

一株单针藻的筛选、鉴定及保藏

廖莎*, 孙启梅, 王鹏翔, 师文静, 李晓姝, 李澜鹏, 彭绍忠

(中国石油化工股份有限公司大连石油化工研究院, 辽宁大连116045)

摘要:从自然界中分离纯化出6株微藻,经过200 mL柱式光照反应器通气培养对微藻进行筛选,得到一株具有产油能力的优良藻株。实验结果表明,6株藻种油脂含量均在20%以上,生物量均超过1.2 g/L,其中SS6生长最快速,12 d进入稳定期,OD₆₈₉达到12.270 3,细胞干重达1.337 g/L,油脂含量达到30.1%,油脂产率达到25.9 mg/(L·d)。经18S rDNA鉴定,SS6藻株为*Monoraphidium komarkovae*。对比研究多种保藏方法,表明SS6在-18℃、20%甘油保护下可保藏1年以上,复苏后其生长和产油能力均能保持保藏前的状态。

关键词:微藻;筛选;生物量;油脂;18S rDNA;保藏

中图分类号:Q953

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)S-0181-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.S.039

Screening, identification and preservation of a microalgae strain

LIAO Sha*, SUN Qi-mei, WANG Peng-xiang, SHI Wen-jing, LI Xiao-shu,
LI Lan-peng, PENG Shao-zhong

(Dalian Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, Sinopec Corp., Dalian 116045, China)

Abstract: Six strains of microalgae are isolated and purified from the nature. Among them, an excellent oil producing strain is obtained through screening and cultivating microalgae strains in a 200 mL column photobioreactor. Experimental results show that the total liquid contents and dry weights of six strains of microalgae all exceed 20% and 1.2 g·L⁻¹, respectively. Among them, the strain SS6 grows the fastest and enters stable phase after 12 days in the photobioreactor. Its OD₆₈₉, biomass, grease contents and grease productivity reach 12.270 3, 1.337 g·L⁻¹, 30.1% and 25.9 mg/(L·d), respectively. Phylogenetic analysis by 18S rDNA identifies that SS6 is *Monoraphidium komarkovae*. By evaluating various preservation methods, it is found that SS6 can be stored for more than one year at -18℃ under the protection by glycerol (20% v/v). After recovery, its abilities in growth and oil production both can maintain the states before preservation.

Key words: microalgae; screening; amount of biomass; grease; 18S rDNA; preservation

随着化石燃料的日趋匮乏及其对环境的危害,加速研发洁净、高效、可再生的能源,改变能源结构,实现可持续发展势在必行。微藻是现今代谢工程领域最具潜力的原料生物质之一^[1]。

微藻学家把任何含有叶绿素a并且有单个叶状不能被分成根、茎、叶的有机体定义为藻类^[2]。由于微藻细胞内具有叶绿素、海胆蛋白等光合器官,是非常有效的光合作用生物系统,能高效地利用太阳能,并通过光合作用将H₂O、CO₂和无机盐转化为有机化合物,包括多糖、淀粉、油脂、蛋白及其他高附加值产品^[3-4]。微藻主要生活在水中,可以是淡水、海水或是半盐水,仅占用少量的土地资源,因其可以快速、高效地固定和利用CO₂,是解决热电厂等各类工厂大量排放CO₂、减少温室效应的有效途径之一。因此,同植物相比,微藻结构简单且基因可操作性强,是优质的细胞工厂,已经成为食品、医药、燃料、精细化工领域的重要材料来源^[5-6]。

从自然界中获得一株优良藻种耗时较长,不恰当的保藏方式容易导致藻种的退化和死亡,微藻的筛选、鉴定及保藏是一项重要的基础工作,对于微藻产业可持续发展至关重要。本研究提出一种从自然界中筛选微藻的方法,并成功获得一株具有产油性微藻,对其进行分子学水平的鉴定,并探索有益的保藏方法。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

水样采自自然界河流。DNA抽提试剂盒,购自上海生工;二乙酸荧光素(FDA),购自Sigma。

显微镜,徕卡公司;冷冻离心机,日本日立公司;冷冻干燥机,美国SIM公司;PCR仪,德国Eppendorf;微型生物反应器(BioLector),M2P-Labs;化学发光荧光凝胶成像系统,美国伯乐公司;紫外分光光度计,美国PE公司;恒温培养箱。

收稿日期:2020-04-01;修回日期:2020-06-28

基金项目:中国石化科技开发项目(214054)

作者简介:廖莎(1986-),女,硕士,工程师,研究方向为生物化工,通讯联系人,liaosha.fshy@sinopec.com。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集

水样采自松花江、珲春河、浑河等。刮取水中石块上的底栖微藻或水中的浮游微藻一起放入透明瓶中保存,得到藻液 1。

1.2.2 藻种的筛选

将藻液 1 用纱布过滤去掉水体中较大的沉淀物,取 100 mL 滤液转入 500 mL 三角摇瓶中,加入 100 mL BG11 培养基(组成见表 1^[7]),在恒温光照振荡摇床中进行富集培养。培养温度为 25℃,光照强度为 3 000 Lux,光暗时间比为 14:10,摇床转速为 120 r/min,培养至溶液呈现明显的绿色,得到藻液 2。

表 1 BG11 培养基

组分	含量/ (g·L ⁻¹)	A5+Co 溶液组分	含量/ (g·L ⁻¹)
NaNO ₃	1.5	H ₃ BO ₃	2.86
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04	MnCl ₂ ·H ₂ O	1.81
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
柠檬酸	0.006	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390
柠檬酸铁铵	0.006	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049
EDTA	0.001		
NaCO ₃	0.02		
A5+Co 溶液	1 mL		

通过稀释涂布和平板划线对藻液 2 进行分离纯化。藻液 2 梯度稀释 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 及 10⁻⁴ 倍,用移液器移取 1~2 滴稀释藻液于琼脂的边缘,均匀涂于平板的琼脂表面,用封口膜密封,在恒温光照培养箱中进行培养,培养温度为 25℃,光照强度为 3 000 Lux,光暗时间比为 14:10。培养到长出单菌落后挑取单克隆进行平板划线,重复多次直至得到纯种。

将得到的纯种分别接入实验室柱式光照反应器中,装液量为 200 mL,培养基采用 BG11,培养温度 25~28℃,光照强度为 5 000 Lux,光暗比为 14:10,通入空气量为 0.5 L/min,通过 CO₂ 来调节培养液的 pH,培养至稳定期后沉淀离心收集藻液,评价干重和总脂含量。

1.3 藻种的鉴定

1.3.1 藻细胞基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取基因组总 DNA^[8]。

1.3.2 藻株 18S rDNA 扩增及回收

以藻细胞基因组 DNA 为模板,通过引物 18S-1:5'-tggttgatcctgccagtagtc-3'和 18S-2:5'-tgatcctct-

gcaggttcacc-3'进行 PCR 扩增^[8]。50 μL 的 PCR 反应体系包括:10×Taq buffer 5 μL、MgCl₂ 4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1 μL、5 U/μL 的 ExTaq 酶(Fermentas) 0.5 μL、引物各 500 pmol、1 μL 基因组 DNA。PCR 反应过程为:94℃ 预变性 6 min,接下来是 30 个循环(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2.5 min),最后是 72℃ 延伸 10 min。扩增得到的 PCR 产物用电泳检测扩增得到目的片段后再用电泳分离,回收纯化目的片段。

1.3.3 回收 18S rDNA 片段的连接及转化

连接反应体系为 10 μL,包括 5 μL 连接缓冲液、4.5 μL 回收的 DNA 片段、0.5 μL 的 pMD18-T 载体^[9]。均匀混合后放置于 15℃ 连接 1 h 以上。参照《分子克隆实验指南》制备 DH5α 感受态细胞;取 5 μL 连接产物加入 50 μL 感受态细胞中,冰浴 20~30 min;然后放入 42℃ 水浴锅中热击细胞 90 s;快速将细胞转入冰水混合物中冷浴 2 min,随后加入 1 mL LB 培养基,37℃ 摇床(160 r/min)中培养 40 min 复苏细胞;6 000 r/min 离心 1 min 收集细胞,倾去部分上清液,用移液器将剩余的约 100 μL LB 培养液混合均匀,重悬细胞;将混合好的细胞涂布于含 50 mg/mL 氨苄的 LB 固体平板上,37℃ 倒置培养过夜(大概 14~16 h)^[10]。

1.3.4 阳性克隆检测和测序

用灭菌的牙签挑取大而圆的菌落划线,用牙签挑取少许菌落沾入 PCR 体系中作为模板,用引物 18S-1:5'-tggttgatcctgccagtagtc-3'和 18S-2:5'-tgatcctctcttgatcctgccaggttcacc-3'进行 PCR 扩增。反应后取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,然后在紫外凝胶扫描分析系统中检测阳性克隆。选择 3 个阳性克隆送至上海生工生物科技有限公司测序。

1.4 藻种的保藏

取 30 mL 藻种至新鲜 BG11 培养基(50 mL 三角瓶装),正常光照条件下培养至较高密度。考察采用传代保藏、冷冻保藏及固定化对藻种 SS6 的保藏效果。

1.4.1 固体/液体保藏

藻液平板划线于琼脂培养基上,长出菌落后转移至弱光照(500~1 000 Lux)条件下,保藏温度为 5、10、15、25℃;培养好的 SS6 藻液转移至弱光照(500~1 000 Lux)条件下,保藏温度为 5、10、15、25℃,传代保藏。

1.4.2 冷冻保藏

藻液经离心(4 000 r/min,3 min)、去离子水洗

两次后,加入新鲜培养基重悬,取出部分微藻加入10%~50%的保护剂,放置于-18℃,进行冷冻保藏。保藏3、6、9个月及1年后取出SS6,解冻、摇匀、离心,用生理盐水洗两次去除保护剂后,一部分进行FDA染色检测存活率,一部分接种到新鲜培养基进行静置培养。

1.4.3 固定化保藏

称取2.5 g海藻酸钠溶于100 mL蒸馏水中,加热搅拌至呈黏稠状胶体时停止加热,放置过夜,使凝胶性质稳定^[11]。将藻液与质量分数2.5%的凝胶按照质量分数1:4比例充分混匀,制成胶-藻混悬液,取50 mL注射器吸取混悬液匀速挤入质量分数2%的CaCl₂溶液中,边挤边摇动。完成后,静置30 min。将CaCl₂溶液倒出,并用无菌水将固定化的藻珠冲洗2遍,然后将洗干净的藻珠分别置于装有水、藻种培养基和琼脂凝胶的三角瓶中,置于室温下,自然光照保藏。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量

生物量采用Lambda45 UV/VIS Spectromete在689 nm处检测吸光度(OD₆₈₉)。细胞干重的测定:量取4 mL藻液,7 000 r/min离心5 min,用去离子水洗涤2次,置于80℃烘箱烘至恒重,取两个测量误差在±10%平行样的平均值。

1.5.2 油脂含量

采用乙酸乙酯正己烷法测定总脂含量^[12]。称量干燥的藻粉100 mg左右(质量计为*m*),放入瓷研钵中,加入适量石英砂和液氮,待液氮挥发后,研磨破壁,放入离心管。加入体积比为1的乙酸乙酯和正己烷混合有机溶剂,用超声清洗仪处理20 min,50℃恒温水浴中提取45 min。提取后离心15 min,收集上清液至离心管中。提取液中加入等体积的蒸馏水,振荡混匀后离心4 min,收集上层有机相至已烘干的玻璃试管中,玻璃管净重为*W*₀(mg)。80℃水浴蒸发玻璃试管中的溶剂后再于80℃烘箱烘干至恒重,质量为*W*₁(mg)。计算藻细胞的总脂含量为*C*(%)=100×(*W*₁-*W*₀)/*m*。

1.5.3 细胞存活率

将4.16 mg FDA溶于10 mL丙酮中配制母液(1 mmol),放置于-18℃冰箱中保存^[13]。取新鲜藻液离心,用无菌去离子水清洗1~2次,用去离子水悬浮细胞(测重悬后细胞浓度)。取5 mL上述稀释的藻液,加入60 μmol FDA,振荡、混合均匀进行荧光染色,用锡箔纸包好保证避光放置30 min,染色期

间保持每5 min振荡一次,确保染色效果。染色结束后取样点在48孔荧光分析用黑板上,置于BioLector检测525 nm下的荧光值(FDA激发波长为480 nm),至少2个平行样。根据以下公式计算相对细胞活力:

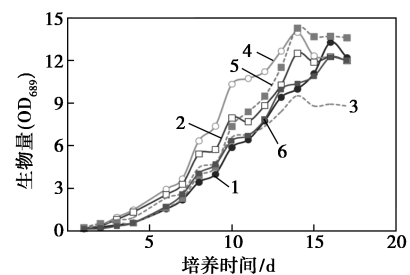
$$\text{相对细胞活力}(\%) = (\text{处理组保藏后稀释液的荧光值} / \text{对照细胞悬液的荧光值}) \times 100\% \quad (\text{OD}_{689} \geq 5.0) \quad (1)$$

$$\text{相对细胞活力}(\%) = (\text{处理组保藏后稀释液的荧光值} / \text{OD}) / (\text{对照细胞悬液的荧光值} / \text{OD}) \times 100\% \quad (\text{OD}_{689} < 5.0) \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 藻株的培养与鉴定

经过分离纯化得到6株藻种,经摇瓶培养至高密度后,以5%的接种量接种至柱式光生物反应器进行进一步培养评价,培养至稳定期,如图1所示。可以看出,藻种前4 d表现出生长缓慢,第5 d生长快速。对比6株藻种,SS6生长最快,第9 d生长减缓,12 d进入稳定期,OD₆₈₉最高达到12.270 3。从生长曲线看,SHJ3和SS5生长较其他藻种缓慢,Y4生物量最低。培养结束后对干物质进行统计分析,藻种的生物量及油脂含量见表2。6株藻种油脂含量均超过20%,生物量均大于1.2 g/L,其中HCS1干重最大,但油脂含量最低。SHJ3和SS6油脂含量相对较高,而SS6油脂产率最大,达25.904 8 mg/(L·d),是具有产油潜力的藻株。



1—SS5;2—HCS1;3—Y4;4—SS6;5—MH2;6—SHJ3

图1 筛选藻种的生长曲线

表2 藻种生物量及油脂含量

藻种	油脂含量/%	干重/(g·L ⁻¹)	油脂产率/(mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
HCS1	20.6	1.8305	23.63322
MH2	23.1	1.7080	24.70772
SHJ3	30.2	1.2630	23.84172
Y4	24.0	1.3605	20.41409
SS5	25.5	1.2310	19.63077
SS6	30.1	1.3770	25.90481

对SS6进行细胞生物学鉴定,在100倍显微镜下观察,细胞呈纺锤形,末端尖细,短轴约3 μm,长

轴约 60 μm,如图 2 所示。提取 SS6 基因组 DNA,利用通用引物进行 PCR 扩增,得到目的条带,序列长度为 1 418 bp。测定 SS6 的 18S 基因片段,运用 NCBI 数据库中的 BLAST 工具进行序列比对,获得目标同源序列。然后运用 Clustal W 对获得的同源序列进行多重比对,比对结果使用 MEGA7.0 软件,基于最大似然算法,选 1 000 次重复的 bootstrap 进行分析,构建系统发育树,结果如图 3 所示。从图中可以看出,藻种 SS6 的 18S 基因与数据库中已有的 *Monoraphidium* 属的一个菌株聚集在同一个分支上,表明其间亲缘关系最近。从基因的序列比对结果可以发现,所测的 18S 基因与 *Monoraphidium komarkovae voucher CCMA UFSCar353* 的同源性高达 99.86%。经显微镜观察形态特征及测序结果鉴定,藻种 SS6 为 *Monoraphidium komarkovae*,即为单针藻属。

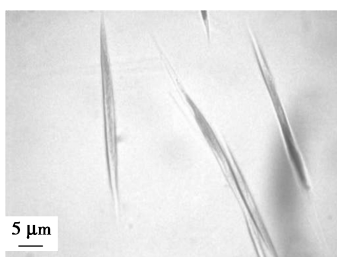


图 2 SS6 藻种的鉴定

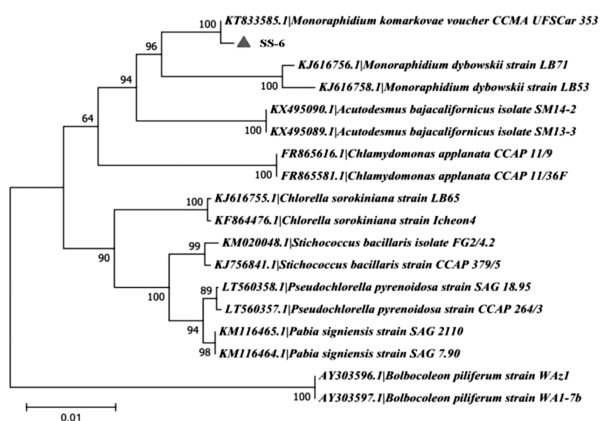


图 3 SS6 18S rDNA 序列系统发育树

2.2 SS6 保藏方法的考察

2.2.1 固体/液体保藏

将 SS6 藻液置于 5、10、15 和 25℃ 光照培养箱中,光暗比 14:10,保藏 1 个月 后测定其细胞相对活性,见表 3。SS6 藻液在不添加任何保护剂的情况下,不同温度放置 1 个月同对照组相比,活性值接近或大于 1,表明该微藻有生长,且藻液外观基本保持绿色,无结块。5℃ 保藏微藻相对活性较好,表明低温在一定程度上可以减缓藻细胞的生长代谢,将其

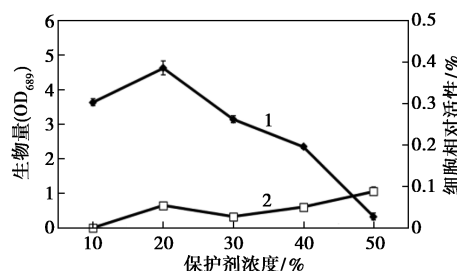
继续保藏至 3 个月时发现藻液开始变黄且有部分结块,确定液体传代保藏时间为 1~3 个月传代一次。SS6 涂布固体平板于 5℃ 保藏 6 个月时,微藻呈现绿色,挑取单菌落培养后细胞相对活力为 1.439,说明细胞生长状态良好;固体保藏到 9 个月时,微藻呈黄色,挑取进行液体培养时有明显结块或絮状,细胞相对活性为 0.190。因此,确定固体传代保藏时间为 6 个月左右传代一次。对传代 1 年的 SS6 通气复苏培养,其油脂含量为 31.30%,表明该方法 SS6 可以保藏 1 年以上。

表 3 不同温度下 SS6 细胞活力比较

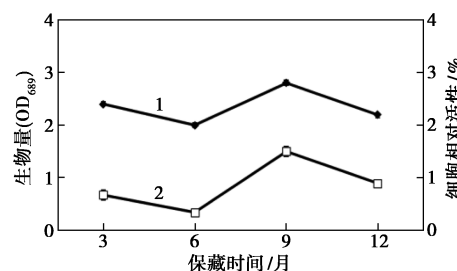
温度/℃	对照	5	10	15	25
细胞相对活力/%	1	1.6±0.02	1.2±0.1	0.8±0.05	0.84±0.02

2.2.2 冷冻保藏

文献[14]表明,影响冷冻保藏效果的因素有抗冻保护剂种类、用量和解冻方法等。甘油常用于菌种的保藏,本文采用甘油做保护剂在 -18℃ 保藏 SS6,考察其最佳保护浓度,效果如图 4(a)所示。从细胞存活率看,保护剂浓度为 20% 对微藻的保护效果较好;对比冷冻保藏后的 SS6 解冻复苏,保护剂浓度 20% 复苏效果最好。甘油属于渗透性保护剂,容易进入细胞内结合水分,产生水合作用,增加溶液黏性,弱化水结晶,起到一定的保护效果。但甘油浓度过高会有一些的毒性。采用 20% 的甘油冷冻保藏 SS6 3、6、9 个月及 1 年,效果如图 4(b)所示。在保护



(a) 保护剂浓度与保藏效果的关系



(b) 保藏时间与保藏效果的关系

1—复苏后生物量;2—冷冻后存活率

图 4 冷冻保藏效果

剂作用下,SS6 保藏一年仍然有存活,且摇瓶复苏后生长状态良好,生物量为 2.201 0。经通气培养油脂含量为 31.14%,表明 SS6 可经冷冻保藏 1 年以上。

2.2.3 固定化保藏

将微藻细胞固定到凝胶内,在一定程度上可以减少外界环境对微藻产生的影响,形成一种保护。为了维持藻株的水分,将成型的固定化藻胶保藏到无菌水、固体培养基、液体培养基和 10% 甘油保藏介质中,置于低温弱光条件下。保藏一个月后观察藻株外观,未溶解。用 4% (质量分数) 的柠檬酸钠溶液解固,5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用无菌水洗涤,重复上述离心过程。完成后对微藻进行复苏,将藻体接入装有 100 mL 生长培养基的锥形瓶(250 mL)中,置于人工气候箱,25~30℃、光照 7 000~10 000 Lux、光周期 14:10 条件下培养至稳定。SS6 固定化保藏效果见表 4。从复苏生物量和细胞相对活性看,SS6 经固定化保藏 1 个月,5 种保藏状态微藻都有存活,但置于液体培养基中由于固定化细胞内外存在一定渗透压,导致部分藻胶提前渗漏,因此藻胶置于固体培养基中保藏效果最佳。但在保藏到 3 个月时观察藻株,大部分溶解,渗液严重。

表 4 微藻固定化保藏效果

保藏介质	OD ₆₈₉	干重/(g·L ⁻¹)	相对细胞活力/%
0	3.000	0.60	0.2501
W	3.175	0.80	0.3414
G	2.230	0.63	0.4010
S	3.820	0.82	0.5210
L	2.920	0.73	0.3914

注:0 为保藏前;W 为无菌水;G 为 10% 甘油;S 为固体培养基;L 为液体培养基。

对比以上几种藻种 SS6 的保藏方法表明,固体/液体保藏的优势在于不需要保护剂,但过程繁琐,需要短期内不断传代,且在传代过程中容易发生污染和变异;固定化保藏 1 个月内可以很好地维持微藻原有的特性且不易染菌,但程序复杂,大多数微藻在培养后期会从胶珠中溢出,且保藏时间短;冷冻保藏法操作简单,能够保持微藻的遗传稳定性,便于长期保存,还能最大限度地减少污染,但不同微藻所使用的保护剂种类和浓度有差异,会影响其广泛使用。

3 结论

(1) 形成一套从自然界筛选藻种的方法并成

功获得一株含油微藻 SS6,经显微镜观察其形态特征及分子生物学鉴定,该藻种为 *Monoraphidium komarkovae*,油脂含量可达 30% 以上,油脂产率达 25.904 8 mg/(L·d)。

(2) 对比研究了多种保藏藻种 SS6 的方法。低温光照条件下,藻种 SS6 在无需添加保护剂的情况下,液体保藏需要 1~3 个月传代,固体保藏需要 6 个月左右传代;在-18℃、20% 甘油保护下,SS6 可保藏 1 年以上再复活传代。3 种方式复苏后微藻的生长指标仍然能恢复到保藏前的状态。

参考文献

- [1] 郑艺,王志鹏,蒋振雄,等.微藻生物燃料及高价值产物的代谢研究进展[J].中国科学:生命科学,2019,49(6):717-726.
- [2] Hemaiswarya S,Raja R,Ravi-Kumar R,et al.Microalgae: Asustainable feed source for aquaculture[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2011,27:1737-1746.
- [3] 朱顺妮,刘芬,樊均辉,等.微藻生物能源及研究现状[J].新能源进展,2018,12(6):467-473.
- [4] Vilem Z,Irena B.Starch overproduction by means of algae[J].Algal Biorefineries,2014,4:217-240.
- [5] 谢雅清,郁彬琦,靳翠丽,等.微藻规模化培养与生物能源开发[J].现代化工,2019,39(8):27-32.
- [6] 贺立燕,韩笑天,俞志明.基于熵权的产生物柴油微藻开发潜力评价[J].海洋与湖沼,2015,3(2):305-310.
- [7] Li G, Ji F, Xiang S, et al. Analytical study on pyrolyzed products of *Desmodesmus* sp. cultivated in BG11 [J]. International Journal of Agricultural & Biological, 2017, 5. DOI: 10.3965/j.ijabe.20171003.2942.
- [8] Scott O, Bendich A. Extraction of DNA from plant tissue [J]. Plant Molecular Biology Manual, 1988, 6: 1-10.
- [9] David W R, Joseph S. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor, 2001.
- [10] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and applications [M]. Amsterdam: Academic Press, 1990: 315-322.
- [11] 张睿钦,管斌,孔青,等.雨生红球藻保藏方法的研究[J].海洋湖沼通报,2012,(4):72-78.
- [12] 朱义平,宋东辉,杨国兰,等.不同氮源对异养小球藻生物量和油脂积累的影响[J].水生生物学报,2012,36(6):1027-1034.
- [13] Regel R H, Ferris J M, Ganf G G, et al. Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 59: 209-223.
- [14] Tzovenis I, Triantaphyllidis G, Naihong X, et al. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain [J]. Aquaculture, 2004, 230: 457-473. ■