

球等鞭金藻 3011 浓缩细胞低温保存技术的研究

阎斌伦¹, 朱明¹, 张学成²

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 中国海洋大学 生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 为了探讨球等鞭金藻 3011(*Isochrysis galbana* Parke) 浓缩细胞的保存条件, 通过研究其在不同温度条件下的长期保存效果来确定最佳的保存温度范围。实验结果表明, 在 0~10℃ 的低温下长期(2 个月以上) 保存后, 球等鞭金藻 3011 获得较高的存活率(70% 以上), 并且在恢复生长时保持较高的比生长率, 因此 0~10℃ 是球等鞭金藻 3011 浓缩细胞长期保存的最佳温度范围。

关键词: 球等鞭金藻 3011(*Isochrysis galbana* Parke); 浓缩细胞; 保存; 温度; 存活率; 生长率
中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)12-0043-04

海洋微藻作为海洋生产力的基础, 在海洋大生态系统中起着不可或缺的作用, 它是海洋浮游动物以及大型底栖生物和游泳生物幼体的主要饵料。海洋微藻中含有大量的蛋白质、糖类、维生素和饱和脂肪酸, 是海洋鱼虾贝类等经济动物的开口饵料。目前, 海洋饵料微藻的生产受到气候、设备等条件的限制, 难以做到微藻的稳定生产, 海洋经济微藻的浓缩和长期保存技术的研究和突破, 将有助于海水经济动物的苗种生产摆脱海洋饵料微藻产量不稳定这一重要制约因素。

国外自 80 年代末开始对海洋经济微藻的浓缩方法和低温保存方法进行研究, 取得了不少的研究成果, 其中美国、英国和日本已有相应的产品(微藻浓缩细胞或称“藻膏”)问世; 但是, 长期保存主要以 -30.0℃ 以下的低温(甚至 -196℃ 的超低温)保存为主, 难以满足产业化的需要^[1]。蒋霞敏^[2] 等对单胞藻浓缩、保藏与应用技术进行了初步的研究, 将小球藻和球等鞭金藻 3011(*Isochrysis galbana* Park) 在 5~7℃ 的冰箱中保存 1~3 个月后恢复生长获得好于常温的效果。郑严^[3] 对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) 进行了冷冻保种实验, 在 -20℃ 条件下保存 20 d 后, 重新培养 2 d 即能正常生长繁殖。孙建华等^[4] 对小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、球等鞭金藻的浓缩和保存方法进行了研究, 浓缩藻液在 1~4℃ 的低温下并加保护剂 SAMs 保存 3 个月, 效良好果, 藻类的二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA) 含

量变化很小。对于球等鞭金藻 3011 浓缩细胞低温保存技术的研究尚无报道。作者研究了将高密度培养的球等鞭金藻 3011 浓缩数百倍后置于不同温度下保存数月后的成活率, 筛选长期保存的最佳温度范围, 为其低温保存提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

球等鞭金藻 3011 由江苏海洋研究所提供; 使用 f/2 培养基, 取自自然海水(盐度 30~35) 经脱脂棉过滤后煮沸消毒, 添加营养盐后用。

1.2 方法

1.2.1 微藻的培养

使用 250 mL 三角烧瓶, 取保存后的微藻浓缩液接种, 使起始吸光度 A 值在 0.1~0.2 之间, 新鲜培养液按实验要求配制, 置实验要求的条件下培养 7~14 d, 每天摇瓶 3~5 次, 在 680 nm 波长下测定其吸光度 A 值一次。实验重复 2 次, 每次至少两个平行样本, 取其平均值。

收稿日期: 2004-05-20; 修回日期: 2004-08-30

基金项目: 江苏高校高新技术产业发展资助项目(JHB04 020)

作者简介: 阎斌伦(1962-), 男, 江苏连云港人, 研究方向为海洋生物技术, E-mail: hhithy sj@yahoo.com.cn; 张学成, 通讯作者: E-mail: xczhang8@163.com

1.2.2 试验设置

1.2.2.1 不同温度下的生长实验

取处于对数生长期的微藻接种,使 A 值在 0.1~0.2,置于温度分别为 0, 5, 10, 15, 20℃, 光照为 36.0 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \pm 0.75 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下生长 7~14 d, 观察其生长状况, 间隔一天测定其 A 值一次。

1.2.2.2 不同温度条件下藻液的保存实验

取处于对数生长期的微藻低速离心后稀释, 使 A 值在 0.25~0.3 之间, 置于温度分别为 0, 5, 10, 15, 20℃ 的温度下黑暗保存, 间隔 2 周取出测定其存活率, 并在 20℃、36.0 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \pm 0.75 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下恢复生长, 间隔一天测定其 A 值一次。

1.2.2.3 不同温度条件下的浓缩细胞保存实验

取处于对数生长期的微藻经离心浓缩 100 倍后, 置于 0, 5, 10, 15, 20℃ 条件下, 黑暗保存, 稀释 300 倍后恢复生长, 其它条件同 1.2.2.2。

1.2.3 分析测试与计算

1.2.3.1 存活率的测定

使用镜检的方法确定细胞的存活率, 死亡的细胞破碎或萎缩且内含物溃散; 而活细胞完整且细胞核、色素体和白糖素完整, 与原始保存的细胞密度对比可以确定微藻的存活率。

1.2.3.2 生长率的测定

应用原位光密度测定法, 生长速率(μ) 计算公式为:

$$\mu = (\ln A_{t_2} - \ln A_{t_1}) / 0.301(t_2 - t_1)$$

式中: A 为光密度值, t_1 为指数生长期开始时的天数, t_2 为指数生长期结束时的天数。

2 结果

2.1 不同温度对球等鞭金藻 3011 生长的影响

从图 1 可以看出, 5℃ 条件下生长极为缓慢; 而 0℃ 条件下球等鞭金藻 3011 几乎不生长, 但也未出现负的生长率; 10℃ 条件下球等鞭金藻 3011 虽然开始出现明显的生长迹象, 但其生长速率仍然很低; 在 15℃ 时, 生长明显加快, 并在第 10 天达到生长高峰, 随之出现负生长; 20℃ 时其生长更快, 在第 7 天即达到生长高峰, 随之出现大幅度的负生长。

2.2 不同保存温度下球等鞭金藻 3011 的 A 值变化

从图 2 中可以看出, 球等鞭金藻 3011 在不同保存温度下的 A 值变化趋势有很大的不同, 其中以 0,

5℃ 条件下的 A 值变化较小, 10℃ 时 A 值 4 周后出现下降的趋势, 而在 15℃ 及 20℃ 保存的球等鞭金藻 3011, 则在第 2 周即出现明显的衰退趋势, 色素快速减少, 藻液逐渐变为白色且浑浊。

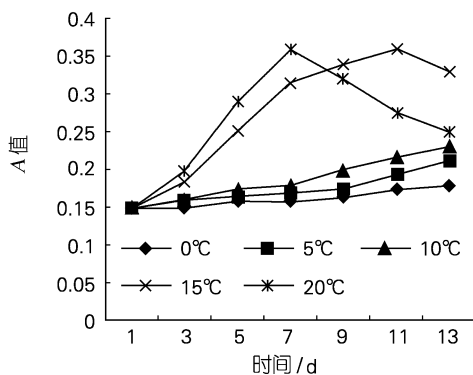


图 1 不同温度对球等鞭金藻 3011 生长的影响

Fig. 1 Effects of different temperatures on the growth of *Isochrysis galbana* Parke

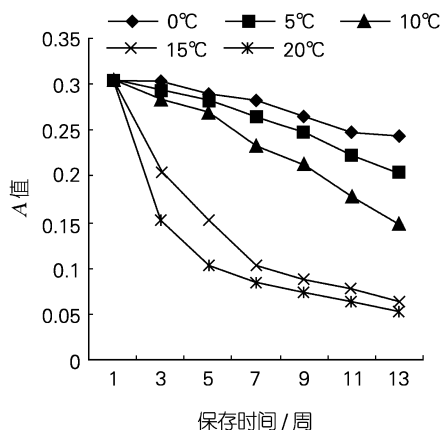


图 2 不同保存温度对球等鞭金藻 3011 A 值的影响

Fig. 2 Effects of different preserving temperatures on the A value of *Isochrysis galbana* Parke

2.3 不同保存温度对球等鞭金藻 3011 浓缩细胞成活率的影响

从图 3 可以看出, 在 0, 5, 10℃ 条件下保存 2 个月, 球等鞭金藻 3011 仍然保持 70% 的存活率, 其中 0, 5℃ 条件下保存 3 个月, 存活率仍达到 70% 以

上,大多数细胞静止且体积增大,白糖素明显,而在15、20℃的保存条件下,存活率在2周后即低于70%,并随着保存时间的延长迅速下降,多数细胞破碎,藻液变白,少数细胞缓慢运动或静止。

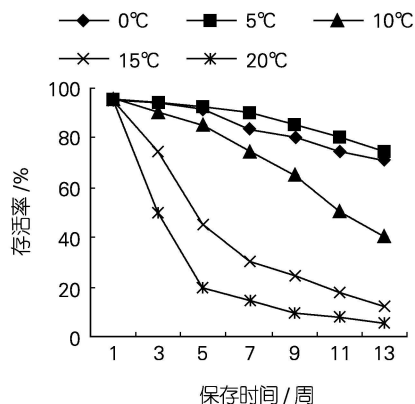


图3 不同保存温度对球等鞭金藻 3011 存活率的影响

Fig. 3 Effects of different preserving temperatures on the survival rates of *Isochrysis galbana* Parke

2.4 不同保存温度对球等鞭金藻 3011 浓缩细胞恢复生长的影响

从图4可以看出,在0℃和5℃下保存4周后,球等鞭金藻 3011 恢复生长的生长率有相对的提高,在此温度下保存3个月后恢复生长,仍然获得很高的生长率;在10℃条件下保存,在保存的前2个月内的恢复生长保持相对稳定的生长率,但在2个月后的生长率出现了明显的下降趋势;在15℃和20℃的条件下保存,恢复生长的生长率随着时间的推移快速下降,并分别在第11周和第9周无法恢复生长。

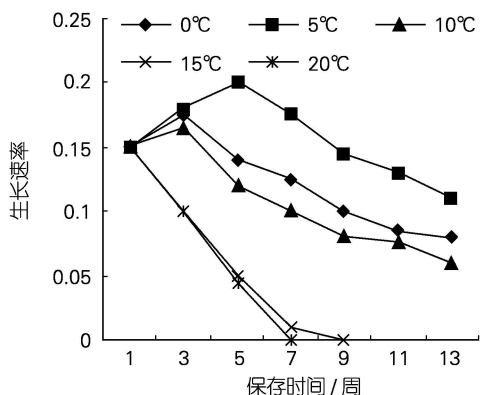


图4 不同保存温度对球等鞭金藻 3011 浓缩细胞恢复生长的影响

Fig. 4 Effects of different preserving temperatures on the condensed cells of *Isochrysis galbana* Parke after recovering

3 讨论

3.1 温度与微藻生长的关系

温度是影响海洋微藻在自然界中生长与繁殖的重要因子之一,它对微藻的生长效应、对微藻的优势种的形成起基本的调节作用;很多与光反应相关的酶都是依赖温度的,Calvin 循环所需的酶也是依赖温度的。一般而言,微藻的生长率只在一定的范围内随温度的增加而增加,而且不同微藻的生长率对温度的依赖关系是不同的;再者,不同微藻对温度存在不同的生长效应^[5]。同理,温度的降低将导致微藻新陈代谢速率的下降,在接近生物学零度时,其同化作用与异化作用的水平相当,而当温度低于生物学零度时,其同化作用与异化作用的水平都将下降,甚至处于低代谢水平的休眠状态。

3.2 保存温度与存活率的关系

在不同温度下保存球等鞭金藻 3011 浓缩细胞,其存活率差别显著。保存温度大于10℃以上,呼吸作用加强,不断地消耗自身的营养;而在黑暗条件下却没有同化作用,微藻的自身营养不断被消耗且无法正常生长繁殖;此外,在无光条件下,微藻和细菌的呼吸以厌氧为主,也将导致微藻内部及藻液中代谢中间产物的积累,进一步引起微藻生存条件的恶化,必然导致微藻的大量死亡。而在小于10℃的低温条件下,微藻的代谢水平很低,其细胞内的营养物质得以保存;低温引起微藻的生理活动的下降,可以诱导微藻进入休眠状态,有利于微藻在长期无光保存条件下的存活^[6]。但是低于0℃且未加保护剂的条件下,金藻的90%以上的细胞极易破碎,失去保存的价值(未发表资料)。而在0~10℃的低温条件下金藻的体积逐渐增大,减慢运动直至失去鞭毛而成为休眠状态,保存一定的时间后在适宜条件下即能够恢复正常生长;同时不同保存温度下的A值及存活率的变化与温度存在密切的相关性,且二者的变化趋势是基本一致的;A值表示了微藻的细胞密度和色素含量的多少,其变化值与存活率的一致性说明:A值也可以作为评价微藻保存存活率的一项参考指标。

3.3 保存温度与微藻活力的关系

比生长率直接反应了微藻的生长力或者活力,测定球等鞭金藻 3011 保存后恢复生长后的比生长率,可以确定微藻浓缩细胞经过长期保存后的生长力或者活力。在20℃和15℃的条件下,其恢复生长的比生长率随时间直线下降,其细胞内部必然发生了一系

列的不可逆变化,使微藻在此温度下难以保持旺盛的生命力;而经过一段时间的低温处理,恢复生长的球等鞭金藻 3011 获得更高的比生长率,可能与低温刺激微藻引起的“复壮作用”有关。在 0℃ 和 5℃ 低温保存的球等鞭金藻 3011 在 3 个月的时期内保持高的比生长率,说明低温可以刺激微藻发生一系列的生理变化后进入深度休眠状态^[7],其内部的细胞结构的变化和生理适宜机理还有待于研究和探索。

4 结语

球等鞭金藻 3011 是常用的海洋经济微藻,是贝类、虾蟹类苗种重要的开口饵料^[8],但是常因为气候等原因而难以稳定生产,如果将金藻浓缩后加以有效保存,是解决这一问题的良好手段。从作者实验的结果可以看出,在 0~ 10℃ 的低温下长期(2 个月以上)保存球等鞭金藻 3011 是可行的。中试结果也表明,将该藻高密度培养后使用化学、物理方法浓缩 1 000 倍左右再保存(0~ 10℃ 下)两个月之内恢复生长,可以在很短的时间内达到苗种生产的要求,也可作为微藻饵料直接投喂,两种使用方法都获得理想的效果。微藻浓缩液生产技术的突破,将使海洋微藻的生产与使用可以保留一定的时间差。微藻可以提前生产,并妥善储存起来备用,从而摆脱海洋饵料微

藻产量不稳定这一重要制约因素,为海水养殖业的健康发展提供一个重要的技术支持。但是海洋微藻浓缩液能否保存更长的时间及其抗逆原理还有待做更多的研究和探讨。

参考文献:

- [1] John G D. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species [J]. *Aquaculture*, 1995, 136: 277-290.
- [2] 蒋霞敏,朱芝峰.单胞藻浓缩、保藏与应用技术的初步研究[J].浙江水产学院学报,1993,12(2):81-91.
- [3] 郑严.褐指藻沉淀浓缩纸吸附保种和高浓度藻液冰冻储存[J].海洋科学,1978,2:59-65.
- [4] 孙建华,王如才.海产单胞藻沉淀方法的研究[J].海洋科学,1997,3:9-13.
- [5] Tracy A, Gayle H, Richard J G. Thermal acclimation in the marine *Chaetoceros calcitrans* [J]. *Eur J Phycol*, 2001, 36: 233-241.
- [6] 李纯,李军.海洋生物种质细胞低温保存与机制[J].海洋科学,2000,4:64-69.
- [7] 周光正,金娟.存贮对海洋微藻活性和脂肪酸分布影响的综述[J].海洋与湖沼通报,1996,3:24-30.
- [8] 曾呈奎,相建海.海洋生物技术[M].济南:山东科学技术出版社,1998.638-640.

Study on the preservation technique for *Isochrysis galbana* Parke condensed at low temperature

YAN Bin-lun¹, ZHU Ming¹, ZHANG Xue-cheng²

(1. The Principally Constructing Biotechnology Laboratory of Jiangsu Province, Lianyungang 222005, China;
2. The Life Science College of China Ocean University, Qingdao 266003, China)

Received: May, 20, 2004

Key words: *Isochrysis galbana* Parke; condensed cells; preservation; temperature; survival rates; growth rate

Abstract: In this paper, effects of different temperatures on *Isochrysis galbana* Parke condensed after long-term preservation (more than 2 months) were investigated, the results showed that cells reached high survival rate (more than 70%) after being conserved at temperature 0~ 10℃, and kept high growth rate after recovering. So 0~ 10℃ could be considered as the most optimum range of temperature for preserving this kind of alga.

(本文编辑:张培新)