

用包埋脱水法冰冻保存海洋饵料金藻*

王起华 李贺 张恩栋 高艳萍 李大鹏¹⁾

(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

¹⁾(大连民族学院生物工程系 大连 116600)

²⁾(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 用包埋脱水法冰冻保存绿色巴夫藻 (*Paulova viridis*)、湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 和球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* 3011) 等三种海洋饵料金藻, 探讨了脱水速率、胶球含水量以及化冻后恢复方法对冰冻保存存活率的影响。结果表明, 三种藻都在 -0.9% 含水量/h 的平均脱水速率下获得最高存活率。各种藻在冰冻前的胶球最佳含水量不同, 绿色巴夫藻为 35%, 湛江等鞭金藻和球等鞭金藻都为 30%。化冻后, 含绿色巴夫藻的胶球在培养基中 22℃ 暗放置 48h 存活率最高; 另两种藻在相对湿度为 75% 的气相中 22℃ 暗放置 12h 存活率最高。在本实验条件下, 绿色巴夫藻、湛江等鞭金藻和球等鞭金藻的冰冻保存的存活率可分别达到 74%、15% 和 17%。

关键词 包埋脱水法, 冰冻保存, 含水量, 脱水速率, 恢复方法

中图分类号 Q33

海洋饵料微藻在鱼、虾、贝类育苗生产中有着重要作用, 有关其超低温保存的研究近年来日益受到重视 (Canavate *et al.*, 1995; Day *et al.*, 1993; 马志珍等, 1997; 王起华等, 1999, 2000a)。以往微藻的保存方法多采用常规的两步冰冻法, 在冰冻过程中需要严格控制降温速率, 要求特殊的设备和技术, 而且大多使用对生物材料有害的抗冻保护剂, 限制了该技术的广泛应用 (Scott *et al.*, 1992; 王起华等, 2002)。20 世纪 90 年代初, 一种新的保存技术——包埋脱水法在高等植物种质的冰冻保存中得以建立并广泛应用。该法操作简单, 不需复杂设备, 而且通常不使用抗冻保护剂, 这无疑是对超低温保存技术的一个重大发展 (Fabre *et al.*, 1990; 王君晖等, 1999)。近年来采用该方法保存某些藻类已获得初步成功 (Day *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1996; Vigneron *et al.*, 1997; 王起华等, 2000b), 表明包埋脱水法在藻类种质冰冻保存中具有一定的应用潜力。作者采用包埋

脱水法研究了脱水速率、胶球含水量和化冻后恢复方法对绿色巴夫藻 (*Paulova viridis*)、湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 和球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* 3011) 等几种海洋饵料金藻超低温保存的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

绿色巴夫藻 (*Paulova viridis*)、湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 和球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* 3011) 藻种由辽宁师范大学藻类生理实验室提供, 在含 100mlf/2 培养基的 250ml 三角烧瓶中培养, 培养条件为 22℃、光强 55μmol photon/(m²·s)、光周期 L:D = 12:12。

1.2 包埋和脱水

1.2.1 包埋 取静止初期的藻细胞作为实验材料, 离心去除培养液后用消毒海水悬浮至约 1.08×10^8 细胞/ml, 与含 30% NaCl 的 6% 褐藻酸

* 国家自然科学基金资助项目, 30170099 号、30470184 号; 辽宁省教育厅基金资助项目, 20041015 号; 中国科学院知识创新工程资助项目, ZKCX2-211 号。王起华, 教授, E-mail: qihua_mail@163.com

1) 通讯作者: 李大鹏, 博士, 研究员, E-mail: dpli@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-12-26, 收修改稿日期: 2004-04-27

钠(SIGMA CHEMICAL CO.)溶液等体积混匀,移入具6号针头的10ml注射器中。将藻液滴入含30% NaCl的0.1mol/L CaCl₂溶液中,轻轻摇动,固定30min后完成包埋过程,胶球直径约为3mm。方法参照王起华等(2000b)。

1.2.2 脱水及含水量的测定 取上述胶球30个称鲜重后,在22℃暗室内用硅胶吸湿法按每小时含水量减少0.9%的平均脱水速率脱水至指定含水量后,测定脱水后的胶球重量和胶球干重,并计算胶球的含水量,方法基本参照王起华等(2000b)。

1.3 冰冻及化冻

每10个胶球为一组放入2ml的冻存管内,密封后从室温下直接投入液氮中保存。24h后取出冻存管迅速放入40℃恒温水浴里快速化冻约3min,此操作参照王起华等(2000b)。

1.4 化冻后的恢复、再培养和存活率的测定

1.4.1 恢复 化冻后的胶球采用下述三种方法恢复:(1)将胶球移入 $f/2$ 培养基中,分别在22℃和4℃下暗放置。(2)将胶球移入直径3cm的培养皿中,将培养皿置于含有过饱和NaCl溶液的密闭玻璃罐的上部气相中(相对湿度,RH75%)22℃下暗放置。(3)将胶球保留在密封的冻存管中,在22℃下分别放置于暗中或光下。

1.4.2 再培养和存活率的测定 恢复过程完成后,将胶球移入含20ml $f/2$ 培养基的50ml三角烧瓶中再培养,培养条件与前述材料培养条件相同。5天后,用丙酮提取胶球中的叶绿素,分别在666nm和730nm波长下测定提取液的光吸收度,按照Jensen(1978)公式计算样品中的叶绿素 a 含量。以未脱水未冰冻的样品作为对照,以未脱水样品经过反复3次冰冻-化冻处理(每次冰冻保存1h,其他同1.3)后作为空白,根据叶绿素 a 含量计算存活率。计算方法参见李莹等(2003)。

2 结果与讨论

2.1 脱水速率对存活率的影响

当胶球以-0.9%含水量/h的平均脱水速率脱水至35%含水量时,绿色巴夫藻冰冻前、后的存活率最高,分别为87%、74.4%。当平均脱水速率低于-0.9%含水量/h时,随着脱水速率的下降,冰冻前、后的存活率都迅速下降。当平均脱水速率高于-0.9%含水量/h时,随着脱水速率的升高,冰冻前的存活率逐步下降,而冰冻后的存活

率则迅速下降。可见,脱水速率过低和过高,都不利于冰冻保存,绿色巴夫藻的最佳平均脱水速率为-0.9%含水量/h(图1)。湛江等鞭金藻和球等鞭金藻(图2a、b)与绿色巴夫藻有相似之处,它们的最佳平均脱水速率也都是-0.9%含水量/h(含水量为30%);当脱水速率低于或高于-0.9%含水量/h时,冰冻前的存活率的变化情况也相似。不同之处有两点:一是湛江等鞭金藻和球等鞭金藻冰冻后的存活率远远低于绿色巴夫藻,两者的最高存活率分别为15%和17%;二是当平均脱水速率高于-0.9%含水量/h时,两种藻冰冻后的存活率都呈缓慢下降。

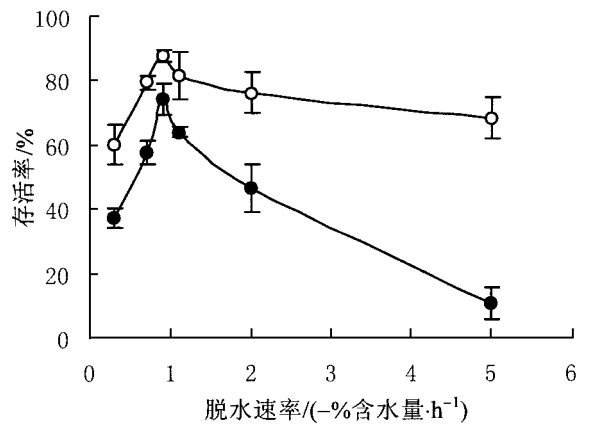


图1 脱水速率对绿色巴夫藻存活率的影响

Fig 1 Effect of dehydration rate on cell viability of *P. viridis*

—○— 冰冻前; —●— 化冻后

脱水速率对包埋脱水法冰冻保存的影响研究目前还鲜有报道,特别是藻类(Li *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 1996)。Hirata等(1996)曾在研究*Dunaliella tertiolecta*的冰冻保存中,发现其最佳平均脱水速率为-0.9%含水量/h。本实验结果表明,3种海洋金藻的最佳平均脱水速率也都是-0.9%含水量/h。不仅如此,作者在采用包埋脱水法冰冻保存几种海洋绿藻(未发表资料)和海洋硅藻(李莹等,2003)时,发现它们的最适平均脱水速率也都大约为-0.9%含水量/h。因此,这一脱水速率很可能适用于多种海洋单细胞藻类。当然,对不同类型的藻类,所采用的脱水速率也会有不同,如Vigneron等(1997)保存掌状海带配子体的平均脱水速率约为-15%含水量/h,王起华等(2000b)保存坛紫菜丝状体时采用了-7.6%含水量/h的平均脱水速率,这些速率显然比上述保存单细胞藻类时所用的脱水速率要高得多。

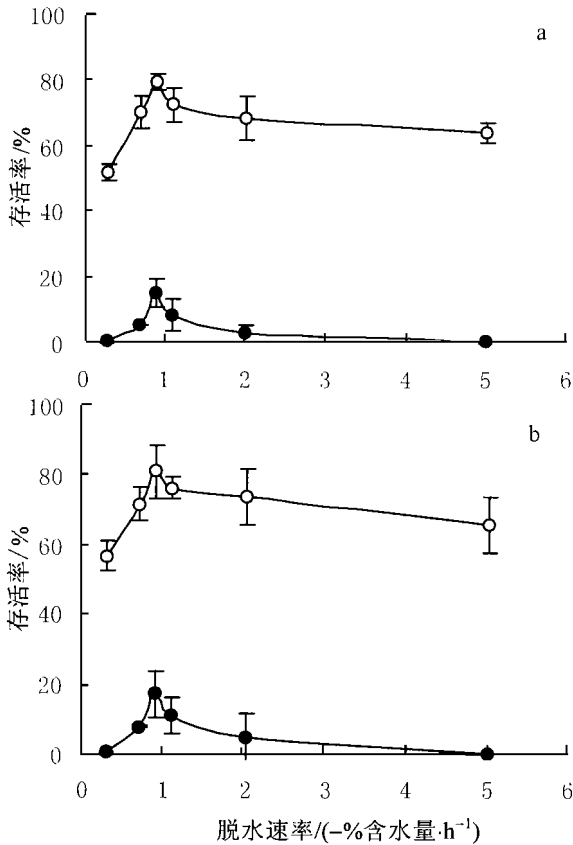


图2 脱水速率对湛江等鞭金藻 (a)和球等鞭金藻 (b) 存活率的影响

Fig. 2 Effect of dehydration rate on cell viability of *I. zhanjiangensis* (a) and *I. galbana* 3011 (b)

含藻细胞的胶球脱水至30%含水量,在冰冻前和化冻后分别放入75%相对湿度的气相中22℃暗恢复12h

—○— 冰冻前; —●— 化冻后

2.2 胶球含水量对存活率的影响

图3表示胶球含水量对绿色巴夫藻冰冻前后的存活率的影响。很明显,胶球含水量对冰冻后存活率的影响远远大于对冰冻前存活率的影响。冰冻前,绿色巴夫藻的脱水范围较宽,当胶球含水量为92%(未脱水材料)时存活率为100%,随含水量的降低存活率呈平缓下降,当含水量降到10%后,存活率仍达到60%以上。冰冻后,当胶球含水量为92%时存活率为0,但是随含水量的降低存活率迅速升高,在含水量降至35%时,存活率达到最高值,为74%;此后,存活率随含水量的降低而迅速下降,当含水量降到10%后,存活率已下降到约30%。因此,冰冻保存绿色巴夫藻的最佳胶球含水量是35%。湛江等鞭金藻和球等鞭金藻二者冰冻前存活率的变化与绿色巴夫藻

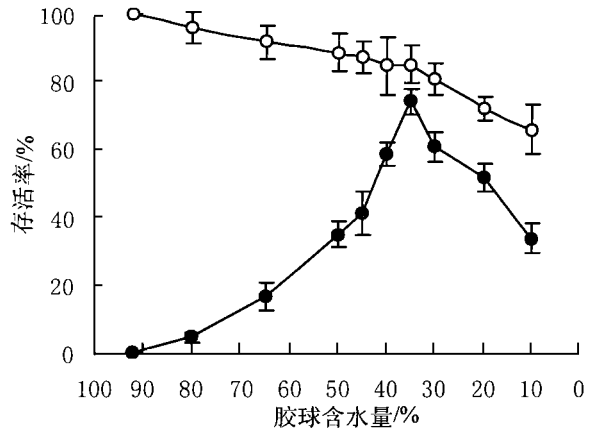


图3 胶球含水量对绿色巴夫藻存活率的影响

Fig. 3 Effect of bead water content on cell viability of *P. viridis* 含藻细胞的胶球以-0.9%含水量/h的速率脱水,在冰冻前和化冻后分别放入22℃培养基中暗恢复48h

—○— 冰冻前; —●— 化冻后

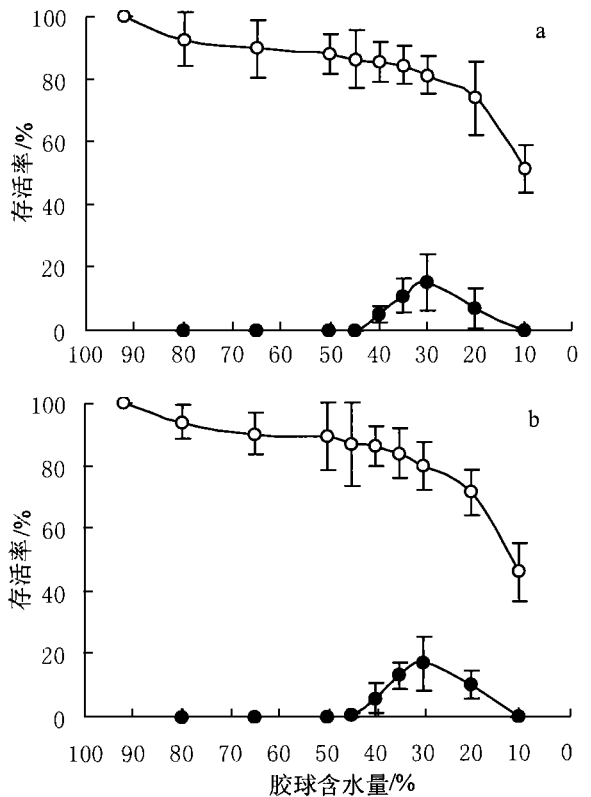


图4 胶球含水量对湛江等鞭金藻 (a)和球等鞭金藻 (b) 存活率的影响

Fig. 4 Effect of bead water content on cell viability of *I. zhanjiangensis* (a) and *I. galbana* 3011 (b)

含藻细胞的胶球以-0.9%含水量/h平均速率脱水,在冰冻和化冻后分别放入75%相对湿度的气相中22℃暗恢复12h

—○— 冰冻前; —●— 化冻后

相似, 脱水范围也较宽, 即使在 10% 的含水量, 存活率也分别在 50% 和 40% 以上。但二者冰冻后的存活率范围很窄, 只有当含水量低于 45% 并高于 10% 时才有较低的存活率, 其中含水量为 30% 时, 二者存活率最高, 分别为 15% 和 17%。因此, 冰冻保存湛江等鞭金藻和球等鞭金藻的最佳胶球含水量都是 30% (图 4a, b)。

采用包埋脱水法冰冻保存植物材料时, 确定最适含水量是提高冰冻保存存活率的重要因素之一。样品冰冻保存前的最适含水量因植物种类和材料类型的不同而有所差异。对高等植物来说, 最适含水量变化范围很大, 如体胚或小孢子胚一般为 13%—20%, 而茎尖和分生组织多为 20%—40% (王君晖等, 1999)。已报道的几种藻类的最

适含水量一般为 40% (Hirata *et al.*, 1996; Vigneron *et al.*, 1997; 李莹等, 2003), 但也发现例外 (王起华等, 2000b)。本实验结果表明, 几种金藻的最适含水量范围都在 30%—35% 之间。Li 等 (1999) 认为, 对于许多植物组织, 如果材料预先脱水到一个最适含水量范围, 将极大地提高冰冻保存存活率, 这个最适范围的变化反映了种系的脱水敏感性及所采用的特定冰冻方法。从本实验结果来看, 在采用包埋脱水法冰冻保存藻类细胞时, 材料的含水量高低同样是影响存活率的关键因素。

2.3 化冻后恢复方法对存活率的影响

表 1 为恢复方法对冰冻保存存活率的影响。由表 1 可知, 绿色巴夫藻在培养基中在室温下暗

表 1 化冻后恢复方法对三种金藻存活率的影响¹⁾

Tab 1 Effect of recovery methods after thawing on cell viability of three golden-brown algae

项目	恢复时间(h)	冰冻后存活率(%)		
		绿色巴夫藻	湛江等鞭金藻	球等鞭金藻 3011
对照	0	63.4	4.5	5.6
培养基	6	43.9	4.1	5.7
4℃	12	51.5	8.7	10.8
暗	24	70.2	4.8	5.3
	48	53.4	3.1	3.0
培养基	6	48.9	5.2	7.6
22℃	12	55.8	9.4	12.7
暗	24	69.0	4.6	4.7
	48	74.4	3.4	3.6
RH75% 气相	6	32.0	7.6	8.7
22℃	12	36.4	15.3	17.4
暗	24	50.3	6.3	6.3
	48	27.3	3.1	3.5
冻存管	6	47.2	4.7	6.6
22℃	12	52.7	8.9	11.4
暗	24	64.3	5.1	4.3
	48	44.2	3.0	3.7
冻存管	6	33.1	5.2	6.9
22℃	12	49.4	8.2	10.2
光	24	52.0	4.4	4.0
	48	39.8	2.9	3.1

1) 含藻细胞的胶球以 0.9% 含水量/h 平均速率脱水, 绿色巴夫藻脱水至 35% 含水量, 湛江等鞭金藻和球等鞭金藻 3011 脱水至 30% 含水量

恢复通常有较高的存活率,存活率随着恢复时间的增加而增加,恢复时间为 48h 时存活率最高,达 74.4%。其他恢复处理都在 24h 后达到最高存活率,其中,在培养基中 4℃ 下暗恢复存活率较高,达 70.2%;在密封的冻存管中室温下暗恢复存活率稍低些,为 64.3%;相比之下,在冻存管中室温下光恢复存活率明显降低,为 52.0%;在含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相 (RH75%) 中暗恢复时,存活率最低,为 50.3%。湛江等鞭金藻和球等鞭金藻的最佳恢复条件极为相似,但与绿色巴夫藻的恢复条件相比,则有很大的不同。湛江等鞭金藻和球等鞭金藻都在含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相中 (RH75%) 暗恢复 12h 存活率最高,分别为 15.3% 和 17.4%。

对某些植物细胞的常规超低温保存研究发现,在刚刚化冻的细胞中可发现膜损伤的现象 (Withers, 1985), 因此,在再培养初期,一般有一个修复细胞结构损伤的过程。而在包埋脱水法中,对经历了脱水-冰冻-化冻过程的胶球,在再培养之初,还要经历一个“复水”的过程,即恢复到正常含水量的过程。本实验中所采用的三种恢复方法中,第一种方法是将含藻细胞的胶球直接移入培养基中恢复,在恢复开始,藻细胞会经历一个快速的复水过程;第二种方法是将含藻细胞的胶球移入相对湿度为 75% 的密闭气相中恢复,在这种状态下,藻细胞在修复损伤过程的同时,会经历一个慢速的复水过程;第三种方法是将含藻细胞的胶球保持在密封的冻存管中,使胶球含水量保持在脱水后的状态,在此种状态下,细胞在恢复过程中并不经历复水过程,需等到再培养开始(胶球移入培养基)时,才完成复水过程。从本实验结果来看,绿色巴夫藻适合用第一种方法恢复,而湛江等鞭金藻和球等鞭金藻显然适合用第二种方法恢复。温度对恢复效果有一定影响,在室温下恢复比在零上低温下恢复更有利。在冻存管中的光、暗对比恢复实验表明,光不利于恢复过程。Li 等 (1999) 在研究一种高等植物体细胞胚的脱水方法时,曾采用在含过饱和盐类溶液的密闭气相中使胚缓慢脱水。作者的实验表明,该方法也可以在胶球化冻后用于胶球的缓慢复水。本实验结果还表明,在含过饱和 NaCl 溶液的密闭气相 (RH75%) 中暗恢复时,湛江等鞭金藻和球等鞭金藻存活率最高。这说明,细胞的复水速率会影响存活率,而最适复水速率可能与藻类种类有关。

较快的复水速率适用于绿色巴夫藻,而较慢的复水速率适用于湛江等鞭金藻和球等鞭金藻。作者在研究恢复方法对其他饵料微藻冰冻保存存活率的影响时进一步发现,适宜的恢复方法应根据藻类种类而定,如某些饵料绿藻和硅藻在冻存管中恢复时(本实验中的第三种方法),可获得最高存活率。总之,关于恢复方法对藻类冰冻保存的影响的研究至今尚无公开报道 (Taylor *et al.*, 1999; 王起华等, 2002), 许多问题仍有待更进一步的研究。

关于金藻超低温保存的研究,目前尚很少有报道。Canavate 等 (1995) 曾采用常规的两步冰冻法详细研究过球等鞭金藻的冰冻保存,认为这是一种难以保存的材料,存活率在 4%—17% 之间。马志珍等 (1997) 曾采用多步慢速冰冻法保存过球等鞭金藻和巴夫藻 (*Pawlawa gyrams*), 结果表明,它们虽然在冰冻保存后能够存活,但是在再培养中需要很长的延缓期,并且生长率较低。王起华等 (1999) 也曾采用两步冰冻法研究过绿色巴夫藻、湛江等鞭金藻和球等鞭金藻 3011 等 3 种海产饵料金藻的超低温保存,获得了相对较高的存活率,最高存活率都达到了 30% 以上。但是要达到这样高的存活率需要对培养温度、藻细胞年龄、抗冻保护剂和冰冻保存程序等影响存活率的各种因素进行优化,操作相当繁琐,难于实际应用。本实验中用包埋脱水法保存这三种饵料金藻,通过控制脱水速率和脱水程度(胶球含水量),并采用适当的恢复方法,获得了相对较高的存活率,特别是绿色巴夫藻存活率可高达 74%,远远高于常规两步法所得到的结果。不仅如此,本实验中不使用二甲亚砜等有害的冰冻保护剂,在冰冻程序上采用了一步冰冻法,从而使操作大大简化。作者的实验结果进一步证实了 Hirata 等 (1996) 的结论,采用包埋脱水法冰冻保存海洋微藻类是一种有潜力的方法。然而,对湛江等鞭金藻和球等鞭金藻,如何进一步提高其冰冻保存存活率,仍是一个需要继续深入研究的课题。

参 考 文 献

- 马志珍, 张继红, 1997. 海产饵料微藻超低温保存技术的研究. 中国水产科学, 4(4): 13—17 [Ma Z Z, Zhang J H, 1997. Studies on ultralow temperature maintenance species technique of microalgae for mariculture. Journal of Fisheries Sciences of China, 4(4): 13—17].

- 王君晖, 边红武, 黄纯农, 1999. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 16(5): 582—586 [Wang J H, Bian H W, Huang C N, 1999. Advances in research on cryopreservation of plant materials by encapsulation-dehydration method. Chinese Bulletin of Botany, 16(5): 582—586]
- 王起华, 石若夫, 程爱华, 1999. 3 种饵料金藻超低温保存的研究. 中国水产科学, 6(2): 89—92 [Wang Q H, Shi R F, Cheng A H, 1999. Cryopreservation of 3 golden-brown algae (Chrysophyta) used as food in mariculture. Journal of Fishery Sciences of China, 6(2): 89—92]
- 王起华, 张恩栋, 李大鹏等, 2000a. 盐生杜氏藻和青岛大扁藻的超低温保存. 植物学报, 42(4): 399—402 [Wang Q H, Zhang E D, Li D P *et al*, 2000a. Cryopreservation of *Dunaliella salina* and *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*. Acta Botanica Sinica, 42(4): 399—402]
- 王起华, 刘明, 程爱华, 2000b. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 自由丝状体的胶囊化冰冻保存. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 23(4): 387—390 [Wang Q H, Liu M, Cheng A H, 2000b. Cryopreservation of the free living conchocelis of *Porphyra haitanensis* by encapsulation-dehydration. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition), 23(4): 387—390]
- 王起华, 张恩栋, 周春影, 2002. 藻类种质超低温保存研究概况. 植物学通报, 19(1): 21—29 [Wang Q H, Zhang E D, Zhou C Y, 2002. A survey of studies on the cryopreservation of algae germplasm. Chinese Bulletin of Botany, 19(1): 21—29]
- Canavate J P, Lubian L M, 1995. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. Aquaculture, 136: 277—290
- Day J G, Fenwick C, 1993. Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture. Aquaculture, 118: 151—160
- Day J G, Fleck R A, Benson E E, 2000. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. J Appl Phycol, 12: 369—377
- Fabre J, Dereudde J, 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. Cryo-Letters, 11: 413—426
- Hirata K, Phunchindawan M, Takamoto J *et al*, 1996. Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration. Cryo-Letters, 17: 321—328
- Jensen A, 1978. Chlorophylls and Carotenoids. In: Hellebust J A, Craigie J S ed. Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge, 61—64
- Li C, Loh C S, Sun W Q, 1999. An improved dehydration protocol for Cryopreservation of *Brassica napus* somatic embryos. Cryo-Lett, 20: 263—268
- Scottet C, Chevreau E, Godard N *et al*, 1992. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. Cryobiology, 29: 691—700
- Taylor R, Fletcher R L, 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae — a review of methodologies. J Appl Phycol, 10: 481—501
- Vigneron T, Arbault S, Kaas R, 1997. Cryopreservation of Gametophytes of *Laminaria digitata* (L) Lamourous by encapsulation dehydration. Cryo-Letters, 18: 93—98
- Withers L A, 1985. Cryopreservation of Cultured Plant Cells and Protoplasts. In: Kartha K K ed. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Inc Boca Raton, Florida, 256—258

CRYOPRESERVATION OF MARINE GOLDEN-BROWN ALGAE (CHRYSOPHYCEAE) USED AS AQUACULTURAL DIET BY ENCAPSULATION-DEHYDRATION

WANG Qi-Hua, LI He, ZHANG En-Dong, GAO Yan-Ping, LI Da-Peng

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

(Department of Biological Engineering, Dalian Nationalities University, Dalian, 116600)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Three golden-brown algae (Chrysophyceae), *Paulova viridis*, *Isodrysis zhanjiangensis* and *I. galbana* 3011 used as aquacultural diets, were preserved in liquid nitrogen using encapsulation-dehydration. Algal cells in the early stationary phase were used for cryopreservation. Harvested cells were encapsulated in 3% Ca-alginate beads with 30% NaCl, about 2 million cells in one bead. Beads were desiccated with silica gel then directly immersed in liquid nitrogen. Cell viability after thawing was evaluated by its chlorophyll content. The main factors influencing cell viability, such as dehydration rate, water content of beads, recovery methods after thawing, were studied. The results were as follows.

Effect of dehydration rate: Various dehydration rates were attained by regulating the weight of silica gel in Petri dishes. At different dehydration rates, all the three algae obtained highest viabilities at the dehydration rate of - 0.9% water content/h. Cell viability was low at either high or low dehydration rate. This is perhaps related to their own tolerance against desiccation and freezing. Some reports showed that several green algae also achieved high viability at the dehydration rate of - 0.9% water content/h using encapsulation-dehydration. It is possible that the dehydration rate of - 0.9% water content/h is common to many marine microalgae.

Effect of water content on cell viability: Water content of plant material is the key factor influencing cell viability using encapsulation-dehydration. For every alga species, the optimum water content of beads before being frozen is: *P. viridis* 35%, *I. zhanjiangensis* and *I. galbana* 3011, 30%. The highest viability of *P. viridis* reached 74.4% when it was dehydrated to its optimum water content. As for other two algae, their highest viabilities were 15.3% and 17.4% respectively. Some research on green algae reported 40% optimum water content. This research, however, showed the optimum range of water content for the three golden-brown algae is between 30% and 35%.

Effect of recovery methods after thawing: After thawing, three recovery methods were used before re-cultivation. The highest viability of *P. viridis* was obtained when beads were incubated in culture medium for 48h in darkness at 22°C. The other two algae, the optimum condition is in a gas phase with 75% relative humidity for 12h in darkness at 22°C. Various researches have shown that recovery methods depend on algae species.

In this study, cell cryopreservation viabilities of *P. viridis*, *I. zhanjiangensis* and *I. galbana* 3011 could reach a maximum of 74.4%, 15.3% and 17.4% respectively.

Key words Encapsulation-dehydration, Cryopreservation, Water content, Dehydration rate, Recovery method