

常温和低温下保存小新月菱形藻的包埋-脱水法

薄岩, 张恩栋, 王起华*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

Storage of *Nitzschia closterium* f. *minutissima* by Encapsulation-dehydration under Normal Temperature and Low Temperature

BO Yan, ZHANG En-Dong, WANG Qi-Hua*

Collage of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

摘要: 用包埋-脱水法在常温和低温下保存小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*), 探讨了温度、光(暗)、含水量、密封袋内空间体积和密封袋外膜材质等因素对保存效果的影响。结果表明, 小新月菱形藻在4℃下暗保存6个月后的最高存活率达到80.4%。而且, 保存后的藻细胞经过恢复培养后, 其生长力可达到保存前的水平。包埋-脱水法操作简单, 无需复杂设备, 在藻类种质保存中有广阔的应用前景。

关键词: 小新月菱形藻; 常温保存; 低温保存; 包埋-脱水法

饵料硅藻在鱼、虾和贝类育苗生产中有着重要的作用, 近年来有关饵料硅藻保存的研究日益受到重视(朱明等 2003; 王起华等 2006)。目前微藻保存技术主要包括: 继代保存法、干燥保存法和超低温保存法等(Day 1999)。继代保存法是目前普遍采用的方法, 该法简单易行, 通常在常温或常低温下保存。但是, 其缺点是保存时间短, 需要频繁继代, 并且容易发生污染和变异, 只能用于藻类的短期保存(Day 1999; 潘克厚和朱葆华 2002)。干燥保存法目前只能用于某些蓝藻和少数绿藻, 且大多存活率很低(Day 1999)。超低温保存可能是微藻长期保存的最好方法, 但是需要较为复杂的操作技术和贵重的保存设备, 且只能保存微量的藻种(Day 1999)。因此, 该法不适合藻种的中期保存, 也无法满足大量藻类保存的需要。采用细胞固定化技术(常用褐藻胶包埋法)保存藻种可能是藻类保存的一条新途径, 已有研究表明, 此法可以在常低温下实现对某些微藻的中期(数月至数年)保存(Hertzberg 和 Jensen 1989; 马志珍和张继红 1998; Chen 2001; Gaudin 等 2006; 孟妍等 2008)。将褐藻胶包埋技术与干燥脱水技术相结合的包埋-脱水法虽然已经成功地用于小新月菱形藻等硅藻的超低温保存(王起华等 2006), 但采用此法在常温(或)低温下保存微藻的研究目前尚鲜有报道(孟妍等 2008)。本文采用包埋-脱水法在常温和低温下保存小新月菱形藻, 探讨了保存温度、光(暗)、胶球含水量、密封袋内空间体积和密封袋外膜材质

等因素对保存效果的影响, 以寻求一种适合于藻类中期保存的新方法。

材料与方法

1 材料

小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)由辽宁师范大学藻类生理实验室提供。实验材料培养在含 100 mL f/2 培养基的 250 mL 三角烧瓶中, (20±2)℃, 冷荧光, 光照强度(50±4) μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期 L:D=14:10, 培养条件参见王起华等(2006)。

2 包埋和脱水

2.1 包埋 将静止初期的藻细胞包埋在直径约 3.5 mm 的褐藻酸钙胶球中, 包埋后的藻密度为 1.0×10⁷ 细胞/胶球。将胶球置于消毒海水中, 在(20±2)℃暗放置 24 h 备用。包埋方法参见王起华等(2006)。

2.2 脱水及含水量的测定 取上述胶球每 120 个为一组, 分别脱水至 93.0% (未脱水对照)、91.0%、88.5%、81.5% 和 58.8% 含水量(以脱水后的胶球鲜重为底), 脱水和含水量的计算方法参见王起华等(2006)。

3 甘油处理

从上述各组含水量的胶球中取出部分胶球, 分

收稿 2008-07-07 修定 2008-09-12

资助 国家自然科学基金(30170099, 30470184)。

* 通讯作者(E-mail: qihua_mail@163.com; Tel: 0411-82158039)。

别浸泡在含 10% 甘油并与各组合水量胶球等渗的 f/2 培养基中, 在与培养材料相同条件下振荡培养, 方法参见孟妍等(2008)。

4 密封和保存

4.1 密封 将上述各种处理的胶球每 5 个一组分别密封在双层农用聚乙烯透明塑料膜(膜厚度为 0.2 mm)中, 密封袋内部体积为 3 cm×1 cm×0.3 cm (长×宽×高, 下同); 将部分含水量分别为 93.0% 和 88.5% 的胶球每 5 个一组分别密封在袋内部体积为 3 cm×3 cm×0.3 cm 和 9 cm×3 cm×0.3 cm 的上述同样材质的袋中; 另外, 将部分含水量为 93.0% 和 88.5% 的胶球每 5 个一组分别密封在袋内部体积为 3 cm×1 cm×0.3 cm 的单层聚乙烯透明塑料袋中, 在外部另密封一层铝塑膜(铝塑膜由秦皇岛市泽宝医药包装有限公司提供)。

4.2 保存 按照实验设置(详见实验结果部分), 将上述密封袋分别保存在 20℃ - 黑暗、20℃ - 光照(光照强度约 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 其他条件同材料培养)、4℃ - 黑暗、4℃ - 光照(自然光, 光照强度约 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和 -30℃ - 黑暗的条件下。保存时间分别为 1 个月、3 个月和 6 个月。

5 恢复、再培养和存活率的测定

5.1 保存后的恢复和培养 将保存后的胶球放入装有 20 mL f/2 培养基的 50 mL 三角瓶中, 在 20℃ 暗处放置 24 h, 在与前述材料培养相同的条件下再培养。预实验表明, 再培养中胶球的颜色经历了逐渐变浅之后又重新加深的变化过程, 选择在胶球颜色变为最浅时提取叶绿素。

5.2 存活率的测定 用 100% 丙酮提取胶球中藻细胞的叶绿素并计算叶绿素 a 含量, 以保存前的胶球作为对照, 以热杀死胶球(将保存前的胶球经过 80℃ 水浴加热 5 min 得到)为空白。根据叶绿素 a 含量计算存活率(王起华等 2006)。

6 生长曲线和生长速率

将保存前和 4℃ 暗保存 6 个月的含水量为 88.5% 的胶球移入含 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸钠的培养基中, 使胶球完全化解。将回收的藻细胞再悬浮于含 20 mL 培养基的 50 mL 三角瓶中, 置于前述藻种培养条件下恢复培养, 以血球计数板测定藻细胞密度。平均生长速率 K 的计算公式为: $K=(\log N_t - \log N_0)/0.301t$ 。式中, N_0 为接种密度, N_t 为最高生

长密度, t 为达到最高生长密度的培养天数。以上参见孟妍等(2008)。

上述实验重复 3 次, 每次实验同一处理设置 3 个平行样品, 文中数据为 9 个平行样品的平均值和标准差。

实验结果

1 温度和保护剂甘油对存活率的影响

表 1 为小新月菱形藻在所设置的 5 种胶球含水量和 3 种保存温度下的存活率。其中, 20℃ 和 4℃ 分别设置暗和弱光 2 种保存条件; -30℃ (暗)设置了不加保护剂和加 10% 甘油作保护剂的 2 种条件。未脱水的实验材料(对照, 胶球含水量 93.0%)在所设置的 3 个温度下暗中保存时, 常温(20℃)保存 6 个月的存活率较低, 为 25.9%; 零上低温(4℃)保存 6 个月的存活率最高, 为 60.7%; 相比之下, 零下低温(-30℃)无甘油保护剂时保存 6 个月的存活率最低, 仅为 2.3%; 而在加入 10% 甘油后, 保存 6 个月的存活率提高到 34.9%。在其他含水量条件下暗保存 6 个月时, 存活率都是 4℃ 最高, -30℃ (10% 甘油)次之, 而 20℃ 的存活率明显低于前二者; 同样, 加保护剂甘油的存活率一般都远高于不加甘油的对照。

2 含水量和光照对存活率的影响

如表 1 所示, 存活率都随着胶球含水量的适度减少而增大。当含水量减少到 88.5% 时, 20℃ 和 4℃ 保存 6 个月的存活率都达到最高值。其中, 20℃ 光和暗保存的存活率分别为 25.9% 和 43.4%, 4℃ 光和暗保存的存活率分别为 71.5% 和 77.7%。相同温度下暗保存的存活率都略高于光保存的存活率。-30℃ (添加 10% 甘油)保存 6 个月的存活率在含水量减少到 81.5% 时达到最高值, 为 55.1%; 而 -30℃ (不加甘油)保存 6 个月的存活率在同一含水量时仅为 1.5%。

3 密封袋内空间体积对存活率的影响

表 2 为密封袋内空间体积对小新月菱形藻存活率的影响。小新月菱形藻保存 6 个月的存活率都是在密封袋内体积为 0.9 cm³ 时达到最高值, 并且都随着密封袋内体积的增加而减小。当密封袋内体积增加到 2.7 cm³ 时, 20℃ (暗)保存条件下的存活率大幅下降; 相比之下, 4℃ (暗)保存条件下的

表1 温度、光照、胶球含水量和保护剂甘油对存活率(%)的影响

温度 /	光 / 暗	时间 / 月	胶球含水量 / %				
			93.0	91.0	88.5	81.5	58.8
20	光	1	98.4±6.7	82.8±6.1	62.9±7.2	67.9±3.7	4.0±2.8
		3	73.7±9.8	77.8±8.8	65.8±8.5	50.7±8.3	3.5±1.9
		6	17.4±4.1	16.0±2.9	25.9±4.5	7.1±2.8	2.9±1.3
20	暗	1	94.4±4.9	81.5±9.1	62.9±7.2	60.9±4.2	28.7±4.9
		3	73.8±3.8	71.5±4.2	70.2±4.4	40.2±4.5	9.0±2.8
		6	25.9±5.6	31.0±3.7	43.4±1.5	14.6±3.1	1.9±1.5
4	光	1	95.8±5.0	93.5±7.8	100.0±5.9	94.8±8.6	84.9±8.1
		3	76.6±1.4	78.7±2.4	89.9±3.4	75.2±3.5	65.8±9.7
		6	55.6±2.2	63.3±4.8	71.5±3.2	61.3±3.5	40.9±5.3
4	暗	1	96.5±6.8	97.6±9.4	100.0±4.7	100.0±5.1	95.0±5.2
		3	79.3±2.6	84.6±2.9	88.6±4.7	88.3±3.0	76.1±7.7
		6	60.7±4.8	67.3±3.8	77.7±1.5	69.7±2.9	46.3±2.2
-30	暗	1	2.4±1.6	2.3±1.6	2.6±1.3	4.7±1.9	7.7±3.1
		3	1.4±0.7	1.2±0.5	0.9±0.5	2.2±1.6	4.4±2.2
		6	2.3±1.0	1.8±0.7	1.8±0.7	1.5±0.7	3.5±1.6
-30*	暗	1	56.7±2.4	54.0±4.9	63.9±5.1	75.2±2.6	46.6±2.3
		3	44.4±2.5	43.7±2.3	49.9±3.3	61.2±4.5	36.7±4.3
		6	34.9±2.1	37.3±4.1	45.7±6.0	55.1±2.5	36.0±3.8

表中数值为存活率(%)的平均值和标准差, 下表同。密封袋由双层农用聚乙烯透明塑料膜制作, 密封袋内部体积为 0.9 cm³; * 表示添加甘油。

表2 密封袋内体积对存活率(%)的影响

温度 /	光 / 暗	胶球含水量 / %	时间 / 月	密封袋内体积 / cm ³		
				0.9	2.7	8.1
20	暗	93.0	1	94.4±4.9	83.4±4.2	91.5±5.5
			3	73.8±3.8	17.8±3.3	20.3±4.8
			6	25.9±5.6	2.1±1.3	3.3±1.3
	暗	88.5	1	62.9±7.2	83.6±4.6	80.7±4.2
			3	70.2±4.4	21.7±4.4	21.3±3.8
			6	43.4±1.0	1.8±1.0	2.2±1.3
4	暗	93.0	1	96.5±6.8	100.0±5.7	100.0±7.0
			3	79.3±2.6	80.4±4.7	83.2±5.1
			6	60.7±4.8	57.1±6.5	53.9±3.1
	暗	88.5	1	100.0±4.7	100.0±4.2	100.0±6.1
			3	88.6±4.7	80.0±2.8	82.6±5.4
			6	77.7±1.5	54.0±1.7	58.4±3.9

密封袋由双层农用聚乙烯透明塑料膜制作。

存活率下降较小。

4 密封袋外膜材质对存活率的影响

表3为密封袋外膜材质对小新月菱形藻存活率的影响。当密封袋的外膜用铝塑膜代替聚乙烯膜时可以明显提高存活率。如20℃保存6个月时,

含水量为88.5%的胶球的藻细胞存活率从43.4%提高到71.0%; 相同条件下4℃保存的藻细胞存活率从77.7%提高到80.4%。

5 保存前后的生长曲线和生长速率

为了进一步考察经过包埋-脱水法保存的小新

表3 密封袋外膜材质对存活率(%)的影响

温度 /	光 / 暗	胶球含水量 /%	时间 / 月	密封袋外膜材质	
				农用聚乙烯膜	铝塑膜
20	暗	93.0	1	94.4±4.9	100.0±6.7
			3	73.8±3.8	74.2±2.8
			6	25.9±5.6	68.0±3.2
	暗	88.5	1	62.9±7.2	98.4±9.2
			3	70.2±4.4	74.4±2.8
			6	43.4±1.0	71.0±2.1
4	暗	93.0	1	96.5±6.8	100.0±5.6
			3	79.3±2.6	85.2±4.2
			6	60.7±4.8	70.0±3.3
	暗	88.5	1	100.0±4.7	100.0±6.5
			3	88.6±4.7	91.6±7.0
			6	77.7±1.5	80.4±3.3

密封袋内层由农用聚乙烯透明塑料膜制作, 密封袋内部体积为 0.9 cm³。

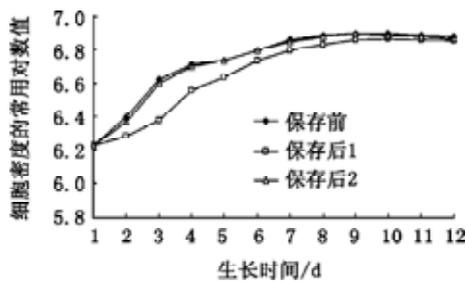


图1 小新月菱藻的生长曲线

保存前: 小新月菱藻在包埋后(未脱水), 经过脱固定化处理, 再经过 5 d 恢复培养后, 用于测定生长曲线; 保存后 1: 小新月菱藻在包埋后, 脱水至 88.5%, 4 暗保存 6 个月, 其他处理过程同上, 用于测定生长曲线; 保存后 2: 包埋、脱水、保存和脱固定化处理同保存后 1, 但经过 5 d 恢复培养后, 取藻细胞接种, 再培养 8 d, 如此重复培养 2 个循环后, 用于测定生长曲线。

新月菱藻的生长力。本文分别用保存前和保存后的藻细胞接种, 测定其生长曲线和生长速率, 结果如图 1 所示。保存前的小新月菱藻在所设置的培养条件下, 在 9 d 后达到最高生长密度, 为 812×10^4 细胞 \cdot mL⁻¹; 9 d 的日平均生长速率为 0.251。相比之下, 保存 6 个月的藻细胞, 经过 5 d 的短期恢复培养后, 其增长速度较慢, 在 10 d 后达到最高生长密度, 为 742×10^4 细胞 \cdot mL⁻¹; 10 d 的日平均生长速率为 0.213。但是同样保存条件下的藻细胞, 在经过 2 个长周期的恢复培养后, 其增长速度大大加快, 在 9 d 后达到最高生长密度, 为 810×10^4 细胞 \cdot mL⁻¹; 9 d 的日平均生长速率为 0.250, 已经与保存前的生长

速率相近。

讨 论

在微藻继代保存中, 为了减少接种频度, 通常都采用比最佳培养条件较低的温度和较弱的光照强度来抑制藻类的生长速率(Day 1999; 潘克厚和朱葆华 2002)。当保存条件从常温(20)降低到零上低温(4)时, 小新月菱藻的存活率有很大的提高。这可能是由于在 4 保存能有效地降低藻细胞的新陈代谢水平, 使存活率显著提高。这一结果与朱明等(2003)保存中肋骨条藻浓缩液的结果相近。然而, 在 -30 无甘油保护剂时存活率极低, 这可能是细胞内结冰伤害所致; 而加入抗冻保护剂甘油后, 存活率大幅度增加。这与孟妍等(2008)保存绿色巴夫藻的结果相似。甘油作为渗透性抗冻保护剂, 有利于保持细胞水分和可溶性盐类, 稳定渗透压(李纯等 2000)。从理论上讲, 在弱光照下藻细胞可以维持一定强度的光合速率, 有利于藻种的保存。但是, 本文中小新月菱藻在 4 弱光条件下保存的存活率仍然低于同温度下黑暗保存的存活率。这可能与保存条件有关, 在本文中, 含藻细胞的胶球是保存在不含液体培养基的密封袋中, 因而不利于藻细胞的光合作用。孟妍等(2008)在相同条件下保存绿色巴夫藻时发现, 黑暗保存的存活率明显高于弱光照保存的存活率。目前, 对弱光照和黑暗两种保存条件的对比研究尚鲜有报道。

采用直接干燥脱水的方法保存微藻,目前只能用于某些蓝藻和少数绿藻,且大多存活率很低(Day 1999)。本文采用褐藻胶包埋藻细胞后,在脱水时,可以为藻细胞提供一种缓冲和保护作用。通过适当降低含水量,进一步抑制了细胞的代谢强度,大大提高了存活率。本文结果表明,密封袋内的空间体积对存活率有一定影响。在暗保存中藻细胞的呼吸作用要消耗 O_2 并释放 CO_2 ,密封袋内 O_2 和 CO_2 的浓度改变都会影响细胞的呼吸强度。密封袋的外膜用铝塑膜代替农用聚乙烯膜时进一步提高了密闭性,减少了密封袋内外的气体交换。因此,通过调节密封袋内的空间体积和改变外膜材质可以有效地提高存活率。

王起华等(1999, 2006)曾先后采用两步法和包埋-脱水法超低温保存小新月菱形藻并取得较好的保存效果。然而,在常温和低温下保存小新月菱形藻的研究尚鲜有报道。本文采用包埋-脱水法探讨了小新月菱形藻在常温和低温下的中期保存。结果表明,小新月菱形藻在常温和低温下都至少可以保存6个月,并保持较高的存活率。对保存后的藻细胞的生长曲线和生长速率的测定结果表明,保存6个月的藻细胞经过脱固定化和一定时间的恢复培养后,其生长力可以达到保存前的水平。这说明包埋-脱水法可以在常温和低温下用于小新月菱形藻的中期保存。目前,尚未见到采用此法于常温和(或)低温下保存小新月菱形藻的研究报道。近年来采用褐藻胶包埋等细胞固定化技术保存某些微藻已证明是一条有效的途径(潘克厚和朱葆华2002)。与超低温保存相比,固定化保种技术操作比较简单,不需要贵重的仪器设备;并且可以在常低温甚至常温下保存,保存成本大大下降;此外,还可以实现大量藻种的保存,因此在微藻中期保存中可能有一定的应用前景(Chen 2003)。新近,孟妍等(2008)首次采用包埋-脱水法在常温和低温下成功地实现了绿色巴夫藻的中期保存。本文结果则进一步表明,

将褐藻胶包埋技术与干燥脱水技术相结合,有可能成为一种微藻常温和低温保种技术中的新方法。

总之,本文将包埋-脱水法用于小新月菱形藻的常温和低温保存,取得了较为理想的保存效果。不仅保存期长达6个月,而且可以保持较高的存活率,保存后的藻细胞经过适当的恢复培养后,其生长力可以达到保存前的水平。对更长时间的保存效果的研究目前正在进行中。

参考文献

- 李纯, 李军, 薛钦昭(2000). 海洋生物种质细胞低温保存与机理. 海洋科学, 24 (4): 12~15
- 马志珍, 张继红(1998). 海产贝用微藻固定化保种技术. 中国水产科学, 5 (2): 57~61
- 孟妍, 张恩栋, 王起华(2008). 包埋-脱水法常温和低温保存绿色巴夫藻. 细胞生物学杂志, 30: 131~135
- 潘克厚, 朱葆华(2002). 微藻的保种技术及其应用. 青岛海洋大学学报, 32 (3): 403~408
- 王起华, 张恩栋, 王冰, 程爱华(1999). 两种海洋饵料硅藻的超低温保存. 辽宁师范大学学报, 22 (4): 310~314
- 王起华, 李莹, 刘艳萍, 李大鹏(2006). 用包埋脱水法冰冻保存小新月菱形藻. 海洋科学, 30 (4): 50~53
- 朱明, 阎彬伦, 滕亚娟, 张学成(2003). 中肋骨条藻的浓缩和长期保存技术的研究. 水产科学, 22 (6): 29~31
- Chen YC (2001). Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*, 195: 71~80
- Chen YC (2003). Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *J Appl Phycol*, 15: 439~444
- Day JG (1999). Conservation strategies for algae. In: Benson EE (ed). *Plant Conservation Biotechnology*. London: Taylor and Francis Ltd, 111~124
- Gaudin P, Lebeau T, Robert JM (2006). Microalgal cell immobilization for the long-term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *J Appl Phycol*, 18: 175~184
- Hertzberg S, Jensen A (1989). Studies of algininate-immobilized marine microalgae. *Bot Marina*, 32: 267~273