

海产饵料用微藻固定化保种技术*

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 12种海产饵料微藻固定化保种培养试验的结果表明,除了隐藻门的波海红胞藻固定化后未见生长,蓝藻门的聚球藻红色品系生长缓慢,存活时间低于3个月外,其他象等鞭金藻3011、旋鞭巴夫藻、牟氏角刺藻、绿色杜氏藻和盐泽螺旋藻等存活时间均在1年以上。将固定化的藻种存放在4℃左右的冰箱中,微型小球藻、朱氏四片藻、浅色紫球藻、三角褐指藻和双点舟形藻等的存活时间可达2年左右。微藻固定化后的生长和存活时间受多种因素的影响。

关键词 微藻, 固定化培养, 保种技术

在海产饵料微藻培养中,保种技术十分重要。分离培养1个单种,往往得化费数月时间,要筛选出1个优良的饵料用微藻有时得费数年功夫。所以当人们分离筛选到1个有用的微藻单种后,必须十分小心、十分细致地在实验室进行保种培养,使它们一代一代地传下去。当需要应用时,将它们扩大培养。常规的工作是一项琐碎繁杂的工作,在多次的移接过程中,稍有疏忽,就会使藻种污染杂藻或原生动物,使保种失败,所以要尽量减少接种次数,既延长转接间隔时间,又能维持藻种的生命活力,这是微藻培养工作中努力要解决的问题之一。利用琼脂平板法保种,一些微藻的存活时间可延长到1年以上,但有些微藻不能在琼脂平板上生长繁殖,或是因琼脂失水干裂引起微藻意外死亡^[1,3],所以有必要进一步研究新的更有效的保种技术。

1978年以来,固定化技术就被用来作为延长光合细胞寿命的一种重要手段,现在也可作为微藻种质保存的重要方法之一。但微藻存活时间从1个月到2年不等^[5,6]。在国内也已有微藻固定化培养研究的报道,但主要研究固定化的微藻生理功能和超微结构^[2,4],尚未见有关于微藻固定化保种试验方面的报道。本研究从1991年开始进行了微藻固定化培养方面的试验,为完善微藻固定化保种技术提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验藻种

12种试验藻种(见表1),均为历年分离筛选的,长年以液态方法保存在实验室内。

收稿日期:1997-04-28

*农业部重点科研项目(渔85-91-06-01-03)的部分内容。

1.2 固定化方法

藻酸盐为市售化学纯褐藻酸钠(温州助剂厂),称取褐藻酸钠 2.5 g 慢慢搅动(约 4h)溶入 100 ml 蒸馏水中,并加入 NaCl 2g,配成 2.5% (W/V)的凝胶溶液,煮沸消毒备用。以凝胶溶液:藻液为 4:1 的比例接种藻种,充分搅匀后制成胶-藻混悬液,用注射器吸取混悬液,通过 9 号针头,以 6ml/min 的速率滴入 2% 的 CaCl_2 溶液中,约 30 min 后形成固化的褐藻酸钙胶珠。每 ml 混悬液约可制成 50 粒,直径约 3.5 mm 的胶珠,用消毒海水洗涤 2 次,就可供各种试验用。每瓶装 100 ml 培养液,接种 100 粒胶珠。

1.3 藻种接种量试验

分 10^4 、 10^5 和 10^6 ml^{-1} 的藻种密度,以小球藻、角刺藻、等鞭藻和螺旋藻为例。

1.4 藻种生长年龄试验

分培养 7、14、21d 3 组,以小球藻、四片藻、褐指藻和等鞭金藻为例。

1.5 存放温度试验

11 种微藻固定化培养 20d 后,一瓶仍存放在培养架上,室温、自然光照;另一瓶存放在冰箱中(约 4°C)。定时取样进行复活试验,室温下培养 10d,先目测、后镜检,以判别是否存活。

1.6 活化试验

每瓶取 5 粒胶珠,用 200 目筛绢网挤碎滤入三角烧瓶中培养。也可用 2% 的柠檬酸钠溶液溶解胶珠解脱出藻细胞后接种,在接种前应将藻悬液离心洗涤,以除去柠檬酸钠残液。

2 结果与讨论

2.1 固定化后对微藻生长的影响

微藻经固定化后,有的适应较快,很快能进行生长繁殖,胶珠内出现气泡。随着光合作用的加强,多数胶珠渐渐开始上浮,胶珠颜色加深,气泡开始减少,渐渐沉底。再培养一段时间,有些微藻从胶珠中溢出。象四片藻、螺旋藻等溢出量较多,紫球藻、聚球藻等溢出量较少。试验结果见表 1。

从表 1 看出,除了红细胞藻在固定化后未见生长(原因待查)外,其他 11 种微藻都能在固定化的胶珠内生长,只是生长的快慢有所不同,生长效果的排列依次为:小球藻>四片藻>褐指藻>紫球藻>舟形藻>角刺藻>螺旋藻>杜氏藻>巴夫藻>等鞭藻>聚球藻。

2.2 接种量对固定化微藻生长的影响

接种量对固定化微藻生长影响的试验结果见表 2。从表 2 看出,尽管接种量大,最后的绝对生长量也高。但从藻的生长率来看,除螺旋藻在 10^4 数量级接种量下不能生长外,中接种量组的生长率最高,低接种量的生长率较低。所以可以认为在进行微藻固定化培养时,用 10^5 ml^{-1} 数量级的接种量较为适宜。

2.3 藻种年龄对固定化微藻生长的影响

各种微藻之间千差万别,即使同一种微藻,也因其年龄、生理状态等的不同,其固定化培养的效果也有差别。藻种年龄对固定化微藻生长的影响的试验结果见表 3。

一般认为年龄大的微藻细胞的体积大些,而更易被固定化载体所吸附。由于单位载体的吸附量愈多,可分裂产生的幼细胞更多,而使所需的反应加速。所以处于生长稳定期的微藻细胞比处于指数生长期的细胞固定化培养效果好。从表 3 看出,以培养 14d 中等年龄的藻细胞固定化培养的效果为最好,这与上述推定较为一致。一般微藻培养 7~10d 后就由生

长指数期进入生长稳定期,而培养年龄达 20d 以上已是稳定期的后期,藻的生理活性已开始下降,细胞的生长繁殖速度也随之减慢。

表 1 12 种微藻固定化后的生长情况

Table 1 The growth of 12 species immobilized microalgae

d

种名 Species	延缓期天数 Days of lag phase	胶珠开始上浮天数 Days of bead upfloat	胶珠开始下沉天数 Days of bead downsink	出现微藻外溢天数 Days of algae escaping from beads
微型小球藻 <i>Chlorella nana</i>	1	3	10	14
朱氏四片藻 <i>Tetraselmis chui</i>	1	3	11	13
三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	1	3	10	15
浅色紫球藻 <i>Porphyridium purpureum</i>	1	4	10	17
双点舟形藻 <i>Navicula dissipata</i>	2	4	10	15
牟氏角刺藻 <i>Chaetoceros mueleri</i>	2	4	11	17
盐泽螺旋藻 <i>Spirulina subsalsa</i>	2	4	13	12
绿色杜氏藻 <i>Dunaliella viridis</i>	2	4	12	14
旋鞭巴夫藻 <i>Pavlova gyraus</i>	2	5	10	15
等鞭金藻 <i>Isochrysis galbana</i>	3	5	10	16
聚球藻 <i>Synechococcus sp.</i>	4	6	11	—
波海红胞藻 <i>Rhodomonas baltica</i>	—	—	—	—

表 2 不同接种量对固定化微藻生长的影响

Table 2 The effect of different inocula on the immobilized microalgae

种名 Species	接种量/($\times 10^4 \text{ml}^{-1}$) Inocula	生长量/($\times 10^4 \text{ml}^{-1}$) Growth yields	K 值 Growth rates
微型小球藻 <i>Chlorella nana</i>	2.3	12.8	0.165
	26.0	192.0	0.192
	220.0	830.0	0.128
牟氏角刺藻 <i>Chaetoceros mueleri</i>	2.4	7.4	0.108
	23.0	88.0	0.129
	210.0	390.0	0.060
等鞭金藻 <i>Isochrysis galbana</i>	2.5	7.5	0.106
	23.0	86.0	0.127
	220.0	420.0	0.062
盐泽螺旋藻 <i>Spirulina subsalsa</i>	2.4	—	—
	26.0	80.0	0.108
	210.0	340.0	0.046

2.4 固定化微藻的保种时间和活化复苏能力

在我们试验的 12 种微藻中,除了红胞藻固定化后不能生长,聚球藻红色品系固定化保种的时间与液体保种差不多外,其他 10 种微藻固定化后的保种时间都比液体保种时间延长了许多倍(表 4)。

表 3 藻种年龄对固定化微藻生长的影响

Table 3 The effect of algae's age on the growth of immobilized microalgae

种名 Species	藻种年龄/d Age of algae	接种量/($\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) Inocula	生长量/($\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) Growth yields	K 值 Growth rates
微型小球藻	7	10.4	58.1	0.165
<i>C. nana</i>	14	11.2	68.8	0.175
	21	9.6	48.2	0.155
朱氏四片藻	7	5.2	27.0	0.158
<i>T. chui</i>	14	5.4	32.5	0.173
	21	5.0	23.6	0.149
三角褐指藻	7	8.9	38.8	0.142
<i>P. tricornutum</i>	14	10.2	49.8	0.153
	21	9.6	37.9	0.132
等鞭金藻	7	9.2	32.6	0.122
<i>I. galbana</i>	14	9.8	42.8	0.142
	21	10.1	32.9	0.114

表 4 固定化对不同微藻活化复苏能力的影响

Table 4 The effect of immobilization on the renew culture ability of different algae

种名 Species	存放时间/d Days of storage									
	30	90	180	270	360	450	540	630	720	
微型小球藻	室温	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. nana</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
朱氏四片藻	室温	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>T. chui</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
三角褐指藻	室温	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. tricornutum</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
浅色紫球藻	室温	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. purpureum</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
双点舟形藻	室温	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. dissipata</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	-
牟氏角刺藻	室温	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. muelleri</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	-	-
盐泽螺旋藻	室温	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. subsalsa</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	+	-	-
绿色杜氏藻	室温	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>D. viridis</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	-	-	-
旋鞭巴夫藻	室温	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. gyrans</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	-	-	-
等鞭金藻	室温	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>I. galbana</i>	4℃	+	+	+	+	+	+	-	-	-
聚球藻	室温	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp.	4℃	+	+	-	-	-	-	-	-	-

注: + 示生长 Growth; - 示死亡 Death.

固定化保种培养保存时间长, 活化复苏也快, 一般经 3~4d 的延缓期, 最多 5~6d 就能复苏生长, 但固定化程序较复杂, 需要细心操作。另外大多数微藻在培养后期常会从胶珠中溢出及有的胶珠融解等缺点。本试验还发现, 在进行微藻活化复苏培养时, 应严格控制培养条件, 使各种微藻处于它们生长繁殖的最适条件下, 有利提高活化复苏的成功率。如三角褐指藻活化应避开高温季节, 或人工控制在 20℃ 以下, 25℃ 以上进行活化往往会引起藻的死亡。另外存放在 4℃ 下的样品进行活化时, 应先在室温下适应 1d, 再进行活化接种培养。

综上所述,固定化保种技术对多数微藻是适用的,具有保存时间长、活化复苏快的优点,且固定化技术要求的设备较为简单,在一般的微藻实验室内都能进行,可以逐步推广使用。

参 考 文 献

- [1] 马志珍.海产微型藻类的实验室培养技术.齐鲁渔业,1989(2):18~21
- [2] 件小南等.几种海洋微藻的固定化培养.海洋学报,1992,14(1):129~133
- [3] 华汝成.单细胞藻类的培养与利用.北京:农业出版社,1986.370~374
- [4] 张学成等.固定化培养对亚心形扁藻生理功能及超微结构的影响.海洋学报,1994,16(4):96~106
- [5] Hertzberg S, et al. Studies of alginate-immobilized marine microalgae. Botanica Marina, 1989, 32(4):267~273
- [6] Tomponnet C, et al. Cytological and physiological behaviour of *Engelmannia gracilis* cells entrapped in a calcium alginate. Physiol. plant., 1985, 63(2):277~283.

Study on the storage technique with immobilization culture of marine microalgae

Ma Zhizhen Zhang Jihong

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

Abstract The test results of 12 species of immobilized algae show that *Rhodomonas baltica* can not grow, *Synechococcus* sp. red strain grows slowly and its survival time is less than 3 months, the other algae such as *Isochrysis galbana* 3011 strain, *Pavlova gyrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Dunaliella viridis* and *Spirulina subsalsa* can live for more than 1 year. If the immobilized algae is stored in refrigerator (4℃), *Chlorella nana*, *Tetraselmis chui*, *Porphyridium purpureum*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Navicula dissipata* can live for about 2 years. The growth and survival time are affected by many factors.

Key words Microalgae, Immobilization culture, Storage technique