

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00344

渗透与非渗透性抗冻剂联用技术对铜绿微囊藻的超低温保藏研究

吴兴华^{1,2} 郑凌凌¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 湖北省环境科学研究院, 武汉 430070)

摘要: 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* Kütz)是一种在全世界分布很广的淡水水华蓝藻。在实验室长期的研究工作中, 为了使铜绿微囊藻能维持稳定的生理学特征, 通常使用超低温保藏技术长期冻存藻细胞。研究发现, 同时使用渗透性和非渗透性的抗冻剂比只使用传统的渗透性保护剂能显著提高 *Microcystis aeruginosa* 超低温保藏的存活率。以三株铜绿微囊藻为材料进行二步法超低温保藏, 对 4 种抗冻剂(甲醇、二甲亚砜、丙三醇、聚乙烯吡咯烷酮), 两种降温速率($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 第一步温度设置(-30°C 、 -40°C 、 -80°C)进行筛选; 用流式细胞仪和细胞计数检测存活率, 并监测冻后相关生理参数、PSII、细胞色素、生长曲线等以确保该方法可保持藻株的活性和生理状态。结果表明, 5%的二甲亚砜和 30%的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)同时使用时能达到最好效果, 并能保持生理活性与冻前一致。

关键词: 超低温保藏; 铜绿微囊藻; 抗冻剂

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)02-0344-08

在我国的太湖和滇池, 微囊藻是最主要水华蓝藻种类^[1]。长期在实验室和保藏库中, 传代培养的蓝藻经常会发生形态学和生理学上的变化, 甚至遗传漂移^[2]。目前基于微囊藻实验室的研究一般都建立在单细胞形态的基础之上, 但研究已表明单细胞和群体微囊藻在生理参数及对胁迫的响应上具有明显的差异^[3, 4]。为了深入研究微囊藻水华形成机制, 对微囊藻群体的研究尤显重要。因此, 急需建立一种有效的保藏方法来确保微囊藻不会丧失其野生型特性。

超低温保藏技术(Cryopreservation)是一种在极低温度下有效长期保藏有价值种质资源的技术^[5]。随着实验室需要保藏的培养物逐渐增多, 超低温保藏技术变得越来越重要了。国内近期频繁有报道表明, 许多不同科研材料被成功超低温保藏^[6, 7]。FACHB-Collection(中国科学院水生生物研究所淡水藻种库)是中国最重要的一家淡水藻类和蓝藻的保藏单位, 该库为水华藻类和其他淡水藻类的实验

室研究提供实验材料。已有很多国际性的保藏库对种质资源进行了成功的超低温保藏, 如 CCAP(The Culture Centre of Algae and Protozoa), UTEX(The Culture Collection of Algae at The University of Texas), NIES(Japan National Institute for Environmental Studies)和 ATCC(The American Type Culture Collection)。Watanabe, *et al.*^[8]1995 年在 NIES 保藏库对 5 株铜绿微囊藻建立了有效的超低温保藏技术, 但这个结果得到的存活率并不太高; 2002 年, Mori, *et al.*^[9]在 Watanabe 和 Sawaguchi 的基础上改进了方法, 将初始降温梯度改为 -30°C , 并对 NIES 的 27 株微囊藻进行超低温保藏, 发现保藏的微囊藻存活率大幅度提高, 但遗憾的是, 该方法并未对其冻前后生理生化参数进行评价。基于此, 本研究对超低温保藏技术的各个环节进行筛选, 并建立了一种有效实验室微囊藻长期保藏技术, 使得保藏后的铜绿微囊藻呈现较高的存活率, 且冻存前后微囊藻的生理学

收稿日期: 2011-02-17; 修订日期: 2011-12-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2008CB418001); 中科院项目(KSCX2-EW-Z-3, KG CX2-YW-374-1)资助

作者简介: 吴兴华(1979—), 女, 湖北宜昌人; 博士研究生; 主要从事藻类生理学研究。E-mail: wenluo8015@126.com

通讯作者: 宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

参数未发生明显变化。

1 材料与方法

1.1 藻株及培养条件

实验所需的 3 株铜绿微囊藻均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-Collection)。其中 *M. aeruginosa* PCC7806 来源于藻种库与法国 PCC 保藏库交换所得, *M. aeruginosa* FACHB-905 和 FACHB-942 分离自云南滇池。

将藻液接入改良的 BG-11 培养基中通入无菌的空气培养, 光照强度为 $15\text{--}20\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗周期为 12h:12h, 温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 。反复富集培养后, 3000 r/min 离心 10min 收集稳定期细胞(Eppendorf, 5804R, Germany), 再转入 100 mL 的三角瓶中, 使其最终细胞密度为 $10^7/\text{mL}$, 用 0.1 mm 的血球计数板在光学显微镜下观察记数, 确定细胞密度(Olympus, CX41, Japan)。

1.2 抗冻剂设计

使用甲醇(色谱级, Merck, Germany), 甘油(AR, Sigma, USA), 二甲亚砜(Me_2SO)(AR, Sigma, USA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(Sigma, USA)作为抗冻剂。步骤为: 将甲醇、甘油、二甲亚砜分别溶入

BG-11 培养基, 设置 3 种浓度梯度, 其终浓度分别为 22.5% (v/v)、15% (v/v)和 7.5% (v/v)。将 PVP 溶解于 0.1 mol/L 的 HEPES, 并用 KOH 调节 pH 至 7.0。然后将溶液加进 BG-11 培养基, 设置 4 种终浓度, 分别为 40% (m/v)、30% (m/v)、20% (m/v)、和 10% (m/v)。所有配制好的抗冻剂溶液均用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤膜(Millipore, USA)过滤灭菌后存入 5 mL 的冷冻管(CBS, USA)保藏。

1.3 超低温保藏流程方案

使用传统的二步法超低温保藏流程^[10](图 1), 具体如下:

第一步, 将 2 mL 抗冻剂母液(PVP 除外)和 2 mL 的 $10^7/\text{mL}$ 的藻细胞加入 5 mL 冷冻管, 摇匀。然后将冷冻管放入程序降温仪(CBS 2100, USA), 以 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 或 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的降温速率下降到第一温度梯度(-30°C 、 -40°C 或 -80°C)。

第二步, 立即将冷冻管放入液氮中, 保藏 48h 以上。

重复以上步骤, 筛选出最佳渗透性抗冻剂和最佳降温速率, 以及最适第一温度梯度; 将最佳渗透性抗冻剂在较合适浓度范围设置 2 个的浓度梯度, 并以 1:1 混合非渗透性抗冻剂 PVP(4 个浓度梯度),

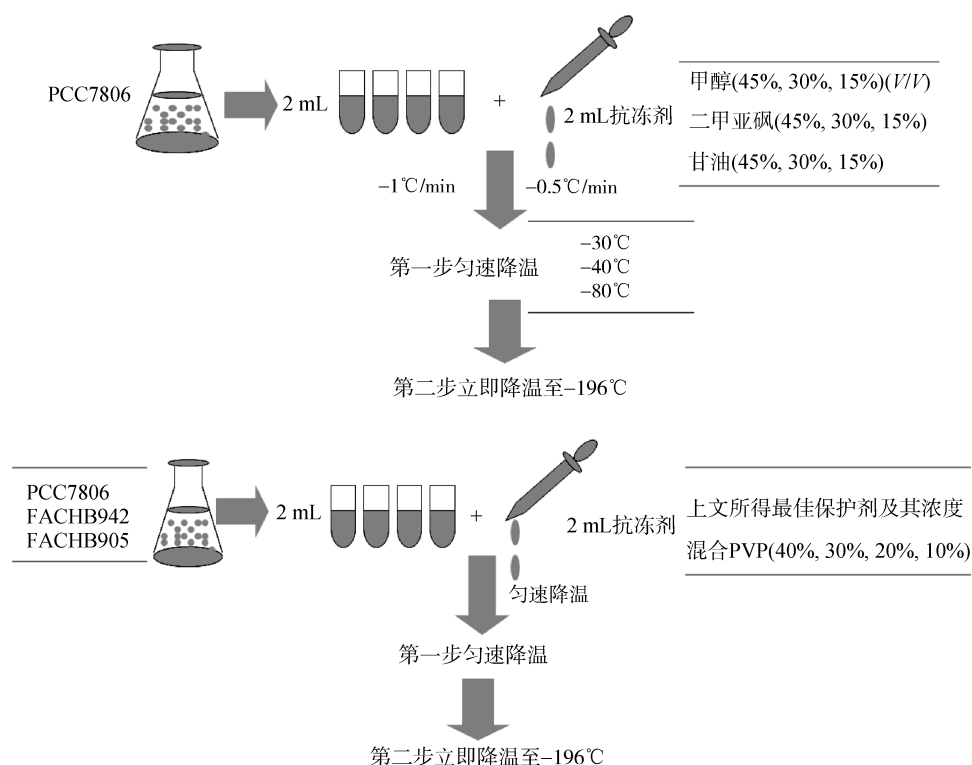


图 1 使用渗透性和非渗透性抗冻剂二步法超低温冻存铜绿微囊藻的流程

Fig. 1 A schematic diagram of the treatments with penetrating and non-penetrating CPAs and the 2-step method for cryopreservation

重复二步法超低温保藏过程。

1.4 存活率的检测

使用 FDA(fluorescein diacetate)(Sigma, USA)标记活的藻细胞,然后在流式细胞仪(Epics Altra, Beckman Coulter, USA)检测冻存藻株的存活率。参照 Jochem^[11]的方法, FDA(Sigma, USA)工作液浓度为 0.03 g/L。藻样 400 μ L 用 BG-11 清洗后,加入 FDA 300 μ L,置于黑暗条件下, 25℃ 反应 5min 后,冰激 10min 停止反应。去除染液后将藻细胞稀释到密度为 1×10^6 /mL。流式细胞仪输出功率 15 mW, 激发波长 488 nm, 被 FDA 染色的细胞可在波长 505—545 nm 被检测到^[12]。在实验中以未染色的热激死亡细胞为阴性对照, 荧光相对值大于 2 的细胞为活细胞。同时,取一支解冻后的藻样用无菌水反复洗 3—4 次后接种到 2 mL 新鲜的培养基中静置 24h, 用血球计数板细胞计数。通过以上二者结果计算出总细胞存活数,对比冻前细胞密度,得到实际存活率。

1.5 生理参数评价

使用 Phyto-PAM 叶绿素荧光仪(PAM, Walz, Germany)测定藻株的光反应曲线。PSII 的电子传递速率(ETR)根据以下公式计算: $\text{Relative ETR} = [(Fm_0 - Ft)/Fm_0 \times 0.84 \times 0.5 \times PAR (\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1})]$, Ft 和 Fm 分别表示最大和稳态的荧光值。 PAR 表示激发光强^[13]。根据 Arnon^[14]的方法,用 80%的丙酮抽提 Chl. *a*, 计算公式: $\text{Chl. } a (\text{mg/L}) = 12.72 \times A_{663} - 2.7 \times A_{645} = 12.19 \times A_{663}$ 。藻蓝蛋白的含量和类胡萝卜素含量测定分别根据 Abelson 和 Simon^[15]和 Richards 和 Thompson^[16]的方法。比生长速率(μ)根据一定时间内保藏前后叶绿素含量的变化来计算^[17]。

1.6 统计分析

所有实验重复 3 次。数据分析采用 Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, USA)统计方式 One-way ANOVA 方法进行两两比较, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

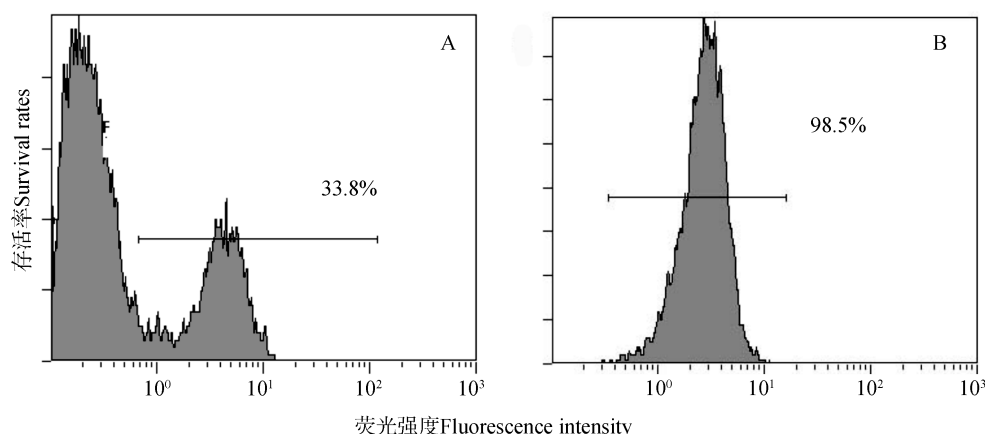


图 2 流式细胞仪对铜绿微囊藻存活率检测的比较

Fig. 2 Comparison of survival levels of *Microcystis aeruginosa* cells determined by flow cytometry (FCM) (Example)

A. 最佳冻存条件下的存活率; B. 非最佳冻存条件下的存活率

A. Cell viability after an optimal cryopreservation treatment; B. Cell viability after an unfavorable cryopreservation treatment

2 结果

2.1 渗透性抗冻剂对 PCC7806 的超低温保藏的影响

根据藻细胞的存活率筛选最适的抗冻剂浓度和保藏条件,图 2 是 PCC7806 的流式细胞仪检测结果示例。不同抗冻剂处理的铜绿微囊藻细胞在 FDA 检测后其存活表现出显著性差异($P < 0.05$),而在最适冻存条件下,存活率平均值无显著性差异(图 2A) ($P > 0.05$),在不适的冻存条件下,存活率呈现显著差异(图 2B) ($P < 0.05$)。

使用 7.5%—15% (v/v) 的甲醇和 7.5%—15% (v/v) 的二甲亚砷,并以速率 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温至 -40°C , PCC 7806 的细胞冻存后存活率差异不显著($P > 0.05$),约为 45%。然而,使用甘油作为保护剂,在相同冻存流程下,其存活率比甲醇的要低超过 20%。而且,速率为 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温至 -40°C 比速率为 $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温至 -40°C ,得到的存活率要好(表 1)。其他两种第一步降温梯度 -30°C 和 -80°C 条件下所得存活率远低于 -40°C 的效果,第一步降温至 -30°C 所得的存活率最高仅能达到 $(32.05 \pm 3.92)\%$,降温至 -80°C 所得的

表 1 PCC7806 在降温速率为-0.5℃/min 或-1℃/min 第一步降温至-40℃超低温冻存的存活率
Tab. 1 Survival levels of *M. aeruginosa* PCC7806 cells frozen to -40℃ at cooling rates of -0.5℃/min or -1℃/min

Cryoprotectants		Cooling rate	Survival levels (%)	
Methanol	22.5%	-0.5℃/min	15.11±0.36	19.05±3.50
	15%		45.48±3.34	41.35±3.06
	7.5%		43.88±1.87	13.99±1.51
Me ₂ SO	22.5%		14.32±2.08	9.34±4.39
	15%		44.32±2.77	7.71±0.83
	7.5%		41.20±0.95	5.50±1.52
Glycerol	22.5%	-1℃/min	7.47±0.60	5.74±1.00
	15%		7.04±0.02	5.39±2.70
	7.5%		8.77±4.03	4.80±1.48

存活率最高为(19.79 ± 5.76)%。

2.2 联用非渗透性抗冻剂对超低温保藏的影响

结果表明, 5%—7.5% (v/v)的甲醇与 5%—7.5% (v/v)的二甲亚砷分别与 30%的 PVP 联用, 速率为 -0.5℃/min 降温至-40℃, 细胞的存活率得到了有效的提升, PCC7806 的存活率分别为(68.70 ± 2.77)%、(65.91 ± 5.34)%、(70.13 ± 0.95)%和(58.69 ± 2.78)%。较之单一渗透性抗冻剂存活率提高了约 20%(表 2)。

2.3 降温过程对三株铜绿微囊藻超低温保藏的影响

根据上文最佳冻存方案对 PCC7806、FACHB-905 和 FACHB-942 进行超低温保藏(图 3)。研究表明, 5%的二甲亚砷与 30%的 PVP 联合使用, 以速率 -0.5℃/min 降温至-40℃的流程存活率显著高于其他处理组($P>0.05$)。而且, 其存活率在三株铜绿微囊藻中只有微小差异。FACHB-942、PCC-7806 和 FACHB-905 的存活率分别为(62.72 ± 0.15)%、(66.3 ± 0.65)%和(71.69 ± 0.39%)(图 3)。

2.4 超低温保藏技术对三株铜绿微囊藻生理参数的影响

本研究对解冻后的藻株接种培养做生长曲线, 计算其比生长速率 μ , 培养条件与冻存前的培养条件一致。结果显示在 5%的二甲亚砷与 30%PVP 联用冻存的情况下, 三株微囊藻的比生长速率与冻存前差异不大, 保藏前 PCC7806、FACHB-905 和 FACHB-942 三株微囊藻的比生长速率分别为(0.0751 ± 0.0902)、(0.0714 ± 0.0451)和(0.0756 ± 0.0023)/d; 保藏后三株微囊藻生长速率分别为(0.0733 ± 0.0004)、(0.0729 ± 0.0082)和(0.0751 ± 0.0651)/d。

对 3 株铜绿微囊藻不同光强下的电子传递速率结果表明(图 4), 除了 5%的二甲亚砷与 30% PVP 联用冻存的方法, 其他解冻后藻株的最大电子传递速率(ETR_{max})显著低于冻存前的细胞。PCC7806、FACHB-905 和 FACHB-942 三株微囊藻在冻存后的

表 2 联用渗透和非渗透性抗冻剂后 PCC7806 的存活率
Tab. 2 Survival levels of *M. aeruginosa* PCC7806 cells after addition of a combination of penetrating cryoprotectant (CPA) and non-penetrating CPA (PVP)

Cryoprotectants	Cooling rate	Survival levels (%)			
		PVP40%	PVP30%	PVP20%	PVP10%
Methanol 7.5%	-1℃/min	38.51±1.09	46.95±3.51	25.31±2.06	27.21±1.51
Methanol 5%		30.41±4.39	44.24±0.83	33.26±1.52	27.85±1.01
Me ₂ SO 7.5%		41.22±2.70	37.88±1.48	34.38±2.06	35.50±1.50
Me ₂ SO 5%		43.60±4.39	34.54±0.83	43.13±1.52	41.22±1.00
Methanol 7.5%	-0.5℃/min	50.00±0.36	65.91±5.34	40.61±1.87	27.91±5.85
Methanol 5%		45.56±2.08	68.70±2.77	45.48±0.95	39.65±1.13
Me ₂ SO 7.5%		45.57±2.08	58.69±2.78	45.48±0.95	39.65±1.13
Me ₂ SO 5%		46.17±2.77	70.13±0.95	56.69±1.14	36.52±0.60

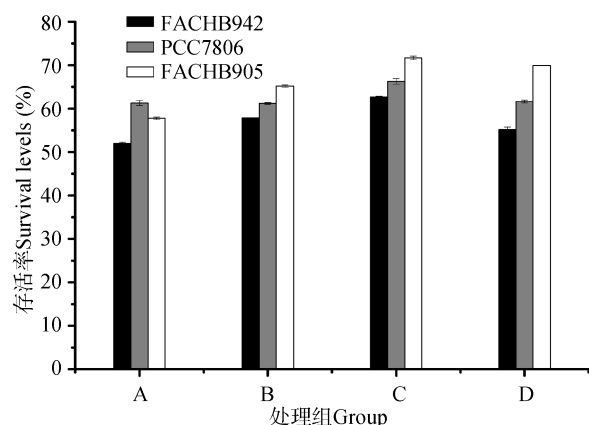


图 3 联用渗透与非渗透性抗冻剂对三株铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa*) 超低温保藏的存活率。

Fig 3 Cell survival levels the 3 strains of *M. aeruginosa* after a combination of cellular and non-penetrating CPA treatments.

A. 7.5% 甲醇 Methanol+30% PVP; B. 5% 甲醇 Methanol+30% PVP; C. 7.5% 二甲亚砜 Me₂SO+30% PVP; D. 5% 二甲亚砜 Me₂SO+30% PVP

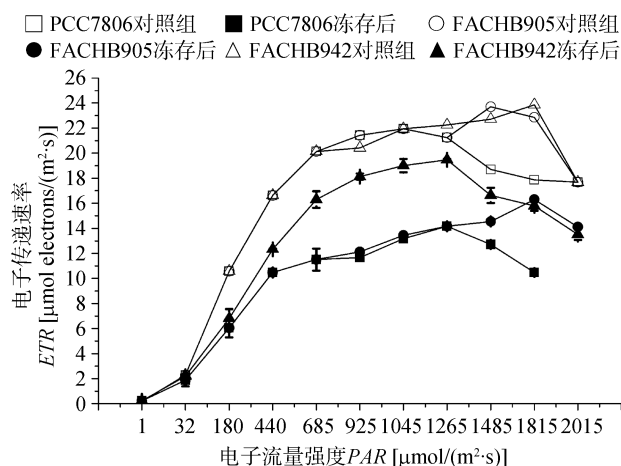


图 4 三株铜绿微囊藻冻存前后对数期电子传递速率曲线的比较

Fig. 4 Comparison of the electron transport rate (ETR) curves in three strains of *M. aeruginosa* before and after freezing during the optimal protocol for cryopreservation

ETR_{max} 最大分别降低 75.29%、77.45% 和 70% (数据未给出)。

此外, 解冻后三株藻的叶绿素都有显著的升高 ($P < 0.05$); 而类胡萝卜素和藻蓝蛋白的含量基本和冻存前持平 (图 5)。

3 讨论

一般认为, 甲醇、甘油和二甲亚砜可以用作藻细胞保藏的抗冻剂^[18, 19]。本研究沿用 Watanabe, *et al.*^[8]使用的抗冻剂, 发现 5%—15% (v/v) 的甲醇在速率 -0.5 °C/min 降温至 -40 °C 时, 得到更高的存活率,

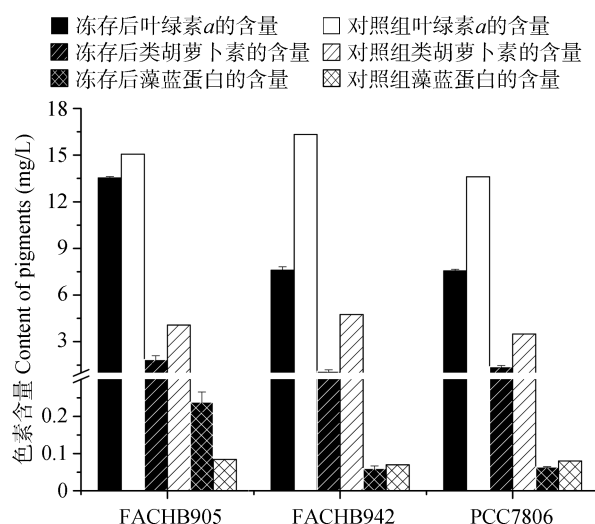


图 5 三株铜绿微囊藻冻存前后细胞色素的比较

Fig. 5 Comparison of the ratios of pigments in the 3 strains of *M. aeruginosa* before and after cryopreservation. The error bars denote standard error of the mean

而在速率 -1 °C/min 降温至 -40 °C 时其存活情况则不理想 (表 1)。Watanabe, *et al.*^[8]的报道认为 5%—10% 的甘油、甲醇或 PVP 作用于铜绿微囊藻, 其存活率非常低。这说明, 改良降温速率是改善冻存效果的关键。尤其在零度以下, 维持一种较慢的降温速率, 有利于细胞脱水的过程, 使细胞在超低温的环境免受胞内冰晶的伤害^[20]。

本研究表明, 5% 的二甲亚砜或 5% 的甲醇与 30% 的 PVP 联用, 比起单独用一种渗透性抗冻剂, 可使细胞的存活率提高约 20% (表 2、图 3)。高浓度的渗透性的抗冻剂对细胞有毒性, 细胞暴露在浓度高于 15% (v/v) 的甲醇中即使时间短暂 (20 min) 也会受到损伤^[21]。在 *Euglena gracilis* 细胞的保藏中, 抗冻剂甘油对其有损伤^[22]。Morris^[23] 1976 年研究对 *Chlorella* spp. 超低温保藏, 发现用抗冻剂二甲亚砜能得到比非渗透性抗冻剂 10% (w/v) PVP 更高的存活率。Day, *et al.*^[24] 对非渗透性抗冻剂的研究表明, 包括 HES 缓冲液, 不适用于大量微藻的保藏。因此, 非渗透性的抗冻剂不适用于单独用作藻类的超低温保藏。而两种抗冻剂的混合一般并不适用于所有微藻, 但 Benhra, *et al.*^[25] 的研究表明这种技术非常适用于栅藻。二甲亚砜、甘油、甲醇都属于渗透型的抗冻剂, 这种抗冻剂容易进入细胞, 在胞内易结合水分子, 发生水合作用, 使溶液的黏性增加, 从而弱化了水的结晶过程, 达到保护的目的^[26, 27]; HES、PVP 和葡聚糖都属于表面活性抗冻剂, 不能渗透进细胞

内, 只能吸附在细胞表面形成黏液层, 阻止水分进出细胞, 并通过增大溶液黏度来阻止冰晶的生长对细胞的破坏^[26, 27]。本研究将两种抗冻剂联合使用, 使得胞内胞外水分结晶的过程对细胞的伤害比使用任何单一一种类型抗冻剂时大大减轻, 成功提高了微囊藻超低温保藏的存活率。

对藻类的超低温保藏至今都很成功, 即使仅有一个单细胞, 通过超低温冻存后和复苏后依然可以继续生长繁殖^[5]。在本研究中, 三株铜绿微囊藻解冻后其电子传递速率均体现有下降和延迟。Sadakane, *et al.*^[28]的研究表明光照期低温可导致光抑制效应。相对于其他的抗冻剂组, 5%的二甲亚砷和 30% PVP 联用可以显著增加解冻后藻细胞的电子传递速率(图 4)。对 *Chlamydomonas reinhardtii* 的研究表明^[5], 使用甲醇做抗冻剂, 解冻后细胞的光合放氧速率有所降低。这一发现说明, 超低温保藏可能因降低了叶绿素的浓度而导致光抑制效应。而且, 本研究观察到冻存前后, 类胡萝卜素和藻蓝蛋白的含量基本持平(图 5), 这个发现与 Sathyendranathe, *et al.*^[29]的研究结果一致, 他假设叶绿素含量通常作为判断色素含量的标准, 但其他色素有可能在吸收光能上作出了比它本身更显著的贡献。解冻后藻细胞的叶绿素含量有所升高, 推测其原因是, 在保藏中死掉的细胞应该是不太健康的, 由于搜集稳定期的藻细胞进行冻存, 因此推测部分细胞已经进入衰亡期, 这部分细胞可能受环境胁迫, 类胡萝卜素含量较高; 而解冻后能存活的细胞都是较健康的, 因此叶绿素的含量较高。尽管三株微囊藻在解冻后生长都有延迟, 但使用最适冻存条件处理过的藻株其比生长速率与未冻存对照组差异不显著。

解冻后的不健康藻细胞可以通过某些化合物染色来做生命力评价, 如 Evan's Blue 法^[30]、自发荧光法和 MTT 法^[31]等。然而, Watanabe 与 Sawaguchi^[8]在超低温冻存单细胞铜绿微囊藻的研究中, 对于生命力评价的选择并未做过多的筛选研究。Morris, *et al.*^[22]对 *Euglena gracilis* 的冻存存活状况评价是由流式细胞仪检测与低温学显微镜观察细胞受到的低温伤害确定的。Fleck, *et al.*^[32]研究结果发现, FDA 阳性的细胞并不一定都具备重新生长繁殖的能力。在本研究中, 解冻后的生长曲线出现一个滞后, 但滞后并不影响活力细胞, 比生长速率依然与未冻存对照组差异不大。由于流式细胞仪能精确对酯酶活性快

速定量, 因此它仍是蓝藻活力评价的最佳选择^[33, 34]。

4 结论

综上所述, 铜绿微囊藻 PCC7806 超低温保藏的最佳条件是: 传统二步法, 第一步降温至 -40°C , 降温速率为 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 以渗透性的 5%(v/v)Me₂SO 与非渗透性的 30%(w/v)PVP 联用作为抗冻剂, 存活率可达到 $(70.13 \pm 0.95)\%$, 远远高于单一使用渗透性抗冻剂能达到的存活率 $(45.48 \pm 3.34)\%$ 。本冻存方案也适用其他株铜绿微囊藻 FACHB-905 和 FACHB-942, 其存活率与 PCC7806 仅存在微小差异。该方案冻存的铜绿微囊藻能维持生长速率、细胞色素、PSII 电子传递等生理特征的稳定。

参考文献:

- [1] Chen W, Peng L, Wan N, *et al.* Mechanism study on the frequent variations of cell-bound microcystins in cyanobacterial blooms in Lake Taihu: Implications for water quality monitoring and assessments [J]. *Chemosphere*, 2009, **77**: 1585—1593
- [2] Yoshimasa Y, Hiroyuki N. The formation and degradation of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* blooms: the importance of pH, water temperature, and day length [J]. *Limnology*, 2005, **1**: 1—6
- [3] Shen H, Song L R. Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloomforming *Microcystis* [J]. *Hydrobiologia*, 2007, **592**: 475—486
- [4] Wu Z X, Song L R. Physiological comparison between colonial and unicellular forms of *Microcystis aeruginosa* Kütz. (Cyanobacteria) [J]. *Phycologia*, 2008, **47**: 98—104
- [5] Crutchfield A M, Diller K R, Brand J J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) [J]. *European Journal of Phycology*, 1999, **34**: 43—52
- [6] Peng L Y, Xiao Y M, Liu Y. Effect of cryopreservation and short-term storage of Chinese giant salamander sperm [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(2): 326—331 [彭亮跃, 肖亚梅, 刘筠. 低温和超低温保存对中国大鲵成熟精子的影响. 水生生物学报, 2011, **35**(2): 326—331]
- [7] Wei P, Zhu J Q, Yan J Q, *et al.* Sperm cryopreservation and the DNA damage detection in *Pagrosomus major* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 1049—1053 [魏平, 竺俊全, 闫家强, 等. 真鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的检测. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 1049—1053]
- [8] Watanabe M M, Sawaguchi T. Cryopreservation of a water-bloom forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* f. *aeruginosa* [J]. *Phycological Research*, 1995, **43**: 111—116
- [9] Mori F, Erata M, Watanabe M M. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-collection [J]. *Microbiology and Culture Collections*, 2002, **18**(1): 45—55

- [10] Hwang S W, Hudock G A. Stability of *Chlamydomonas reinhardtii* in liquid nitrogen storage [J]. *Journal of Phycology*, 1971, **7**: 300—303
- [11] Jochem F J. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate [J]. *Marine Biology*, 1999, **135**: 721—728
- [12] Wu Z X, Song L R, Li R H. Different tolerances and responses to low temperature and darkness between water-bloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus* [J]. *Hydrobiologia*, 2008, **56**(1): 47—55
- [13] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **345**: 659—668
- [14] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 1949, **24**: 1—15
- [15] Abelson J N, Simon M I. Phycobiliproteins in cyanobacteria [A]. In: Method in enzymology [C]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1988, 167
- [16] Richards F A, Thompson T G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments [J]. *Journal of Marine Research*, 1952, **11**: 156—172
- [17] Wintermans J F G M, De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll and their pheophytins in ethanol [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1965, **109**: 448—453
- [18] Saks N M. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen storage [J]. *Cryobiology*, 1978, **15**: 563—568
- [19] Ben-Amotz A, Gilboa A. Cryopreservation of marine unicellular algae. Part I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1980, **2**: 157—161
- [20] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1984, **247**: 125—142
- [21] Fleck R A. The assessment of cell damage and recovery in cryopreserved freshwater protists [D]. PhD Thesis, University Abertay Dundee. 1998
- [22] Morris G J. Cryopreservation of 250 strains of chlorococcales by the method of two-step cooling [J]. *British Phycological Journal*, 1978, **13**: 15—24
- [23] Morris G J. The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate [J]. *Archives of Microbiology*, 1976, **107**: 57—62
- [24] Day J G, Harding K. Chapter 6 Cryopreservation of Algae [A]. In: Reed B M (Eds.), Plant Cryopreservation: A Practical Guide [C], Springer, 2008, 95—116
- [25] Benhra A, Ferard J F, Vasseur P. Factorial design to optimize the viability of the alga *Scenedesmus subspicatus* after cryopreservation [J]. *Cryo-Letters*, 1994, **15**: 269—278
- [26] Meryman H T, Williams R J, Douglas M S. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection [J]. *Cryobiology*, 1977, **14**: 287-302
- [27] Zdenek H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms [J]. *Cryobiology*, 2003, **46**: 205—229
- [28] Sadakane H, Ishibashi K, Yoshimoto M, *et al.* Effects of low temperature, light, and O₂ on chilling-sensitive and -resistant strains in *Chlorella ellipsoidea* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1981, **22**: 657—666
- [29] Sathyendranathe S, Lazzara L, Prieur L. Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton [J]. *Limnology and Oceanography*, 1987, **32**: 403—415
- [30] Gahan P B. Plant Histochemistry and Cytochemistry [M]. London: Academic Press. 1984, 42—47
- [31] Li J, Song L R. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) [J]. *Phycologia*, 2007, **46**: 593—599
- [32] Day J G, Harding K C, Nadarajan J, *et al.* Cryopreservation: Conservation of Bioresources at Ultra Low Temperatures [A]. In: Walker J M, Rapley R (Eds.), Molecular Biomethods Handbook [C]. Humana Press. 2008, 917—947
- [33] Jochem F J. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate [J]. *Marine Biology*, 1999, **135**: 721—728
- [34] Latour D H, Giraudet H, Berthon J L. Frequency of dividing cells and viability of *Microcystis aeruginosa* in sediment of a eutrophic reservoir [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, **36**: 117—122

DEVELOPMENT ON A CRYOPRESERVATION PROTOCOL OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* USING PENETRATING AND NON-PENETRATING CRYOPROTECTANTS

WU Xing-Hua^{1,2}, ZHENG Ling-Ling¹ and SONG Li-Rong¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Hubei Academy of Environmental Sciences, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Microcystis aeruginosa* Kütz is a freshwater bloom-forming cyanobacterium that is found all over the world. Owing to their adverse effects on water quality and human health, these blooms in water of reservoirs and recreational water systems are a cause of great concern, *M. aeruginosa* became to a popular research object. Previous studies have revealed significant differences between the physiological parameters and stress responses of individual cells in lab and wild type colonial of *Microcystis* in fields. Therefore, to avoid the loss of natural characteristics, an efficient technology or method would have to be used for preservation of *M. aeruginosa*. Cryopreservation is a useful method to preserve cells and organs for a long time in lab. It was thus used on *M. aeruginosa* in order to keep the physiological characteristics stable at long-term studies. In the present study, cryopreservation of three strains *M. aeruginosa* (PCC7806, FACHB-905 and FACHB-942) was accomplished successfully. Combination of three penetrating cryoprotective additives (CPA) (methanol, dimethylsulphoxide (Me₂SO), glycerol) and non-penetrating polyvinylpyrrolidone (PVP) could improve viability almost 20% than only using the same penetrating CPA. The optimal protocol of cryopreservation was screened from CPAs above and four concentrations of each, two cooling rates (−1°C/min and −0.5°C/min), and the first-step temperature degraded (−30°C, −40°C and −80°C) of traditional two step methods. In addition, cell viability was determined by performing flow cytometry with fluorescein diacetate (FDA). The results showed that an optimal cooling protocol was at cooling rate of 0.5°C/min to −40°C and combination of penetrating CPA (Me₂SO, 5%) and non-penetrating CPA (PVP, 30%). The ratios of viable cells in the FACHB-942, PCC-7806 and FACHB-905 were approximately (62.72 ± 0.15)%, (66.3 ± 0.65)%, and (71.69 ± 0.39)%, respectively. However, the ratios of viable cells in these strains were all only about 45%. At this protocol of cryopreservation, physiological parameters of three strains *M. aeruginosa* such as PSII, the cells pigments and specific growth rates were analyzed before preservation and after thaw, results about the comparison showed that *M. aeruginosa* could keep its physiological characteristics stable.

Key words: Cryopreservation; *Microcystis aeruginosa*; Cryoprotective additives