用包埋脱水法冰冻保存小新月菱形藻

王起华[1]，李　莹[2]，刘艳萍[1]，李大鹏[3]

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院，辽宁 大连 116029；2. 辽阳职业技术学院 师范分院，辽宁 辽阳 111000；
3. 中国科学院 海洋研究所，山东 青岛 266071)

摘要：采用包埋脱水法研究了小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)的超低温保存，探讨了影响存活率的内、外因素：藻细胞年龄、脱水速率、胶球含水量和化冻后的恢复方法等。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，以含水量每小时减少 0.9 %的平均速率脱水至胶球含水量为 40 %，化冻后在冻存管中室温下暗恢复 12 h 的条件下冰冻存活率较高，可达到 18.3 %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，是保存小新月菱形藻的一种有潜力的方法。

关键词：小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)；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(2006)04-0050-04

海洋饵料微藻在鱼、虾、贝类育苗生产中有着重要作用，有关其超低温保存的研究近年来日益受到重视[1~6]。然而，以往的保存方法多采用常规的两步冷冻法，限制了该技术的广泛应用[7]。20 世纪 90 年代初，包埋脱水法在高等植物种质的冷冻保存中得以建立并广泛应用。该法操作简单，不需复杂设备，而且通常不使用抗冻保护剂，是对超低温保存技术的一个重大发展[8]。近年来采用该方法保存某些藻类已获得初步成功[9~12]。但是，采用该法保存海洋饵料微藻的研究尚鲜有报道，作者[13]曾尝试用包埋脱水法冷冻保存牟氏角刺藻并取得了初步成功。作者用包埋脱水法研究了藻细胞年龄、脱水速率和胶球含水量对另一种海洋饵料硅藻——小新月菱形藻超低温保存的影响，并在此基础上进一步探讨了化冻后恢复方法对小新月菱形藻和牟氏角刺藻冷冻保存的影响。

1　材料和方法

1.1　材料及其培养

小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)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 18 ℃ ±2 ℃；冷荧光，光强 2 500 lx ±200 lx，光照周期 12 ∶12。实验材料的培养光强为 2 900 lx ±200 lx，其他条件同前。牟氏角刺藻(*Chaetoceros muelleri*)的培养条件见文献[13]。除特殊说明外，取培养 10 d 的材料(静止期)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，用含 0.5 mol/L 蔗糖的消毒海水再悬浮至适当密度，与含 0.5 mol/L 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，将藻液滴入含相同浓度的蔗糖和 NaCl 的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液中，轻轻摇动，60 min 后完成包埋过程。控制条件可制成直径为 2.5 mm，藻密度为 200 $\times 10^4$ 个/球的胶球。此方法参照文献[13]。

1.2.2　脱水及含水量的测定

将上述胶球放置在 22 ℃暗室中，用硅胶吸湿法脱水。除特殊说明外，以每小时含水量减少 0.9 %的脱水速率脱水至 40 %含水量后测定胶球的含水量，方法参照李莹等[13]。

1.3　冰冻和化冻

胶球脱水后立即采用一步冰冻法快速冰冻，保存 24 h 后采用快速化冻法化冻，方法参照王起华等[12]。

收稿日期：2004-02-25；修回日期：2004-08-10
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30170099，30470184)；辽宁省教育厅科研基金资助项目(20041015)
作者简介：王起华(1943-)，男，辽宁北宁人，教授，主要从事藻类生理和生物技术研究，E-mail：qihua_mail@163.com；李大鹏，通讯作者，E-mail：dpli@ms.qdio.ac.cn

1.4 化冻后的恢复

化冻后的胶球采用下述 3 种方法恢复:(1)将胶球移入 f/2 培养基中;(2)将胶球移入直径 3 cm 的培养皿中,将培养皿分别置于含有过饱和盐(KNO_3、NaCl 和 $NaNO_2$)溶液的密闭玻璃罐的上部气相中,其相对湿度(RH)分别为 KNO_3,92 %;NaCl,75 %;$NaNO_2$,64 %;(3)将胶球保留在密封的冻存管中。上述处理都是在 22 ℃暗中进行,除特殊说明外,恢复时间都是 12 h。

1.5 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-脱水样品分别再培养 5 d,培养条件与前述实验材料的培养条件相同。用 90 %丙酮提取叶绿素后计算其含量,并根据叶绿素含量计算存活率[13]。

2 结果与讨论

2.1 藻细胞年龄对小新月菱形藻存活率的影响

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,指数期的小新月菱形藻的冰冻保存存活率为 8.3 %。而静止期的材料存活率显著升高,达到 18.3 %。这与王起华等[5]采用两步法冰冻保存该藻的结果基本一致。Morris[14]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结果表明,藻细胞年龄对抗冻性的影响与藻类种类有关[4]。

表 1 藻细胞年龄对小新月菱形藻存活率的影响

Tab.1 The effect of the age of algal cells on the viability of *N. closterium minutissima*

处理	存活率(%)	
	指数期	静止期
冰冻前	84.8 ±2.4	85.6 ±2.3
冰冻后	8.3 ±1.8	18.3 ±2.8

2.2 脱水速率对小新月菱形藻存活率的影响

如图 1 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 %左右。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 0.9 %时,可获得最大存活率,为 18.3 %。这一结果与 Hirata 等[10]对杜氏藻的研究结果基本一致,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,脱水速率对小新月菱形藻冰冻前的存活率影响很小,而对杜氏藻冰冻前的存活率影响较大。本实验结果与作者冰冻保存牟氏角刺藻的实验结果[13]都表明,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。

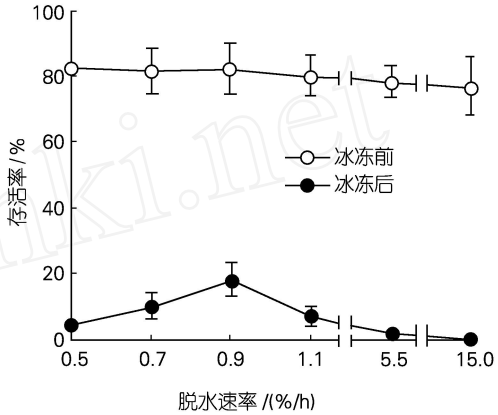

图 1 脱水速率对小新月菱形藻存活率的影响

Fig.1 The effect of dehydration rate on the viability of *N. closterium minutissima*

2.3 含水量对小新月菱形藻存活率的影响

胶球含水量对存活率的影响如图 2 所示,当含水量高于 30 %时,冰冻前藻细胞的存活率随含水量减小而缓慢下降;当含水量为 30 %时,存活率仍在 80 %以上;当含水量低于 30 %后,存活率随含水量的减少而迅速下降;到含水量为 15 %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,约为 18.3 %,增大或减小含水量都会使存活率下降。上述结果与 Hirata[10]和李莹[13]用其他微藻得到的结果相似。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 %[8]。已报道的藻类的最适含水量一般为 40 %[10,11,13]。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[12]。

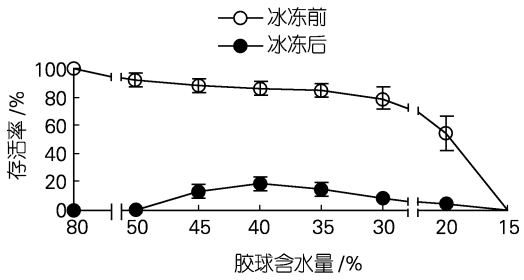

图 2　胶球含水量对小新月菱形藻存活率的影响

Fig. 2　The effect of the water content of beads on the viability of *N. closterium minutissima*

2.4　化冻后恢复方法对存活率的影响

图 3 为恢复方法对小新月菱形藻存活率的影响。由图可知,各种恢复处理都在 12 h 达到最高存活率,在冻存管中恢复时存活率最高,达 18.3 %。在含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相(RH75 %)中恢复时,存活率较高,为 17.1 %。而在培养基中恢复存活率最低,仅为 10.9 %。

图 4 为恢复方法对牟氏角刺藻存活率的影响。各种恢复处理都在 12 h 达到最高存活率,这与小新月菱形藻的情况相似。不同的是,牟氏角刺藻在含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相(RH75 %)中恢复时,存活率最高,达 35.1 %。在冻存管中恢复存活率较高,为32.5 %。而在培养基中恢复存活率较低,为 25.1 %。

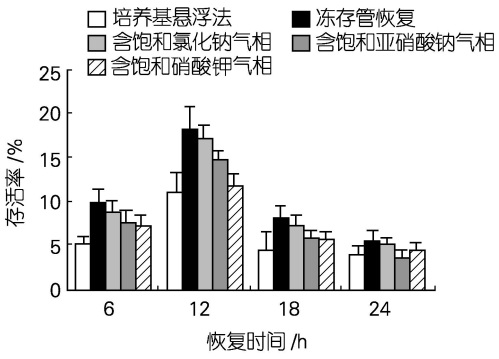

图 3　化冻后恢复方法对小新月菱形藻存活率的影响

Fig. 3　The effect of recovery method after thawing on the viability of *N. closterium minutissima*

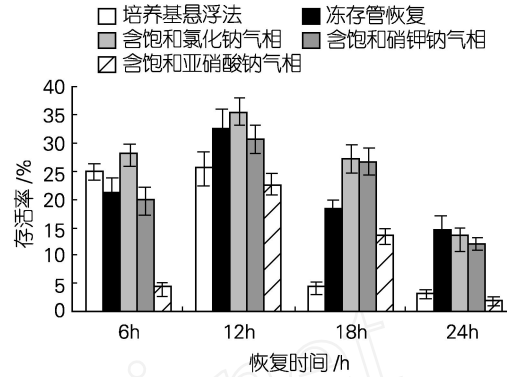

图 4　化冻后恢复方法对牟氏角刺藻存活率的影响

Fig. 4　The effect of recovery method after thawing on the viability of *Chatoceros muelleri*

在包埋脱水法中,对经历了脱水-冰冻-化冻过程的胶球,在再培养之初,还要经历一个"复水"的过程,即恢复到正常含水量的过程。在本实验所采用的 3 种恢复方法中,第一种方法是将含藻细胞的胶球直接移入培养基中恢复,在恢复开始,藻细胞会经历一个快速的复水过程;第二种方法是将含藻细胞的胶球移入含有过饱和盐类的密闭气相中恢复,藻细胞在修复损伤过程的同时,会经历一个相对慢速的复水过程,其复水速率与过饱和盐类的相对湿度有关;第三种方法是将含藻细胞的胶球保持在密封的冻存管中,使胶球含水量保持在脱水后的状态,细胞在恢复过程中并不经历复水过程,需等到再培养开始(胶球移入培养基)时,才完成复水过程。本实验结果表明,第三种方法适合于小新月菱形藻细胞的恢复,而第二种方法中含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相(RH75 %)适合于牟氏角刺藻的恢复。关于恢复方法对藻类冰冻保存的影响的研究至今尚无公开报道[7,15],许多问题仍有待更进一步的研究。

综上所述,作者首次采用包埋(胶囊化)脱水法研究了小新月菱形藻的冰冻保存。结果表明,藻细胞年龄、脱水速率、胶球含水量和化冻后恢复方法等因素都对存活率有较大的影响。与常规的两步冰冻法相比,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,用包埋 - 脱水法冰冻保存小新月菱形藻所获得的存活率仍然明显低于用两步法所能得到的存活率[5]。因此,如何提高存活率是一个需要进一步探讨的课题。

参考文献:

[1] Canavate J P, Lubian L M. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species[J]. **Aquaculture,** 1995, 136: 277-290.

[2] Day J G, Fenwick C. Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture[J]. **Aquaculture,** 1993, 118:151-160.

[3] **马志珍, 张继红. 海产饵料微藻超低温保存技术的研究**[J]. **中国水产科学**, 1997, **4**(4):13-17.

[4] **王起华, 石若夫, 程爱华. 三种饵料金藻超低温保存的研究**[J]. **中国水产科学**,1999, **6**(2):89-92.

[5] **王起华, 张恩栋, 王冰,等. 两种海洋饵料硅藻的超低温保存**[J]. **辽宁师范大学学报**, 1999, **22**(4):310-314.

[6] **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**[J]. **植物学报**, 2000, **42**(4):399-402.

[7] **王起华, 张恩栋, 周春影. 藻类种质超低温保存研究概况**[J]. **植物学通报**, 2002, **19**(1):21-29.

[8] **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**[J]. **植物学通报**, 1999, **16**(5): 582-586.

[9] Day J G, Fleck R A, Benson E E. Cryopreservation-recalcitrance in milcoalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury[J]. **J Appl Phycol,** 2000, 12: 369-377.

[10] Hirata K, Phunchindawan M, Takamoto J, *et al*. Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration[J]. **Cryo-Letters,** 1996, **17**: 321-328.

[11] Vignerom T, Arbeult S, Kaas R. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria degitata* (L) Lamouroux by encapsulated dehydration[J]. **Cryo-Letters,** 1997, 18:93-98.

[12] **王起华,刘明,程爱华. 坛紫菜自由丝状体的胶囊化冰冻保存**[J]. **辽宁师范大学学报**, 2000, **23**(4): 387-390.

[13] **李莹,王起华,李贺,等. 用包埋脱水法冰冻保存牟氏角刺藻**[J]. **海洋科学**, 2003, **27**(7):48-51.

[14] Morris G J. The cryopreservation of 250 strains of *Chlorococcales* by the methods of two-step cooling [J]. **Br Phycol J,** 1978, 13:15-24.

[15] Taylor R, Fletcher R L. Cryopreservation of eucaryotic algae-a review of methodologies[J]. **J Appl Phycol,** 1999, 10:481-501.

Cryopreservation of Nitzschia closterium minutissima **by encapsulation-dehydration**

WANG Qi-hua[1], LI Ying[2], LIU Yan-ping[1], LI Da-peng[3]

(1. The School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. Liaoyang Vocational Technology College, Liaoyang 111000, China; 3. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Feb., 25, 2004

Key words: *Nitzschia closterium minutissima;* encapsulation-dehydration; cryopreservation

Abstract: *Nitzschia closterium minutissima* was preserved in liquid nitrogen by encapsulation-dehydration. The main factors influencing the algal viabilitiy after cryopreservation, such as the age of algal cells, the dehydration rate, the water content of beads and the recovery method after thawing, were studied. The results showed that the algae viability after cryopreservation reached about 18.3%——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 of sucrose and the beads were dehydrated at an average rate of water content reduction 0.9%/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 did a potential method for preservation of *N. closterium minutissima*.

(本文编辑:张培新)