

蓝藻无菌化方法研究进展

李天丽, 郑凌凌, 张琪, 宋立荣*

中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

摘要: 随着微藻产业的蓬勃发展, 蓝藻作为具有重要经济价值的资源受到人们越来越多的关注, 其多糖和蛋白的开发已被应用于多个领域。为了更深入清晰地挖掘蓝藻的特性和功能, 研究者首先需获得无菌的纯种藻株, 这是深入开展蓝藻生理生化、遗传和毒性等研究的基础。重点综述了如何根据蓝藻的结构及生理特性选择合适的无菌化方法, 介绍了基于蓝藻与污染菌之间差异性的无菌化方法, 以期为蓝藻的无菌化工作提供参考。

关键词: 蓝藻; 无菌化方法

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2015.05.01

Progress of Aseptic Purification Technique of Cyanobacteria

LI Tian-li, ZHENG Ling-ling, ZHANG Qi, SONG Li-rong*

Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: With the vigorous development of the microalgae industry, people are paying much more attention to cyanobacteria according to its important economic value, as its polysaccharide and protein are applied in many fields. In order to excavate the characteristics and function of cyanobacteria more in-depth and clearly, it is necessary to obtain axenic cultures of cyanobacteria, which is also regarded as the foundation for the further research on physiological, biochemical, genetic and taxonomic characteristics of cyanobacteria. This paper mainly reviewed the chosen of appropriate aseptic purification methods based on their structures and physiological characteristics. Furthermore, the methods based on the differences between cyanobacteria and contaminated bacteria were introduced. The paper was expected to provide useful information for the works on purification of cyanobacteria.

Key words: cyanobacteria; aseptic purification technique

蓝藻, 又被称为蓝细菌(cyanobacteria), 是一类结构相对简单、进化历史悠久、能进行光合作用的原核生物, 为单细胞、丝状或非丝状的群体。近年来, 蓝藻因其部分种类可引发水华^[1]而受到越来越多的关注。另一方面, 蓝藻具有重要的经济价值, 其多糖和蛋白可被开发应用于食品医药^[2-4]、日用化工^[5]和环保^[6]等领域。然而, 由于无法获得蓝藻的无菌株制约了科学家们对于蓝藻的研究开发与产业化, 其主要原因在于从自然界中获取的蓝藻不是无菌的, 它们通常与细菌黏附在一起, 而细菌与蓝藻的关系是多种多样的, 有的细菌会促进蓝藻的生长^[7], 有的细菌与蓝藻在一

起会产生溶藻或者抑藻效应^[8,9]。获得藻种的无菌培养株对于其生理生化、分子遗传、毒性及分类等研究都是必要的, 细菌或者霉菌的存在会对研究产生干扰, 从而影响结果的准确性, 故蓝藻的无菌化是顺利完成很多实验的前提。另外, 藻种无菌化程度也是衡量藻株质量的标准之一, 为了提高保藏藻株的质量, 国际上主要的藻种库都十分关注藻株的无菌化问题, 如法国巴斯德研究所菌物保藏中心(Pasteur Culture Collection, PCC)藻种库长期以来在蓝藻的纯化方面做了很多工作^[10,11], 在蓝藻无菌株的获得方面积累了丰富的经验。

收稿日期: 2015-07-06; 接受日期: 2015-08-24

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA022001); 科技部基础条件平台项目(2005DKA32300)资助。

作者简介: 李天丽, 助理实验师, 硕士, 主要从事藻种培养与纯化方面的研究。E-mail: getli333@163.com。* 通信作者: 宋立荣, 研究员, 博士生导师, 主要从事藻类生物学与湖泊生态学方面的研究。E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

对蓝藻进行纯化存在诸多的困难,如步骤繁琐、纯化周期长以及易反复感染等,基于此,本文根据近年来的文献报道对蓝藻的无菌化技术进行归类综述,以期为蓝藻的研究开发与产业化研究提供技术参考。

1 基于蓝藻的结构及生理特性的纯化方法

蓝藻被称为是极端环境的开路先锋,实行荒漠化治理后的沙原戈壁,最先生长出的生物往往是蓝藻,它是荒漠中生物结皮形成最关键的必须生物^[12],在温泉或极地,潮湿土壤中或干燥的岩石上,都会有蓝藻的存在。蓝藻之所以适应环境的能力如此强大,是与其结构和生理特性密不可分的。与其他微藻不同,蓝藻属于原核生物,没有细胞核和色素体,但有些结构和生理特性是蓝藻所特有的,在有些种类的丝状蓝藻中,我们能同时观察到多达4种细胞类型:可以进行光合放氧及CO₂固定的营养细胞、具有滑行运动能力的藻殖段的细胞、休眠的厚壁孢子以及可固定空气中氮素的异形胞^[13]。可以根据这些结构和特性对蓝藻进行纯化。

1.1 可产生厚壁孢子的蓝藻

某些蓝藻在生长受到胁迫时,会产生具备休眠和繁殖功能的厚壁孢子,以适应不良的环境,当生长环境恢复正常后,厚壁孢子会萌发成正常的营养细胞。厚壁孢子能够耐受较高的温度,可以根据这一特性对蓝藻进行纯化。Wieringa^[14]利用高温(47~48℃,15~75 min)对缺氧条件下培养的鱼腥藻、念珠藻等进行处理,得到了系列无菌株。此方法适用于可产生厚壁孢子的蓝藻,且污染的细菌不能产生孢子。

另外,针对可分化产生厚壁孢子的蓝藻,可采用一些具备较强的杀菌或者抑菌效果的化学试剂进行处理以达到除菌效果。Vaz等^[15]利用次氯酸钠对3株念珠藻进行了纯化:用BG-11₀(缺氮培养基)进行培养,直至分化产生大量的厚壁孢子,再用稀释的次氯酸钠溶液(1%、2%、3%)分别处理10 s、20 s、30 s,涂布于BG-11₀(缺氮培养基)固体平板,培养至少2周。结果显示,用次氯酸钠溶液处理10 s即可达到除菌的效果,此方法操作简单快速、成本低,适用于可产生厚壁孢子的

蓝藻。

1.2 具有趋光运动特性的蓝藻

约一半的单细胞蓝藻和四分之三的丝状蓝藻在固体培养基中可表现出趋光运动的特性^[10],Vaara等^[16]利用这一特性,对伪鱼腥藻、颤藻、鞘丝藻、席藻和鱼腥藻等进行了纯化:在1%的BG11固体平板上划水平线,然后将少量藻种接种到平板中央,26℃单向光照下(50~100 lx)培养,光照方向与划线方向平行,过夜培养后在显微镜下挑取。对比实验中发现,丝状蓝藻在划线平板上的滑动距离远远大于未划线平板上的滑动距离,在滑动过程中,蓝藻可进行自清洁,与吸附的细菌分离开来,最终达到除菌的目的。

1.3 具有伪空胞的蓝藻

有些种类的蓝藻细胞(如微囊藻、束丝藻、鱼腥藻和阿氏颤藻等)中含有伪空胞,在显微镜下这些伪空胞呈现黑色、红色或紫色。蓝藻可以通过伪空胞调节自身的浮力进行垂直迁移,以获取适宜的光能和充足的营养盐^[17]。由于伪空胞的存在,可造成蓝藻细胞与污染菌之间的悬浮性差异,可利用这种差异性对蓝藻进行纯化。Shirai等^[18]通过实验发现,有些微囊藻藻株单纯使用平板涂布的方法无法得到无菌株,于是尝试利用附生菌与微囊藻的不同悬浮特点进行分离,在平板涂布方法基础上尝试了两步离心法:取对数生长中期的藻液用无菌水稀释100倍,漩涡震荡,取1 mL细胞悬浮液于1.5 mL离心管中,150 g,20℃离心30 min,使得具有伪空胞的微囊藻细胞停留在液体上层,而细菌的数量减少三分之二,随后2 000~3 000 g,20℃离心5 min,高速离心用以去除上层液体中的细菌,取上层液体1 μL在CB琼脂糖固体平板上进行涂布,长出单个藻落后进行挑取培养,获得了无菌微囊藻。

1.4 具有异形胞的蓝藻

有些蓝藻和固氮菌一样,具有固氮酶,能够将空气中游离氮素进行同化,为细胞自身生长提供含氮化合物。在进行显微观察时,成熟的异形胞比营养细胞体积稍大,色素减少,包被加厚。异形胞的存在使得固氮蓝藻能够在缺氮培养基中生长,可以利用缺氮培养基进行纯化以提高藻-菌比例,再结合其他纯化方法得到无菌株^[6]。作者利用BG-11₀(缺氮)固体平板培养基对鱼腥藻和

念珠藻进行划线纯化,在反复划线数次后发现污染菌的数量大大减少,但仍需结合其他纯化方法才能得到无菌株。若外源污染中含有固氮菌,则此法不宜采用。

1.5 细胞表面有多糖胶被的蓝藻

很多蓝藻细胞表面具有多糖胶被,由于多糖胶被与蓝藻细胞很难完全分离,故黏附在多糖胶被上的细菌很难被去除。Fujishiro 等^[19]在对隐杆藻进行纯化时,通过对藻液进行超声后离心(14 000 g, 10 min)的方法,去除了隐杆藻细胞表面的多糖,从而也去除了多糖黏附的细菌,再加入40%~50%的碘克沙醇溶液中进行超速离心(112 700 g, 2 h),最大程度地去除了细菌污染。

2 基于蓝藻与污染菌之间差异性的纯化方法

2.1 抗生素方法

抗生素是微生物的代谢产物或人工合成的类似物,可以干扰其他微生物的生长或代谢。不同的抗生素可以通过不同的途径来抑制细菌的繁殖,其抑菌机制主要分为4种类型:干扰细胞壁的合成、损伤细胞膜渗透性、抑制蛋白质合成以及抑制核酸的转录与复制^[20],可根据蓝藻与细菌对抗生素的耐受性差异来选择合适的抗生素作为除菌的有力工具^[21]。

利用抗生素对蓝藻进行除菌的优点是周期短、见效快,近年来越来越多的研究者选择用此法进行蓝藻的纯化。Han 等^[22]尝试了7种抗生素用于念珠藻的无菌化,利用代谢组学的方法优化和评估了抗生素处理,比较了念珠藻对各种抗生素的耐受性,深入研究了其中4种抗生素对念珠藻代谢活性的影响,以及去除抗生素后念珠藻的代谢修复及其所需时间,最终确定抗生素的最佳添加顺序,依次为壮观霉素(奇霉素)、庆大霉素、氨基青霉素和卡那霉素。

Han 等^[23]为了获得铜绿微囊藻的无菌株,在对其进行超声-过滤洗涤后,依次用卡那霉素(50 μg/mL)、氨基西林(100 μg/mL)、亚胺培南(50 μg/mL)25℃处理过夜,在此需要注意的是,在每种抗生素处理完后需进行过滤洗涤以去除此种抗生素,再加入新抗生素处理。若同时加入3种抗生素,会因对微囊藻细胞杀伤力太大而致死。

在应用抗生素进行处理时,可加入有机质来促进污染菌的生长,使得这些污染菌优先被抗生素作用。Choi 等^[24]利用亚胺培南(100 μg/mL)、新霉素(100 μg/mL)、放线菌酮(20 μg/mL)对钝顶螺旋藻进行连续处理,在加入抗生素的同时添加了0.1%的葡萄糖,以促进细菌的生长,且需在黑暗条件下处理,若在光照条件下处理,藻细胞会因生长代谢旺盛而受到抗生素的迫害,导致藻细胞死亡。

不同藻株在不同环境中污染的杂菌类型不同,为了增强抗生素的除菌效果,可对污染菌进行鉴定,从而有针对性地选择合适的抗生素进行处理。Hong 等^[25]对能源微藻——节球藻进行了纯化,再采用放线菌酮(20 μg/mL)、亚胺培南(100 μg/mL)对目的藻株进行24 h的黑暗处理后在BG11平板上进行转接培养,但只使得部分藻株得到了纯化,对于未能纯化干净的藻株,对其污染细菌进行了分离鉴定,有针对性地选择了卡那霉素(100 μg/mL)进行处理,最后得到了无菌株。

由于蓝藻是原核生物,与细菌的遗传距离小,所以在利用抗生素除菌时,会对蓝藻细胞产生伤害,藻株对于不同的抗生素耐受性不同,故在用此法进行除菌时,需检测藻株对于抗生素的最低致死浓度^[24]。

2.2 化学试剂方法

某些化学试剂具备较强的杀菌或者抑菌效果,但蓝藻对其却表现出一定的耐受性,根据这种差异性可选择合适的化学药品对蓝藻进行纯化,其纯化效果主要取决于试剂种类的选择、作用的浓度和处理的时间等,在具体操作中,需对作用浓度和处理时间进行摸索,以求除菌效果显著的同时对藻细胞的伤害降到最低。

除了利用次氯酸钠溶液进行蓝藻纯化外,根据蓝藻和细菌对硫化物的耐受性不同,可采用硫化物处理的方法进行纯化。Bolch 等^[26]采用不同浓度的Na₂S对8株铜绿微囊藻进行纯化,最后得到3株无菌株。此方法操作简单、见效快,但是某些蓝藻对硫化物的耐受性表现得比细菌还要低,则无法使用此方法进行纯化。

溶菌酶也可用于蓝藻纯化, Kim 等^[27]利用溶菌酶对水华鱼腥藻进行除菌:在藻种培养液中加入溶菌酶后于37℃作用60~90 min,离心洗涤后

取 50 μL 培养液涂布于 1.5% BG11 固体平板,待长出后挑取单藻落培养,结果显示 1 g/L 的溶菌酶浓度对水华鱼腥藻的除菌效果最佳,且对藻细胞伤害不大。

此外,苯酚^[28]、亚硫酸钠^[29]、叠氮化钠、氟化钠^[30]等也被用于蓝藻的纯化。

2.3 紫外照射方法

紫外照射方法是基于蓝藻和细菌在抵抗紫外照射方面的差异性上建立起来的,由于蓝藻在紫外照射下会启动自身的保护机制^[31~33],因此相对细菌而言具有较高的抗 UV 能力。Gerloff 等^[34]采用紫外照射的方法获得了无菌的聚球藻;李静等^[35]采用抗生素和紫外照射联合处理的方法得到了微囊藻的无菌株。

3 其他方法

平板涂布与划线是得到纯培养物最传统经典的方法,日本学者 Shirai 等^[36]应用 B-12 和 CB 固体培养基对微囊藻进行了无菌化:取 0.1 mL 的藻液(涡旋震荡后稀释 100 倍)加入到 10 mL 灭菌冷却未凝固的固体培养基(0.4%~1%)中,倒平板,或将稀释的藻液直接涂布在凝固的固体平板上,长出藻落后进行分离。Nishizawa 等^[37]在上述方法基础上进行了改进,对伪鱼腥藻进行了纯化,为了尽量得到单细胞,取指数生长早期 1 mL 的藻液,加入直径为 1.8~2 mm 的玻璃珠后漩涡震荡 30 s,然后 400 g、20 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,将上清涂布在 0.4%的固体 CB 琼脂糖培养基上,待单藻落长出后挑出培养。Hong 等^[38]利用平板划线的方法从采自南极的藻垫样品中分离出颤藻。此方法优点在于成本低、操作方便,对藻细胞本身伤害小;缺点在于无菌化周期较长,有时需反复涂布或划线数次才能得到无菌株,且对于含胶被的蓝藻来说成功率较低,故此方法常常与其他无菌化方法联合起来对蓝藻进行除菌。

过滤洗涤方法,需根据蓝藻细胞的形态和大小选择合适的微孔滤膜或其他滤过材料,用无菌水或无菌培养基对藻细胞进行反复洗涤,以降低杂菌的数量,再结合其他方法获得无菌株^[39, 40];

毛细吸管清洗法是采用毛细吸管在显微镜下对单个藻细胞进行反复洗涤以去除细菌的方法,此方法要求所用器皿全部经过灭菌,且整个操作

过程在无菌环境下进行,王霞等^[41]应用此法获得了铜绿微囊藻的无菌株。

4 综合处理方法

以上所述方法各具特点,但各具局限性。某些蓝藻与细菌黏附紧密,或样品中存在其他的杂质,单纯使用一种方法难以达到理想的无菌化效果,因此需针对藻种具体的污染情况,采取多种方法联合对蓝藻进行处理。

Sena 等^[42]采用过滤洗涤、化学方法等联合对节旋藻进行无菌化处理:第一步,对 20 mL 培养液进行过滤洗涤,即利用 47 μm 的微孔滤膜进行过滤,用 1 L 无菌缓冲液进行洗涤;第二步,高碱处理(pH 12, KOH)72 h,以去除原生动植物和微囊藻的污染;第三步,组合抗生素处理(氨苄青霉素 61.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 盘尼西林 85.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 头孢西丁 76.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 美罗培南 38.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在 32 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 黑暗处理 48 h,离心洗涤去除抗生素;最后一步采用稀释(1:10 000)的方法去除色球藻,最终得到节旋藻的无菌株。

Li 等^[43]经加热、超声、离心洗涤、平板划线、单向光照培养等步骤得到纯化的 *Leptolyngbya nodulosa* 无菌株。Katoh 等^[6]利用平板涂布、抗生素处理(卡那霉素 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 放线菌酮 30~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、离心洗涤等方法从蓝藻结皮中分离纯化得到一株普通念珠藻无菌株。

5 无菌检测方法

为了判断是否已得到藻种的无菌株,需在除菌操作后对藻种进行无菌化检测。若利用抗生素方法进行无菌化,则需在检测之前必须经过反复洗涤和多次转接培养,以去除抗生素的影响,避免判断有误。常用的无菌检测方法有 3 种,其方法比较见表 1。目前对于无菌检测方法尚无统一标准,每种方法具有其优缺点,研究者可根据实验条件同时选择多种方法进行检测,以提高检测的准确性。

6 展望

蓝藻的无菌化工作通常使研究者感到棘手、

表1 无菌检测方法的比较

Table 1 Comparison of sterility testing methods.

方法名称	方法举例	优点	缺点
富含有机质培养基检测法 ^[15,16,24,38]	LB培养基、R2A培养基等	成本低、操作简单方便、检测结果直观	检测耗时长
荧光染色法 ^[24,26,40]	AO(acridine orange,吖啶橙)染色法、DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole,4,6-二脒基-2-苯基吲哚)染色法等	快速、简便、结果准确	成本相对较高
显微观察法 ^[16,23,26,36]	扫描电镜、相差显微镜等	观察直观	对仪器设备要求高,对技术人员专业技能要求较高

繁琐且耗时,根据目的蓝藻的结构和生理特性而有针对性地选择纯化方法,可以提高纯化效率,为藻种的生理生化、遗传、毒性等研究奠定基础。相对而言,生长繁殖迅速且对化学药物(抗生素、杀菌剂等)耐受性较强的藻类,利用传统的无菌化方法较易获得无菌藻株,而某些对化学药物较敏感、或具有多糖胶被的单细胞群体或丝状体,细菌常附生在多糖胶被中,用单一的传统无菌化方法难以得到无菌株,因此需针对藻株的特性和具体染菌情况,设计有效可行的除菌方案。

目前,随着流式细胞仪和显微操作仪器的发展,有望大大提高无菌化工作的效率,Cho等^[44]采用超声波处理-FACS荧光激活细胞拣选法,显微镜下挑取无菌藻落的方法获得了小球藻的无菌株,此方法也可尝试应用于蓝藻的无菌化,其避免了使用抗生素等化学试剂对藻细胞产生的伤害,且操作简单快速。另外,在得到蓝藻的无菌株后,如何长久地保持藻株的无菌状态更需要深入探究,可通过一些途径如改变保藏方式以减少转接频率,规范化的无菌操作等,尽可能减少藻株与外界的接触,严格控制污染途径,以保持藻株的无菌状态。

参 考 文 献

- [1] Merel S, Walker D, Chicana R, *et al.*. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins [J]. *Environ. Int.*, 2013, 59:303-327.
- [2] Markou G, Vandamme D, Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients [J]. *Water Res.*, 2014, 65:186-202.
- [3] Bhatnagar M, Parwani L, Sharma V, *et al.*. Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena* sp. (Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents for wound management [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2014, 99:692-699.
- [4] Dixit R B, Suseela M R. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 2013, 103(5):947-961.
- [5] Li H F, Xu J A, Liu Y M, *et al.*. Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune* [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2011, 83(4):1821-1827.
- [6] Katoh H, Furukawa J, Tomita-Yokotani K, *et al.*. Isolation and purification of an axenic diazotrophic drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*, from natural cyanobacterial crusts and its utilization for field research on soils polluted with radioisotopes [J]. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 2012, 1817(8):1499-1505.
- [7] 王霞,吕宪国,张学林,等.松花湖铜绿微囊藻无菌株和单藻株生长因素的研究[J].*生态学杂志*,2005,5:518-522.
- [8] Shao J H, He Y X, Chen A W, *et al.*. Interactive effects of algicidal efficiency of *Bacillus* sp. B50 and bacterial community on susceptibility of *Microcystis aeruginosa* with different growth rates [J]. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2015, 97:1-6.
- [9] Lin S Q, Pan J L, Li Z H, *et al.*. Characterization of an algicidal bacterium *Breundimonas* J4 and chemical defense of *Synechococcus* sp. BN60 against bacterium J4 [J]. *Harmful Algae*, 2014, 37:1-7.
- [10] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, *et al.*. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1979, 111:1-61.
- [11] Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria [J]. *Methods Enzymol.*, 1988, 167:3-27.
- [12] Hu C X, Liu Y D, Song L R, *et al.*. Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands [J]. *J. Appl. Phycol.*, 2002, 14(4):281-292.
- [13] Meeks J C, Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states [J]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, 66(1):94-121.
- [14] Wieringa K T. A New Method for obtaining bacteria-free cultures of blue-green algae[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 1968, 34(1):54-56.
- [15] Vaz M G M V, Bastos R W, Milanez G P, *et al.*. Use of sodium hypochlorite solutions to obtain axenic cultures of *Nostoc* strains (Cyanobacteria) [J]. *Brazi. J. Bot.*, 2014, 37(2):115-120.
- [16] Vaara T, Vaara M, Niemela S. Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38(5):1011-1014.

- [17] 孔繁翔,高 光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J].生态学报,2005,03:589-595.
- [18] Shirai M, Ohtake A, Sano T, *et al.*. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57(4):1241-1245.
- [19] Fujishiro T, Ogawa T, Matsuoka M, *et al.*. Establishment of a pure culture of the hitherto uncultured unicellular cyanobacterium *Aphanothece sacrum*, and phylogenetic position of the organism [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(6):3338-3345.
- [20] 唐经凡. 抗生素的作用机理及应用[J]. 中国现代药物应用, 2008,2(7):99-100.
- [21] 麻晓霞,马丽萍,石勋祥,等. 微藻对常用抗生素敏感性的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2012,1:83-86.
- [22] Han P P, Jia S R, Sun Y, *et al.*. Metabolomic approach to optimizing and evaluating antibiotic treatment in the axenic culture of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2014, 30(9):2407-2418.
- [23] Han A W, Oh K H, Jheong W H, *et al.*. Establishment of an axenic culture of microcystin-producing *Microcystis aeruginosa* isolated from a Korean reservoir [J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 20(7):1152-1155.
- [24] Choi G G, Bae M S, Ahn C Y, *et al.*. Induction of axenic culture of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria [J]. Biotechnol. Lett., 2008, 30(1):87-92.
- [25] Hong J W, Choi H G, Kang S H, *et al.*. Axenic purification and cultivation of an Arctic cyanobacterium, *Nodularia spumigena* KNUA005, with cold tolerance potential for sustainable production of algae-based biofuel [J]. Algae, 2010, 25(2):99-104.
- [26] Bolch C J S, Blackburn S I. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutz. [J]. J. Appl. Phycol., 1996, 8(1):5-13.
- [27] Kim J S, Park Y H, Yoon B D, *et al.*. Establishment of axenic cultures of *Anabaena flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (Cyanobacteria) by lysozyme treatment[J]. J. Phycol., 1999, 35(4):865-869.
- [28] Carmichael W W, Gorham P R. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae 1,2 [J]. J. Phycol., 1974, 10(2):238-240.
- [29] Parker D L. Improved procedures for the cloning and purification of *Microcystis* cultures (cyanophyta) [J]. J. Phycol., 1982, 18(4):471-477.
- [30] Melo R D S, Neves M H C B, Baptista O R. Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, 1849 [J]. Acta Bot. Bras., 2011, 25:234-240.
- [31] Sinha R P, Klisch M, Groniger A, *et al.*. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae [J]. J. Photochem. Photobiol., B-Biol., 1998, 47(2-3):83-94.
- [32] Wright D J, Smith S C, Joardar V, *et al.*. UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (cyanobacteria) [J]. J. Biol. Chem., 2005, 280(48):40271-40281.
- [33] 汪 燕,李珊珊,李建宏,等. 铜绿微囊藻对紫外辐射的生理代谢响应[J].生态学报,2011(21):6532-6539.
- [34] Gerloff G C, Fitzgerald G P, Skoog F. The isolation, purification, and culture of blue-green algae [J]. Am. J. Bot., 1950, 37(3):216-218.
- [35] 李 静,李建宏,李文斌. 抗生素和紫外照射联合处理制备无菌微囊藻株[J].水生生物学报,2014,3:592-596.
- [36] Shirai M, Matumaru K, Ohtake A, *et al.*. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic microcystis strains (Cyanobacteria) [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55(10):2569-2571.
- [37] Nishizawa T, Hanami T, Hirano E, *et al.*. Isolation and molecular characterization of a multicellular cyanobacterium, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. strain ABRG5-3 [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, 74(9):1827-1835.
- [38] Hong J W, Kim S H, Choi H G, *et al.*. Isolation and description of a globally distributed cryosphere cyanobacterium from Antarctica [J]. Polar Res., 2013, 32, .
- [39] Ferris M J, Hirsch C F. Method for isolation and purification of Cyanobacteria [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57(5):1448-1452.
- [40] Mohamed Z A, Al-Shehri A M. Grazing on *Microcystis aeruginosa* and degradation of microcystins by the heterotrophic flagellate *Diphyllleia rotans* [J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2013, 96:48-52.
- [41] 王 霞,吕宪国,张学林. 松花湖铜绿微囊藻无菌株的分离及其生长特征[J].中国环境科学,2004,5:68-72.
- [42] Sena L, Rojas D, Montiel E, *et al.*. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2011, 27(5):1045-1053.
- [43] Li Z K, Yu J J, Kim K R, *et al.*. Nitrogen fixation by a marine non-heterocystous cyanobacterium requires a heterotrophic bacterial consort [J]. Environ. Microbiol., 2010, 12(5):1185-1193.
- [44] Cho D H, Ramanan R, Kim B H, *et al.*. Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples [J]. J. Phycol., 2013, 49(4):802-810.