

從養殖池中純化光合菌及其大量培養的技術

黃世鈴、楊豐隆、黃麗玲

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

從環境水域中，分離及純化光合菌的技術，是連續性大量培養光合菌的基礎。光合菌屬於廣鹽性，因此從文蛤池、文蛤醣酵肥池、水溝（排放大量有機物質如豬排泄物）、養蝦池等含鹽分的水域較淡水池容易分離出光合菌。由於光合菌可以應用在淡水、半淡海水及海水等養殖池，且往往可以得到預期的效果，所以使用時不需考慮水域的鹽度問題。大量培養光合菌時，以和光合菌滲透壓相同的鹽度為原則，此範圍內，光合菌不須要浪費能量來平衡體內的鹽度，可以達到快速增殖的目的。本文將說明如何純化光合菌與大量培養的技術。

光合菌純化

分離與純化光合菌具有相當的學術性和技術性，也要耗費很長的時間。光合菌成長較慢，每個純化步驟需 3–5 天，才有足夠大小的菌落供觀察和分離，全程約需 20–30 天。

一、配製培養基

分離及純化光合菌可以用 Trypticase soy agar (TSA) 或 NS 固態培養基。TSA 為商業製品，依照使用說明直接配製。NS 固態培養

基包括主成分（表 1）和微量元素（表 2），二者合併配製再加入 agar (15 g) 即可，可用來分離、純化和連續培養光合菌。NS 固態培養基為貧營養培養基，不適合用在一般細菌的分離和連續培養，但適合光合菌的增殖和成長，配製較麻煩，不加 agar 的培養液適合光合菌液態培養。其他應用營養物質如魚溶漿、魚粉、酵母萃取物、麩胺酸、葡萄糖、黑糖、糖蜜、去油黃豆粉等亦都可以用來培養光合菌，但要具備相當的光合菌培養知識和防止雜菌污染的技術。

表 1 NS 固態培養基主成分配方

Yeast extract	0.5 g
Sodium malate (sodium succinate)	5 g
NH4Cl	1 g
Mineral salts solution	100.0 ml

表 2 NS 固態培養基微量元素

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂	0.02 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.002 g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.001 g

二、從池塘環境中進行光合菌的分離

從池塘等水域中採得的水體多半含有大量的細菌，尤其是文蛤醣酵肥池和含大量有機物質的水溝，菌種菌相非常複雜，菌量也非常龐大。要從複雜菌相的水體中分離特定的細菌，首先要利用連續性的十倍稀釋法，再進行稀釋水體細菌培養及觀察。技術說明如下：

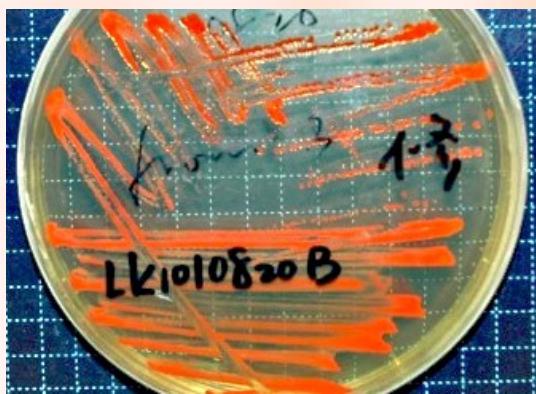
1. 將無菌操作台消毒。
2. 應用分離器材與生理食鹽水充分滅菌。
3. 取 10 支試管，每支試管裝入生理食鹽水 9 ml。
4. 以吸管取出 1 ml 環境水體放入第 1 支試管 (內含 9 ml saline)，試驗水稀釋倍率為 10^{-1} 。
5. 第 1 支試管震盪後，取出 1 ml 稀釋水液到第 2 支試管中，試驗水稀釋倍率為 10^{-2} 。
6. 第 2 支試管震盪後，取出 1 ml 稀釋水液到第 3 支試管中，試驗水稀釋倍率為 10^{-3} 。
7. 上述步驟重複到第 10 根試管，試驗水稀釋倍率分別為 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 。
8. 利用吸管從每根試管中抽出 50 μL 到 TSA 培養皿上，以 L 棒 (玻璃製或白鐵製均可)，輕輕將菌液塗抹開來。
9. 在 28°C 培養箱中培養，每天觀察培養皿中細菌菌落，連續觀察 7 天。

三、純化及培養

光合菌的純化和培養工作在固態培養基中較適當也較好操作。將稀釋過的水體置於固態培養基中培養細菌，此時會出現各種顏

色、外觀與大小的菌落，從其中挑選紅色菌落，這是細菌分離與純化的基本步驟。光合菌比其它細菌成長慢，而且剛出現的菌落顏色很淡，約需 3–5 天才會慢慢轉變為明顯的紅色或粉紅色；進一步從紅色的菌落不斷的進行分離與純化培養，最後可以得到純化的光合菌菌落。

純化與分離光合菌的操作過程：將採得的水體置於固態培養基中培養細菌，大量而複雜的菌落中出現單一紅色菌落 → 將紅色菌落挖出繼續分離純化培養，紅色菌落變多 → 將未完全分離的紅色菌繼續挖出分離純化培養，紅色菌落繼續增加 → 再將紅色菌挖出培養，培養皿出現大量的光合菌紅色菌落 → 固態培養基中已經出現單一的紅色菌落，再繼續分離純化，紅色菌落和單一紅菌落變多 → 再從單一紅色菌落分離培養，培養皿中已經呈現同型態的紅色菌落，光合菌分離工作已經完成 (如圖)，可以進行菌種鑑定、純種培養和菌種保存。



培養皿中呈現同型態的紅色菌落，完成光合菌分離

光合菌大量培養

一、光合菌液態培養

從固態培養基轉換到液態培養液中大量培養，應採逐步進行為原則。1個11 cm的培養皿，經5天大量培養後，可以收集到1 g的光合菌，1 g光合菌的數量約為 10^{11-12} ，培養瓶中含500 ml的液體培養，大量培養時，約需3-5個11 cm培養皿的量。光合菌數量要足夠進行液態培養才有意義，此時其菌數約為 10^9 菌落數/ml，經3-5天可增殖10倍左右，菌數約為 10^{10} 菌落數/ml，繼續進行擴量培養，從500 ml培養液 \rightarrow 1 L培養液 \rightarrow 2 L培養液 \rightarrow 5 L培養液 \rightarrow 10 L培養液...，直到預期的容量。

如初期液體中光合菌的數量為 10^9 菌落數/ml，經3-5天增量後約為 10^{10} 菌落數/ml，如每分地使用20 L，代表每分地加入光合菌數為 2×10^{14} 菌落數，池塘中加入大量的光合菌，才會具備菌與菌間的競爭力，也容易在池塘生態水域中擴量增殖形成優勢菌種，才具應用上的意義。

二、培養光合菌的基本條件

光合菌具鞭毛，有運動性和趨光性，大量培養時的重要因子包括溫度、光照、鹽度、溶氧（微氧環境）及pH等。

（一）溫度

大量培養光合菌的適當水溫為30-40°C，溫度愈高成長愈快。

（二）光照

光合菌具菌綠素，仰賴光合作用合成自身需要的醣類，以達到快速增殖的目的，所以在大量培養時需要較強的光照。如在室外養殖池進行培養，以上層水體的成長繁殖較好，也可利用透明的塑膠或玻璃容器進行培養。室內培養時，可以用塑膠或玻璃等透明

容器，或玻璃缸、FRP桶等，照光可以使用40 W燈炮，舊式燈炮除供應足夠光照條件外，也會提供熱源，對於偏好高水溫的光合菌效果很好。LED燈有足夠的光照條件，但沒有增溫的效果，所以以其為光源時應考慮水溫。

（三）鹽度和溶氧

光合菌為廣鹽性細菌，從淡水至海水（鹽度0-35 psu）都可成長，但大量培養時仍以鹽度10-15 psu較好，亦即培養液鹽度與光合菌菌體的滲透壓一致時最佳。光合菌對於水中溶氧適應很廣，在高溶氧和微氧條件下都可增殖，但微氧環境較高溶氧時成長率佳。

（四）pH值

實驗結果顯示，培養光合菌時，培養液的pH會隨著培養時間（菌體增加量）愈來愈高。光合菌最適的pH範圍為7.0-8.3，在這個範圍內，pH愈高，光合菌的成長和繁殖愈好。在培養2-3天後，培養液中pH會急遽升高，pH可能達8.5-8.9。pH>8.5會造成光合菌死亡，導致菌量急劇降低，所以要適時調整pH，也可以定時採收光合菌並加入新培養液，同樣有降低pH的效果，對於持續培養光合菌具有正面的效益。

採收光合菌相當重要，也是保證光合菌持續生產的不二法門，適當的採收可以：(1)有更大的空間供增殖和利用；(2)更多營養物質可供成長繁殖；(3)減少光合菌本身的外分泌酵素，以免抑制其增殖；(4)適時降低光合菌培養液的pH值，持續大量培養；(5)確保光合菌的生長曲線保持在對數期後期與穩定期中期之間，對於持續性繁殖具正面意義。