

海产饵料微藻超低温保种技术的研究^{*}

马志珍 张继红

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 15种海产饵料微藻在超低温(-196°C)下保存试验结果表明,除了波海红胞藻和中肋骨条藻未能活化复苏外,其余13种微藻都能在一定的时间内活化复苏,进行正常的生长繁殖,只是各种微藻的生长延缓期和生长率各有不同。细小裂面藻的延缓期最短,为4天,15天的平均生长率最大($K=0.253$);盐沼杜氏藻为最长,15天,生长率最小($K=0.077$),其他微藻的延缓期都在5—10天,生长率为 $0.121-0.204$ 。多数微藻在超低温条件都能长期保持生命活力,超低温技术是微藻保种中的一种较好的方法。

关键词 微藻,液氮,冷冻保护剂,保种技术

低温生物学中最活跃的领域是研究生物样品在液氮超低温下长期保存。动物的精液、血浆、皮肤、眼角膜以及胚胎等组织和细胞的超低温保存技术,已广泛应用于医学、畜牧业和水产业^[2,3]。植物的超低温保存研究起步较晚,微藻的超低温保存研究更为少见。只有Hwang, S. W.等报道了7属9种淡水微藻的22个品系在液氮中保存能存活5—8年^[6]。Hansen, O. H.^[5]报道了灰色念珠藻和蛋白核小球藻分别在 -25°C 、 -30°C 、 -70°C 和 -196°C 下的冰冻保存的结果。Norman, M. S.^[7]报道了一些盐沼微藻,利用甘油和二甲基亚砜(DMSO)作冷冻保护剂在液氮中保存1年的结果。另外间接引文中渡边信报道了小球藻、衣藻和裸藻等微藻的超低温保存方法,论述了预备培养的温度、培养液的营养盐类、冷冻速率、冷冻保护剂和解冻速度等内外因条件与耐冻性的关系。而杉山昭博等^[4]只进行了小球藻、四角突四片藻和细致角刺藻在 -20°C 和 -70°C 下的保存试验,得出在 -70°C 下能存活1年的结果。在国内,仅见阎立强等^[1]关于鱼腥藻和钝顶螺旋藻的超低温试验报告^[1]。可见微藻,特别是海产微藻的超低温保存方面的研究,国内外均很薄弱,开展这方面的研究很有必要。

1 材料和方法

1.1 藻种 共15种,其中蓝藻类3种——细小裂面藻(*Merismopedia minima*)、聚球藻红色品系(*Synechococcus* sp.)和盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*);红藻类1种——浅色紫球

收稿日期:1996-07-01。

^{*}农业部重点科研项目(编号:渔85-91-06-01-03)的部分内容。

藻 (*Porphyridium purpureum*) ; 隐藻类 1 种——波海红细胞藻 (*Rhodomonas baltica*) ; 甲藻类 1 种——原甲藻 (*Prorocentrum* sp.) ; 金藻类 2 种——绿光等鞭金藻 3011 品系 (*Isochrysis galbana* strain 3011) 和旋鞭巴夫藻 (*Pavlova gyraus*) ; 硅藻类 3 种——三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 、牟氏角刺藻 (*Chaetoceros muelleri*) 和中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) ; 绿藻类 4 种——微型小球藻 (*Chlorella nana*) 、盐沼杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 、绿色杜氏藻 (*Dunaliella viridis*) 和朱氏四片藻 (*Tetraselmis chui*) 。均为本实验室分离、筛选及收集保存的藻种, 常年保存在液体培养液中。

1.2 冷冻保护剂的毒性试验 选用渗透性保护剂——甘油、葡萄糖(G)和二甲基亚砜(DMSO)和非渗透性保护剂——蔗糖和蜂蜜, 浓度为 10%。以朱氏四片藻为例, 藻种和保护剂在试验前都经 0℃ (1h) 处理。

1.3 冷冻保护剂的添加量试验 因为发现 G、蔗糖和蜂蜜作保护剂时, 在微藻培养中会刺激细菌和霉菌的生长繁殖, 所以只选甘油和 DMSO, 但为了保留一种非渗透性保护剂, 仍选用了蔗糖。也以朱氏四片藻为例, 冷冻程序: 0℃ (1h), -20℃ (1h) → -196℃ (24h)。

1.4 冷冻速度的试验 以 DMSO 和蔗糖作保护剂, 浓度为 10%, 藻种为朱氏四片藻和牟氏角刺藻。快冻组: 藻种锻炼 (4℃ 左右, 24h) → 0℃ (1h) → -196℃ (24h); 慢冻组: 藻种锻炼 (4℃ 左右, 24h) → 0℃ (1h) → -20℃ (0.5h) → -30℃ (0.5h) → -70~80℃ (0.5h) → -196℃ (24h)。

1.5 15 种微藻的保种试验 选用 DMSO 作保护剂, 浓度为 10%。用慢冻程序, 35℃ - 37℃ 水浴快速解冻, 离心洗涤 2 次后接种培养。

2 结果与讨论

2.1 冷冻保护剂的毒性试验

添加冷冻保护剂是冷冻试验中的常规程序, 而一些保护剂具有一定的毒性, 对微藻的生长有一定的影响 (表 1)。

表 1 各种冷冻保护剂对四片藻生长的影响

Table 1 Effect of each kinds of cryoprotective agent on the growth of *Tetraselmis chui*

保护剂 Cryoprotector	接种量 Initial inocula	6 天的生长量测定值 Growth yields (6days) ($\times 10^4$ cells/ml)										$\bar{X} \pm SD$	生长率(K) Growth rate	相对成活率 Relative survival rate (%)
DMSO	1.1	8	5	7	6	8	9	6	5	7	8	6.9 ± 1.370	0.442	72.63
葡萄糖 Glucose	1.1	8	6	7	5	9	9	8	5	7	8	7.2 ± 1.476	0.452	75.79
甘油 Glycerol	1.1	7	6	8	8	8	10	9	8	6	8	7.8 ± 1.229	0.471	82.11
蔗糖 Sucrose	1.1	5	8	7	8	9	8	7	6	9	6	7.3 ± 1.337	0.455	76.84
蜂蜜 Honey	1.1	9	8	9	5	6	7	6	8	6	8	7.2 ± 1.398	0.452	75.79
10% DMSO + 8% 蔗糖	1.1	9	7	8	10	8	6	7	8	7	9	7.9 ± 1.197	0.474	83.16
8% Sucrose														
对照 Control	1.1	11	10	7	12	8	13	10	7	8	9	9.5 ± 2.068	0.518	100.00

从表 1 看, 各种保护剂对四片藻的毒性影响有一定差异, 但不太明显。将 DMSO 和蔗

糖联合应用,似乎能减轻一些毒性。在培养到 10 天以后,G、蔗糖和蜂蜜等 3 组培养液变混浊,镜检发现细菌数量很多,在蜂蜜组还出了一些霉菌。由此提示我们,在进行冷冻试验时,解冻后应将保护剂尽量离心洗涤干净。

2.2 冷冻保护剂的添加量试验

冷冻保护剂的用量大小,对微藻存活的影响是不同的(表 2)。从表 2 看出,甘油、DMSO 和蔗糖等 3 种保护剂的适宜用量均为 10%,用量偏低一点(5%)效果比用量偏高(15%)对成活的影响较小些。在保护剂的种类之间对微藻存活也有一定的影响,但差异不很明显。将 DMSO 和蔗糖联用,效果较好些。本次试验中四片藻的生长率较低,均在 0.100 以下,分析其原因是在解冻后,未将保护剂离心洗涤除去,就进行接种造成的。这是考虑到如经离心洗涤,微藻的量会受到损失,各组间的接种量就会有差异,无法比较各组的生长率。

表 2 冷冻保护剂的添加量对四片藻存活的影响

Table 2 Effect of the amount of cryoprotective agent on the growth of *Tetraselmis chui*

保护剂 Cryoprotector	添加量 Additive amount	接种量 Initial inocula ($\times 10^4$ cells/ml)	延缓期 Lag phase (days)	微藻 15 天的生长量 Growth yields (15days) ($\times 10^4$ cells/ml)					$\bar{X} \pm SD$	生长率(K) Growth rate	相对成活率 Relative survival rate (%)
甘 油 Glycerol	5%	18.2	6	35	33	28	31	32	31.8 ± 2.588	0.054	337.50
	10%	18.2	5	41	46	43	47	40	43.4 ± 3.050	0.084	525.00
	15%	18.2	7	29	30	31	26	28	28.8 ± 1.924	0.044	275.00
DMSO	5%	18.2	6	34	28	35	33	36	33.2 ± 3.114	0.058	362.50
	10%	18.2	5	46	38	42	43	45	42.8 ± 3.115	0.082	512.50
	15%	18.2	8	30	25	24	26	29	26.8 ± 2.588	0.038	237.50
蔗 糖 Sucrose	5%	18.2	5	38	34	40	39	33	36.8 ± 3.114	0.068	425.00
	10%	18.2	5	49	42	45	46	41	44.6 ± 3.209	0.086	537.50
	15%	18.2	6	36	39	34	35	33	35.4 ± 2.302	0.064	400.00
DMSO + 蔗糖 Sucrose	10% 8%	18.2	5	49	41	45	46	47	45.6 ± 2.966	0.088	550.00
对 照 Control	0	18.2	12	18	20	22	23	24	21.4 ± 2.408	0.016	100.00

2.3 冷冻速度的试验

试验表明,冷冻速度对微藻的存活有很大影响,但对不同的微藻其影响程度是不同的(表 3)。总的看来,分步慢冻的效果要比快冻的效果好。

2.4 15 种微藻的保种试验

选择各门藻类中具有代表性的 15 种海产饵料微藻,进行了超低温保种试验,结果表明,除了波海红胞藻和中肋骨条藻经冷冻处理后未能活化复苏外(其原因待查),其他 13 种微藻均能在一定的时间内活化复苏,进行正常生长繁殖(表 4)。说明超低温冷冻技术可以在多数微藻的保种培养中应用。

表 3 快速冷冻和慢速冷冻对微藻存活的影响

Table 3 Effect of the speed of temperature drop on the survival of the microalgae

微 藻 Microalgae	保护剂 Cryoprotector	冷冻速度 Speed of temp. drop	接种量 Initial inocula (× 10 ⁴ cells/ml)	微藻 15 天的生长量 Growth yields (15days) (x10 ⁴ cells/ml)						X ± SD	生长率(K) Crowth rate	相对成活率 Relative survival rate(%)
四片藻 <i>T. chui</i>	DMSO	快 Fast	18.2	36	35	39	30	34	34.8 ± 3.271	0.062	27.19	
	DMSO	慢 Slow	16.8	74	62	70	67	70	68.6 ± 4.450	0.135	59.21	
	蔗糖 Sucrose	快 Fast	17.6	40	34	36	38	39	37.4 ± 2.408	0.072	31.58	
	蔗糖 Sucrose	慢 Flow	17.2	49	41	45	47	46	45.6 ± 2.966	0.094	41.23	
对照 Control	未加 No adding	未冻 No freezing	8.4	98	84	92	91	87	90.4 ± 5.320	0.229	100.00	
角刺藻 <i>C. muelleri</i>	DMSO	快 Fast	20.2	32	25	27	29	29	28.4 ± 2.608	0.033	12.83	
	DMSO	慢 Slow	22.6	250	226	235	240	232	236.6 ± 9.044	0.256	96.60	
	蔗糖 Sucrose	快 Fast	19.4	25	20	23	22	24	22.8 ± 1.924	0.016	6.04	
	蔗糖 Sucrose	慢 Slow	19.8	180	175	170	174	184	176.6 ± 5.459	0.210	79.25	
对照 Control	未加 No adding	未冻 No freezing	15.6	258	232	247	245	250	246.4 ± 9.450	0.265	100.00	

表 4 15 种海产饵料微藻在超低温下保存的试验结果

Table 4 The recovery and growth rates of 15 microalgae kept in ultralow temperature

微藻 Microalgae	接种量 Initial inocula ($\times 10^4$ cells/ml)	延缓期 Lag phase (days)	微藻 15 天的生长量 Growth yields(15days) ($\times 10^4$ cells/ml)						$\bar{X} \pm SD$	生长率(K) Growth rate
蓝藻门 <i>Cyanophyta</i>										
裂面藻 <i>Merismopedia minima</i>	20.2	4	305	255	286	268	289	280.6 $\pm$ 19.424	0.253	
聚球藻 <i>Synechococcus sp.</i>	18.4	10	126	98	104	88	116	106.4 $\pm$ 14.926	0.169	
螺旋藻 <i>Spirulina subsalsa</i>	16.2	10	58	39	48	46	50	48.2 $\pm$ 66.870	0.105	
红藻门 <i>Rhodophyta</i>										
紫球藻 <i>Porphyridium purpureum</i>	1.96	6	168	145	121	151	142	145.4 $\pm$ 16.950	0.193	
隐藻门 <i>Cryptophyta</i>										
红胞藻 <i>Rhodomonas basitica</i>	8.4	死亡	-	-	-	-	-	-	-	
甲藻门 <i>Dinophyta</i>										
原甲藻 <i>Porocentrum sp.</i>	18.6	8	148	125	108	128	122	126.2 $\pm$ 14.394	0.184	
金藻门 <i>Chrysophyta</i>										
等鞭金藻 <i>Isochrysis galvana</i>	20.4	12	112	88	89	94	109	98.4 $\pm$ 11.327	0.151	
巴夫藻 <i>Pavlova gyrams</i>	16.8	8	132	124	128	102	127	122.6 $\pm$ 11.866	0.191	
硅藻门 <i>Bacillariophyta</i>										
褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.2	7	148	135	138	120	131	134.4 $\pm$ 10.213	0.192	
角刺藻 <i>Chaetoceros mueller</i>	20.6	8	132	113	118	109	136	121.6 $\pm$ 11.845	0.171	
骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	14.8	死亡	-	-	-	-	-	-	-	
绿藻门 <i>Chlorophyta</i>										
小球藻 <i>Chlorella nana</i>	24.6	5	230	201	192	195	205	204.6 $\pm$ 15.076	0.204	
盐沼杜氏藻 <i>Dunaliella salina</i>	12.8	15	32	30	24	26	31	28.6 $\pm$ 3.345	0.077	
绿色杜氏藻 <i>D. viridis</i>	18.8	10	126	116	98	94	97	106.2 $\pm$ 14.043	0.167	
四片藻 <i>Tetraselmis chui</i>	12.2	6	49	38	42	45	40	42.8 $\pm$ 4.324	0.121	

微藻超低温保存研究的历史较短,许多问题尚在探索之中。但随着研究的深入,在探明

生物细胞冻害和抗冻机理的基础上,超低温保存微藻藻种的应用前景将会是十分光明的。

参 考 文 献

- [1] 阎立强等,1993。两种蓝藻超低温保存抗冻保护剂的研究。辽宁师范大学学报(自然科学版),16(2):153-155。
- [2] 华泽钊等,1994。低温生物医学技术。科学出版社(北京)。
- [3] 张轩杰,1987。鱼类精液超低温冷冻保存研究进展。水产学报,11(3):359-367。
- [4] 杉山昭博等,1988。海产微细藻類の凍結保存について。水产増殖,(3):253-258。
- [5] Hansen, O. H., 1973. Preservation by freezing and freeze-drying. In "Handbook of phycological Methods, Vol. I", 195-205. Cambridge University Press.
- [6] Hwang, S. W. et al., 1971. Stability of *Chlamydomonas reinhardtii* in liquid nitrogen storage. J. phycal., 7(4): 300-303.
- [7] Norman, M. S. 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. Cryobiology, 15:563-568.

STUDIES ON ULTRALOW TEMPERATURE MAINTENANCE SPECIES TECHNIQUE OF MICROALGAE FOR MARICULTURE

Ma Zhizhen Zhang Jihong

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT 15 species of microalgae were stored at ultralow temperature (-196°C). The results showed that except for *Rhodomonas baltica* and *Skeletonema costatum*, the other 13 species could recover and grow as usual. But every species of the algae had different lag phase and growth rate. The lag phase of *Merismopedia minima* was shortest (4 days) and its average growth rate of 15 days was largest ($k=0.253$). The lag phase of *Dunaliella salina* was longest (15 days) and its average growth rate of 15 days was least ($k=0.077$). The lag phases of the others were among 5-10 days and their growth rates were among 0.121-0.204. Most of microalgae could live for a long time keeping in the condition of ultralow temperature, therefore, ultralow temperature technique was a better method of maintenance microalgae species.

KEY WORDS Microalgae, Liquid nitrogen, Cryoprotective agent, Maintenance species technique