藻 *Akashiwo sanguinea*



五、藻类的保存技术

◆ 继代法保存 普遍采用的方法，适合一切藻种的保存。

通常在常温或常低温（ $15^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ， $0^{\circ}\text{C}\sim 15^{\circ}\text{C}$ ）进行。藻种可接种在固体、液体或双相培养基中。适度光照条件下培养，达到较高密度时，再移置低温、弱光的条件下保藏。保藏时间：半年~1年。

◆ 固定化保存法 固定化细胞（immobilized cells）

将游离细胞包埋多糖或多聚化合物制成的网状支持物中，固定载体束缚藻种，影响其代谢过程，从而抑制细胞的生长和分裂。存活时间从1个月到几年不等。缺少广谱性，还需要做更深入、广泛的研究。

◆ 超低温保种技术 液氮（ $\sim 196^{\circ}\text{C}$ ）保存。

物质代谢和生长活动几乎完全停止。超低温保存法具有保持种质遗传稳定性、对藻种进行优胜劣汰、便于长期保存、能最大限度地减少污染等方面的优点，还能省去藻种的活力监测和繁殖更新。至今还没有找出1种对所有种类都适用的保护剂。

◆ 浓缩低温保存技术

藻液高密度培养后，浓缩1000倍左右，再低温保存。海洋微藻的抗逆原理还有待作更多的研究和探讨。

◆ 冷冻真空干燥保存法

~70°C左右快速冷冻，真空干燥，使藻种的新陈代谢活动处于高度静止状态。冷冻干燥保存法优点是微藻复苏效果好，保藏期内可避免其他杂菌污染，便于携带运输，易实现商品化生产；其缺点是操作繁琐、对设备要求高等；

◆ 低温甘油生理盐水法

甘油生理盐水混匀后直接放置在~20°C±0.5°C冰箱放置保存。保存时间长，一般3年左右。

◆ 藻种室目前保存方法 继代法+ 循环移养保存

50毫升三角烧瓶等器具，灭菌烘干，加入正常浓度的培养液，接种后用无菌膜捆扎。光暗节律：12：12，光照强度：1500lux，温度：19-21 °C，盐度：38~34营养盐：f/2，f/4，L1，YBC-II等。每周摇动两次。一般15~20天即可移样一次。

优点：此法简单、容易掌握。

适合所有藻，成本低。

保存的藻种活力强、纯度高、数量大，随时可以扩大培养开展实验。

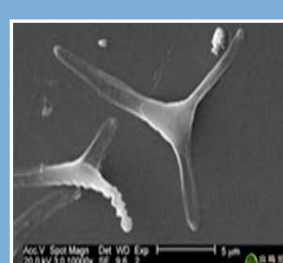
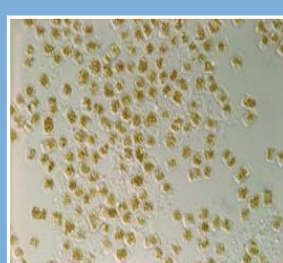
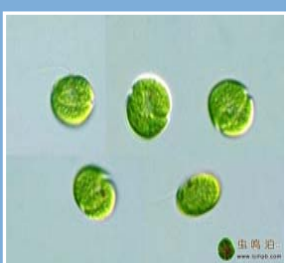
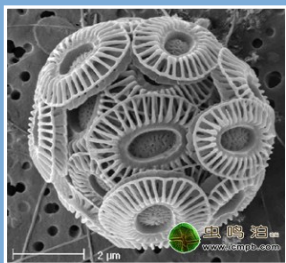
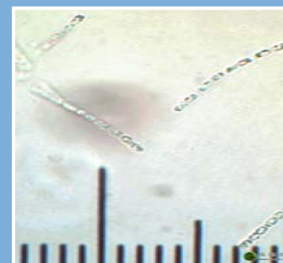
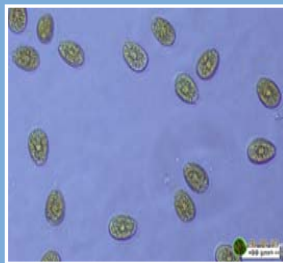
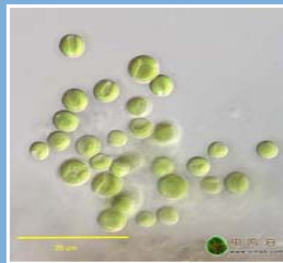
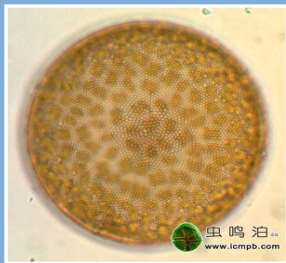
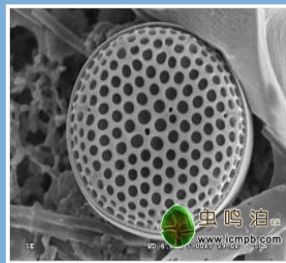
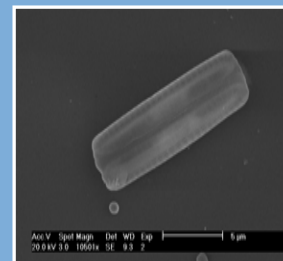
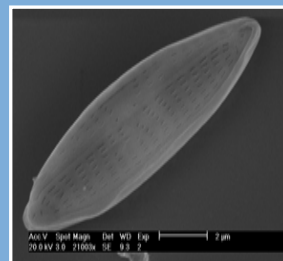
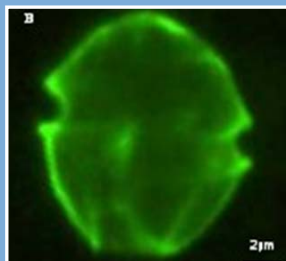
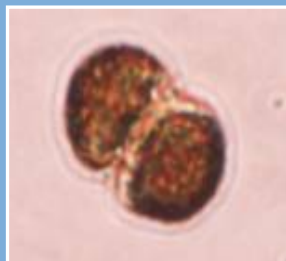
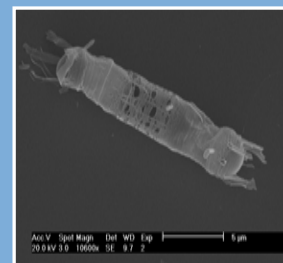
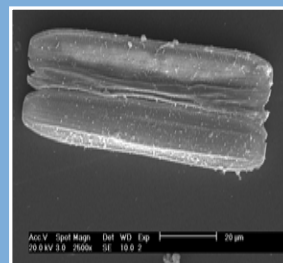
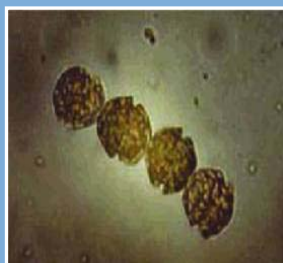
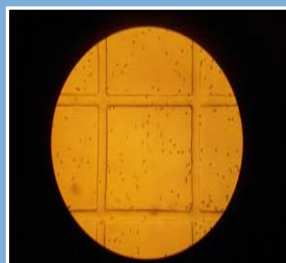
六、藻种室常用藻类



CCMA藻种分类饼图（2011年9月更新）

- ◆ 海洋藻类保种中心（Center for Collections of Marine Algae, CCMA）创建于2005年，藻种库现保存有蓝、绿、硅、甲、裸、隐、金、黄等藻类，主要以甲、硅、绿为主，共计310株系。
- ◆ 每年中心均搭乘航次，从台湾海峡、南海、东海及厦门港分离新的株系，并运用分子生物学及扫描电镜等技术进行鉴定。
- ◆ 使用频率最高的藻类：
 - 甲藻：*Alexandrium* (亚历山大属), *Prorocentrum* (原甲藻属), *Karenia* (凯伦藻属), *Gymnodinium* (裸甲藻属),
 - 硅藻：*Thalassiosira* (海链藻属), *Nitzschia* (菱形藻属), *Skeletonema* (骨条藻属), *Phaeodactylum tricornutum* Bohl (三角褐指藻), *Coscinodiscus* (圆筛藻属).
 - 绿藻：微绿球藻 (*Nannochloropsis oceanica*), *Platymonas* sp.(扁藻), *Chlorella* sp.(小球藻), *Dunaliella Salinā* (盐藻).
 - 蓝藻：*Trichodesmium* (束毛藻), *Synechococcus* (聚球藻).
 - 金藻：*Prymnesium parvum* (小定鞭金藻), *Isochrysis galbana* (球等鞭金藻), *Dierateria zhanjiangensis* (湛江叉鞭金藻), *Chrysophyta.sp* (金藻sp.).

使用频率较高的藻类



七、微藻的培养技术

A. 普通培养

1. 藻种培养设施

藻种的培养要在保种室中进行，保种室要求通风条件好，光线条件好，温度可控性好，保种室要配有空调、冰箱、具有人工光源的培养架等。

2. 容器、工具的消毒

进行单细胞藻类的纯培养，容器、工具、培养基都要进行严格灭菌。

a. 高温消毒法

- 直接灼烧消毒 接种环、镊子等金属小工具，载玻片、小刀、试管口、瓶口等可以直接在酒精灯火焰上短暂灼烧消毒。
- 煮沸消毒
- 烘箱干燥消毒 **高压灭菌**

b. 化学药品消毒法 化学药品消毒主要用于生产性大量培养中，大型容器、工具、水泥池等常用化学药剂消毒。

- 漂白粉消毒
- **酒精消毒**
- 高锰酸钾消毒
- 石炭酸消毒 3%~5%

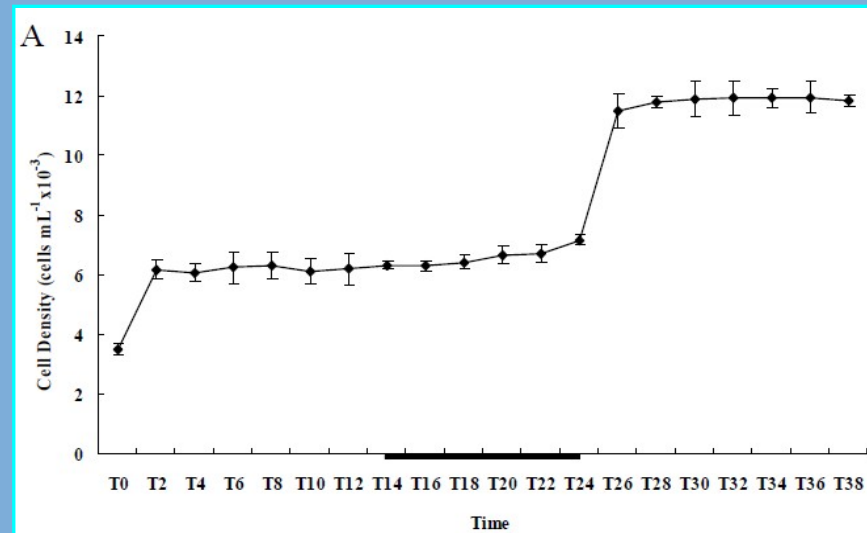
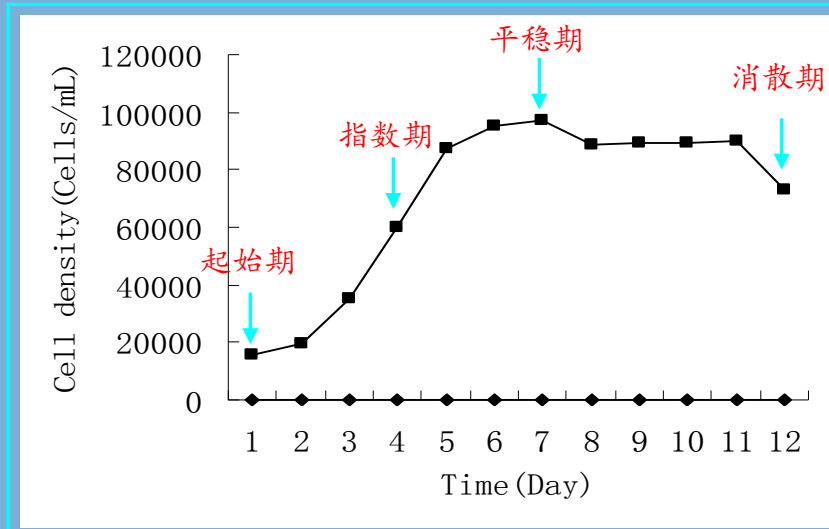
c. 紫外消毒 无法高压灭菌大器具

d. 抗生素消毒 藻液

3. 培养液的制备和消毒：加热消毒法/高压灭菌
 - 营养盐：母液配制 → 0.45um滤膜抽滤 → 高压灭菌（不能灭菌的0.22um滤膜过滤）
 - 培养液：0.45um抽滤 → 添加营养盐（不包括Vitamins, Si） → 高压灭菌 110 °C 30min → 添加Vitamins/Si

4. 接种：把藻液接入新配好的培养液中
 - 选择无污染、生长旺盛、颜色正常、藻液中无沉淀、细胞无附壁的藻种进行接种
 - 藻种液和新培养液的比例为1:5~1:50
 - 接种的时间最好在上午的10时~下午4点
 - 培养条件：保种的条件最好保证在藻种的最适生长条件，要保证藻种不受污染

5. 藻种培养：（一般情况）
 - pH 保持在6~8（Tris-Base）。光暗节律：14:10；光照强度：3000-8000lux；温度：20-23°C；盐度：38~34‰.
 - 营养盐：f/2, K, L1, YBC-II等。硅藻加Si
 - 每周摇动2~3次.
 - 一般15~20天.

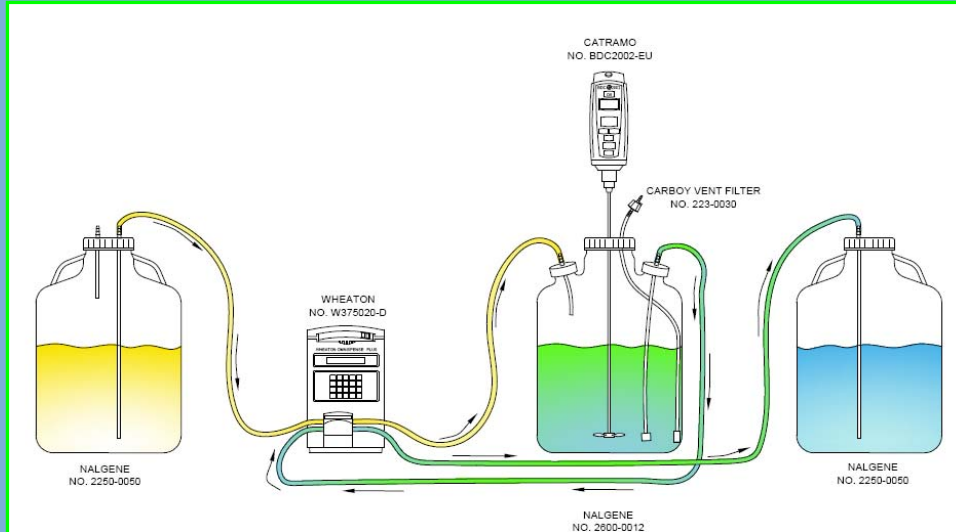


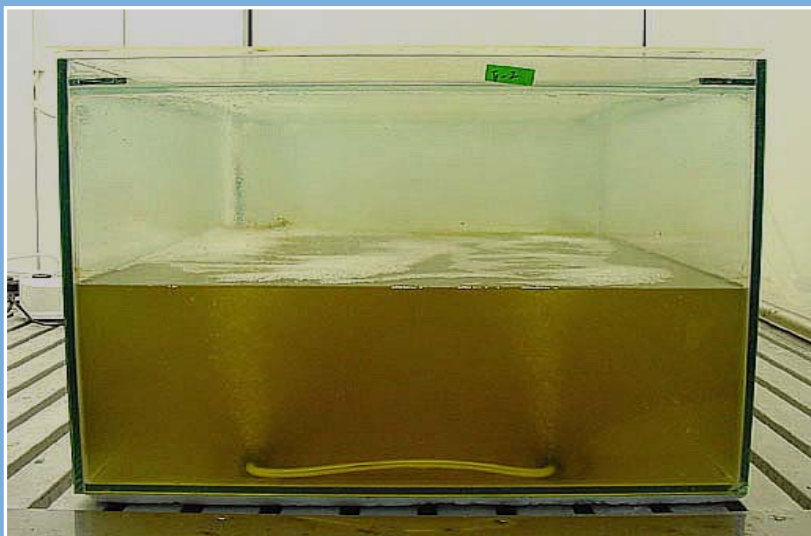
Alexandrium MTK4 不同生长期

同步化后一个细胞周期

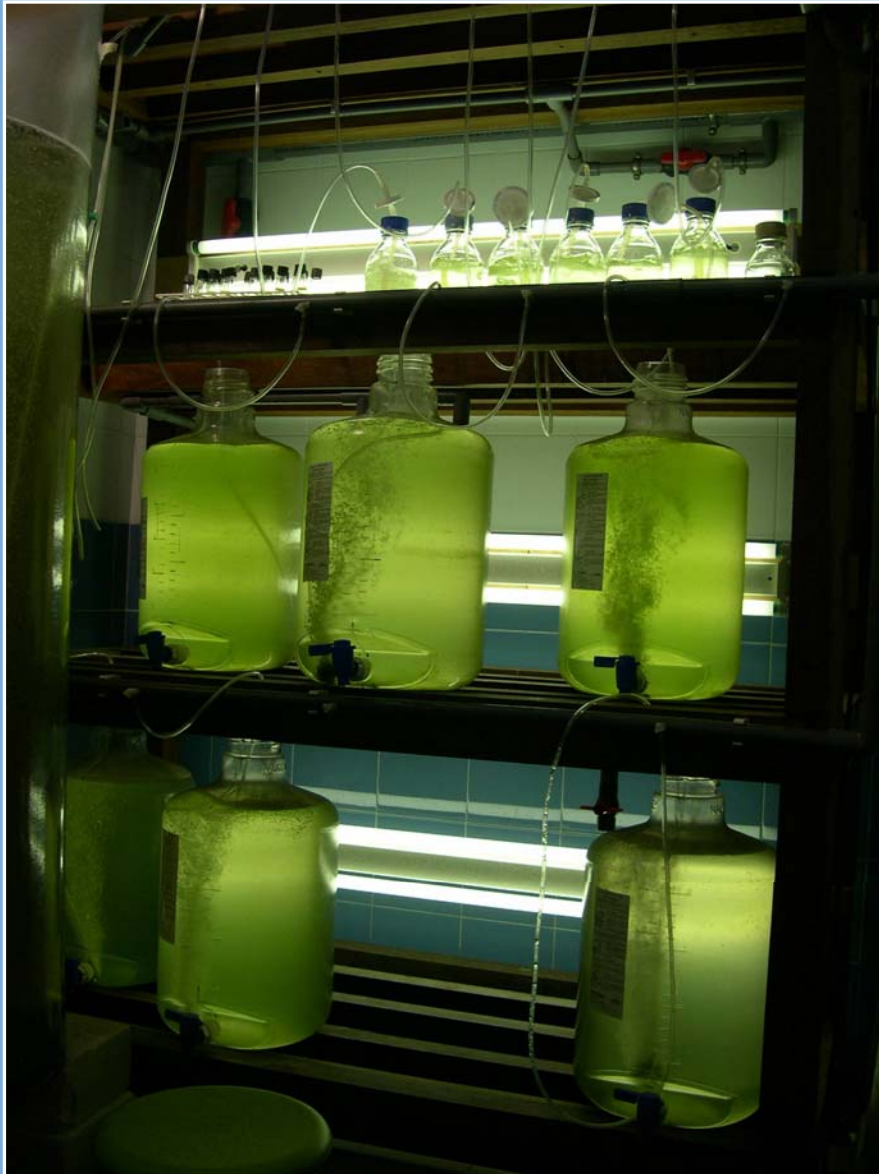
B. 批量培养

但一般生产性的单种培养，则只须达到消毒目的就可以。高压灭菌/紫外灭菌/化学药品消毒

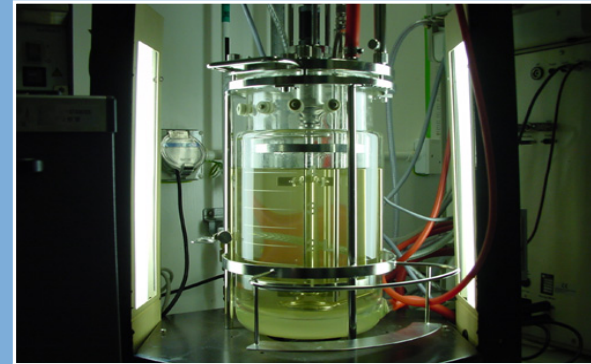




Large scale culturing using carboy



Green Algae



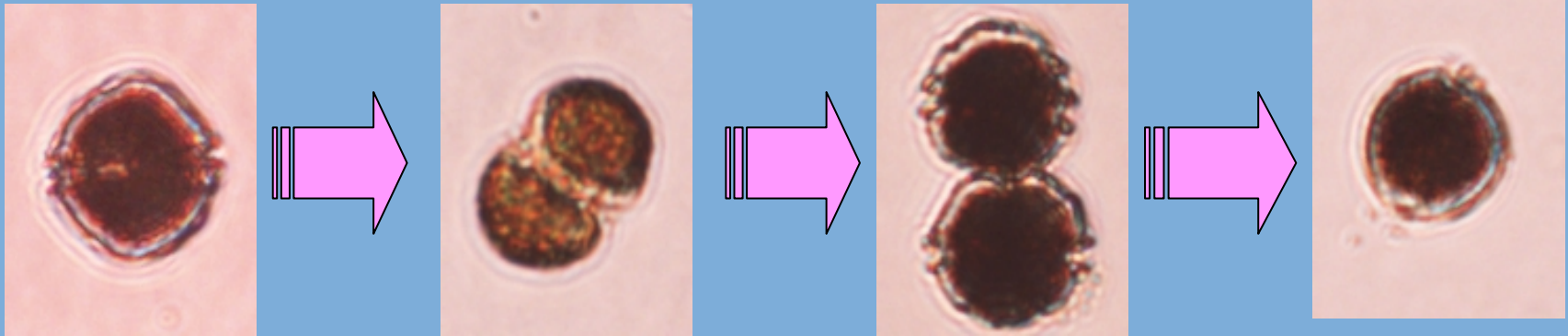
Prorocentrum lima



八、微藻培养常见问题分析

1. 细胞固定

甲醛、乙醇、戊二醛、鲁格氏, PI. etc.

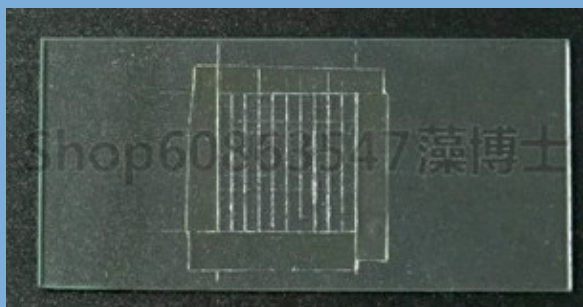


2. 细胞计数

细胞计数装置

- Sedgwick-Rafter 计数筐
- Palmer-Maloney 计数筐
- 血球计数板(0.2mm deep)
- 血球计数板(0.1mm deep)
- Petroff-Hausser 计数筐(0.02mm)
- Hawksley计数筐

——— 《Handbook of Phycological Methods》



- 浮游生物计数框
- 单细胞：个
- 多细胞：条
- 群体：打散计数

3. 人工海水的配制

配制方法

1. 蒸馏水若干，确定加营养盐量
 2. 添加营养盐，逐一溶解
 3. 充分搅拌，防止水体内溶解不匀。然后静置
 4. 0.45滤膜过滤（蠕动泵+滤器/隔膜泵+抽滤瓶）
 5. 添加 f/2-medium（硅藻专用的Na₂SiO₃·9H₂O 不能高压灭菌，只能灭菌后添加）
 6. 调节pH值到7.9-8.3.
 7. 高压灭菌（110度30分钟），70度取出，静置自然冷却
 8. 转接前看海水有无沉淀或针状结晶，若有，废弃重新配置
- 用海水晒干的盐添加去离子水重新勾兑成海水，经预实验发现44.2g/L d. H₂O, 盐度大概是千分之三十。
 然后是0.45滤膜过滤（蠕动泵+滤器/隔膜泵+抽滤瓶）
 - 5. 添加 f/2-medium（硅藻专用的Na₂SiO₃·9H₂O 不能高压灭菌，只能灭菌后添加）
 - 6. 调节pH值到7.9-8.3.
 - 7. 高压灭菌（110度30分钟），70度取出，静置自然冷却
 - 8. 转接前看海水有无沉淀或针状结晶，若有，废弃重新配置

Synthetic ocean water	1 g /L
NaCl	24.54
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.017
KCl	0.7
CaCl ₂	1.11
MgCl ₂ ·6H ₂ O	11.1
H ₃ BO ₃	0.003
Na ₂ SO ₄	4.09
KBr	0.1
NaF	0.003
NaHCO ₃	0.185

表 2.1 人工海水的组成⁴

Table 2.1 Compositions of synthetic seawater⁴

组·分 ⁴	含量(g/L) ⁴	组·分 ⁴	含量(g/L) ⁴
氯化钠(NaCl) ⁴	23.939 ⁴	碳酸氢钠(NaHCO ₃) ⁴	0.196 ⁴
氯化镁(MgCl ₂ ·6·H ₂ O) ⁴	5.079 ⁴	溴化钾(KBr) ⁴	0.098 ⁴
硫酸钠(Na ₂ SO ₄) ⁴	3.994 ⁴	硼酸(H ₃ BO ₃) ⁴	0.027 ⁴
氯化钙(CaCl ₂) ⁴	1.123 ⁴	氟化钠(NaF) ⁴	0.003 ⁴
氯化钾(KCl) ⁴	0.667 ⁴	氯化锶(SrCl ₂ ·6·H ₂ O) ⁴	0.024 ⁴

3. 充气培养产生泡沫原因分析

1. 通气时气泡过大过密集。

气泵：选择合适的小功率气泵，连接气阀，旋转气阀调节气体进入强度。

气头：选择冒小气泡的气头，调节气阀，使气泡最好是一个接一个形成一串，而不是剧烈通气，气泡造成培养基上部翻动。

2. 细胞破碎：气泡过大造成细胞破碎，形成带有颜色的气泡。我做甲藻细胞周期实验，用150L大缸培养，气泡过大，因为甲藻细胞壁较脆弱而破碎，培养液乳白色，形成白色泡沫。

3. 染菌：尤其是培养条件不是很好的地方，可以在气泵和气头之间可以串联一个0.22微米的滤头，对空气进行过滤，减少细菌的注入。

4. 藻类代谢物：我们在培养产油绿藻的时候发现，培养液面层会出现一层白色的膜，经检验不是菌膜，是油脂成分。

解决办法：

A: 藻体分离，离心或者筛绢过滤收集细胞，无菌海水淋洗去除泡沫

B: 重新配制培养基

C: 重新接种



4. 关于海水高温高压灭菌后析晶问题

- 灭菌冷却时遇到海水析晶现象，海水里出海针状结晶。

原因大概如下：

- 1. 灭菌后体积减少，挥发太多导致盐分析出。小体积（100毫升以下）海水灭菌，通常先灭大瓶海水和小空瓶然后分装。
- 2. 灭菌温度过高 水分析出太多。我们通常选择**灭菌条件：110-115度20-30分钟**。多次验证表明，从未结晶。
- 3. 瓶子包扎太严实，内外气压失衡，海水喷出。
- 4. 灭菌之后海水最好是自然冷却，水浴降温海水易结晶。通常是灭菌完成后温度降到70度以下取出室温冷却。

5. 关于海水高温高压灭菌后白色絮状物

1. 海水过滤之后放置太久，有细菌滋生。
2. 添加硅酸盐 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)，如果加到海水灭菌会出现乳白色沉淀。
养硅藻实验需要添加时，一般接种前添加。为避免灭菌，可用0.22微米针孔式滤器过滤。

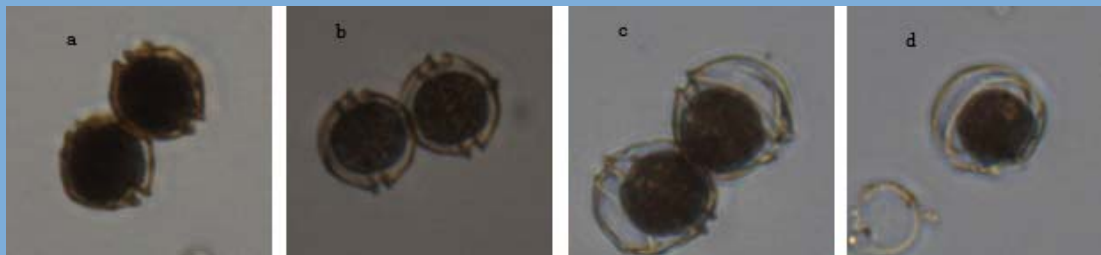
6. 抗生素处理细胞

细胞活力差，藻液染菌，有白色絮状物沉淀，恶臭气味。

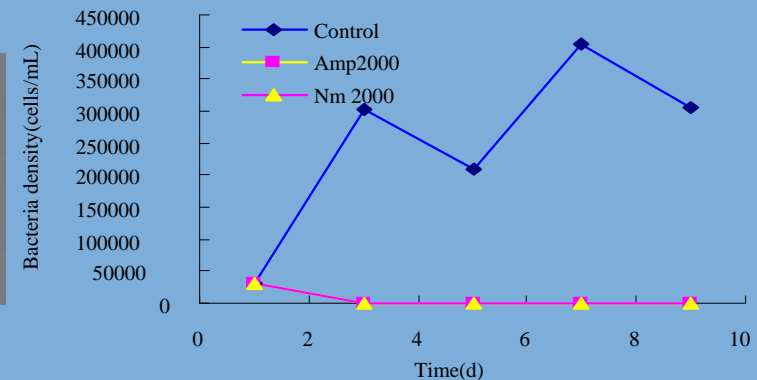
- 抗生素处理：青霉素-硫酸链霉素 5‰。处理24小时。
- 每年最多4次

抗生素/抗霉菌药物溶液 (青霉素/链霉素/两性霉素B)每毫升含10,000单位的青霉素、10,000 μg链霉素和真菌、抗酵母菌、抗霉菌或抗细菌制剂。其通常的有效剂量是10ml/L (100X溶液)。
 注： 这些产品仅用于研究，不用于诊断或治疗

抗生素和选择性试剂	货号	包装	储存温度	价格(¥)
两性霉素B (Fungizone) 溶液, 250 μg/ml。	●SV30078.01	50 ml	-0°C	169
抗生素抗霉菌药物溶液 (青霉素链霉素两性霉素B) 100X, 10,000 U/ml青霉素G, 10,000 μg/ml链霉素, 25μg/ml两性霉素B。	●SV30079.01	100 ml	-0°C	276
G418 硫酸盐溶液, 50 mg/ml。	●SV30069.01	20 ml	2-8°C	690
G418硫酸盐溶液, 纯度>90%。	●SV30068.01	1 g	2-8°C	541
	●SV30068.02	5 g	2-8°C	2,441
庆大霉素溶液, 50 mg/ml。	●SV30080.01	10 x 10 ml	15-30°C	3,220
鞘霉素B溶液, 50 mg/ml。	●SV30070.01	20 ml	15-30°C	1,501
青霉素链霉素/谷氨酰胺溶液	●SV30082.01	100 ml	-20°C	156
青霉素链霉素溶液, 10,000 U/ml青霉素, 10,000 μg/ml链霉素, 溶于0.85% NaCl。	●SV30010	100 ml	-20°C	190
嘌呤霉素2 HCl, UPG。	●SV30075.01	100 ml	-0°C	1,717



氨基青霉素对 *A. tamarensis* CI01 细胞形态的影响 (10×20)



抗生素添加后培养液中细菌密度的变化

公共培养室制度

1. 公共培养区实行统一分配和管理，如需延长时间请重新提出申请，使用期限结束未申请延时，培养区域由藻种室收回。
2. 请更换拖鞋和穿白大褂通过风淋室再进入培养区内。
3. 卫生制度：公共培养区卫生实行包干负责制。
 - 每人负责自己的培养区域，保持台面整洁、无盐渍、灰尘、杂物等；
 - 及时清除空瓶子和废弃的藻液；
 - 实验完毕，清理干净无菌操作台，废弃物准确地扔在垃圾筐里；
 - 公共培养区及地板卫生由管理人员每周定时清理。
 - 申请时间结束时，请自觉收走所有个人实验用品并通知管理人员确认
 - 门卡禁止擅自外借他人或帮人代刷。
 - 未经允许请不要进入保种区，禁止擅自使用保种室的移液枪和试剂。

九、藻种室开放规定及藻种室日常运行说明

开放规定

1. 公共培养区面向国重室所有老师和学生开放；
2. 需较长时间培养藻种时请填写申请表，并遵循藻种室使用制度；
3. 提取或购买藻种时请填写藻种提取申请表；
4. 熟悉藻种室日常运行情况。

日常运行说明

1. 本藻种室洁净度级别为10万级，相当于微生物最大允许数为500浮游菌/立方米；
2. 进入藻种室前请更换拖鞋和白大褂；
3. 风淋室风淋时间为8秒；风淋室的门同一时间内只能打开一扇；
4. 培养室的温度设置为20℃，波动为±2℃ 光暗周期为14 hL:10hD，保种室为温度20℃，波动为±1℃ 10hL:14hD；
5. 废弃藻液不能直接倒入洗手池内，需经过煮沸或加入氢氧化钠后倒入一楼洗手间内的专用废液池中；
6. 未经允许请不要进入藻种室。

交流



海洋微藻论坛: <http://www.icmpb.com>



MEL种质中心 <http://mel.xmu.edu.cn/gomap/CCMA>



群1: 141242931 (已满); 群2: 183042643 (已满);
群4: 37232263

谢 谢 大 家 !