

# 杜氏盐藻无菌纯化研究

唐颖, 王长海\*, 李克锦, 黄笛

(大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116024)

**摘要:** 首先通过杜氏盐藻及藻液内优势菌对抗生素的敏感性实验确定了氨苄青霉素、庆大霉素、头孢霉素和链霉素为该盐藻的除菌工具. 采用联合加入的方法, 即上述4种抗生素终浓度均为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 相同浓度连续混合处理3次, 每次处理间隔2 d, 再结合平板稀释分离法, 获得无菌盐藻. 带菌盐藻的生长稍快于无菌盐藻, 但会较早出现老化现象; 分别回加分离到带菌盐藻中的5种优势菌会促进无菌盐藻的生长. 本实验为进一步的盐藻转基因以及藻菌关系等研究奠定了基础.

**关键词:** 杜氏盐藻; 无菌纯化; 抗生素; 平板培养

**中图分类号:** Q938.8 **文献标志码:** A

## 0 引言

微藻的无菌纯种培养是微藻生理学、营养学和生物化学等研究的基础, 也是进行水产饵料、赤潮治理和遗传工程等应用性研究中亟待解决的问题. 现阶段微藻无菌纯化的主要方法有抗生素法、离心法、稀释法、毛细管法等<sup>[1~6]</sup>. 由于与藻共存的菌常附着在藻体表面胶质鞘等处, 物理和化学的不同纯化手段往往需要结合使用, 这也使得微藻的无菌纯化工作相对繁琐. 在已鉴定的微藻中只有很少一部分获得无菌纯种培养, 多数微藻的无菌纯化研究尚未见报道.

本研究以抗生素为除菌工具, 并结合涂布平板培养法分离无菌盐藻纯种, 以期对微藻无菌化培养研究提供依据, 并为进一步盐藻的遗传工程以及藻菌关系等研究奠定基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 盐藻来源及培养方法

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)来自烟台大学海洋学院. 培养条件为温度(23±0.5)℃, 自然光照, 静置培养. 培养基为f/2培养基, 所用海水取自大连水产学院近海海域, 经过滤后高压灭菌使用.

### 1.2 主要试剂

所有抗生素均购自大连博瑞得生物技术有限责任公司. 参照萨姆布鲁克等的方法配制抗生素母液<sup>[7]</sup>. 配制的抗生素母液用0.22  $\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌. 蛋白胨和酵母粉均购自Oxoid公司.

### 1.3 盐藻吸光度值测定

以722分光光度计和1.0 cm比色皿于波长682 nm处测量藻液的吸光度值<sup>[8]</sup>.

藻体比生长速率 $K(\text{d}^{-1})$ 的计算公式为 $K = (\lg OD_t - \lg OD_0) / t$ . 其中 $OD_0$ 是起始的藻液吸光度值;  $OD_t$ 是经过 $t$ 时间的藻液吸光度值;  $t$ 是生长时间, d.

### 1.4 藻液内细菌数目的粗略测定

取100  $\mu\text{L}$ 适当稀释的藻液涂布于2216E固体培养基中, 于(28±0.5)℃下培养48 h后, 计算平板中的菌落数即可粗略换算出藻液内的细菌数目. 每个样本重复3次, 取平均值.

### 1.5 测定盐藻培养液内细菌对抗生素敏感性的K-B纸片扩散法药敏试验<sup>[9]</sup>

将菌液密度调到约 $1.5 \times 10^8$ 个/mL, 用无菌棉棒蘸取菌液, 涂布于厚度均一的Mueller-Hinton(M-H)琼脂固体培养基(杭州微生物试剂厂)表面. 将含抗生素纸片(30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 杭州微生

物试剂厂)紧贴于平板中心位置的琼脂表面.在30℃下培养24h后,测量抑菌圈的直径.每个样本重复3次,取各抗生素抑菌圈直径的平均值.

### 1.6 K-B 纸片扩散法联合药敏试验<sup>[9]</sup>

将含两种不同抗生素的纸片贴于已接种菌的M-H琼脂表面,两片之间的距离为3~4mm.30℃下培养24h后观察结果,根据两种抗生素抑菌环的不同图形判断二者作用的相互关系.

### 1.7 无菌藻液中回加所有菌的方法

用2μm的滤膜除去处于生长初期的带菌藻,再将过滤液经0.22μm的膜过滤,使菌滞留于膜上.将此带菌滤膜加入到生长初期的无菌藻液中,即得回加了带菌藻中几乎所有菌的藻液<sup>[10]</sup>(附生在藻体上的菌除外).

## 2 结果与分析

### 2.1 藻液中霉菌的排除

在除菌的预实验中发现,用抗生素消除细菌一定的抑制作用后,藻液中会有絮状物出现,将藻液涂于2216E固体培养基上培养6~7d后,平板上有霉菌生长,说明该盐藻有霉菌污染.利用平板法培养盐藻50d,挑取无霉菌污染的盐藻克隆进行培养.最终的无菌检验结果证明该法可有效排除本藻液中的霉菌污染.用已排除霉菌污染的藻液进行进一步的除菌实验.

### 2.2 除菌抗生素的选择

#### 2.2.1 盐藻培养液内细菌对抗生素的敏感性

取对数生长中期的藻液,将其进行适当稀释后,通过2216E培养基平板分离得到菌落形态、大小、颜色等特征不同的5株细菌,分别记为A、B、C、D和E.利用药敏试验测定藻液中的这5株优势细菌对氯霉素等7种抗生素的敏感性,结果如表1所示.

表1 盐藻培养液内细菌菌株的抗生素敏感性

Tab.1 The antibiotic sensitivity of bacteria in culture of *Dunaliella salina*

细菌	氯霉素	庆大霉素	氨苄青霉素	链霉素	头孢霉素	卡那霉素	新霉素
A	+++	+++	+++	++	-	+	+
B	+++	+++	+	++	++++	+	-
C	-	+++	++++	+++	+	++	+
D	++++	+++	+++	++	++++	++	+
E	++++	+	++	+	+++	-	-

注:“++++”表示抑菌环平均直径大于50mm;“+++”表示抑菌环平均直径在41~50mm;“++”表示抑菌环平均直径在31~40mm;“+”表示抑菌环平均直径在20~30mm;“-”表示抑菌环平均直径小于20mm

由表1可看出,在这7种抗生素中,新霉素的抑菌效果最弱,抑菌环平均直径都在30mm以下,不作为本实验的除菌抗生素.氯霉素和庆大霉素对其中4株菌有较强的作用;而头孢霉素和氨苄青霉素对其中3株菌的作用较强.故暂将氯霉素、庆大霉素、头孢霉素和氨苄青霉素作为首选抗生素.考虑到抗生素之间的联合作用,将链霉素和卡那霉素也作为备选的抗生素.

另外实验中发现,用抗生素抑制藻液中部分优势细菌的生长,可分离到生长相对缓慢的细菌.菌株E正是此方法分离得到的.林伟也指出用不同抗生素初步除菌后,再分别进行菌种分离纯化及相应的药敏试验会得到更全面的结果,但同时使研究工作过于繁琐<sup>[11]</sup>.

利用联合药敏试验测定所选的除新霉素外的6种抗生素对于5株优势菌的作用是否存在拮抗关系.结果表明6种抗生素中任意两种对于5株菌的作用均为累加作用(即两种抗生素的抑菌环大小并未改变并且相交处成钝角)或协同作用(即两种抗生素的抑菌环交接角平直),表明这6种抗生素适合联合使用.

抗生素法是微藻除菌常用的方法.高剂量多次除菌可降低抗药菌出现的几率,而药敏试验目的是更有效快捷地找到合适的抗生素,提高除菌效率,同时也尽量避免出现菌的抗药性<sup>[12]</sup>.大量实验表明单种抗生素很难达到好的除菌效果,本文也曾选择氨苄青霉素、庆大霉素两种对优势细菌有普遍较强作用的抗生素进行单种抗生素除菌实验.结果表明当其终浓度为1000μg/mL时,藻液中仍有相当数目的细菌存在;并且随着抗生素浓度的继续增加,其细菌密度均降低不明显,说明高浓度的单种抗生素无法达到理想的除菌效果.故除菌实验中通常选用某些除菌性质互补如高效杀菌抗生素(如青霉素、头孢霉素)和慢效杀菌抗生素(如庆大霉素)的联用,来提高除菌的效率.

2.2.2 盐藻对抗生素的敏感性 以不加任何抗生素的盐藻为对照,测定盐藻对所选抗生素的敏感性,结果如表2和图1所示.培养10d后加氯霉素的藻液全部变白,盐藻全部死亡,说明氯霉素对盐藻的生长影响较大,不适宜作为该盐藻的除菌抗生素.其他5种抗生素浓度达到1600μg/mL时,终末细胞密度均达到对照组的75%以上.从图1更直观地看出,随着浓度的增大,除氯霉素之外的其他5种抗生素作用下的盐藻比生长速率没有明显变化,说明这5种抗生素对盐藻生

长的影响不大,可作为进一步除菌实验所选择的 抗生素.

表 2 盐藻对 6 种抗生素的敏感性

Tab. 2 The antibiotic sensitivities of *Dunaliella salina* to 6 antibiotics

抗生素	$\rho/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$OD_1$ (对数初期)	$OD_2$ (对数末期)	$K/d^{-1}$	终末细胞密度/ ( $10^4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ )
对照	—	0.105	0.582	$0.149 \pm 0.004$	$200.5 \pm 17.16$
庆大霉素	400	0.103	0.575	$0.150 \pm 0.007$	$198.0 \pm 10.58$
	800	0.104	0.594	$0.151 \pm 0.003$	$204.8 \pm 18.58$
	1 200	0.101	0.502	$0.139 \pm 0.006$	$171.8 \pm 11.93$
	1 600	0.106	0.450	$0.126 \pm 0.004$	$153.5 \pm 8.50$
头孢霉素	400	0.107	0.620	$0.152 \pm 0.002$	$214.0 \pm 5.29$
	800	0.102	0.621	$0.157 \pm 0.006$	$214.5 \pm 7.57$
	1 200	0.106	0.555	$0.144 \pm 0.004$	$191.0 \pm 18.25$
	1 600	0.105	0.526	$0.140 \pm 0.007$	$181.0 \pm 8.54$
氨苄青霉素	400	0.106	0.635	$0.155 \pm 0.005$	$219.5 \pm 8.39$
	800	0.105	0.646	$0.158 \pm 0.002$	$223.0 \pm 11.14$
	1 200	0.107	0.582	$0.147 \pm 0.007$	$200.5 \pm 11.68$
	1 600	0.110	0.576	$0.144 \pm 0.005$	$198.5 \pm 16.20$
链霉素	400	0.107	0.540	$0.141 \pm 0.005$	$198.0 \pm 15.62$
	800	0.103	0.507	$0.138 \pm 0.002$	$204.8 \pm 13.61$
	1 200	0.100	0.458	$0.132 \pm 0.002$	$171.8 \pm 10.41$
	1 600	0.105	0.452	$0.127 \pm 0.004$	$153.5 \pm 4.04$
卡那霉素	400	0.110	0.594	$0.146 \pm 0.009$	$204.8 \pm 4.04$
	800	0.106	0.579	$0.147 \pm 0.005$	$199.5 \pm 7.64$
	1 200	0.105	0.550	$0.144 \pm 0.006$	$189.0 \pm 13.45$
	1 600	0.108	0.538	$0.139 \pm 0.002$	$184.8 \pm 5.77$
氯霉素	400	0.105		全部死亡	
	800	0.103		全部死亡	
	1 200	0.106		全部死亡	
	1 600	0.107		全部死亡	

注:对数初期为传代培养 5 d 的藻液;对数末期为传代培养 10 d 的藻液;终末细胞为传代培养 13 d 的藻液

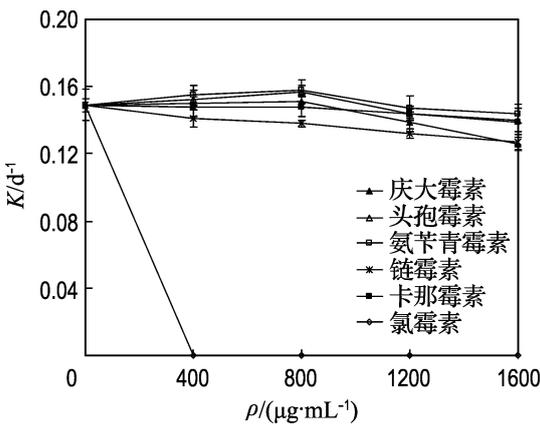


图 1 6 种抗生素不同浓度下盐藻的比生长速率  
Fig. 1 Relative rates of *Dunaliella salina* to 6 antibiotics in different concentrations

### 2.3 联合抗生素除菌

首先为了确定联合除菌的抗生素种类,设计了如下 4 种组合. 组合 1:3 种首选抗生素氨苄青霉素、庆大霉素和头孢霉素;组合 2:组合 1 中 3

种首选抗生素再加上备选抗生素卡那霉素;组合 3:组合 1 中 3 种首选抗生素再加上备选抗生素链霉素;组合 4:组合 1 中 3 种首选抗生素再加上备选抗生素卡那霉素和链霉素. 当 4 种组合各抗生素在对数中期藻液中的终浓度均为  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,联合抗生素作用 2 次(每次间隔 2 d),处理后第 3 d 验菌,组合 1~4 的藻液中细菌密度  $N$  分别为  $7.40 \times 10^4$ 、 $8.47 \times 10^4$ 、 $7.28 \times 10^3$  和  $6.85 \times 10^3$  cfu /mL,对照组的细菌密度为  $1.25 \times 10^5$  cfu /mL. 结果表明组合 3、4 除菌效果相对好一些,且效果差别不大,综上,选择组合 3 氨苄青霉素、庆大霉素、头孢霉素和链霉素等 4 种抗生素联合除菌.

进一步研究了这 4 种抗生素联合除菌的适当作用浓度及作用次数,结果如表 3 所示. 各抗生素浓度为 800 和  $1\,000 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,除菌效果较好,处理 3 次后,菌的密度可暂时降低至 0. 但当各抗生素浓度为  $1\,000 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,处理后藻液吸光度

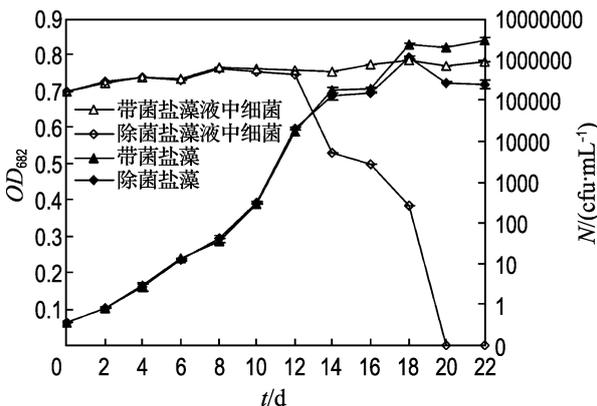
值仅为对照组的 61.8%。所以,最终确定较理想的联合抗生素除菌方法是:混合加入氨苄青霉素、庆大霉素、头孢霉素和链霉素于对数中期藻液中,其终浓度均为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;相同浓度连续混合处理 3 次,每次处理间隔 2 d。

表 3 4 种联合抗生素不同浓度及作用时间的除菌效果

Tab. 3 The effect of sterilization to different concentrations and treatment time of 4 combinative antibiotics

$\rho/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$N/(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$			$OD(3 \text{ 次},$ 第 10 d)
	1 次,第 3 d	2 次,第 3 d	3 次,第 3 d	
0(对照)	$6.80 \times 10^5$	$1.20 \times 10^6$	$8.30 \times 10^5$	0.953
200	$9.28 \times 10^4$	$1.06 \times 10^4$	$9.16 \times 10^3$	0.956
400	$7.56 \times 10^4$	$8.92 \times 10^3$	$3.90 \times 10^3$	0.923
600	$4.89 \times 10^4$	$3.90 \times 10^3$	$3.45 \times 10^2$	0.817
800	$3.65 \times 10^3$	178	0	0.804
1 000	$4.14 \times 10^3$	144	0	0.589

图 2 显示了使用此最佳联合抗生素除菌过程中藻与菌生长的动态变化特征.结果显示,对照液中细菌的密度在盐藻的一个生长周期内都在  $10^5$  数量级内变化.而联合抗生素的作用不但使藻液内细菌的数目急剧减少,还对盐藻的生长有一定的影响.这种影响作用会随着传代培养而逐渐消除。



注:分别在第 12、15 及 18 d 添加联合抗生素除菌

图 2 联合抗生素对盐藻和藻液内细菌生长的影响

Fig. 2 The effect of combinative antibiotics on the growth of *Dunaliella salina* and bacteria in the culture

另外, Cottrell 等认为逐步加入抗生素除菌可克服不同抗生素之间的拮抗作用<sup>[13]</sup>. 本文也曾使用 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的氨苄青霉素、头孢霉素、庆大霉素和链霉素逐步除菌,但结果不理想,可能与

抗生素逐步加入无法发挥抗生素之间的联合作用有关. 不过,林伟的实验表明对于某些微藻来说,抗生素逐步加入法的确很有效,说明不同微藻的除菌方法不能一概而论<sup>[12]</sup>.

有文献报道抗生素对细菌生长有一定的钝化作用,当消除培养体系中的抗生素影响时,细菌生长会有所恢复<sup>[9]</sup>. 而在本文实验中,进一步延长抗生素处理后藻液在 2216E 固体培养基上的培养时间,发现培养 20 d 后,浓度为 800 和 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的两个实验组确有菌落长出,细菌密度为 20 ~ 30 cfu/mL. 因此,进一步的实验将联合抗生素处理 3 次后第 3 d 的藻液进行适当稀释后立即涂于 f/2 固体培养基,利用平板法进一步分离无菌单克隆藻,以保证除菌效果. 另外,利用平板法分离无菌藻也可较快捷地消除抗生素对盐藻生长的影响。

## 2.4 涂布平板培养法分离纯化无菌藻

将抗生素优化处理后的藻液适当稀释后涂布于 f/2 固体培养基,培养 20 d,选取藻落密度适当且菌落数目最少的平板,用灭菌牙签挑取藻落大且与菌落分离的单克隆藻株,于 f/2 液体培养基中培养,共挑取 20 个单克隆藻株,从 1 到 20 编号。

将培养 25 d 至生长对数中期的 20 个单克隆藻株涂布于 2216E 固体培养基上验菌,30 d 后,编号 1、6、10、14、15、18、19 的单克隆藻的平板上出现菌落,其余 13 个藻株均未长菌. 将这 13 个无菌藻继续传代培养一个月,再用 2216E 固体培养基验菌,结果 2、12、13 和 16 均未出现菌落,初步证明获得了纯化的无菌藻. 实验发现这 4 株无菌藻的生长无大差别,遂将其混合藻液作为后续实验的无菌藻藻种,进行进一步的无菌鉴定。

汪本凡也曾利用高盐法和平板分离法结合以及离心法与平板分离法结合获得无菌盐藻<sup>[14]</sup>. 不过,很多海水中与耐盐微藻共栖的细菌同时也具备了嗜盐或耐盐的特性,这使得高盐法用于这类耐盐微藻的除菌有一定的局限性. 离心法适于作为除菌工作中的辅助手段,从而减少培养体系中大量游离的细菌;但值得注意的是离心法难以去除附生在藻体表面的细菌,并且反复离心的操作会增大微藻染菌的机会. 固体平板稀释分离法通常用于藻的无菌纯化的最后步骤,可以去除不稳定附生在藻体表面的菌体. 不过,要考察与藻稳定共栖或寄生于藻体的菌就需要进一步的实验观察了。

## 2.5 无菌藻的鉴定

2.5.1 培养法 将处于对数生长期的初步分离纯化的无菌藻分别接种于固体和液体的 2216E、f/2、添加营养盐的 f/2(0.5% 蛋白胍, 0.5% 酵母膏) 和葡萄糖酵母膏真菌培养基(葡萄糖 1 g, 酵母膏 0.1 g, 海水 1 000 mL) 中, ( $28 \pm 0.5$ ) °C 下培养 30 d, 镜检均未有菌生长的迹象。

2.5.2 镜检法 采用扫描电镜(JEM-1200EX) 镜检处于对数生长期的分离纯化的无菌藻。结果如图 3~5 所示, 无菌藻轮廓清晰, 表面及藻液中均未发现菌体, 藻体间较自然带菌藻体分散。而对照组的藻体表面及藻液中均可见到大量菌体, 很多藻因被菌体包裹而无法辨其轮廓, 并且藻体也更加容易聚合在一起。

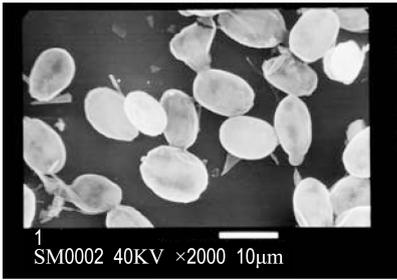


图 3 2 000 倍扫描电镜下的无菌盐藻

Fig. 3 The SEM photograph of axenic *Dunaliella salina* ( $\times 2\ 000$ )

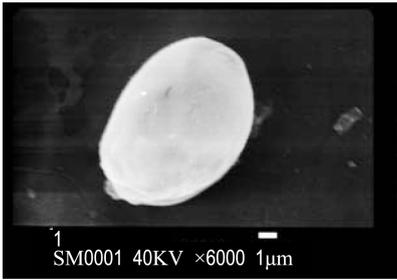


图 4 6 000 倍扫描电镜下的无菌盐藻

Fig. 4 The SEM photograph of axenic *Dunaliella salina* ( $\times 6\ 000$ )

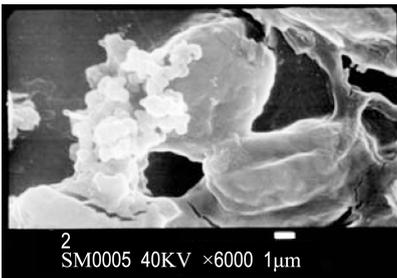


图 5 6 000 倍扫描电镜下的有菌盐藻

Fig. 5 The SEM photograph of nature *Dunaliella salina* ( $\times 6\ 000$ )

## 2.6 无菌藻、自然带菌藻的生长初步比较

由图 6 可见自然带菌藻的生长较无菌藻稍快, 但二者相差不大。培养中还观察到无菌藻培养 30 多天, 藻体悬浮分散均匀, 仍未出现老化现象, 而带菌藻则较早出现藻体凝聚成片、易下沉等老化现象。用 1.7 所述方法回加带菌体系的几乎所有菌, 观察到藻的生长和无菌、带菌藻生长差别不大, 但老化现象和带菌藻相似, 也比无菌藻较早地出现凝聚和下沉。这些说明和盐藻共栖的菌中可能存在促使盐藻老化的菌。另外, 带菌盐藻更较容易出现附壁的现象, 这也许与藻体和共栖细菌的细胞外分泌等多种因素有关。

分别向生长初期的无菌藻液中回加单一的 5 株分离到的优势菌(细菌密度  $2 \times 10^5$  个/mL), 发现这 5 株菌均可不同程度地促进无菌藻的生长。文献[15]的实验也表明与盐藻培养体系共存的某些菌可能会提供藻生长所需的维生素、微量元素等, 从而促进藻的生长。这些结果与林伟等一些实验结果是一致的<sup>[10]</sup>。

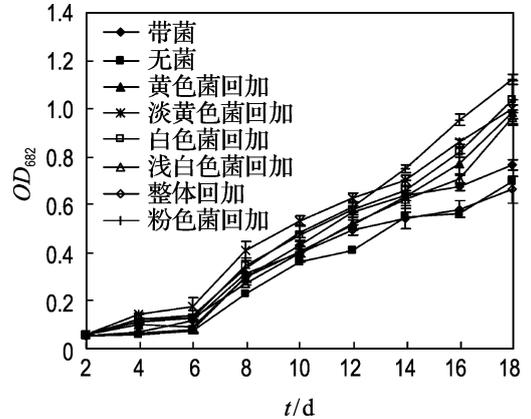


图 6 与盐藻共栖的细菌对于盐藻生长的影响

Fig. 6 The effect of bacteria on the growth of *Dunaliella salina*

## 3 结 论

(1) 通过盐藻及藻液内优势菌对抗生素的敏感性实验确定了氨苄青霉素、庆大霉素、头孢霉素和链霉素为该盐藻的除菌工具。

(2) 采用联合加入的方法, 即上述 4 种抗生素终浓度均为  $800 \mu\text{g/mL}$ , 相同浓度连续混合处理 3 次, 每次处理间隔 2 d; 再结合平板稀释分离法, 获得无菌盐藻。

(3) 带菌盐藻的生长稍快于无菌盐藻, 但会较早出现老化现象; 分别回加分离到的带菌盐藻中

的5种优势菌会促进无菌盐藻的生长.

## 参考文献:

- [1] 汪本凡,赵良侠,叶 霁,等. 微藻无菌化技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, **34**(2):363-366
- [2] WANG Chang-hai, HO A Y T, QIAN Pei-yuan, *et al.* Antibiotic treatment enhances C2 toxin production by *Alexandrium tamarens* in batch cultures[J]. *Harmful Algae*, 2004, **3**(1): 21-28
- [3] FERRIS M J, HIRSCH C F. Method for isolation and purification of cyanobacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(5): 1448-1452
- [4] YIM J H, LEE H K. Axenic culture of *Gyrodinium impudium* strain KG03, a marine red-tide microalga that produces exopolysaccharide [J]. *The Journal of Microbiology*, 2004, **42**(4): 305-314
- [5] DIVAN C L, SCHNOES H K. Production of axenic *Gonyaulax* cultures by treatment with antibiotics [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **44**(1): 250-254
- [6] CHO Ji-young, CHOI Jae-suk, KONG In-soo, *et al.* A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2002, **14**(5): 385-390
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [8] 李克锦, 唐 颖, 王长海. 盐藻的无菌培养及其抗生素标记的选择 [J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2009, **22**(2):117-121
- [9] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术 [M]. 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:912-923
- [10] 林 伟, 陈 騫, 刘秀云. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点比较 [J]. 海洋与湖沼, 2000, **31**(6):647-652
- [11] 林 伟. 海洋微藻与细菌相互关系研究——正负相互作用的几个例证 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所, 2005:28-30
- [12] 林 伟. 几种海洋微藻的无菌化培养 [J]. 实验与技术, 2000, **24**(10):4-6
- [13] COTTRELL M T, SUTTLE C A. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (prasinophyceae) using antibiotics [J]. *Journal of Phycology*, 1993, **29**(3): 385-387
- [14] 汪本凡. 杜氏盐藻纯化及生物学特性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004:8-10
- [15] 唐 颖, 黄 迪, 王长海. 无菌与带菌盐藻生理生化的初步比较 [J]. 海洋科学进展, 2009, **27**(s1):48-57

## Research on axenic purification of *Dunaliella salina*

TANG Ying, WANG Chang-hai\*, LI Ke-jin, HUANG Di

( School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China )

**Abstract:** The appropriate antibiotics for *Dunaliella salina* purification were initially determined by investigating the effects of several antibiotics on the microalgae and co-occurring bacteria. With the mixture of ampicillin, gentamycin sulfate, cefalotin sodium and streptomycin added in the culture, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final concentrations respectively, every two days and repeated three times, the bacteria-free algal culture was obtained by spread plate. The microalgae mixed with bacteria grew a little faster than axenic microalgae, but was aging earlier. The microalgae was stimulated to grow faster with isolated co-occurring bacteria added. The results show significance for further study on relationships between microalgae and co-occurring bacteria, as well as genetic engineering.

**Key words:** *Dunaliella salina*; axenic purification; antibiotic; plate culture