

用包埋脱水法冰冻保存牟氏角刺藻*

李莹 王起华** 李贺 李婷婷

(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

提要 采用包埋脱水法研究了牟氏角刺藻 (*Chaetoceros muelleri*) 的超低温保存, 探讨了影响存活率的内、外因素: 藻细胞年龄、蔗糖浓度、脱水速率、胶球含水量等。结果表明, 将处于静止初期的藻细胞包埋在含有 0.5 mol/L 蔗糖的 3% 褐藻酸钙胶球中, 以平均速率 0.9% 含水量/h 脱水至胶球含水量为 40% 的条件下冰冻存活率较高, 可达到 30% 左右。与常规的两步法冰冻保存相比, 包埋脱水法可大大简化操作程序, 是保存牟氏角刺藻的一种有潜力的方法。

关键词 牟氏角刺藻, 包埋脱水法, 冰冻(超低温)保存

中图分类号 Q33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)07-0048-04

近 10 年来随着超低温保存技术的改进和发展, 已有越来越多的微藻实现了冰冻保存 (液氮, -196°C), 但绝大多数都是采用常规的两步冰冻法^[1~3]。20 世纪 90 年代, 包埋(胶囊化)脱水法, 开始用于植物材料的冰冻保存^[4~7]。与两步法相比, 该方法不仅保持了超低温保存的各种优点, 而且操作简单, 不需要复杂设备, 并且通常不使用抗冻保护剂, 这无疑是超低温保存技术的一个重大进展^[4,7]。近几年来虽然应用该方法保存某些藻类获得了初步成功^[8~10], 但所用的藻类种类十分有限, 缺乏广泛而深入的研究。牟氏角刺藻属于硅藻类, 是海产养殖中的一种优良饵料, 作者曾报道过该藻的两步法保存技术^[11]。本文采用包埋脱水法, 对牟氏角刺藻的冰冻保存作了新尝试, 研究了影响冰冻存活率的内外因素, 并与两步法的冰冻保存结果作了比较。鉴于目前尚未见到采用包埋脱水法保存硅藻类的报道, 本文的研究结果对采用该法保存其他种类的硅藻也有一定的借鉴意义。

1 材料和方法

1.1 材料及其培养

牟氏角刺藻 (*Chaetoceros muelleri*) 由大连水产研究所提供, 并由辽宁师范大学藻类生理研究室纯化为单种。藻种的培养条件为 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 冷荧光, 光强 $2\ 500\ \text{lx} \pm 200\ \text{lx}$, 光周期 12:12。实验材料的培养光强为 $3\ 200\ \text{lx} \pm 200\ \text{lx}$, 其他条件同前。除特殊说明外, 取培养 10 d 的材料用于冰冻保存。

1.2 包埋和脱水

1.2.1 包埋 取上述培养材料, 离心除去培养液后用消毒海水再悬浮至适当密度, 与含指定浓度的蔗糖和 30‰NaCl 的 6% 褐藻酸钠 (SIGMA CHEMICAL CO.) 溶液等体积混匀, 移入具 6 号针头的 10 mL 注射器中, 将藻液滴入含相应浓度的蔗糖和 30‰NaCl 的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液中, 轻轻摇动, 60 min 后胶球变硬, 即完成包埋过程。控制条件可制成直径为 2.5 mm, 密度为 200×10^4 cells/球的胶球。此方法参照文献[10], 略有改动。除蔗糖浓度实验外, 包埋用蔗糖浓度为 0.5 mol/L。

1.2.2 脱水及含水量的测定 将上述包埋材料在 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的藻类培养室中暗放置, 用硅胶吸湿法按指定速率脱水至一定含水量后测定胶球的含水量, 方法基本参照文献[5, 10], 并作适当修改。除特殊说明外, 平均脱水速率为每小时含水量减少 0.9%; 脱水后胶球含水量为 40%。

* 国家自然科学基金项目 30170099 号; 辽宁省教育厅科研基金项目 20041015 号。

第一作者: 李莹, 出生于 1971 年, 讲师, 研究方向: 藻类生理生化, E-mail: lyly505@163.com

** 辽宁师范大学教授, 本文通讯作者。

收稿日期: 2002-10-08; 修改日期: 2003-03-26

1.3 冰冻和化冻

方法参考文献[10]。

1.4 存活率的测定

上述实验均以未脱水且未冰冻的包埋材料作为

对照样品, 将对照样品和冰冻前后的包埋样品分别再培养 5 d, 培养条件与前述实验材料的培养条件相同。用 90% 丙酮提取叶绿素并计算其含量^[12], 按照下列公式计算存活率^[13,14]。

$$\text{冰冻保存前存活率}(\%) = \frac{\text{脱水后冰冻前样品的叶绿素含量}}{\text{对照样品的叶绿素含量}} \times 100\%$$

$$\text{冰冻保存后存活率}(\%) = \frac{\text{化冻后样品的叶绿素含量}}{\text{对照样品的叶绿素含量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 藻细胞年龄对存活率的影响

图 1 为牟氏角刺藻的生长曲线, 分别取指数期(6 d)和静止期(10 d)的材料用于冰冻保存。其结果如表 1 所示, 指数期的牟氏角刺藻的冰冻保存存活率很低, 为 11.1%。而静止期的材料存活率显著升高, 达到 22.8%。这与王起华等^[11]采用两步法冰冻保存该藻的结果基本一致。Morris^[15]曾指出, 静止期的细胞由于受许多营养条件及物理因子的限制, 生理状态发生了很大变化, 因而导致抗冻性的增强。但对某些藻类的研究表明, 藻细胞年龄对抗冻性的影响与藻类种类有关^[13]。

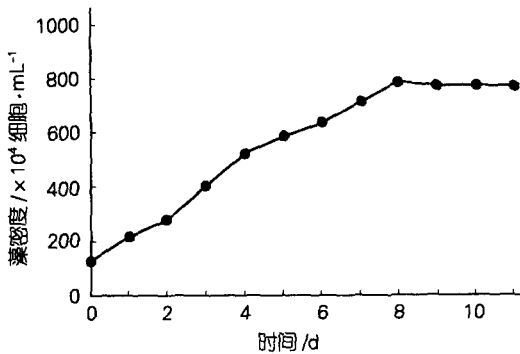


图 1 牟氏角刺藻的生长曲线
Fig. 1 The growth curve of *Chaetoceros muelleri*

表 1 藻细胞年龄对存活率(%)的影响

Tab.1 The effect of the age of algal cells on their viability (%)

生长期	指数期	静止期
冰冻前	85.1	86.6
冰冻后	11.1	22.8

2.2 蔗糖浓度对存活率的影响

蔗糖浓度对存活率的影响如图 2 所示, 用不同蔗糖浓度包埋的藻类材料在冰冻前的存活率均在 80% 以上。但是在冰冻保存后存活率发生显著变化。不含蔗糖的材料存活率为 0, 随着蔗糖浓度的增加, 存活率有显著增加。当蔗糖浓度达到 0.5 mol/L 左右时, 存活率最高, 约为 30%; 尔后下降, 当蔗糖浓度为 0.8 mol/L 时, 存活率仅为 3.6%。在用包埋脱水法冰冻保存高等植物的研究中, 用含蔗糖的培养基对材料进行预培养或在包埋时加入蔗糖使材料预先部分脱水, 是提高冰冻保存存活率的一个常用方法^[5,6]。Hirita^[8]在用包埋脱水法冰冻保存几种海洋微藻时, 曾探讨了蔗糖浓度对 *Dunaliella tertiolecta* 存活率的影响, 结果表明, 当蔗糖浓度高于 0.8 mol/L 时可显著降低冰冻前藻细胞的存活率, 这说明 *D. tertiolecta* 对高浓度蔗糖很敏感。与此相比, 作者所用的牟氏角刺藻显然对高浓度蔗糖有较大的抗性。Hirita^[8]的结果还表明, 蔗糖浓度显著影响 *D. tertiolecta* 冰冻保存后的存活率, 当蔗糖浓度为 0.5 mol/L 时存活率最高。这与本

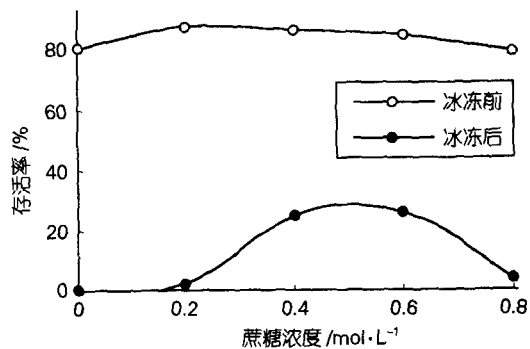


图 2 蔗糖浓度对存活率的影响
Fig. 2 The effect of sucrose concentration on the viability

实验的结果相似。上述结果表明,在包埋时加入蔗糖使材料预先部分脱水,对提高冰冻保存存活率起着重要作用。

2.3 脱水速率对存活率的影响

如图3所示,脱水速率对冰冻前包埋材料的存活率影响很小,存活率都在80%以上。然而,脱水速率对冰冻后材料的存活率有显著的影响,当脱水速率在含水量每小时减少0.5%~1.1%范围内,材料有较高的存活率,脱水速率为0.9%含水量/h时,可获得最大存活率。这一结果与Hirata^[8]研究脱水速率对*D. tertiolecta*存活率影响的实验结果基本一致,即脱水速率显著影响冰冻后材料的存活率。不同的是,如前所述,脱水速率对牟氏角刺藻冰冻前的存活率影响很小,而对冰冻前的*D. tertiolecta*的存活率影响较大,特别是在较低的脱水速率下,*D. tertiolecta*的存活率显著下降。总之,脱水速率是影响冰冻存活率的重要因素之一,应该给予更大的重视。

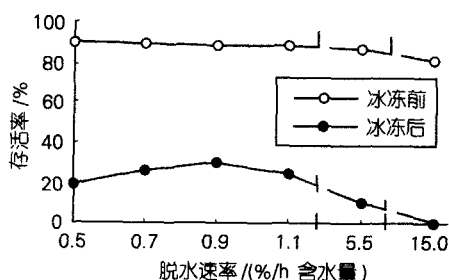


图3 脱水速率对存活率的影响

Fig. 3 The effect of dehydration rate on the viability

2.4 含水量对存活率的影响

胶球含水量对存活率的影响如图4所示,当含水量高于40%时,冰冻前材料的存活率随含水量减小而缓慢下降;当含水量为40%时,存活率仍在80%以上;在含水量低于40%后,存活率迅速下降;到含水量为10%时存活率已为零。对冰冻后的材料,当含水量为40%时存活率最高,为30%,增大或减小含水量都会使存活率急剧下降。上述结果与Hirata^[8]用*D. tertiolecta*所得到的结果相似。本实验结果进一步表明,确定最适含水量是提高冰冻存活率的重要因素之一。样品保存前的最适含水量因植物种类和材料类型的不同而不同。对高等植物来说,最适含水量变化范围很大,如体胚或小孢子胚一般为13%~20%,

而茎尖和分生组织多为20%~40%^[4-6]。已报道的藻类的最适含水量一般为40%^[8,9]。但也发现有例外,作者在保存坛紫菜丝状体时曾观察到,当含水量在20%~40%范围内,样品冰冻后的存活率几乎不受含水量的影响,都在65%左右^[10]。

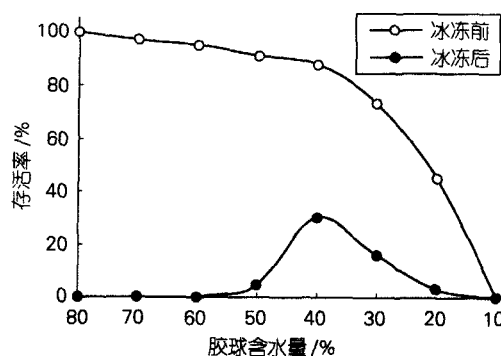


图4 胶球含水量对存活率的影响

Fig. 4 The effect of the water content of beads on the viability

综上所述,作者首次采用包埋(胶囊化)脱水法研究了牟氏角刺藻的冰冻保存。结果表明,藻细胞年龄、包埋时的蔗糖浓度、脱水速率和胶球含水量等因素都对存活率有较大的影响。通过优化内、外条件,明显提高了冰冻保存效果,使牟氏角刺藻获得了约30%的较高存活率。与两步冰冻法相比,该方法不需要使用抗冻保护剂,也不需要严格控制降温速率,因而大大简化了冰冻-化冻操作程序,是一种有潜力的保存方法。然而,在采用两步法保存牟氏角刺藻时,在优化条件下存活率可高达80%以上^[11]。因此,在实际应用包埋脱水法保存牟氏角刺藻时,尚有待进一步提高其存活率。

参考文献

- Day J G. Cryo-conservation of microalgae and cyanobacteria. *Cryo-Letters (Supplement)*, 1998, 1: 7-14
- Taylor R, Fletcher RL. Cryopreservation of eucaryotic algae - a review of methodologies. *J Appl Phycol*, 1999a, 10: 481-501
- 王起华, 张恩栋, 周春影. 藻类种质超低温保存研究概况. *植物学通报*, 2002, 19(1): 21-29
- Scottex C, Chevreau E, Godard N, et al. Cryopreservation of cold-acclimated Shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. *Cryobiology*, 1992, 29: 691-700

研究报告 *REPORTS*

- 5 Hatanaka T, Yasuda T, Yamaguchi T, et al. Direct regrowth of encapsulated Somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen. *Cryo-Letters*, 1994, 15: 47-52
- 6 王君晖, 边红武, 黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(5): 582-586
- 7 Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, et al. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *Cryo-Letters*, 2000, 21: 53-62
- 8 Hirata K, Phunchindawan M, Takamoto J, et al. Cryo-preservation of microalgae using encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters*, 1996, 17: 321-328
- 9 Vignerom T, Arbeult S, Kaas R. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria digitata* (L) Lamouroux by encapsulated dehydration. *Cryo-Letters*, 1997, 18: 93-98
- 10 王起华, 刘明, 程爱华. 坛紫菜自由丝状体的胶囊化冰冻保存. *辽宁师范大学学报*, 2000, 23(4): 387-390
- 11 王起华, 张恩栋, 王冰, 等. 两种海洋饵料硅藻的超低温保存. *辽宁师范大学学报*, 1999, 22(4): 310-314
- 12 湛江水产专科学校主编. 海洋饵料生物培养. 北京, 农业出版社, 1980. 200
- 13 王起华, 石若夫, 程爱华. 三种饵料金藻超低温保存的研究. *中国水产科学*, 1999, 6(2): 89-92
- 14 王起华, 张恩栋, 李大鹏, 等. 盐生杜氏藻和青岛大扁藻的超低温保存. *植物学报*, 2000, 42(4): 399-402
- 15 Morris G J. The cryopreservation of 250 strains of *Chlorococcales* by the methods of two-step cooling. *Br Phycol J*, 1978, 13: 15-24

CRYOPRESERVATION OF *Chaetoceros muelleri* BY ENCAPSULATION-DEHYDRATION

LI Ying WANG Qi-Hua LI He LI Ting-Ting
(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian, 116029)

Received: Oct., 8, 2002

Key Words: *Chaetoceros muelleri*, Encapsulation-dehydration, Cryopreservation

Abstract

Chaetoceros muelleri was preserved in liquid nitrogen by encapsulation-dehydration. The main factors influencing the algal viability after cryopreservation, such as the age of algal cells, the sucrose concentration, the dehydration rate and the water content of beads, were studied. The results showed that the algal viability after cryopreservation reached about 30% a relatively high viable rate when the algal cells in a stationary phase were encapsulated in the beads of 3% Ca-alginate with 0.5 mol/L sucrose and the beads were dehydrated at an average rate of 0.9% water content/h to 40% of the water content. Compared with the conventional two-step freezing method, the encapsulation-dehydration method simplified the operation procedure of cryopreservation greatly and so was a potential method for preservation of *Chaetoceros muelleri*.

(本文编辑:张培新)