

文章编号: 1674-7054(2012)03-0216-06

4株小球藻缺陷培养条件的优化 及藻株 CE14 的分子鉴定

邓晓东¹, 周玉娇¹, 费小雯²

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101;

2. 海南医学院 理学院, 海南 海口 571101)

摘要: 通过采集海口周边热带淡水水样, 用平板分离纯化法获得 158 株纯藻, 选择其中 4 株(CE1, CE14, CE18, CE31) 经初步鉴定的小球藻进行缺陷培养(HSM, HSM-N, HSM-S, HSM-P 4 种培养基培养) 及油脂含量测定, 结果显示: N 和 S 2 种元素缺乏对这 4 株小球藻生物量影响较大, 且使这 4 株小球藻的含油量显著高于在 HSM 培养基培养的含油量; P 元素的缺乏对这 4 株小球藻生物量影响较小, 仅使 CE1 和 CE18 的油脂含量显著上升。CE14 生长迅速, 油脂含量高, 其在 HSM-S 培养基中的油脂含量高于其他 3 种培养基, 占细胞干重的 86.55%。对 CE14 进行 18S rDNA 鉴定, 得出 CE14 藻株属于绿藻门, 绿藻纲, 绿球藻目, 小球藻科, 小球藻属, 与 *Chlorella vulgaris* 的 18S rDNA 基因的相似度为 99%。

关键词: 小球藻; 缺陷培养; 分子鉴定**中图分类号:** Q 93-335; Q 93-331**文献标志码:** A

由于石化燃料的不可再生性和由此带来的环境问题日益突出, 科学家们正努力寻找可替代的新能源。生物柴油由于其与现行的柴油发动机有较好的兼容性, 成为欧美等发达国家主要选择的再生能源。目前生物柴油主要来源于: 含油植物、废油和动物脂肪, 而这些来源生产的生物柴油远远不能满足现在燃料的需要^[1]。微藻由于具有种类多样、光合作用效率高、生物产量高、生长繁殖快、生长周期短和自身合成油脂能力强的有利特点而被许多学者认为是制备生物柴油最佳的原料之一^[2]。从单位面积年产量推算, 微藻是唯一的可满足现在燃料需求的生物柴油来源。小球藻(*Chlorella* spp.) 是一类普生性单细胞绿藻, 属于绿藻门(Chlorophyta), 绿藻纲(Chlorophyceae), 绿球藻目(Chlorococcales), 卵囊藻科(Oocystaceae), 小球藻属(*Chlorella*)。小球藻种类繁多, 生态类型多种多样, 淡水、海水中均有分布, 在人工培养基中亦能良好生长。目前已知的小球藻约 15 种, 含其变种可达数百种之多^[3-5]。在我国, 常见的小球藻种类为普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*) 和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)。小球藻光合效率高, 富含蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素、矿物质和色素等, 是一种重要的微藻资源^[6]。最近, 因其具有高含油量和快速生长的特性, 而成为生产生物柴油的重要藻株之一^[7]。小球藻因其株系和分离地不同, 含油量和生物量积累有所不同。本实验通过平板分离纯化法获得 158 株纯藻(采自海口周边热带淡水水域), 选择其中 4 株小球藻进行生物量和油脂含量测定, 以期通过培养基的优化得到最佳的产油条件和藻株。

1 材料与方法

1.1 藻种 小球藻(*Chlorella vulgaris*) CE1, CE14, CE18, CE31 采自海口周边热带淡水水域, 通过平板分离纯化方法获取。

收稿日期: 2012-07-01**基金项目:** 海南省工程技术研究中心专项(GCZX2011006、GCZX2012004); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBBZX0941)**作者简介:** 邓晓东(1967-), 男, 重庆人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所副研究员。**通信作者:** 费小雯, 海南医学院副教授. E-mail: feixw2000@hotmail.com

1.2 培养条件及生物量测定 挑取固体平板上培养的藻株至含有 1 mL ddH₂O 的 2 mL 离心管中,混合物用枪头吹打均匀,分别取适量接种于含有 50 mL HSM 和 HSM 缺陷培养基(表 1) 液体培养基的 100 mL 三角烧瓶中,置于恒温光照摇床中振荡培养,培养条件为: 25 ℃, 230 r · min⁻¹, 全光照,光照强度 50 ~ 110 μE · m⁻² · s⁻¹。小球藻培养至一定浓度后取样,用灭菌双蒸水进行 10 倍浓度梯度稀释,用酶标仪(BIO-TEK Elx800) 测定 490 nm 波长处各稀释样品的吸光值;同时取各稀释样品测定其干质量,并制作标准曲线。培养期间每 48 h 取样 1 次,用酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光值并依据标准曲线换算其生物量,每组实验设 3 个平行。

表 1 实验所用培养基配方

HSM	稀释标准溶液 / (mg · L ⁻¹)	- N	- P	- S
醋酸钠(水合物)	2000	2000	2000	2000
NH ₄ Cl	500	546.7(NaCl)	500	500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	20	20	20	16.5(MgCl ₂ · 6H ₂ O)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10	10	10	10
K ₂ HPO ₄	1440	1440	1234(KCl)	1440
KH ₂ PO ₄	720	720	163(KCl)	720
Trace	1 mL	1 mL (Trace-N)	1 mL	1 mL(Trace-S)

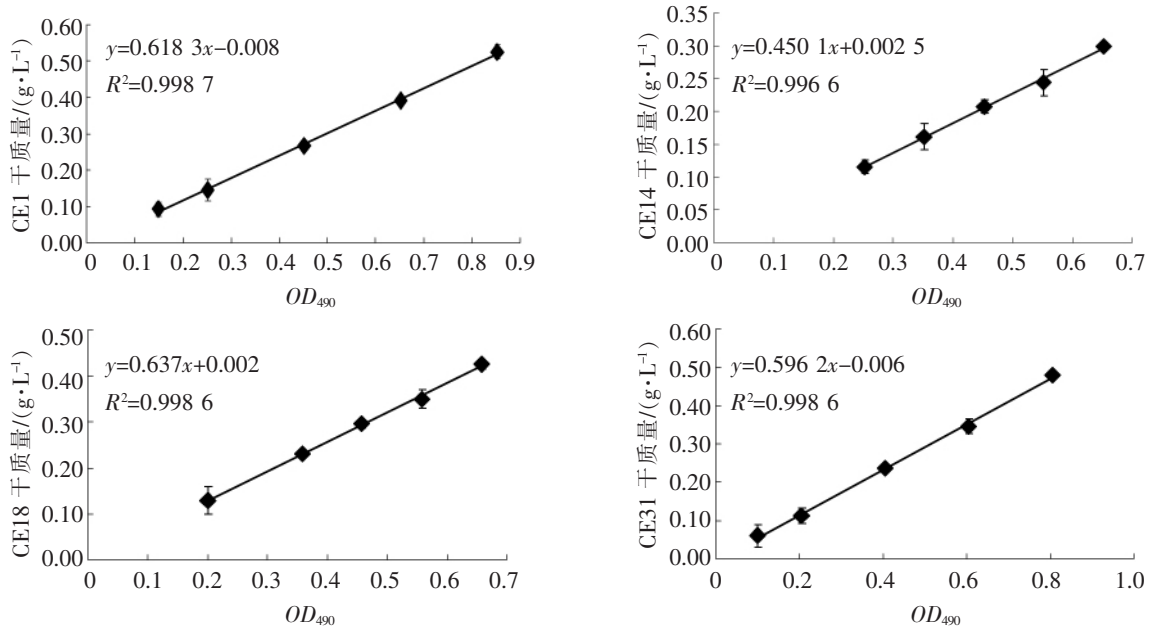
1.3 中性脂含量测定 自 Greenspan 等^[8] 提出采用尼罗红(9-diethylamino-5H-benzo [α] phenoxazine-5-one) 染色细胞,并用荧光法测定细胞内油脂含量以来,先后在多种生物中证明尼罗红染色后的细胞荧光强度与细胞内油脂含量呈显著相关。Chungang Gao 等^[9] 研究表明,小球藻经尼罗红染色后细胞荧光密度与细胞内油脂含量呈线性相关($R^2 = 0.9067$)。为此,笔者选用尼罗红染色细胞。在小球藻的培养期间,每 48 h 取 200 μL 藻液,加入 0.2 μL 0.1 g · L⁻¹ 尼罗红染料和 1.8 μL DMSO 孵育约 10 min,以 480 nm 为激发波长,575 nm 为消光波长,用荧光发光检测仪分别测定光密度值 A_1 和 A_2 ,并依据标准曲线换算成油脂含量,二者之差即为中性脂的吸收值。每组实验设 3 个平行。同时取样 10 μL 藻液,与 1 μL 0.1 g · L⁻¹ 尼罗红染料混合后制片,采用荧光显微镜(Nikon 80i),以 480 nm 为激发波长,570 nm 为消光波长的荧光滤镜观察细胞中脂滴的大小、数量与方位。以 Triolein(Sigma) 做为油脂标准品在相同测定条件下检测其光密度值,并制作油脂标准品标准曲线。

1.4 微藻藻种的分子鉴定 仅通过形态观察,只能对分离到的藻种进行简单的门、纲、目水平上的鉴定,为了达到属、种水平上的分类,笔者进行微藻的分子鉴定分析。采用改良 Glassbeeds 法提取微藻基因组 DNA,用 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,通过紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,并将 DNA 溶液稀释至 50 mg · L⁻¹ [10-11],然后,进行降落 PCR 反应。降落 PCR 反应程序为: ① 95 ℃ 预变性 4 min; ② 95 ℃ 变性 40 s, 68 ~ 58 ℃ 退火 40 s(每经历 1 个循环退火温度降低 1 ℃,当退火温度降为 58 ℃ 时再循环 20 次), 72 ℃ 延伸 20 s,共 30 个循环; ③ 72 ℃ 10 min; ④ 4 ℃, pause。最后,回收 PCR 产物测序。序列测定由上海生工生物技术有限公司完成。测序结果提交至 nucleotide blast 数据库,搜索同源序列,应用 ClustalX1. 83 软件进行多序列比对;通过 MEGA4. 1,以邻位相连法构建系统发育树 [12-13]。

2 结果与分析

2.1 4 株小球藻细胞干质量与 OD_{490} 的关系 从图 1 可见 4 株小球藻(CE1, CE14, CE18, CE31) 在波长 490 nm(经全波段扫描确定) 处的吸光度均与其干质量有良好的线性关系。这与文献 [4-15] 在 450 ~ 700 nm 波长下,小球藻细胞浓度与藻液吸光度之间均表现为极显著的线性相关的结果相似。

2.2 4 株小球藻油脂含量的检测结果 油脂与荧光密度的线性关系见图 2。图 2 表明, R^2 值为 0.9911, 油脂含量与荧光密度在一定范围内具有良好的线性关系。

图1 4株小球藻干质量与 OD_{490} 的线性关系图

4株小球藻 CE1, CE14, CE18, CE31 的生长曲线(见图3)表明,4株小球藻均以在 HSM 培养基中的生长情况为最佳,其次是在 HSM-P 培养基的生长情况,最次的是在 HSM-N 和 HSM-S 培养基的生长情况。可见对这4株小球藻来说,P元素的缺乏对它们的生长影响较小,N和S元素的缺乏对它们的生长影响较大。4株小球藻

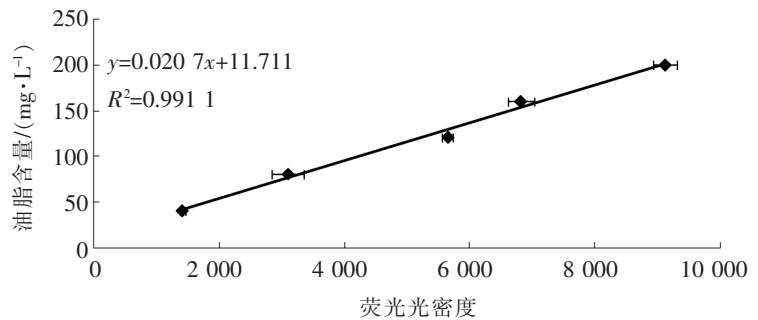


图2 荧光光密度与油脂含量的线性关系

CE1, CE14, CE18, CE31 在 HSM 培养基中的生物量最大值分别为 0.81, 0.49, 0.48, 0.75 $g \cdot L^{-1}$; CE14, CE18 的生物量显著低于 CE1 和 CE31; 4株小球藻在 HSM-P 培养基中的生物量与在 HSM 培养基中的生物量相似。在 HSM-N 和 HSM-S 培养基中,4株小球藻生物量没有明显差异。

4株小球藻的油脂积累情况见图4。结果表明,4株小球藻在 HSM 培养基中的油脂积累最少。经 SPSS 独立 T 检验分析,4株小球藻在 N、P、S 元素缺乏的 HSM 培养基中的油脂含量与在 HSM 培养基中的油脂含量相比,在培养 2, 4, 6, 8 d 后,均表现出极显著上升。CE1 和 CE31 在 HSM-N 和 HSM-S 培养基中的油脂含量比 HSM 培养基中的油脂含量显著增加。CE1 在 N 和 S 元素缺乏的 HSM 培养基中的油脂最大含量分别为: 58.22%, 67.05%; CE31 在 N 和 S 元素缺乏的 HSM 培养基中的油脂最大含量分别为: 47.49%, 63.84%。由此可见,N 和 S 元素缺乏对 CE1 和 CE31 的油脂积累有很大的影响。CE18 在 3 种元素(N、P、S)缺乏的 HSM 培养基中的油脂含量比在正常 HSM 培养基中的油脂含量显著上升,可见这 3 种元素的缺乏均对 CE18 的油脂积累产生很大影响,其中,在 HSM-N 培养基中的油脂含量最大值为 79.71%。CE14 在 HSM-S 培养基中的油脂含量均高于其他 3 种培养基的油脂含量,占细胞干质量的 86.55%(图5)。

2.3 18S rDNA 基因扩增与克隆 以 DNA 为模板,通过降落 PCR 方法,采用微藻通用简并引物,同时扩增到大小约为 800 bp 和 1 100 bp 的 2 条基因片段(图6),片段大小分别与预期的目标片段 16S rDNA 和 18S rDNA 片段大小一致。

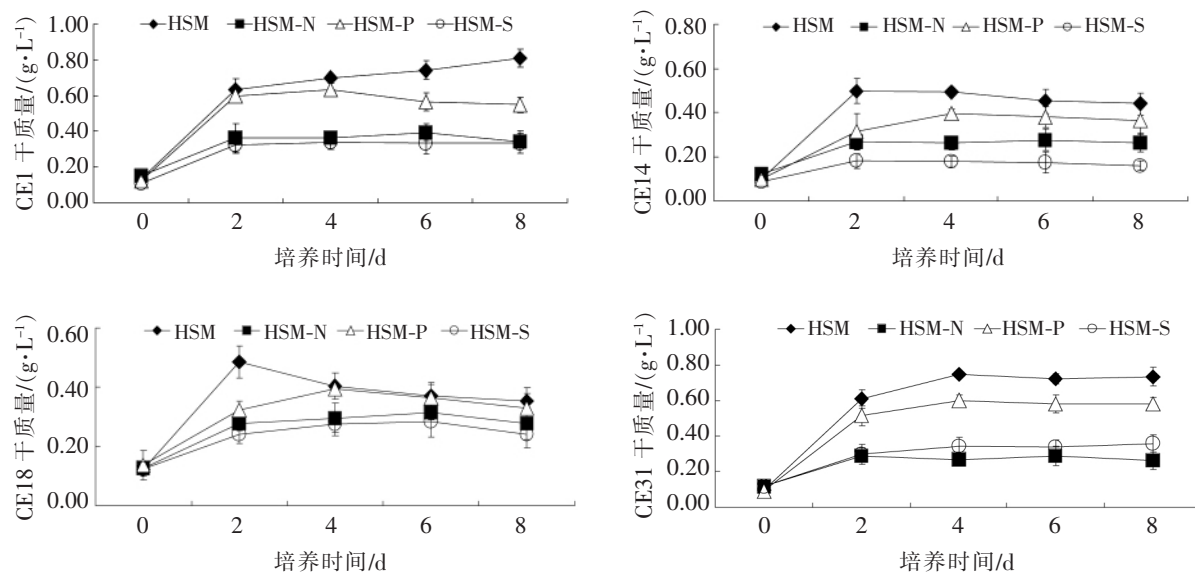


图3 4株小球藻在不同培养基的生长曲线

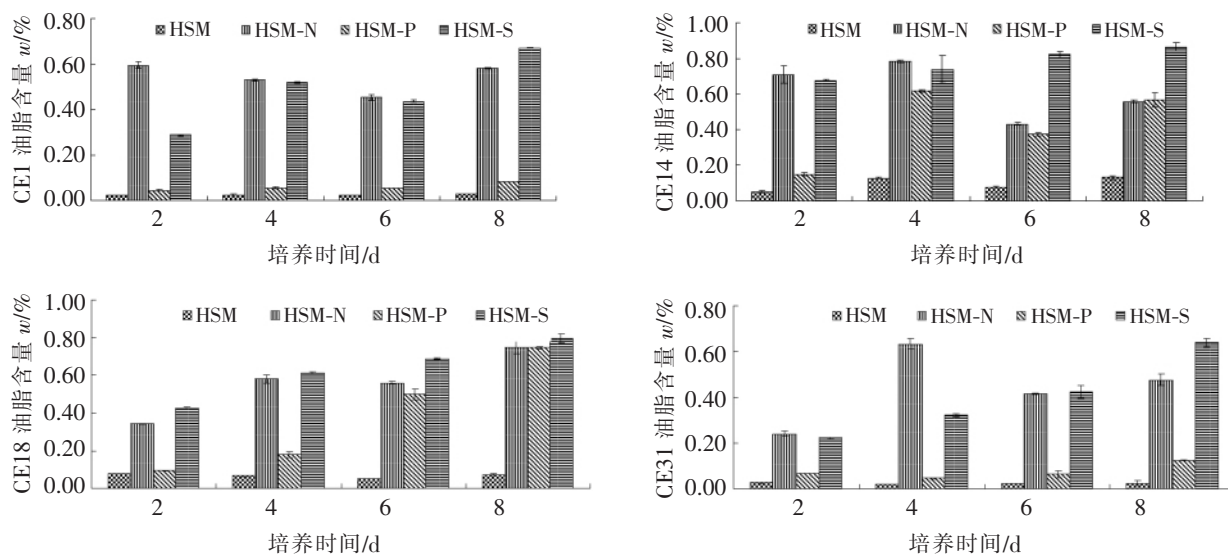


图4 4株小球藻在不同培养基的油脂积累

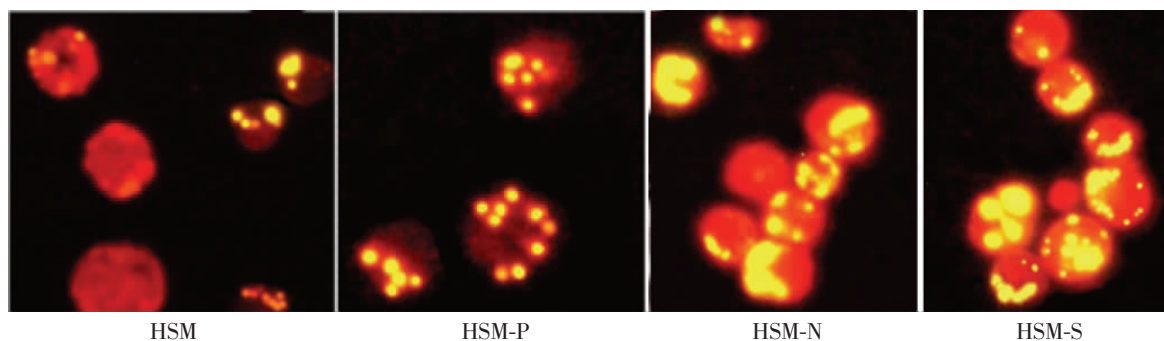


图5 小球藻 CE14 在 4 种培养基中培养 4 d 时的油脂荧光定性分析(图片倍数:10×40)

黄光荧光代表以三酰甘油为主的中性脂,可通过转酯化反应制备生物柴油;

橘红色荧光代表以磷脂为主的极性脂,主要参与膜的构成和代谢调控

2.4 18S rDNA 基因序列 对 CE14 藻株 18S rDNA 重组质粒进行测序,结果表明 18S rDNA 长片段长为 1 079 bp,将 CE14 藻株的 18S rDNA 基因部分片段与其同源序列进行进化树分析(图 7),结果表明:CE14 藻株属于绿藻门,绿藻纲,绿球藻目,小球藻科,小球藻属,与 *Chlorella vulgaris* 的 18S rDNA 基因的相似度为 99%。

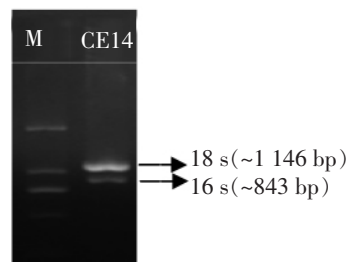


图 6 16S,18S rDNA 基因组 DNA 扩增图

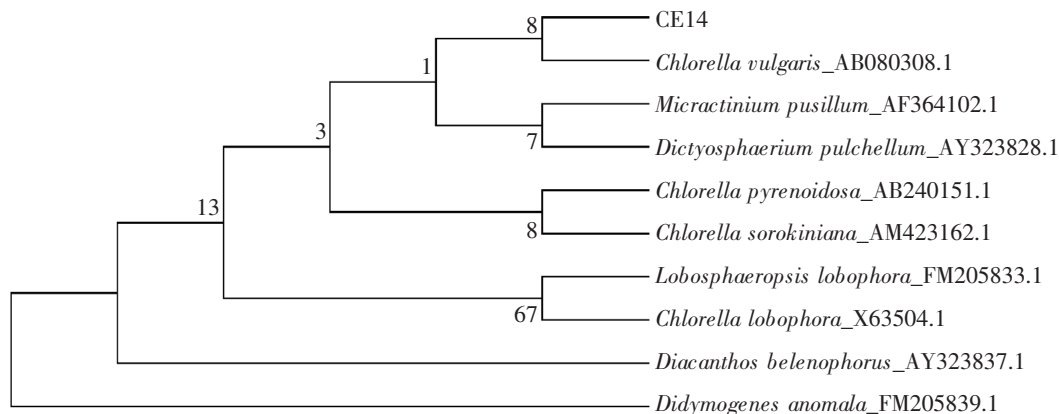


图 7 CE14 藻株 18S rDNA 系统树

3 讨 论

目前,微藻生物柴油整个产业链的研发还处于起步阶段,藻油的价格远远高于石油的价格,如何降低微藻生物柴油的成本是开发微藻能源的关键问题。藻株的产油能力以及培养条件的优化是降低微藻生物柴油生产的重要手段。本研究通过平板分离纯化 4 株小球藻,采用 HSM,HSM - N,HSM - S,HSM - P 4 种培养基培养。结果显示:N 和 S 2 种元素的缺乏对 4 株小球藻生物量影响较大,其诱导小球藻油脂的积累也十分明显;P 元素的缺乏对小球藻生物量影响较小,仅使 CE1 和 CE18 2 株小球藻油脂含量显著上升。CE14 生长迅速,油脂含量高,其在 HSM - S 培养基中的油脂含量最高,占细胞干质量的 86.55%。对 CE14 进行 18S rDNA 鉴定,得出 CE14 藻株属于绿藻门,绿藻纲,绿球藻目,小球藻科,小球藻属,是良好的生物柴油来源。

氮、硫、磷等营养元素对微藻脂肪含量有影响,氮源的种类以及氮的浓度对微藻生长与油脂积累的影响最关键^[6-17]。在氮不足的情况下,细胞的生长和细胞内各组分的合成都受到抑制,但细胞内的脂类保持着较高水平。氮源限制可以使细胞内的脂肪含量提高 2~3 倍^[18]。通过营养限制培养来提高微藻含油量已成为微藻生物能源的 1 种新手段。

参考文献:

- [1] YUSUF C. Biodiesel from microalgae [J]. Biotechnology Advances,2007,25:294-306.
- [2] 余杨. 基于生物柴油制备的海洋高脂微藻筛选 [D]. 厦门: 厦门大学,2009.
- [3] 胡开辉,汪世华. 小球藻的研究开发进展 [J]. 武汉工业学院学报,2005,24:27-30.
- [4] 单俊秀,张平,刘丽丽. 小球藻的应用研究进展 [J]. 应用科技,2010(1):233-233.
- [5] 杨桂娟,栾忠奇,周笑辉. 温度对小球藻生长量和溶氧量影响研究 [J]. 农机化研究,2009,(9):157-158.
- [6] 张学成,时艳侠,孟振. 小球藻紫外线诱变及高产藻株的筛选 [J]. 中国海洋大学学报,2007,37:749-753.
- [7] DENG X D, LI Y J, FEI X W. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel [J]. African Journal of Microbiology Research, 2009(3):1008-1014.

- [4] 刘志媛,王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程 [J]. 海洋科学,2008,37:56-59.
- [5] GAO C F, WEI X. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75:437-440.
- [6] MORGAN-KISS R M, IVANOV A G, MODLA S. Identity and physiology of a new psychrophilic eukaryotic green alga, *Chlorella* sp., strain BI, isolated from a transitory pond near Bratina Island Antarctica [J]. Extremophiles, 2008, 12:701-711.
- [7] YU Y, CHEN B, YOU W L. Identification of the alga known as Nannochloropsis Z-1 isolated from a prawn farm in Hainan, China as *Chlorella* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007,23:207-210.
- [8] MEI H, LUO W, LIU G X, et al. Phylogeny of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences [J]. Plant Systematics and Evolution, 2007,265:179-191.
- [9] ALBERGHINA J S, VIGNA M S, CONFALONIERI V A. Phylogenetic position of the Oedogoniales within the green algae (Chlorophyta) and the evolution of the absolute orientation of the flagellar apparatus [J]. Plant Systematics and Evolution, 2006,261:151-163.
- [10] 刘志媛,王广策,铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程 [J]. 海洋科学,2008,37:56-59.
- [11] 吕旭阳,张雯,杨阳,等. 分光光度法测定小球藻数量的方法研究 [J]. 安徽农业科学,2009,37:11104-11105.
- [12] 张学成,时艳侠,孟振. 小球藻紫外线诱变及高产藻株的筛选 [J]. 中国海洋大学学报,2007,37:749-753.
- [13] 黄瑞芳,刘广发,周韬,等. 耐高温巴氏杜氏藻突变株的诱变和鉴定 [J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006(2):272-275.
- [14] LAING L, UTTING S D. The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae [J]. Aquaculture,1980,21:79-86.

Optimal Culture of 4 *Chlorella* Strains and Molecular Identification of Alga Strain CE14

DENG Xiao-dong¹, ZHOU Yu-jiao¹, FEI Xiao-wen²

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Haikou 571101, China; 2. School of Natural Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571101, China)

Abstract: Energy crisis and environmental pollution have become increasingly prominent with the extensive use of fossil fuels, which is widely considered to be unsustainable. Biodiesel is a potential alternative to fossil fuels. Microalgae have been considered the most promising biodiesel sources. Microalgae were collected from tropical freshwater water sampled around Haikou, and 185 strains of pure algae were obtained by flat-panel separation. Of the strains four were preliminarily identified as *Chlorella* strains, CE1, CE14, CE18 and CE31, and were cultured on 4 different high salt minimal (HSM) media, HSM, HSM-N (N-deficient), HSM-S, and HSM-P. Their biomass and lipid content were determined. The cultural media deficient of N and S gave notable impact on biomass production of all the four *Chlorella* strains, and significantly increased their lipid contents as compared with the control. The cultural medium deficient of P had less influence on biomass production of the four *Chlorella* strains, but increased notably lipid contents of strains CE1 and CE18. The strain CE14 grew very fast and contained high lipid, and its lipid content was the highest when cultured under the medium HSM-S as against other three media and accounted for 86.55% of the cell dry weight. This strain was identified based on 18S rDNA sequencing and designated as the genus *Chlorella*, family Chlorellaceae, order Chlorococcales, class Chlorophyceae, division Chlorophyta, and its gene shared 99% similarity with the 18S rDNA gene of *Chlorella vulgaris*. CE14 is a promising potential alga source for production of biodiesel fuel.

Key words: *Chlorella*; element-deficient culture; molecular identification