

3种饵料金藻的超低温保存研究*

王起华 石若夫 程爱华

(辽宁师范大学, 大连 116029)

摘要 用两步冷冻法研究绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)、湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)、球等鞭金藻(*I. galbana* 3011)的超低温保存(液氮, -196°C), 探讨了影响存活率的内、外因素。结果表明, 降温速率 $0.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 预冻温度 -40°C , 预冻时间 30 min 时可获得较高的存活率。15% DMSO 或 15% DMSO + 10% 蔗糖是良好的抗冻保护剂。某些藻类在生长静止期或在低于最适温度下培养时可显著提高其存活率。通过控制内、外条件, 3种金藻的存活率都可达到 30% 以上, 比以往的报道有显著提高。

关键词 绿色巴夫藻, 湛江等鞭金藻, 球等鞭金藻, 超低温保存, 存活率

近 40 年来, 随着超低温保存技术的建立和发展, 已有越来越多的微藻实现了在 -196°C 液氮中的保存。超低温保存方法由于具有保持种质遗传稳定性、便于长期保存、能最大程度地减小污染等方面的优点而受到越来越广泛的重视^[1-8]。

微藻的冷冻保存, 目前普遍采用两步冷冻法^[3,6]。影响两步法保存效果的因素可归纳为内、外因两个方面。外因主要包括预冻温度、预冻时间、降温速率、化冻速率、抗冻保护剂的种类、浓度和使用方法等^[2,6,7,9]。内因则主要由藻类的种类决定, 还与藻细胞年龄、培养温度等因素有关^[6,10,11]。

采用超低温技术冷冻保存海洋饵料藻类的研究近年来日益受到关注^[4,5], 然而有关海洋金藻类超低温冷冻保存的研究却极少有报道, 仅 Cañavate 等^[4]对球等鞭金藻的冷冻保存做了初步研究, 认为它是 1 种难于保存的材料^[4]。本文以国内海水养殖中最常用 3 种饵料金藻为材料, 采用两步冷冻法, 对影响冷冻存活率的内、外因素作了较为系统的研究, 以期进一步改进保存效果。

1 材料与方法

1.1 材料及其培养

收稿日期: 1997-10-16

* 国家自然科学基金资助项目, 编号: 39470065 号

绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*, 简称为 Pv)、湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*, 简称为 Iz)和球等鞭金藻(*I. galbana* 3011, 简称为 Ig 3011), 由中国科学院海洋研究所提供, 并由辽宁师范大学植物生理研究室纯化为无菌单株系。藻种和实验材料在无菌操作下培养在含 100 ml f/2 培养基的 250 ml 三角瓶中^[12]。在 $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, $(2\ 300 \pm 200)\text{lx}$ 的冷荧光下培养, 光周期 12:12。除特殊说明外, 冷冻保存实验都用培养 5 d 的材料。

1.2 抗冻保护剂的配制和加入

保护剂通常配成使用浓度的 2 倍。DMSO(二甲基亚砜)和含 DMSO 的复合保护剂采用逐步加入法, 在 45 min 内加完。甲醇则一次加入后放置 15 min。除有关保护剂的实验外, 其他都用 15% 的 DMSO^[9]。

1.3 两步法冷冻

1.3.1 预冻温度和预冻时间 在室温 $(18 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下离心收藻, 用新鲜培养基再悬浮至所需的密度。取 2 ml 藻液移入 4 ml 冻干管中, 加入 2 ml 保护剂后放入 KF-4 低温浴槽(辽阳恒温仪器厂制)中, 以 $0.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率分别降到 -20°C 和 -40°C , 并在各相应温度下停留 15~120 min, 最后移入液氮中。

1.3.2 降温速率与预冻时间 分别以约 $0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率从室温预冻到 -30°C , 再分别停

留 15~120 min, 最后移入液氮中。从 -30°C 降温至 -40°C 时需时过长, 故除预冻温度实验外, 其它实验都采用 -30°C 的预冻温度。

1.3.3 解冻和保护剂的去除 将在液氮中保存 24 h 的冻干管放入 40°C 恒温水浴中, 迅速振荡直到最后一个冰晶消失后移入冰水浴中。除特殊说明外, 均在放置 20 min 后离心去除保护剂。

1.4 存活率的测定——再培养法

基本参照 Cañavate 等的方法^[4], 将经过冷冻保存处理的藻细胞与未冷冻的对照藻细胞分别接种于新鲜培养基中, 再培养 3 d 后用细胞计数板测定它们的细胞密度。根据不同接种密度的未冷冻藻细胞的生长曲线即可推算出上述冷冻样品和对照样品接种时的活细胞的密度。二者的百分比值即为冷冻保存的存活率。

1.5 藻细胞年龄对存活率的影响

材料分别培养 5 d(指数生长期)、8 d(静止初期)和 11 d(静止期)后进行冷冻保存。

1.6 培养温度对存活率的影响

材料分别 20°C 和 15°C 下培养 8 d 和 11 d 后用于冷冻保存。

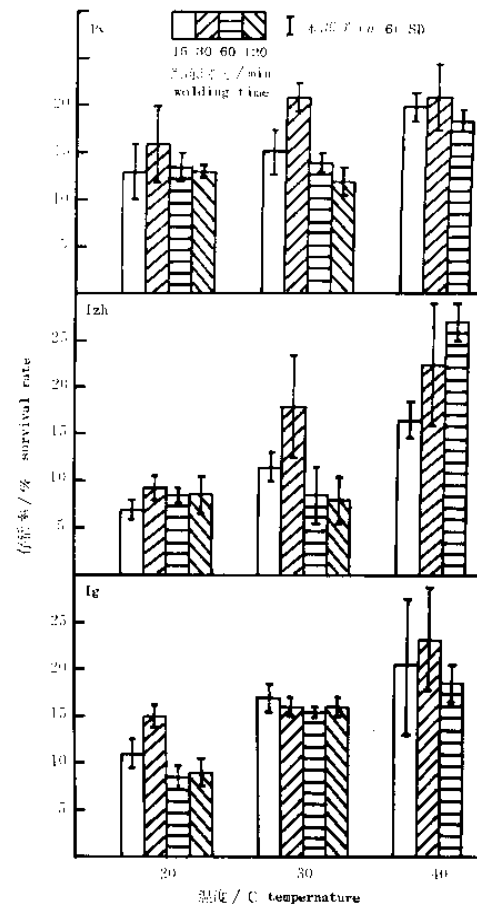
2 结果与讨论

2.1 预冻温度、预冻时间和降温速率对冷冻保存存活率的影响

图 1 为预冻温度和预冻时间对存活率的影响。结果表明, 预冻温度对存活率有很大的影响, 3 种金藻的存活率都随预冻温度的下降而升高, 一般在 -40°C 时达到最高值。而预冻时间对存活率也有较大影响, 多数情况下 30 min 的预冻可获得较高的存活率。Cañavate 等^[4]曾报道 Ig 在 -20°C 、 -50°C 和 -80°C 3 种预冻温度下的保存效果以 -50°C 最好, -20°C 次之, 而 -80°C 下存活率为零, 但他们未进行预冻时间的实验。本实验进一步证实了 Morris G J^[11]在淡水 *Chlorella* 所得到的结果, 即预冻温度结合预冻时间是影响某些藻类冷冻保存存活率的重要因素。因为二者决定了细胞在慢速冷冻中的脱水程度。而控制合适的脱水程度是细胞投入液氮后保持较高成活率的关键。

降温速率对存活率也有很大影响(表 1)。在降温速率 $0.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时, 3 种金藻的存活率最高, 这与 Cañavate 等人的结果有些不同, 他们的实验结果表明, $0.25\sim 4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率下冷冻保存 Ig, 对存

活率没有影响^[4]。



Pv - 绿色巴夫藻; Lzh - 湛江等鞭藻; Ig - 球等鞭藻.

图 1 预冻温度和预冻时间对存活率的影响

Fig. 1 Effect of final temperature and holding time in the first freezing step on survival rate

表 1 降温速率和预冻时间对存活率的影响

Table 1 Effect of cooling rate and holding time in the first freezing step on survival rate (n = 6) (mean $\pm$ SD) %

藻类 algae	降温速率/ ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) cooling rate	预冻时间/min holding time			
		15	30	60	120
Pv	0.41	9.3 $\pm$ 0.8	9.9 $\pm$ 1.2	7.2 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.4
	0.7	15.2 $\pm$ 1.1	20.8 $\pm$ 1.2	14.1 $\pm$ 1.0	12.0 $\pm$ 0.1
	4		11.6 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 2.6	
Lzh	0.46	4.3 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.9	6.1 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.4
	0.7	11.6 $\pm$ 1.6	18.2 $\pm$ 6.9	8.0 $\pm$ 3.0	8.6 $\pm$ 3.3
	4		6.4 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.9	
Ig 3011	0.7	17.6 $\pm$ 1.4	15.6 $\pm$ 0.7	15.2 $\pm$ 0.3	15.1 $\pm$ 3.7
	4		9.7 $\pm$ 4.4	7.7 $\pm$ 1.0	

2.2 抗冻保护剂对存活率的影响

抗冻保护剂对 3 种金藻存活率的影响如表 2 所示。单一保护剂中, 15% DMSO 对 3 种金藻都有较好的保护效果。其中 Ig 3011 的存活率为 $(15.6 \pm 0.7)\%$, 这与 Cañavate 等^[9] 17.1% 的存活率十分接近。当用 5%~10% 的甲醇作保护剂时, 3 种金藻存活率为 9%~16%, 这与 Cañavate 等^[4] 的结果有较大差异, 他们的实验证明, Ig 虽可在室温下耐受 5%~10% 的甲醇, 但以 5% 甲醇作保护剂时的冷冻保存存活率却为零。这种差异可能由于所用 Ig 株系不同所致, 但也可能与保护剂的去除方法有关。本研究还发现, 当采用复合保护剂 15% DMSO + 10% 蔗糖时, Izh 和 Ig 3011 的存活率有明显的提高。

表 2 抗冻保护剂对存活率的影响

抗冻保护剂 cryoprotectant	藻类 algae		
	Pv	Izh	Ig 3011
5% 甲醇 methanol	16.7 ± 1.7	11.2 ± 1.8	11.9 ± 5.5
10% 甲醇 methanol	16.8 ± 0.4	9.0 ± 1.5	13.1 ± 1.5
15% 甲醇 methanol	8.8 ± 0.3	6.1 ± 1.1	6.9 ± 2.3
15% DMSO	20.8 ± 1.2	18.2 ± 6.9	15.5 ± 0.7
15% DMSO + 10% 蔗糖 DMSO + sucrose	10.1 ± 1.0	24.0 ± 9.4	25.6 ± 1.6
15% DMSO + 10% PVP*	15.3 ± 1.2	10.9 ± 2.8	14.3 ± 2.1
不加保护剂 no cryoprotectant	0.0	0.0	0.0

* PVP - 聚乙烯吡咯烷酮。

表 3 化冻后在 0℃ 下保持时间对成活率的影响

		(mean ± SD) %		
藻类 algae	保护剂 cryoprotectant	保持时间/min holding time		
		0	20	60
Pv	10% 甲醇 methanol	16.2 ± 1.4	18.1 ± 2.9	20.2 ± 1.3
	15% DMSO	20.1 ± 3.0	16.8 ± 1.1	15.4 ± 0.8
Izh	15% DMSO	11.2 ± 1.2	12.1 ± 1.6	10.9 ± 0.6
Ig 3011	15% DMSO	18.0 ± 2.1	19.2 ± 3.7	23.7 ± 2.7

表 3 为化冻后在 0℃ 下保持时间对存活率的影响。用 10% 甲醇作保护剂时, Pv 的存活率随保持时间的延长而逐步增加; 用 15% DMSO 作保护剂时, Pv 的存活率随保持时间的延长逐步下降, Ig 3011 的存活率逐步增加, 而 Izh 存活率变化很小。甲醇、DMSO 等保护剂对细胞有一定的毒性, 在样品化冻后通常采用离心法或大量稀释法将它们去除掉^[7,9]。而我们发现, 化冻后的保持时间对存活率

有一定影响, 这种影响既和藻类种类有关, 也和保护剂的种类有关。

2.3 藻细胞年龄对抗冻性的影响

Morris G J^[11]发现, 淡水 *Chlorella* 细胞的抗冻性在静止期显著高于指数期。而 Ben-Amotz A^[3]在对 12 种海藻进行冷冻保存时, 认为细胞年龄与抗冻性无关。我们的实验结果表明, 藻细胞年龄对抗冻性的影响与细胞种类有密切关系(表 4)。对于 Pv, 静止期细胞(11 d)的抗冻性明显高于指数期的细胞(5 d), Ig 3011 则在静止初期(8 d)时抗冻性最高, 而 Izh 的抗冻性与细胞年龄无关。

表 4 藻细胞年龄对存活率的影响

Table 4 Effect of algae cell age on survival rate

藻类 algae	(mean ± SD) %		
	藻细胞年龄/d algae cell age		
	5	8	11
Pv	15.9 ± 1.8	27.6 ± 3.6	30.4 ± 3.4
Izh	14.3 ± 2.9	16.0 ± 5.1	16.1 ± 3.9
Ig 3011	19.3 ± 1.2	30.6 ± 6.4	17.3 ± 2.3

2.4 培养温度对抗冻性的影响

Morris G J^[10]在对 *Chlorocella* 211/8 h 进行冷冻保存时发现, 将培养温度从 20℃ (适温) 降至 15℃ (亚适温) 时可以提高其抗冻性。而 Day 和 Fenwick^[5]在冷冻保存几种 *Tetraselmis* 时则发现, 将培养温度从适温降至亚适温时会降低细胞的抗冻性。我们使用的 3 种金藻的最适生长温度为 20~30℃。如图 2 所示, 当培养温度降至 15℃ 时可显著提高 Izh 的抗冻性, 而对 Pv 和 Ig 的作用并不明显, 甚至会导致抗冻性下降。因此, 我们认为培养温度对抗冻性的影响与藻类种类有关。

在微藻冷冻保存的研究中, 存活率的鉴定方法是一个重要问题。在以往的报道中曾采用过荧光染色法^[5,8]、光合放氧法^[3]、运动能力观测法^[5,8]、平板克隆法^[7]、溶液再培养法^[4,9]等。其中, 后 2 种方法被认为是最可靠的方法^[6,9]。我们采用了溶液再培养法, 该法虽然操作麻烦, 但可以保证测定结果的准确度和可靠性。

综上所述, 在采用两步法冷冻保存 3 种海洋金藻时, 影响存活率的主要外部因素是确定合适的预冻条件和选择适当的保护剂。在以 0.7℃/min 的速率降温至 -40℃ 并保持 30 min 时, 通常可获得较高的存活率。15% DMSO 或 15% DMSO + 10% 蔗糖是良好的抗冻保护剂。藻细胞年龄、材料培养温度

等内部因素对抗冻性有时也有较大影响,但这些因素的影响似乎更与藻类本身的特点相关。通过控制合适的内、外条件,我们冷冻保存3种金藻的存活率都可达到30%以上(图2)。这比Cañavate等^[4,9]保存1g所得到的4%~17%的存活率有了显著提高。然而,种质长期保存要求有50%以上的存活率,为此尚需做更深入的工作。

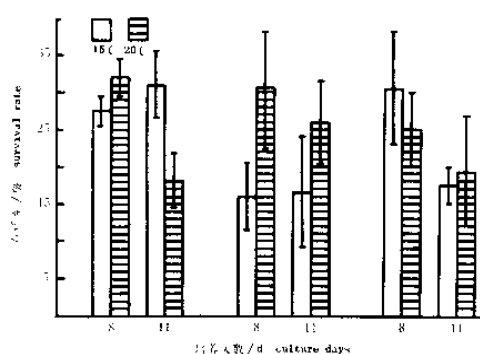


图2 培养温度对存活率的影响

Fig.2 Effect of culture temperature on survival rate

参 考 文 献

- 王素娟主编. 海藻生物技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 138~143
- 闫立强, 等. 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, 1993, 16(2): 153~155
- Ben-Amotz A, Gilboa A. Cryopreservation of marine unicellular algae. I. A Survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. Mar Ecol Prog Ser, 1980, 2: 157~161
- Cañavate J P, Lubian L M. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. Aquaculture, 1995, 136: 277~290
- Day J G, Fenwick C. Cryopreservation of members of the genus Tetraselmis used in aquaculture. Aquaculture, 1993, 118: 151~160
- Leeson E A, et al. maintenance of algae and protozoa. In: Kirsop B E, Snell J, J S Chapter. Maintenance of microorganisms. Academic Press, 1984, 13: 131~160
- Morris G J. The cryopreservation of *Chlorella*. I. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. Arch Microbiol, 1976 a, 107: 57~62
- Tsuru S. Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. Cryobiology, 1973, 10: 445~452
- Cañavate J P, Lubian L M. Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethylsulfoxide and methanol. J Phycol, 1994, 30: 559~565
- Morris G J. The cryopreservation of *Chlorella*. II. Effect of growth temperature on freezing tolerance. Arch Microbiol, 1976 b, 107: 309~312
- Morris G J. Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the methods of two-step cooling. Br Phycol J, 1978, 13: 15~24
- McLachlan J. Growth media - marine. In: Stein J R. Handbook of phycollogical methods, culture methods & growth measurements. Cambridge Univ Press, 1973. 2: 25~51

Cryopreservation of 3 golden algae (*Chrysophyta*) used as feed in mariculture

Wang Qihua Shi Ruofu Cheng Aihua

(Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract *Pavlova viridis*, *Isochrysis zhanjiangensis* and *Isochrysis galbana* were cryopreserved in liquid nitrogen with the method of two-step cooling. The survival rates were higher when the cooling rate was 0.7°C/min and the final temperature in the first freezing step was -40°C and the holding time was 30 min. 15% DMSO and 15% DMSO plus 10% sucrose were effective cryoprotectants. The survival rate of algae during stationary phase of growth or cultured below the optimum temperature was high sometimes. Under suitable conditions of cryopreservation, the survival rates of all the 3 algae could be raised up to over 30%.

Key words *Pavlova viridis*, *Isochrysis zhanjiangensis*, *Isochrysis galbana*, cryopreservation, survival rate