

刘红全,袁莎,林小园,等. 2种绿藻的玻璃化冻存研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):183-186.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.051

2种绿藻的玻璃化冻存研究

刘红全^{1,2},袁莎^{1,2},林小园^{1,2},李洁琼^{1,2},龙寒^{1,2},禰金彩^{1,2},何秀苗^{1,2}

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院/微生物与植物资源利用广西高校重点实验室,广西南宁 530007;

2. 广西民族大学海洋与生物技术学院/广西多糖材料与改性重点实验室,广西南宁 530007)

摘要:收集对数生长后期细胞,采用不同配方及浓度的玻璃化冻存液以及不同的冻存步骤对胶网藻 HE01 和小球藻 HE07 进行冷冻保存试验,通过复苏后的细胞存活率判断适合的冻存液和冻存步骤。结果发现,不同的微藻所需的冻存液不同。对 HE01 和 HE07 海洋微藻分别使用 5% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖溶液和 15% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖溶液做为冻存剂,4 ℃ 条件下 30 min 后,转入 -20 ℃ 预冻存 2 h,再 -80 ℃ 过夜后投入液氮中保存,胶网藻 HE01 和小球藻 HE07 的冻存率分别为 70.2%、70.59%。复苏后微藻生长状况良好。

关键词:胶网藻;小球藻;玻璃化冻存;抗冻保护剂

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0183-03

微藻结构简单、繁殖迅速、易于培养、能够产生多种生物活性物质,具有很好的开发前景。藻类的长时间培养容易引起藻种污染,生命力减退以及藻种的基因漂变^[1-2],给藻种的保存、研究以及大规模培养带来众多不便。目前,在微藻保存中的方法有固定化保存,继代保存和超低温冻存法^[3]。这些方法在实际应用中有其弊端,如继代培养在多次接种过程中藻种容易污染和逐渐老化,生命力减退。固定化保种程序复杂,大多数微藻在培养后期常会从胶珠中溢出^[4-5]。自 1985 年 Rall 等首次将小鼠胚胎细胞运用玻璃化冻存的方式成功冻存^[6]以来,玻璃化冻存的应用越来越广。玻璃化冻存技术不仅可以克服在藻种多次接种下导致的污染、基因漂变问题,还可以在超低温条件下杀死有害细菌,实现藻种长期保存的目的^[7]。微藻玻璃化冻存的成功报道也越来越多^[8-10]。小球藻 (*Chlorella*) 具有很高的营养价值,胶网藻 (*Dictyosphaerium*) 产油脂量较高,对它们进行成功低温保存将为进一步开发利用这 2 种绿藻奠定基础。本试验对胶网藻和小球藻的玻璃化冻存进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 藻种来源及其培养

胶网藻 HE01 与小球藻 HE07 分离于广西沿海红树林的水样中。2 种绿藻培养于 F/2 培养基中,在 (24 ± 1) ℃、光照度 (4 × 40 W 日光照射)、光-暗周期为 12 h—12 h 的条件下培养。取对数生长后期的藻液用于试验。

1.2 抗冻保护剂的选择

在蔡小宁等的试验方法^[11]上做出改进,选取 10% DMSO +

10% 乙二醇 + 30% 蔗糖 + F/2 培养基为玻璃化冻存液配方。分别在此基础上改变 DMSO、乙二醇与蔗糖浓度。DMSO 浓度梯度为 5%、10%、15%、20%、25%;乙二醇浓度梯度为 5%、10%、15%、20%、25%;蔗糖浓度梯度为 10%、15%、20%、25%、30%。在单因素优化结果的基础上进行 3 因素 3 水平的正交试验,正交试验选用浓度为单因素优化最佳值与左右相邻值。

表 1 玻璃化冻存的试验因子及水平

处理	因子		
	DMSO 浓度	乙二醇浓度	蔗糖浓度
1	5%	5%	20%
2	10%	10%	25%
3	15%	15%	30%

1.3 玻璃化冻存

1.3.1 预处理 将对数生长期的 2 种藻细胞置于 4 ℃ 的环境下暗培养 48 h。提高藻种的耐寒性。

1.3.2 预平衡 取预培养后的藻细胞 4 mL,经离心浓缩后分别加入稀释 2 倍的玻璃化冻存液和培养基预平衡 5 min,离心去除平衡液,迅速加入玻璃化冻存液或培养基分装到 2 mL 的冻存管中,每管 500 μL。

1.3.3 冻存步骤对微藻冻存率的影响 分别将 2 种藻迅速放入到液氮罐中或者在 4 ℃ 冻存 30 min 后,移到 -20 ℃ 冻存 2 h 再移到 -80 ℃ 条件下过夜后投入到液氮罐中。

1.3.4 解冻和冻存液的去除 将在液氮中保存 24 h 后的藻种取出,立即放入 40 ℃ 恒温水浴锅快速解冻。化冻后的微藻在无菌条件下室温平衡 20 min 后加入 3 倍体积培养基离心去除溶液,用培养基重复洗涤 2~3 次。

1.3.5 冻存后的恢复培养 将去除冻存液的藻细胞接种到新鲜培养基中,暗培养 1 d 后转入到光照培养。

1.4 藻细胞存活率的测定

参照 Canavate 等的方法^[12],取恢复培养后的藻细胞接入 F/2 培养基,培养 4 d 后,采用 752 型紫外分光光度计测定藻液的 $D_{680\text{nm}}$ 值。并以未冻存的藻细胞作对照。

收稿日期:2016-05-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:30960215);广西自然科学基金(编号:桂科青 0728019);广西民族大学相思湖青年学者创新团队资助项目。

作者简介:刘红全(1975—),男,黑龙江人,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:lhongquan@163.com。

存活率 = 解冻后藻液的 $D_{680\text{ nm}}$ 值 / 未冻存藻液的 $D_{680\text{ nm}}$ 值 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 蔗糖浓度对冻存率的影响

未加入冻存液的 2 种藻的存活率均为 0, 可以看出 2 种海藻对超低温均没有耐受性。随着蔗糖的浓度增加, 2 种海洋绿藻的存活率显著增加。当蔗糖浓度达到 25% 的时候存活率最高, HE01 为 63.75%, HE07 为 60.36% (图 1)。

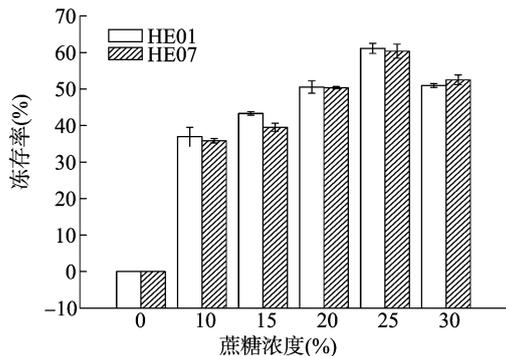


图1 蔗糖浓度对 2 种绿藻冻存率的影响

2.2 DMSO 浓度对冻存率的影响

当 DMSO 浓度为 10% 的时候 2 种绿藻冻存率最高, HE01 和 HE07 冻存率分别为 61.6%、55.26% (图 2)。这一结果与蔡小宁等的研究^[11]相符。一般认为, DMSO 的高极性使其易于透过细胞膜, 并在细胞内外形成高渗透压, 因此 DMSO 穿透能力较强并且具有更好的保护效果, 防止细胞内形成冰晶导致细胞膜被破坏^[13]。

2.3 乙二醇浓度对冻存率的影响

乙二醇可迅速渗入细胞内, 降低细胞膜对水的通透性。试验结果表明, 乙二醇在浓度为 10% 的时候海洋微藻冻存率最高, HE01 和 HE07 冻存率分别为 61.27%、61.44% (图 3)。

2.4 正交试验结果

玻璃化冻存液试验因子对 2 种海洋微藻的存活率有明

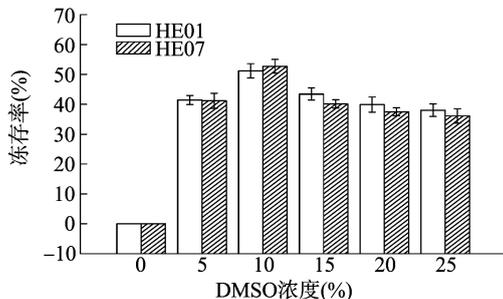


图2 DMSO 浓度对 2 种绿藻存活率的影响

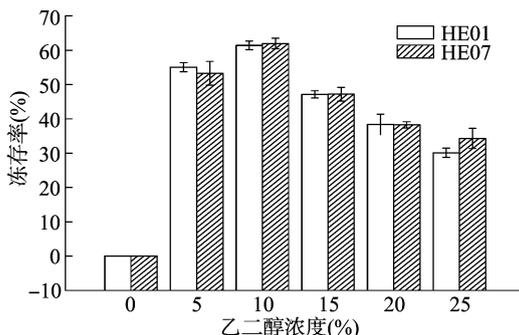


图3 乙二醇浓度对 2 种绿藻存活率的影响

显影响 (表 2、表 3、表 4)。影响存活率的因素主次顺序是: DMSO 浓度 > 蔗糖浓度 > 乙二醇浓度。根据 k 值可以得到适合 HE01 的最佳玻璃化冻存条件为 5% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖 + F/2 培养基。通过冻存试验 HE01 的存活率为 70.2%, 高于正交试验中的存活率。适合 HE07 最佳玻璃化冻存的条件为 15% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖 + F/2 培养基, 由正交试验可以看出存活率为 70.59%。因此, 综合考虑 HE01 的玻璃化液最优组合水平为 5% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖, HE07 的玻璃化液最优组合条件为 15% DMSO + 15% 乙二醇 + 25% 蔗糖。

2.5 冻存步骤对冷冻保存存活率的影响

相较于未分步冻存的 HE01 存活率为 55.6%, 分步冻存

表 2 DMSO、乙二醇及蔗糖正交组合的试验结果分析

试验号	DMSO 浓度 (%)	乙二醇浓度 (%)	蔗糖浓度 (%)	空列	HE01 存活率	HE07 存活率
1	5	5	20	1	0.523 659 0	0.546 562 6
2	5	10	25	2	0.640 968 8	0.655 486 6
3	5	15	20	3	0.580 329 8	0.585 247 9
4	10	5	25	3	0.505 692 4	0.374 970 2
5	10	10	30	1	0.440 770 4	0.355 123 1
6	10	15	20	2	0.467 303 0	0.345 177 7
7	15	5	30	2	0.471 585 9	0.571 987 2
8	15	10	20	3	0.523 816 4	0.627 843 6
9	15	15	25	1	0.645 094 4	0.705 947 2
k_1 (HE01)	0.582	0.500	0.505	0.537		
k_2 (HE01)	0.471	0.535	0.597	0.522		
k_3 (HE01)	0.547	0.564	0.498	0.537		
极差 (HE01)	0.111	0.065	0.099	0.010		
k_1 (HE07)	0.596	0.498	0.507	0.536		
k_2 (HE07)	0.358	0.546	0.579	0.524		
k_3 (HE07)	0.635	0.545	0.504	0.529		
极差 (HE07)	0.277	0.048	0.075	0.012		

表3 HE01 玻璃化冻存方差分析

方差来源	离差平方和	自由度 <i>df</i>	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
DMSO	0.019	2	0.010	96.092	0.010
乙二醇	0.006	2	0.003	30.355	0.032
蔗糖	0.019	2	0.009	93.408	0.011
误差	0.000	2	0.000		

注: $R^2 = 0.995$ (调整 $R^2 = 0.982$)。

表4 HE07 玻璃化冻存方差分析

方差来源	离差平方和	自由度 <i>df</i>	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
DMSO	0.135	2	0.067	656.517	0.013
乙二醇	0.005	2	0.002	22.458	0.043
蔗糖	0.011	2	0.005	52.738	0.019
误差	0.000	2	0.000		

注: $R^2 = 0.998$ (调整 $R^2 = 0.993$)。

的 HE01 存活率提高为 67.2% (图 4); 经过分步冻存的 HE07 存活率为 68.9%, 高于未分步冻存 41.4% 的存活率 (图 5)。反映出充分的预冻处理是保证玻璃化冻存的成功条件之一。

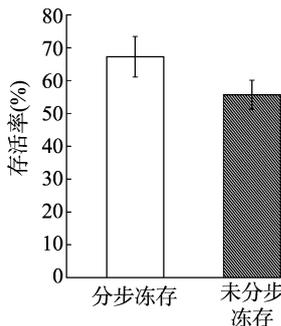


图4 冻存步骤对 HE01 存活率的影响

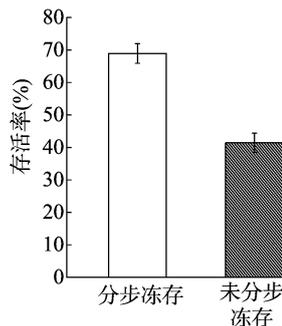


图5 冻存步骤对 HE07 存活率的影响

2.6 冻存后 2 种绿藻的生长情况

冻存后恢复培养的 2 种绿藻细胞其生长曲线测定结果 (图 6、图 7) 表明, 冷冻组与对照组的生长规律一致, 在生长前期, 冻存的细胞生长较慢, 但在对数后期, 冻存组的活性恢复, 生长速度和对照组差别不大。

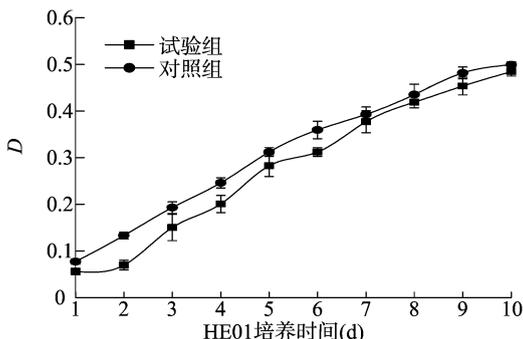


图6 HE01 的生长曲线的测定

3 讨论

影响微藻低温冷冻存活率的因素有很多, 包括冷冻剂、藻种、冷冻步骤等等^[14]。针对不同的藻种, 也要对其玻璃化冻存液进行特定的优化。将不同的冻存保护剂联合使用进行玻璃化冻存, 可以使防冻剂的液体黏滞度升高, 液体分子的弥散运动被抑制, 从而加强冷冻效果和减轻毒性。DMSO、蔗糖、

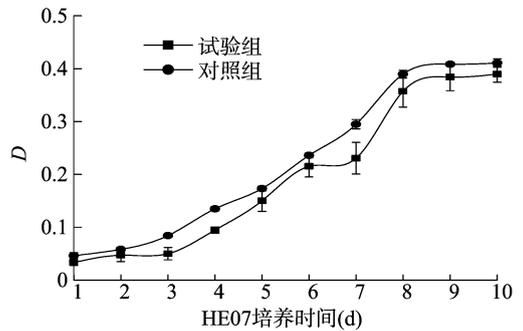


图7 HE07 生长曲线的测定

乙二醇是最常用的抗冻保护剂。蔗糖可以限制水分过快进入细胞, 为细胞提供一个高渗环境, 增加抗动力的同时又充分脱水, 避免冻存时冰晶形成造成伤害, 也避免解冻时发生渗透性休克, 起到特异性保护作用^[15]。结果表明在所示的浓度范围内, 蔗糖浓度越低导致微藻存活率越低。乙二醇与 DMSO 都是常见的渗透性冷冻保护剂。乙二醇可迅速渗入细胞内, 降低细胞膜对水的通透性。DMSO 的高度水溶性使其易于透过细胞膜并形成高渗透压, 补偿了细胞内外存在的盐梯度, 因此可防止细胞内的冰晶形成和细胞膜的破坏。但 DMSO 具有一定的毒性, 能导致部分细胞死亡。闫立强等发现, DMSO 对微藻的毒性大小既与微藻种类有关, 也与 DMSO 浓度有关^[16]。如图 2 所示, 随着 DMSO 浓度由 10% 逐渐增加, 2 种微藻的冻存率也越来越低。这是因为高浓度的 DMSO 对微藻有较大毒性, 导致了微藻细胞的死亡。10% 浓度的 DMSO 是介于微藻细胞毒性与细胞保护之间的一个临界点。不同的微藻由于细胞壁的不同对冻存剂的耐受力不同, 导致每种微藻的抗冻保护剂不同。在冷冻过程中, 常将几种保护剂混合起来使用, 既保证了抗冻性也降低了单一保护剂高浓度的毒性。

在做预处理时冷冻保护剂与细胞接触的温度和时间需要进行严格控制, 试验结果表明进行预冻存处理效果好于将藻种直接投入到液氮当中。因为低温环境可以降低 DMSO 的毒性^[17], 同时细胞与冷冻保护剂预先接触可提高细胞对渗透压突变的耐受性。通过控制海洋微藻冻存的内外条件, 本试验冻存的 2 种海洋绿藻, 存活率都达到了 66% 以上。

玻璃化冻存法研究虽然取得了一定的进展, 但是适合于一种藻种的方法对另一种藻可能并不适用。针对这一领域, 还有许多问题需要做进一步的探讨与研究。如微藻化冻后的材料处理, 活化复苏培养所需的条件^[18], 抗冻性与细胞年龄等, 有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Gwo J C, Chiu J Y, Chou C C, et al. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) [J]. *Cryobiology*, 2005, 50(3): 338-343.
- [2] Rhodes L, Smith J, Tervit R, et al. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae [J]. *Cryobiology*, 2006, 52(1): 152-156.

施沁璇,王 俊,盛鹏程,等.淡水养殖池塘中水体碳氮比对养殖环境的影响[J].江苏农业科学,2017,45(21):186-189.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.052

淡水养殖池塘中水体碳氮比对养殖环境的影响

施沁璇^{1,2,3},王 俊^{1,2,3},盛鹏程^{1,2,3},罗毅志^{1,2,3},吴琦芳³,黄小红³,叶雪平^{1,2,3}

(1.农业部淡水渔业健康养殖重点实验室,浙江湖州 313001; 2.浙江省鱼类健康与营养重点实验室,浙江湖州 313001;
3.浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:2015年对浙北地区温室中华鳖、外塘中华鳖、加州鲈、乌鳢、翘嘴红鲌5个淡水养殖品种在1个养殖周期内的养殖水及周边外河水中碳、氮含量进行调查测定,分析不同养殖品种及周边外河水体中的碳氮比(简称C/N)水平。结果显示,各养殖品种养殖水体中总有机碳(简称TOC)含量随养殖时间的延长而增加,总氮(简称TN)含量随养殖时间的延长先增加后减少,在8月达到最大值;而水体中C/N则随养殖时间先减小后增加,且在8月达到最小值;比较养殖水体和周边外河水中的C/N,结果显示,温室中华鳖养殖池水中C/N最低为0.65;翘嘴红鲌养殖池水中最高为5.59,各养殖品种间差异显著($P < 0.05$),但作为养殖水源的周边各外河水间无显著性差异。此外,相关性分析显示,高C/N的养殖水体水质显著优于($P < 0.05$)低C/N的养殖水体水质,说明养殖后期适当添加额外碳源,提高养殖水体C/N,可能是改善养殖环境的有效途径。

关键词:淡水养殖;养殖品种;碳氮比;养殖环境;总有机碳(TOC)含量;总氮(TN)含量

中图分类号: X714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0186-04

生物絮团技术(biofloc technology,简称BFT)是指通过向养殖水体中大量投饵补充有机碳物质,保持一定的碳氮比,从而定向调控养殖系统微生物群落并且利用微生物转换水中的氨态氮成为菌体蛋白,显著提高饲料利用的一种新型养殖技术^[1]。该技术通过调控养殖水体的碳氮比(简称C/N),可以

改善养殖水质、节约养殖成本,近年来广泛应用于罗非鱼、草鱼、鳊鱼等淡水鱼类的生产养殖过程中^[1-4]。已有的研究表明,乌鳢、加州鲈等淡水经济鱼类养殖池塘中的主要污染物为有机污染物和氮,养殖水体中化学需氧量、氨氮、亚硝酸盐氮等含量过高不仅影响水质,还容易导致病害的发生,但却未见针对养殖水体中C/N的相关研究报告^[5-6]。本研究通过分析浙北地区主要淡水养殖区外河及不同淡水养殖品种池塘水体中的C/N水平,探讨不同养殖品种间的差异及其在养殖周期内的变化规律,阐述水产养殖对周边环境质量的潜在影响,指出提高养殖池塘中C/N的措施。

收稿日期:2016-06-16

基金项目:浙江省公益技术研究农业项目(编号:2016C32075)。

作者简介:施沁璇(1989—),女,浙江嘉兴人,助理工程师,主要从事渔业水域生态环境保护研究。E-mail:shizhuhuan@163.com。

通信作者:叶雪平,推广研究员,主要从事渔业水域生态环境保护研究。E-mail:yxp900@sina.com。

[3]潘克厚,朱葆华.微藻的保种技术及其应用[J].青岛海洋大学学报(自然科学版),2002,32(3):403-408.

[4]马志珍,张继红.海产饵料用微藻固定化保种技术[J].中国水产科学,1998(2):57-61.

[5]马志珍.微藻固定化培养技术及其应用前景[J].国外水产,1993(3):1-4.

[6]Rall W F, Fahy G M. Lce-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313(6003):573-575.

[7]Müller J, Day J G, Harding K, et al. Assessing genetic stability of a range of terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment length polymorphism (AFLP) [J]. American Journal of Botany, 2007, 94(5):799-808.

[8]Day J G. Cryo-conservation of microalgae and cyanobacteria [J]. Cryo Letters, 1998, 1:7-14.

[9]Morris G J. Cryopreservation of 250 strains of chlorococcales by the methods of two-step cooling [J]. British Phycological Journal, 1978, 13(1):15-24.

[10]Day J G. Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria [J]. Methods in Molecular Biology, 2007, 368(368):141-151.

[11]蔡小宁,陈舒泛,陈俊,等.小球藻的玻璃化超低温保存法[J].植物生理学通讯,2004,40(5):599-601.

[12]Canavate J P, Lubinn L M. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species [J]. Aquaculture, 1995, 136(3/4):277-290.

[13]Gorlin J. Stem cell cryopreservation [J]. The Journal of Infusional Chemotherapy, 1996, 6(1):23-27.

[14]王起华,石若夫,程爱华.3种饵料金藻的超低温保存研究[J].中国水产科学,1999,6(2):89-92.

[15]林小园,刘红全,袁卫生.海洋微藻的玻璃化冻存技术研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(1):190-194.

[16]闫立强,赵树仁,程爱华,等.两种蓝藻超低温保存抗冻保护剂的研究[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),1993(2):153-155.

[17]Wusteman M C, Pegg D E. Differences in the requirements for cryopreservation of porcine aortic smooth muscle and endothelial cells [J]. Tissue Engineering, 2001, 7(5):507-518.

[18]王起华,张恩栋,周春影.藻类种质超低温保存研究概况[J].植物学通报,2002,19(1):21-29.