

包埋-脱水法常温和低温保存绿色巴夫藻

孟妍 张恩栋 王起华*

(辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029)

摘要 用包埋-脱水法在常温和低温下保存绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*), 探讨了温度、光(暗)和含水量等因素对存活率的影响。结果表明, 通过调节含水量、控制光(暗)条件以及使用甘油保护剂等措施, 绿色巴夫藻在常温和低温下都可以保存6个月并保持较高的存活率。其中4℃(暗)保存的最高存活率高达77.6%, 而且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。包埋-脱水法操作简单, 无需贵重设备, 在藻类种质保存中有广阔的应用前景。

关键词 绿色巴夫藻; 常温保存; 低温保存; 包埋-脱水法

饵料金藻在鱼、虾、贝类育苗生产中有着重要的作用, 近年来有关饵料金藻保存的研究日益受到重视^[1-4]。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^[5]。其中, 前2种方法通常采用常温或常低温进行保存。常温一般指大约15~25℃, 常低温一般指大约0~15℃。继代保存法是目前普遍采用的方法, 虽然简单易行, 但是保存时间短, 需要频繁继代, 容易发生污染和变异^[5-6]; 超低温保存可能是微藻长期保存的最好方法^[1,5], 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, 使其广泛应用受到一定的限制^[5]; 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, 该法可以在常低温下实现对某些藻类的中期(数月甚至数年)保存^[3,7-10]。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绿色巴夫藻等金藻的超低温保存^[2], 但采用该法在常温和(或)低温下保存藻类的研究目前尚未见报道。本文采用包埋脱水法在常温和低温下保存绿色巴夫藻, 探讨了保存温度、光(暗)和胶球含水量等因素对保存效果的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)藻种由辽宁师范大学藻类生理实验室提供。在含100 ml *f/2* 培养基的250 ml 三角烧瓶中培养, 培养条件为20±2℃, 冷荧光, 光强为2 500 lx, 光周期L:D=14:10。

1.2 包埋和脱水

1.2.1 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5×10⁷ 个/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^[2]。

1.2.2 脱水及含水量的测定 取上述胶球每90个为一组, 分别脱水至93.0%(未脱水对照)、90.9%、87.7%、81.1%和58.8%含水量(都以脱水后胶球的鲜重为底), 脱水和含水量的计算方法参见王起华等^[2]。

1.3 甘油处理

从上述各组含水量的胶球中取出部分胶球, 分别浸泡在含10%甘油并与各组含水量胶球等渗的*f/2* 培养基中, 在与培养材料相同条件下振荡培养(100 r/min), 使甘油充分渗透到藻细胞中。

1.4 保存

将胶球每5个一组分别放入1 cm×3 cm 的双层聚乙烯透明塑料袋中密封保存。将未经过甘油处理的各组含水量的胶球分别在20℃(暗), 20℃(1 500 lx 光照, 其他同培养条件); 4℃(暗), 4℃(1 200 lx 自然光照)和-30℃(暗)的条件下保存。经过甘油处理的各组含水量的胶球在-30℃(暗)条件下保存。保存时间分别为1个月、3个月和6个月。

1.5 恢复、再培养和存活率的测定

1.5.1 保存后的恢复和培养 将保存后的胶球放入装有20 ml 的*f/2* 培养基的50 ml 三角瓶中, 在20℃暗处放置24 h, 在与前述培养材料相同的条件下再培养。预实验表明, 在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

收稿日期: 2007-08-27 接受日期: 2007-10-26

国家自然科学基金资助项目(No.30170099, No.30470184)

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

色变为最浅时提取叶绿素。

1.5.2 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5min得到)为空白。根据叶绿素a含量计算存活率^[2]。

1.6 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81.1%的胶球移入含0.1mol/L柠檬酸钠的培养基中,使胶球完全化解,脱固定化条件参考Hertzberg等^[7]。将回收的藻细胞再悬浮于含20ml培养基的50ml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。

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。

2 结果

表1为绿色巴夫藻在所设置的5个含水量和3种保存温度条件下的存活率。其中,20℃和4℃分别设置了暗和弱光两种保存条件;-30℃(暗)设置了不加保护剂和加10%甘油作保护剂的两种保存条件。结果表明,含水量、保存温度、光(暗)和保护剂甘

油都对存活率有影响。

2.1 温度和保护剂甘油对存活率的影响

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℃)的保存效果较差,存活率随着保存时间的延长下降幅度较大,保存6个月的存活率为34.7%。零下低温(4℃)的保存效果最好,随着保存时间的延长,存活率降幅较小,保存6个月的存活率达到58.5%;相比之下,零下低温(-30℃)无甘油保护剂时保存效果最差,保存6个月的存活率仅为0.1%。而在加入10%甘油后,保存效果有了极大改进,不仅存活率大大增加,而且随着保存时间的延长存活率降幅较小;保存6个月的存活率达到37.5%。

2.2 光暗对存活率的影响

弱光照下保存的存活率一般都低于对应条件下黑暗中保存的存活率。以对照(胶球含水量93.0%)为例,在20℃(光)下,保存时间从3个月延长至6个月时,存活率大幅度下降,保存6个月的存活率仅为8.2%,远低于同温度下暗中的存活率。相比之下,4℃(光)下的保存效果较好,保存6个月的存活率达到47.2%,与同温度下暗中的存活率相差较小。

2.3 含水量对存活率的影响

在多数保存条件下,存活率都随着胶球含水量的减少而增大,一般都在87.7%含水量时达到最高值。其中,4℃暗保存6个月的存活率达到77.6%;4℃光保存6个月的存活率为69.0%;-30℃(暗,10%甘油)

表1 绿色巴夫藻的存活率(%)

温度(℃)	含水量(%)		93.0(对照)	90.9	87.7	81.1	58.8
	光/暗	时间(月)					
20	暗	1	92.2±2.1	100±3.4	100±0.8	100±2.1	44.9±5.7
		3	70.8±0.6	77.7±2.6	84.9±1.3	68.8±4.1	9.9±1.2
		6	34.7±3.5	44.5±2.9	18.6±6.2	3.5±0.2	1.8±0.4
20	光	1	93.5±1.8	100±3.7	100±4.2	100±1.6	9.1±0.5
		3	71.7±1.7	56.1±7.0	77.8±1.7	54.2±3.3	5.0±0.8
		6	8.2±2.6	3.8±0.6	8.8±0.3	2.2±0.2	2.3±0.9
4	暗	1	97.1±0.4	100±4.5	100±0.9	100±2.4	91.4±6.5
		3	82.1±1.9	92.0±1.1	93.1±2.0	75.7±5.3	22.9±2.3
		6	58.5±2.4	63.9±0.9	77.6±5.1	57.9±2.9	7.7±1.7
4	光	1	100±2.3	100±4.8	100±3.4	100±3.1	67.7±7.1
		3	68.4±3.9	82.8±2.0	86.3±1.6	77.5±4.8	16.8±0.8
		6	47.2±2.3	59.0±3.8	69.0±2.2	43.6±2.5	1.4±0.4
-30	暗	1	0.1±0.1	0.6±0.2	0.9±0.3	2.0±0.9	19.8±6.9
		3	0.5±0.6	1.5±0.6	1.8±1.4	2.8±1.1	17.3±6.2
		6	0.1±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1	2.2±0.6	16.3±3.4
-30	暗 (10%甘油)	1	53.1±6.5	64.7±6.1	72.5±5.1	70.2±4.4	63.7±4.4
		3	39.9±5.0	58.7±3.1	70.0±4.3	64.8±3.1	59.6±8.0
		6	37.5±6.5	56.5±7.4	67.6±6.9	64.1±5.2	58.1±0

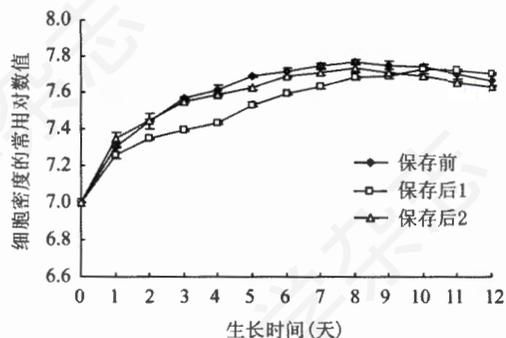


图1 绿色巴夫藻的生长曲线

保存前:绿色巴夫藻在包埋后(未脱水),经过脱固定化处理,再经过5天恢复培养后,用于测定生长曲线;保存后1:绿色巴夫藻在包埋后,脱水至81.1%,4℃暗保存6个月,其他处理过程同上;保存后2:包埋、脱水、保存和脱固定化处理同保存后1。经过5天恢复培养后,取藻细胞接种,再培养8天,如此重复培养2个循环后,用于测定生长曲线。

保存6个月的存活率为67.6%。20℃暗保存6个月的存活率在胶球含水量减少到90.9%时达到最高值,为44.5%。当胶球含水量继续减少时,上述各保存条件下的存活率都开始下降。与其他保存条件相比,-30℃(暗)保存的存活率随着胶球含水量的减少而不断增大,当含水量降至58.8%时,存活率达到最高值,保存6个月的存活率为16.3%。

2.4 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-脱水法保存的绿色巴夫藻的生长力。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。保存前的绿色巴夫藻在所设置的培养条件下,在8天后达到最高生长密度,为 5.870×10^4 个/ml;8天的日平均生长速率为0.221。相比之下,保存6个月的藻细胞,仅经过5天的短期恢复培养后,其增长速度较慢,在10天后达到最高生长密度,为 5.360×10^4 个/ml;10天的日平均生长速率为0.168。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8天后达到最高生长密度,为 5.400×10^4 个/ml;8天的日平均生长速率为0.211,已经与保存前的生长速率相近。

3 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度来抑制藻类的生长速率^[5,6]。本实验结果表明,当保存温度从常温(20℃)降低到零上低温(4℃)时,存活率

有很大的提高。这表明4℃的低温对绿色巴夫藻不仅没有伤害作用,而且由于降低了藻细胞的代谢活动,减少了呼吸消耗,因而提高了保存效果。这一结果与朱明等^[11]的结果相近。他们曾用0~20℃的不同温度保存中肋骨条藻浓缩液,发现温度越低保存效果越好。在零下低温(-30℃,暗)无甘油保护时,绿色巴夫藻的存活率极低;而加入抗冻保护剂甘油后,存活率大幅增加。这说明在没有保护剂存在时,-30℃会产生严重的冻害,而甘油是一种有效的抗冻保护剂。甘油能够增加溶液的粘性,在冷冻过程中可有效起到防止细胞脱水和阻止冰晶形成的作用;同时甘油有良好的吸水性并能自由通过细胞膜,有利于保持细胞水分和可溶性盐类,稳定渗透压^[12]。朱葆华等^[4]在研究不同温度对2种饵料金藻的保存效果时,也发现在有抗冻保护剂时,-22℃的低温可以取得较好的保存效果。温度降低可以使微藻的新陈代谢速率下降,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^[13]。本实验中绿色巴夫藻在4℃弱光下也获得了较好的保存效果,但是与同温度下黑暗保存的结果相比,存活率仍然较低,这可能与保存条件有关。本实验中,胶球被封固在不加培养基的透明塑料袋内,藻细胞营养供应受到限制,也不能和外界进行气体交换,因此不能维持有效的光合作用。这一实验结果与Chen^[3]的研究结果相似,Chen在4℃(暗,无培养基)条件下密闭保存球等鞭金藻,曾取得了较好的保存效果,存活时间可达到1年。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^[9]。采用褐藻胶包埋藻细胞后,由于褐藻胶的亲水性,在脱水时,可以为藻细胞提供一种缓冲和保护作用。本实验中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。

王起华等曾先后采用两步冷冻法和包埋-脱水法超低温保存绿色巴夫藻等3种饵料金藻。其中,采用两步法保存绿色巴夫藻的存活率可以达到30%^[11];而采用包埋-脱水法保存的存活率则高达74%^[12]。这表明超低温技术可以用于绿色巴夫藻的长期保存,而采用包埋-脱水法可能是最佳选择。然而,在常温和低温下保存绿色巴夫藻的研究尚鲜有报道。新近,朱葆华等^[4]探讨了温度对2种饵料金藻的浓缩液的保存效果。结果表明,绿色巴夫藻在25℃的室温下,存活率为0;在4℃保存1个月的存活率约11%,保

存2个月的存活率接近于0;在-22℃(20%二甲基亚砷+10%甘油)保存1个月的存活率约22%,2个月的存活率约10%。这表明在常温和低温下保存绿色巴夫藻的浓缩液,不仅存活率低,而且保存时间短,难于实现藻种的中期保存。与此相比,本实验采用包埋-脱水法在常温和低温下保存高密度的绿色巴夫藻,取得了很好的保存效果。不仅保存时间可以长达6个月,而且保持了较高的存活率。其中,4℃(暗)保存的存活率高达77.6%;-30℃(暗,10%甘油)保存的存活率为67.6%;20℃室温(暗)保存的存活率也达到44.5%。对4℃(暗)保存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绿色巴夫藻的中短期保存。目前,尚未见到采用该法在常温和(或)低温下保存微藻的研究报道。

采用褐藻胶包埋等细胞固定化技术保存某些微藻近年来被证明是一条有效的途径^[6]。Tamponnet等^[4]保存固定化的纤细裸藻,3个月后仍能保持90%的叶绿素含量。Hertzberg等^[7]采用褐藻胶包埋7种海洋硅藻,在4℃弱光或黑暗中的保存时间长达3~12个月。马志珍等^[8]用褐藻胶包埋12种海产饵料微藻,在室温自然光照下,11种藻的存活时间都在1年以上;在4℃,有5种藻的存活时间可以达到2年左右。Chen^[9]在4℃(暗,无培养基)条件下保存用褐藻胶包埋的四尾栅藻和球等鞭金藻,前者的存活时间长达3年,后者的存活时间也达到1年。Gaudin等^[10]用褐藻胶包埋海洋硅藻*Haslea ostrearia*,在4℃弱光下保

存时间可以长达4个月。这些研究表明,藻类细胞固定化技术可以被用于微藻的中期(数月甚至数年)保存。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。因此该技术在微藻中期保存中有广阔的应用前景^[3]。本实验结果则进一步表明,将褐藻胶包埋技术与干燥脱水技术相结合,有可能成为微藻常温和低温保种技术中的一种新方法。

本实验将包埋-脱水法用于饵料金藻-绿色巴夫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,而且保持了较高的存活率,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 (References)

- [1] 王起华等. *中国水产科学*, 1999, 6: 89
- [2] 王起华等. *海洋与湖沼*, 2005, 36: 172
- [3] Chen YC. *J Appl Phycol*, 2003, 15: 439
- [4] 朱葆华等. *海洋科学*, 2006, 30: 70
- [5] Day JG. In: Benson EE ed. *Plant Conservation Biotechnology*, London: Taylor and Francis Ltd, 1999, 111
- [6] 潘克厚等. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32: 403
- [7] Hertzberg S et al. *Bot Mar*, 1989, 32: 267
- [8] 马志珍等. *中国水产科学*, 1998, 5: 57
- [9] Chen YC. *Aquaculture*, 2001, 195: 71
- [10] Gaudin P et al. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 175
- [11] 朱明等. *水产科学*, 2003, 22: 29
- [12] 李纯等. *海洋科学*, 2000, 24: 12
- [13] 阎斌伦等. *海洋科学*, 2005, 29: 43
- [14] Tamponnet C et al. *Physiol Plant*, 1985, 63: 277

Storage of *Pavlova viridis* by Encapsulation-dehydration under Normal Temperature and Low Temperature

Yan Meng, En-Dong Zhang, Qi-Hua Wang*

(The School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract *Pavlova viridis* was preserved by encapsulation-dehydration under normal temperature and low temperature. The main factors influencing the algal viability, such as different temperature, illumination intensities and the water content of beads, were studied. The results showed that alginate beads were stored for 6 months under normal temperature and low temperature and the high viability were obtained through adjusting the water content, controlling illumination intensities and using glycerin. The algae viability reached about 77.6% at 4 °C (dark). After preservation, the growth rates of algae could reach the normal level in the conditions suitable for recovery. Encapsulation-dehydration is simple without the requirement for specialist equipment, so it has a bright application prospect in the algae preservation.

Key words *Pavlova viridis*; normal temperature preservation; low temperature preservation; encapsulation-dehydration

Received: August 27, 2007 Accepted: October 26, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170099, No.30470184)

*Corresponding author. Tel: 86-411-82158039, E-mail: qihua_mail@163.com

中国细胞生物学学会 2008 年活动计划

序号	活动名称	时间	规模(人)	地点	联系人	电话
学术活动						
1	第一届植物细胞生物学学术研讨会	7月中旬	30~40	兰州	孙颖 刘春明	0311-86267213
2	第二届细胞结构与功能的信号基础研究研讨会	8月	60	安徽黄山	史庆华	13515669435
3	感染与肿瘤免疫学术研讨会	10月	50~100	待定	舒红兵	027-68753795
4	第三届全国生物信息学与系统生物学学术大会	10月6日~9日	350	湖北	孙之荣	010-62772237
5	第二届中国细胞生物学医学细胞生物学学术会议	11月	300	浙江台州	李继承	0571-88208088
6	细胞生物学教学改革研讨会	11月	50~100	浙江台州	辛华	0531-88382046
7	神经细胞生物学前沿研讨会	11月	20~30	海南三亚	罗振革	021-54921831
组织活动						
1	医学细胞生物学会第一次理事会	11月	30	浙江台州	李继承	0571-88208088
2	第九届理事会第二次理事会	11月	90	海南	杨瑾	021-54922856
继续教育和培训						
1	第二届中国医学细胞生物学培训班	6~7月	80	上海	胡以平	021-25070291
期刊活动						
1	第2届科研与科技期刊发展论坛	夏天	400	上海生命科学 信息中心	李党生	021-54922951