



別來“藻”麻煩！ 淺談抗生素於微藻無菌化培養之應用

許自研

水產試驗所東港生技研究中心

前言

微藻一般是指 1–10 μm 的單細胞藻類，肉眼雖無法看見，但是種類繁多、生物量龐大且分布極廣，不論在海水、淡水或潮溼的土壤中都能發現。而微藻本身富含蛋白質、脂肪、EPA、DHA 等多種生物活性物質，具有生長快、產量高、容易培養、適應能力強、可調控等特點，不論是生質能開發、廢水處理、健康食品、水產養殖等領域都有極大的應用潛力。

微藻的科技研究或產業利用上均需保持微藻種原的純淨單一，但其培養過程中卻極易受到細菌、真菌等微生物感染（圖 1），進



圖 1 微藻固態培養遭真菌及細菌感染

而影響實驗結果、培養成效或種原保存。一旦藻原發生感染，後續處理將會非常繁瑣，因此在微藻培養過程中，研究人員會衷心希望這些微生物別來「找麻煩」。常見的無菌化培養方式有離心洗滌法、稀釋過濾法、消毒法、毛細管顯微分離法、特性利用法，例如趨光運動性（圖 2）、耐高鹽性等以及抗生素法，其中以抗生素法在除菌及抑菌方面最為快速有效。

細菌的剋星—抗生素

抗生素 (antibiotics) 是由微生物 (包括細菌、真菌、放線菌屬) 所產生具有抑制其它類微生物生長及生存的一類次級代謝產物，或是用化學方法合成或半合成的類似化合物。抗生素主要的作用是直接殺死特定細菌或是抑制其生長，能透過影響細菌菌體的代謝過程而改變菌體型態，發揮抑制或殺滅效果，但因具有選擇性而無法一體適用於所有微生物。抗生素依其作用效果可分為廣效型或專一型，係針對「細菌有而人類或其他高等動植物沒有的機制」來達到殺傷目的，其作用機制主要為抑制細菌細胞壁的合成、與細菌的細胞膜相互作用、干擾蛋白質的合

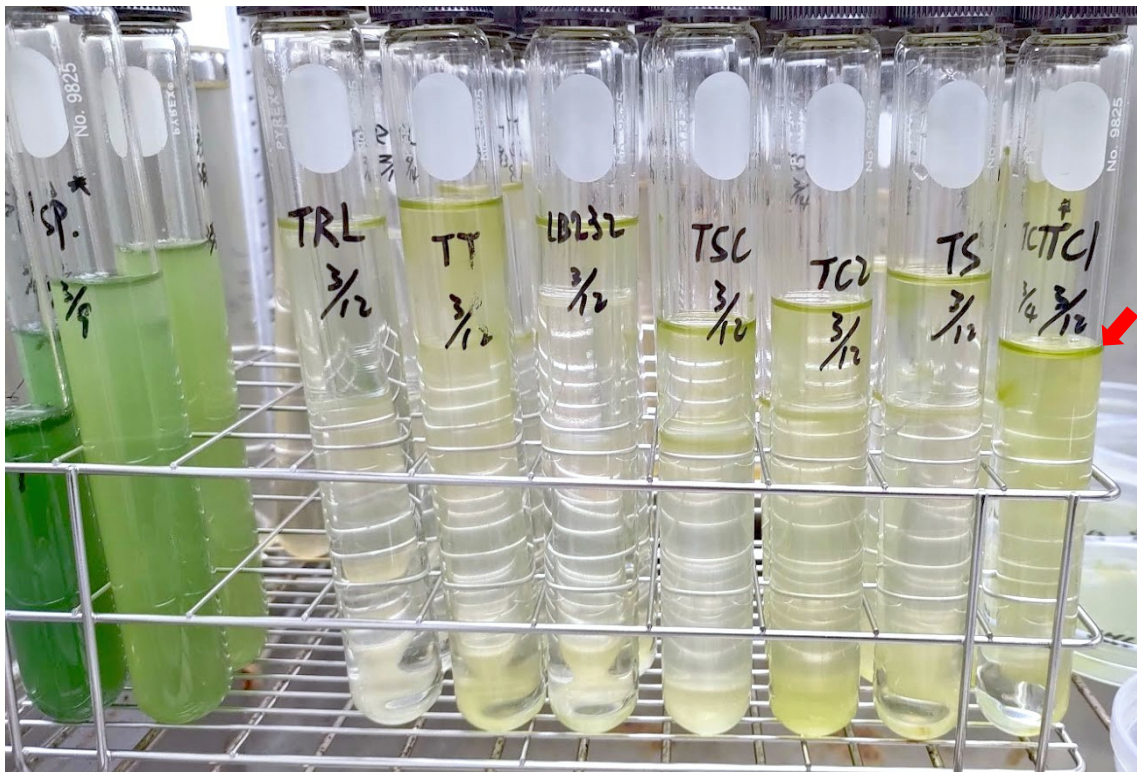


圖 2 扁藻具有鞭毛及趨光性會在水面聚集

成、抑制核酸轉錄和複製功能等四種類型。目前抗生素主要應用於醫學治療、生技研究、農業、畜牧業、食品工業以及水產養殖業，涉及層面廣泛，顯見抗生素與人類生活及產業發展息息相關。

殺菌不殺藻－抗生素法在藻種保存的使用

鑒於微藻和細菌對於不同抗生素之敏感性皆有一定差異，因此可以根據其耐受性，利用不同種類或濃度的抗生素除去藻液中所含的細菌，故選擇最適合的抗生素，是此法的關鍵所在。

在除菌或滅菌處理過程中，必須滿足兩項前提，其一為抗生素不能對微藻的生長及活存產生負面影響，其二為必須具有殺滅或抑制細菌的能力。在微藻培養過程中，添加抗生素將直接對藻細胞產生正面或負面作用，一方面可能是抗生素對於微藻產生毒性，進而抑制了藻細胞的生長；另一方面也可能在特定濃度下發生「毒物興奮效應」(hormesis)，反而刺激微藻蛋白酶活化、調節合成以及誘導某些基因表達，從而促進了藻體的生長 (圖 3)。當培養的微藻種類不同時，所伴生的雜菌種群亦可能有所不同，因此需要透過試驗，了解雜菌的藥敏性以及微藻本身對抗生素的耐受性，進一步確認合適

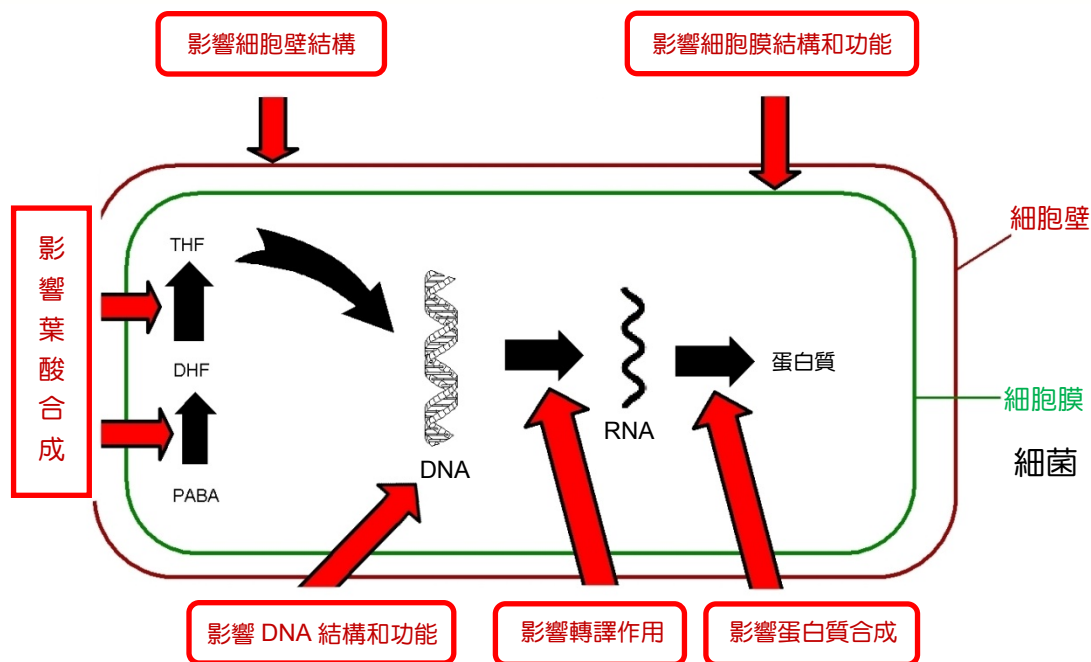


圖 3 抗生素抑菌作用機制 (改繪自 J. Raghu)

的抗生素種類及相應濃度，才能有效除去培養過程中的雜菌，留下純化後的目標藻種，確保微藻培養無菌化。

常用於微藻培養之抗生素種類與效果

由於抗生素問世以來，不斷推陳出新，目前可以有效殺死細菌的抗生素約有一千多種，包括許多合成與半合成的產品，在臨床上使用的抗生素則約有 150 種之多，因此在使用上，抗生素的種類、濃度，甚至是組合添加，對於不同藻種皆有不同之影響，而其中常用於微藻培養的抗生素主要有青黴素 (penicillin)、硫酸慶大黴素 (gentamicin sulfate)、氯黴素 (chloramphenicol)、鏈黴素

(streptomycin) 等。

青黴素 (又稱盤尼西林) 是屬於 β -內醯胺類抗生素 (β -lactams)，同時也是第一個被商業化生產的抗生素，由英國微生物學家 Alexander Fleming (1881 – 1955) 首先發現。青黴素因性質溫和也較不會抑制藻類生長，故普遍被使用在微藻除菌方面。在藻液中添加適量的青黴素會使細菌細胞壁缺損，造成抗滲透壓能力下降，進而引發菌體變形破裂而死亡。在 500 IU/ml 的濃度下，青黴素會影響小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的生長 (王，2010)，而當濃度提高到 2000 IU/ml 才會對三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 產生明顯抑制影響 (陳，2004)，可見不同微藻對於某一抗生素的敏感性是有所差異的。

硫酸慶大黴素屬於新黴素類，具廣效性，作用機制是影響蛋白質的合成，對多種革蘭氏陰性菌、陽性菌都有抑菌和殺菌作用，因此也在微藻除菌中廣泛受到使用。在 100 mg/L 的低濃度下，在分離、純化擬球藻時，不會對藻細胞造成傷害且能有效抑制細菌的孳生，獲得無菌擬球藻。當濃度為 50–100 mg/L 時，對湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 之生長有促進作用，然濃度提高到 1,000 mg/L 則會對藻細胞產生明顯的抑制作用 (黃, 2007)。換言之，在適當濃度下，抗生素不僅可以抑制或殺滅細菌，還能促進藻細胞生長。

氯黴素是一種廣效性抗生素，由於結構簡單，目前主要多為人工化學合成。由於氯黴素的治療效果好且價格低廉，許多畜牧、水產養殖業者大量使用於飼料中，其中有不肖業者未遵照停藥標準，使得此抗生素殘留在動物體內，隨著肉品進入人體。氯黴素已被證實對人體有許多不良影響，因此只有在不能使用其他較安全的抗生素時，才會建議使用氯黴素。而在微藻除菌方面，25 mg/L 的氯黴素可以有效降低小球藻發生細菌感染的機會，且打氣培養之小球藻生長量和代謝產物是無添加氯黴素的 1.6 倍 (錢, 2008)；當濃度在 100 mg/L 以下時，對小球藻的生長影響不顯著，直到氯黴素濃度提高至 200 mg/L 時才有顯著抑制作用 (Zhou et al., 2007)。因氯黴素可抑制藻類伴生雜菌並促進藻細胞生長，在研究基因工程選擇標記的研究中，已受到廣泛的討論。

鏈黴素是一種氨基糖苷類廣效抗生素，其抗菌機制是作用於細菌體內的核糖體，抑

制細菌蛋白質合成，並破壞細菌細胞膜的完整性。然而微藻對其敏感性程度存在藻種差異，例如鏈黴素對毒藻—塔瑪亞歷山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 的生長無明顯抑制作用，因此可用於該藻株無菌化培養的研究 (張, 2007)。鏈黴素在 4–8 IU/ml 濃度下，對節螺藻 (*Arthrospira* sp.) 的生長具有抑制作用 (唐, 1991)；濃度為 1000 IU/ml 時，對波吉卵囊藻 (*Oocystis borgei*) 的生長無顯著影響，且對藻液中伴生菌有明顯的抑制作用 (李, 2009)。

其他種類的抗生素如卡納黴素 (kanamycin)、紅黴素 (erythromycin)、土黴素 (oxytetracycline)、鹽酸林可黴素 (lincomycin hydrochloride)、硫酸阿米卡星 (amikacin sulfate)、哌拉西林鈉 (piperacillin sodium)、頭孢唑啉鈉 (cefazolin sodium) 等，在微藻培養抑菌或敏感性測試方面都有相關研究提出，例如在培養血腥紅球藻 (*Porphyridium cruentum*) 過程中，於培養液中添加濃度低於 100 IU/ml 之卡納黴素，可抑制或殺滅其伴生菌，但對藻之成長影響很小，因此可在藻種純化過程中用來抑菌 (王, 2004)；紅黴素濃度在 0.1 mg/L 時，對顫藻 (*Oscillatoria* sp.) 的生長有些許抑制作用，而提高到 1 mg/L 時則會完全抑制藻細胞生長 (尚, 2000)；土黴素在濃度 0–5 mg/L 範圍內，藻細胞在增長期內的增幅隨濃度提高而增大，但在衰退期時衰退也越快 (趙, 2005)；鹽酸林可黴素、硫酸阿米卡星、哌拉西林鈉、頭孢唑啉鈉的濃度在 0.5–100 mg/L 範圍內均可促進巴夫藻 (*Pavlova* sp.) 的生長，但濃度超過 100 mg/L 則會抑制藻體生長

(岳, 2005)。因此, 在藻種培養過程中, 應用抗生素來抑菌或殺菌時, 須注意抗生素之添加量, 以免也抑制藻種之成長。

抗生素組合使用效果更好

由於抗生素抑菌機制以及對於各種細菌殺滅或抑制的作用程度不同, 因此將多種抗生素混合使用時的除菌效果通常比單獨使用來得好。但抗生素應該要逐種加入至藻液中, 還是混和後一次加入, 其實兩種方式都有文獻支持。例如 Cottrell 等 (1993) 認為抗生素因作用機制不同, 混合使用時可能會造成拮抗作用, 反而降低除菌效果, 因此建議使用逐種添加方式進行微藻除菌, 並根據青黴素破壞菌體細胞壁的特性而將其選為第一優先添加之抗生素, 而透過干擾細菌合成蛋白質的硫酸慶大黴素、卡納黴素等抗生素則應後續添加。雖然如此, 亦有文獻支持將不同作用機制的抗生素混和添加, 例如球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 及小球藻以組合抗生素 (青黴素、卡納黴素、硫酸慶大黴素、鏈黴素) 進行添加處理, 不僅可以除菌且藻種也不易老化 (林, 2000); 青黴素和硫酸慶大黴素的組合, 對斜生柵藻 (*Scenedesmus obliquus*) 及其附生菌會產生強烈的抑制作用, 但改為青黴素和卡納黴素的組合時, 則能徹底除去斜生柵藻的伴生菌, 且順利得到無菌化的斜生柵藻 (唐, 2010)。另郝 (2010) 則採用新黴素、鏈黴素、卡納黴素這樣的組合培養微藻, 則成功獲得無菌化的強壯前溝藻 (*Amphidinium carterae*) 及青島大扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)。林 (2000) 研究

發現依序加入各種抗生素無法獲得無菌化的扁藻 (*Platymonas* sp.)、骨藻 (*Skeletonema costatum*)、錐狀斯克利普藻 (*Scrippsiella trochoidea*) 等, 但將同樣的抗生素組合使用後卻可完全除菌。因此, 將不同類型的抗生素進行組合或逐種使用, 都有可能提高除菌效果且促進藻體細胞的生長, 有效除去藻液培養過程中所伴生的細菌, 且使微藻培養過程不易老化, 以確保研究及保種工作順利進行。

結語

微藻種類繁多, 其成分含量與應用性多元, 開發微藻的過程中確保無菌化培養是極為重要的工作, 但細菌的存在並非絕對之惡, 有研究指出, 微藻與細菌其實存在相當微妙的相互關係, 例如 Bell 等 (1972) 指出, 微藻在成長過程會不斷向水環境釋出有機物質, 使藻細胞周圍形成一種被稱為「藻際 (phycosphere)」的微環境; Caldwell 等 (1978) 認為在藻際環境中聚集大量細菌, 這些細菌攝取微藻分泌的有機物質, 再代謝成礦物質或其他形式釋回水中被其他藻類利用, 也為藻類生長提供營養。另一方面, 在相關產業大量培養微藻的過程中, 要營造完全無菌環境亦是相當困難, 因此除非是研究所需或保種純化等較為必要的情況, 一般並不建議過度使用抗生素進行抑菌, 以免造成「抗生素污染」, 使細菌產生抗藥性, 導致抗生素的效力大幅降低。倘真如此, 當我們面臨「超級細菌」之時, 極可能淪為無藥可救的局面, 不可不慎!