

絮凝剂对紫菜酶解单细胞的絮凝作用及对其生长的影响

周立冉 王 海 戴继勋

(青岛海洋大学 266003)

提要 为解决紫菜养殖和制饵的生产实践中出现的单细胞收集困难问题进行了初步研究。首次尝试利用细胞絮凝剂收集大型海藻的酶解单细胞,检查了几种常规絮凝剂及新型生物絮凝剂对其絮凝作用,观察了对其生长发育的影响。实验中发现常规絮凝剂明矾具有明显的絮凝作用,浓度过高时有致畸作用;饱和石灰水和甲壳胺絮凝效果较好,但甲壳胺具有阻碍细胞发育的特点; Ca^{2+} Mg^{2+} 基本无絮凝作用; Fe^{3+} 在高浓度时有致畸作用。

关键词 絮凝剂,紫菜,酶解单细胞,絮凝作用

80年代后期,戴继勋等成功地利用紫菜酶解单细胞进行了纯系培养、育苗等工作,给紫菜养殖业带来了良好的经济效益。由于紫菜营养价值高抗寒力强,耐久存,利用其酶解单细胞饲养的扇贝存活率高,生长快,是代替单胞藻投喂经济贝类的良好饲料^①。但是,无论育苗还是制饵都面临着细胞收集困难的问题。目前大

规模生产中迫切需要一种快速方便收集细胞的方法。大型海藻的酶解单细胞中应用尚未见报道。本实验是

^① 王 海,紫菜细胞饵料培育亲贝和幼体的研究(待发表)。
收稿日期:1996年12月11日

以紫菜酶解单细胞为材料,以明矾 $KAl(SO_4)_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_3$, 饱和石灰水($Ca(OH)_2$), 甲壳胺等 6 种作为絮凝剂,进行了细胞絮凝实验,并对絮凝单细胞用消毒海水稀释培养,观察絮凝剂对紫菜酶解单细胞生长发育的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

藻体 幼嫩条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)(1996年2月采于山东日照)。

培养用水 取自青岛太平角的天然海水,经煮沸灭菌。

絮凝剂 1% W/V 明矾母液(海水配制,下同)
 10% W/V $CaCl_2$ 母液
 10% W/V $MgCl_2$ 母液
 饱和 $Ca(OH)_2$ 溶液
 0.1 mol/L $FeCl_3$ 母液
 1% W/V 的甲壳胺的醋酸溶液(醋酸浓度 0.5% V/V)

1.2 实验方法

1.2.1 紫菜的酶解

紫菜,在灭菌海水中光照恢复海螺酶于 18~20℃ 酶解 1.5 h,镜检,筛绢过滤。用灭菌海水冲洗挤出的单细胞,测单细胞浓度,稀释至约为 600 000/m l。

1.2.2 单细胞絮凝

浓度调整好的细胞悬液,加不同量的絮凝剂使之形成不同的浓度梯度,吹打均匀,记录絮凝完全时间,一定时刻取悬液测其细胞浓度,计算沉淀度,每种絮凝剂设有空白对照,沉淀度计算公式如下①:

$$\text{沉淀度}(\%) = \frac{\text{原液细胞浓度} - \text{上清细胞浓度}}{100/\text{原液细胞浓度}} \times 100$$

1.2.3 单细胞培养

灭菌海水培养,3~4 d 换 1 次水,显微镜检查细胞生长状况,计算畸形率,畸形率计算公式:畸形率(%) = 畸变细胞数 × 100 / 总细胞数

所有脱离正常发育,形状或大小与对照明显差异的均为畸形。

2 结果与分析

2.1 明矾组(细胞浓度 650 000/m l)

在梯度 10×10^{-6} ~ 1980×10^{-6} 之间,沉淀速度随浓度升高而加快,同时沉淀度也随之上升,可以观察到细胞絮凝的紧密程度随之降低现象。再用更高浓度的

明矾来絮凝,发现絮凝速度,絮凝产物的聚集紧密程度都不再增加。

培养结果数据表明,明矾浓度低时,细胞生长接近正常;高浓度的明矾对细胞起伤害作用,畸形率随浓度升高而升高(见表 1)。

2.2 $CaCl_2$ 组(细胞浓度 630 000/m l)

$CaCl_2$ 的浓度升高与否对沉淀速度,沉淀度,细胞紧密程度的影响不大,都与对照组几乎相同,由表中数据可知, $CaCl_2$ 在 9.09% ~ 20% 之间无明显絮凝作用。

经 $CaCl_2$ 絮凝过的细胞生长发育较正常,细胞死亡率,畸形率发育状态都与对照相差不大(见表 2)。

表 1 明矾对细胞的作用

结果	浓度($V/V \times 10^{-6}$)					对照
	10	60	660	1320	1980	
pH	6.5	6.5	6	5	4	6.5
沉淀完全时间(m in)	19	17	14	10	10	32
10 m in 时上清细胞数 ($\times 10^4/m l$)	10	8.5	4	1.5	1.6	4.0
沉淀度(%)	84.6	86.9	93.8	97.6	97.8	38.5
细胞死亡率(%)	31	35	49	75.4	76	28
畸形率(%)	5	9	10	~ 40	~ 40	4~ 5

表 2 $CaCl_2$ 对细胞的作用

浓度($V/V \%$)	9.09	13.04	16.67	20	对照
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
沉淀完全时间(m in)	31	30	31	31	30
10 m in 时上清细胞数 ($\times 10^4/m l$)	43.5	41.5	40	42.6	42
沉淀度(%)	31.5	34.1	36.5	32.4	33.3
细胞死亡率(%)	29	30	28	31	30
畸形率(%)	4	4	5	4	4~ 5

2.3 $MgCl_2$ 组(细胞浓度 600 000/m l)

实验结果与 $CaCl_2$ 类似, $MgCl_2$ 的浓度升高对沉淀速度,沉淀度和细胞紧密程度的影响不大,与对照组数据相近,从表中数据可知, $MgCl_2$ 在浓度 9.09% ~ 20% 之间无絮凝作用。

由表中数据知,处理浓度升高对畸形的产生作用不大,但细胞的死亡率稍有下降(见表 3)。

① 孙建华,1995. 海产单胞藻浓缩与保存方法的研究,硕士论文。

表 3 MgCl₂ 对细胞作用

Tab. 3 Effect of MgCl₂ on single cells

浓度(V/V %)	9.09	13.04	16.67	20	对照
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
沉淀完全时间(m in)	28	30	28	29	29
10 m in 时上清细胞数 (× 10 ⁴ /m l)	42	39	40.5	41.5	40
沉淀度(%)	30	35	33.3	31.7	33.3
细胞死亡率(%)	31	30	26	27	32
畸形率(%)	5	6	4	5	4~ 5

观察细胞生长状况, 处理组与对照组基本相同, 都

表 4 FeCl₃ 对细胞作用

Tab. 4 Effect of FeCl₃ on single cells

浓度(mm ol/L)	0.05	0.10	1.00	5.00	对照
pH	6.5	6	5.5	5	6.5
沉淀完全时间(m in)	20	21	7	6	28
细胞死亡率(%)	30	35	80	90	20
畸形率(%)	50	50	90	100	4~ 5
生长发育状况	小体积畸形叶 状体居多, 其次 为正常叶状体	小体积畸形叶 状体, 正常叶状 体, 愈伤组织	大量畸形叶状 体, 少量愈伤组 织团块	全部畸形叶状 体, 肥大, 为正 常的 5 倍左右	正常叶状体, 少 量愈伤组织

2.5 饱和 Ca(OH)₂ 液(细胞浓度 600 000/ m l)

实验结果显示, 在 0.67% ~ 13% 之间, 随着浓度升高沉淀速度加快, 同一时刻沉淀度随之升高, 但超过

表 5 Ca(OH)₂ 对细胞作用

Tab. 5 Effect of Ca(OH)₂ on single cells

浓度(V/V %)	0.67	3.3	8	10	13	对照
pH	7	7.5	8	8	8.5	6.5
沉淀完全时间(m in)	31	30	26	19	15	32
10 m in 时上清细胞数 (× 10 ⁴ /m l)	61.7	60.4	51.3	32.8	23.8	40
沉淀度(%)	0	0	14.5	45.3	60.3	33.5
细胞死亡率(%)	1~ 2	1~ 2	1~ 2	2~ 3	2~ 3	20
畸形率(%)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	4~ 5
生长发育状况	大量单细胞 开始分裂	大量单细胞 开始分裂	约 50% 单细 胞开始分裂	单细胞尚未 分裂, 呈圆形	单细胞尚未 分裂, 呈圆形	单细胞出现 根部, 有向叶 状体发育的 趋向

2.6 甲壳胺(细胞浓度 600 000/m l)

絮凝速度很快, 但浓度达 3.3% 之后, 絮凝产物都漂浮在液面呈白色蓬松状。故未计沉淀度。

出现了正常的细胞分裂, 正常的叶状体, 有少量形状不太规则的愈伤组织团块。

2.4 FeCl₃ 处理组(细胞浓度 610 000/m l)

FeCl₃ 在低浓度时(0.05~ 0.10 mm ol/L)有一定絮凝作用, 浓度升高形成黄色絮状物, 此时镜检发现有大量细胞死亡, 故未统计细胞数。

培养结果表明, 低浓度处理时(< 1.00 mm ol/L)死亡率接近正常, 畸形率很高; 高浓度时有明显毒害作用, 死亡率和畸形率均呈大副度上升, 存活细胞几乎全为畸形(见表 4)。

13% 后, 沉降速度快, 但形成一种白色絮状产物, 细胞紧密度差。

培养结果表明单细胞死亡率低, 畸形率低, 生长正常。(见表 5)

培养结果表明, 细胞死亡率和畸形率都很小, 且出现细胞不分裂现象(见表 6)。

表 6 甲壳胺对细胞作用

Tab. 6 Chitosan's effects on single cells

浓度(V/V %)	0.13	0.67	3.3	6.7	10	对照
pH ¹⁾	8	8	8	8	8	6.5
絮凝完全时间(m in)	6	5	2	2	2	30
细胞死亡率(%)	2	2	1	1	0	20
畸形率(%)	< 1	< 1	< 1	0	0	4~ 5
生长发育状况	开始形成根部	少量单细胞形成根部	更少量单细胞形成根部	大量圆形细胞,少数处于分裂状态	大量处于分裂中的圆形细胞,色泽鲜艳	单细胞形成根部

1) 调节后的值。

3 小结

结合絮凝效果和培养结果,选出各絮凝剂的最佳絮凝浓度范围,得出以下结论:明矾、饱和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、甲壳胺的絮凝效果较好,参考浓度分别为 $660 \times 10^{-6} \sim 1320 \times 10^{-6}$ 、10% 和 6.7% ~ 10%。 CaCl_2 和 MgCl_2 对絮凝没有促进作用。 FeCl_3 在浓度低时有一定的絮凝效果,浓度高时则主要为诱变效应,细胞存活率很低。

参考文献

- [1] 戴继勋、包振民,1988. 遗传学报 15(4): 299~ 302.
- [2] 戴继勋等,1988. 生物工程学报 4(2): 133~ 137.
- [3] 戴继勋等,1990. 海洋与湖沼 21(3): 293~ 296.
- [4] 林昱等,1994. 海洋通报 13(5): 14~ 18.
- [5] 蒋霞敏等,1993. 浙江水产学院学报 12(2): 81~ 91.
- [6] 谭天伟,1995. 生物工程进展 15(5): 53~ 56.

THE EFFECT OF FLOCCULATING AGENTS ON ENZY-MATICALLY ISOLATED *Porphyra* CELLS AND THEIR IN-FLUENCE ON CELLS DEVELOPMENT

Zhou Liran, Wang Hai and Dai Jixun
(Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Dec. 11, 1996

Key Words: Flocculating agent, *Porphyra*, Enzymatically isolated single cell, Flocculation effect

Abstract

This is the preliminary study which resolves the problem of cell collection in *Porphyra* breeding and diet preparation. Several normal flocculating agents and one new biological agent were firstly used to collect the isolated cells of seaweed. The flocculation effect and the influence on cells development were investigated. The normal agent $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ was found to be highly effective but to cause cell deformation under high concentration. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and Chitosan were effective. But the biological agent Chitosan could hinder the development of cells. CaCl_2 and MgCl_2 had not apparent flocculent effect. Fe^{3+} could raise the development rate of cells under high concentration.