

小球藻和盐藻利用石油烃富集油脂的研究

梁译之 范禹辰 高 杨 宁淑香 李铁松*

(辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081)

摘要 利用单细胞分离和紫外诱变技术分别获得海水小球藻和盐生杜氏藻的生长优势株, 将其分别接种于不同石油浓度的海水培养液中, 利用紫外和荧光分光光度法分别测定培养液中带共轭双键的烃类化合物和芳烃的含量, 利用索氏提取法测定胞内油脂含量。结果表明, 石油浓度为 1.5~10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的培养液中, 小球藻和盐藻均能有效降解带共轭双键的烃类化合物, 降解率分别为 25.3%~35.5% 和 17.9%~24.0%, 芳烃降解率分别为 22.1%~30.2% 和 18.7%~26.2%; 石油浓度为 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 时, 两种微藻对带共轭双键的烃类化合物和芳烃的降解效率均最大, 小球藻的降解能力略好于盐藻; 石油浓度为 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 时, 两种微藻的胞内油脂含量分别占细胞干重的 14.0% 和 25.5%, 分别是对照组的 1.5 倍和 1.2 倍, 浓度为 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 时两种微藻的胞内油脂含量均最高。该研究为利用石油污染海水培养微藻使其富集油脂及今后开发微藻燃料奠定了基础。

关键词 海水小球藻 盐藻 紫外诱变 石油烃 油脂

中图分类号 TE667 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0098-06

Lipid enrichment of *Chlorella* sp. and *Dunaliella salina* by degradation of petroleum hydrocarbons

LIANG Yi-zhi FAN Yu-chen GAO Yang NING Shu-xiang LI Tie-song*

(College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116081)

ABSTRACT This study aims to investigate the possibility of using marine microalgae (green microalgae) to degrade petroleum hydrocarbons and converse them into lipids in cells. Rapid growth strains of *Chlorella* sp. and *Dunaliella salina* were obtained by single separation technology and ultraviolet mutation breeding techniques. The mutagenesis dominant strains were then cultured in oily seawater with different oil concentrations. The contents of conjugated hydrocarbon compounds and petroleum aromatic hydrocarbons were determined respectively by UV spectrophotometry and fluorescence spectrophotometry. The lipid content of the microalgae cells was measured by the Soxhlet extraction method. The results showed that *Chlorella* and *D. salina* were able to degrade petroleum hydrocarbons effectively at oil concentrations of 1.5~10.0 $\mu\text{g/ml}$. The degradation rates of conjugated hydrocarbon compounds were 25.3%~39.5%

辽宁省教育厅科技基金(2008A350)、辽宁师范大学博士启动基金(海洋微藻降解利用石油烃的研究)和辽宁师范大学本科生创新基金(海洋微藻深度处理石油污染海水的研究)共同资助

* 通讯作者。E-mail: sally_ts_Li@163.com

收稿日期: 2012-08-21; 接受日期: 2012-12-04

作者简介: 梁译之(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋藻类环境生物技术的研究。E-mail: liang_yizhi@126.com, Tel: 18641735699

and 17.9%~24.0%, respectively, while the degradation rates of petroleum aromatic hydrocarbons were 18.7%~26.2% and 22.1%~30.2%, respectively. Degradation rates for both petroleum hydrocarbons were the highest at oil concentration of 3.5 μ g/ml, and the performance of *Chlorella* was slightly better than *D. salina*. The lipid contents of the algal cells were 1.2 and 1.5 folds of the control when cultured in oily seawater at oil concentrations of 1.5 μ g/ml and 3.5 μ g/ml, and the lipid content of the algal cells was the highest for the latter.

KEY WORDS *Chlorella* sp. *Dunaliella salina* UV-irradiated
Petroleum hydrocarbons Lipid

2010年 Wijffels 和 Barbosa 在《Science》上发表文章,认为微藻燃料是最具价值的生物燃料,未来 10~15 年将进入迅速发展期。海洋微藻燃料作为最具发展前景的第三代生物燃料有着独特优势,如微藻可利用海水和滩涂进行大规模培养,不与人争粮、与粮争地,生长快速,产油率高出大豆近 10 倍;油脂燃烧效率高,污染低 (Rene *et al.* 2010)。20 世纪 80 年代美国率先开展了微藻燃料研究,筛选了 3 000 多种微藻,从中选取 300 余种用于提取可燃性油脂,结果表明绿藻门的海洋微藻油脂含量高,最具开发价值(宋东辉等 2008)。海水小球藻 *Chlorella* sp. 和盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 均属于绿藻门,且具有生长快速、易于培养、富含油脂等优点(许 宾等 2011;陶永华等 2006)。我国在微藻燃料研究方面起步较晚,有诸多领域值得深入研究。利用微藻处理各种废水的研究国内外已有很多报道(Wang *et al.* 2007;Chisti 2008;Hossain *et al.* 2008),但对海洋微藻降解利用海水中石油烃进行培养的研究却罕见报道。若能将海洋石油污染的生物修复与对修复生物利用相结合,变废为宝,将会对社会和人类带来巨大效益,迄今这方面的研究国内外还未见报道。本研究试图找到能降解利用石油烃的藻株,为将其开发成既能深度修复石油污染海水,又能通过大规模培养技术成为优良的微藻燃料而进行探索。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

海水小球藻 *Chlorella* sp. 和盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 由辽宁省海洋科学研究院提供,并经本实验室分离纯化除菌得到纯藻种。海水于 2010 年 7 月采自大连金石滩海域,经粗滤、高压灭菌后使用。培养液 F/2 成分见 Borowitzka(1998),培养周期为 15d。开始实验时间为 2010 年 9 月。

1.2 主要仪器、药品和试剂

SPX-250B-G 微电脑光照培养箱(上海托莫斯科学仪器有限公司),UV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),RF540 荧光分光光度计(日本 Shimadzu),CH-20BIM 光学显微镜(日本 OLYMPUS)。药品和试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 培养条件

微藻培养在恒温光照培养箱中进行,温度 23 \pm 1 $^{\circ}$ C,冷白光,光强 3 000 lx,光周期 12/12(光照/黑暗),液体培养每天定时人工摇动两次,每次相反方向各 1min。

1.3.2 藻体计数

采用分光光度法,小球藻和盐藻分别在 640nm(郑旭龙 2006)和 450nm(郭金耀等 2007)测量 OD 值(对诱变后微藻进行分光光度计连续波长扫描,其特异性光吸收值与原藻种基本一致)。同时用 0.1ml 血球计数板在光学显微镜下进行细胞计数,得到 OD 值与细胞密度之间的关系方程为:小球藻 $y=0.0269x+0.0310$,

$R^2=0.9972$; 盐藻 $y=0.1474x-0.0745$, $R^2=0.9900$, 其中 y 为细胞密度($\times 10^6$ 个/ml), x 为 OD 值。

1.3.3 单细胞分离及微藻的接种、培养

单细胞分离采用华栋等(1998)的方法, 接种密度分别为小球藻: $0.55 \times 10^6 \sim 0.59 \times 10^6$ 个细胞/ml, 盐藻 $0.42 \times 10^6 \sim 0.45 \times 10^6$ 个细胞/ml, 生长速率计算公式(刘青等 2006)为: $V_t = (N_t - N_0)/t$, 其中 N_0 为初始接种密度(个细胞/ml), N_t 为培养第 t 天的细胞密度(个细胞/ml), t 为培养天数。

1.3.4 紫外诱变、紫外诱变和优势株的筛选

分别取 5ml 对数生长期的藻液均匀铺于培养皿中, 细胞密度分别为小球藻 0.59×10^6 个细胞/ml 和盐藻 0.45×10^6 个细胞/ml, 在距离为 15cm 的 60W 紫外灯下照射, 照射时间分别为 0、1、2、5、10、20、30min, 之后黑暗培养 5h, 在光学显微镜下观察并通过血球计数法测量细胞存活率(%), 每组设 3 个平行。依据诱变确定的最佳照射时间, 分别对经过单细胞分离和筛选的两种藻株的藻液进行紫外诱变, 每组设 3 个平行。照射后将藻液分别转移到盛有 15ml 培养液的 50ml 三角瓶中, 培养第 4 天将藻液分别涂于固体培养基上, 每个平行涂 3 个板。培养第 12 天, 每种藻分别从平板中挑取 5 株体积大、颜色浓绿的诱变优势株进行单克隆培养, 测量生长曲线, 培养第 15 天分析生化成分, 未诱变原始藻设为对照。

1.3.5 生化成分分析

取藻液 10ml, 3 000r/min 离心 10min, 分别收集藻泥和上清液测定藻体胞内和胞外蛋白质及多糖的含量。蛋白质含量的测定采用双缩脲法(刘邻涓等 2004), 多糖含量的测定采用蒽酮比色法(邹峥嵘等 2007)。通过标准蛋白绘制标准曲线, 得回归方程为: $y=1.1057x-0.0356$, $R^2=0.996$, 其中 y 为吸光度, x 为蛋白含量(mg/L)。通过葡萄糖绘制标准曲线, 得回归方程: $y=0.7619x+0.1676$, $R^2=0.9887$, 其中 y 为吸光度, x 为多糖含量(mg/L)。叶绿素与 β -胡萝卜素含量的测定方法见戴荣继等(2004)。

1.3.6 石油醚脱芳

将层析用硅胶和中性层析氧化铝在 120℃ 下活化 2h。然后趁温热装入 4cm \times 50cm(内径 \times 柱长)的玻璃层析柱中, 装柱下层硅胶高 12cm, 上层氧化铝高 1cm, 将 60~90℃ 石油醚通过此柱, 脱芳后的石油醚收集于细口瓶中。取脱芳石油醚于 1cm 石英比色杯中, 在紫外分光光度计上, 重蒸馏水调零, 于 225nm 波长测其透光率, 大于 85% 方可使用。否则, 需再经脱芳处理(贾秀明等 2007; 陈祖林 2010)。

1.3.7 标准石油的制备和石油烃含量的测定

根据标准石油的制备方法(国家海洋局 1979)配得油标准溶液, 用油标准溶液配制油标准使用液, 此溶液 1.00ml 含 0.100mg 油。

取 60ml 添加了不同浓度标准石油的藻液, 1 000r/min 离心 5min, 取 50ml 上清液移入分液漏斗中, 脱芳石油醚萃取后, 采用紫外分光光度法和荧光法(国家海洋局 1979; 陈晖 1988)分别测量藻液中带共轭双键的烃类化合物(CHC)和芳烃的含量。通过标准石油绘制标准曲线, 分别得回归方程: CHC $y=0.0301x-0.0081$, $R^2=0.9870$ 和芳烃 $y=4.9143x+1.2000$, $R^2=0.9930$, 其中 y 为吸光度, x 为油含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)。石油烃降解率的计算: $(x_1 - x_0)/x \times 100\%$, 其中 x_1 为藻液中测得的油含量, x_0 为有藻无油空白组中测得的含油量, x 为无藻有油的空白对照组中测得的含油量。

1.3.8 细胞内油脂含量的测定

取 30ml 添加了不同浓度标准石油的藻液, 1 000r/min 离心 20min, 收集细胞, 采用索氏提取法测定细胞内油脂含量(韦芳三等 2011)。

2 实验结果

2.1 诱变出发株和诱变条件的选择

经单细胞分离和初步筛选后, 各获得 10 株生长旺盛的藻株作为诱变出发株的供选藻株, 连续培养 15d, 观察其生长状况, 选其中生长最旺盛的各 1 株作为诱变出发株。预诱变结果表明, 随照射时间延长, 藻液由碧绿色逐渐变浅, 藻细胞存活率均随照射时间的延长逐渐降低, 且在 0~30min 范围内呈线性关系, 实验中使用的

各种紫外线剂量对小球藻和盐藻细胞都有致死作用。辐射时间从 15min 增至 25min 时,藻细胞死亡率增加两倍多,说明此时的辐射量是处于多数细胞的敏感区域与耐受极限。为了获得较多的突变型,又不至于因为辐射剂量过大造成大部分细胞死亡而残留一些不活跃的细胞,海水小球藻和盐藻均采用 60W 紫外灯、照射距离 15cm、照射时间 20min 进行诱变较为适宜。

2.2 优势藻株的选择

挑选得到的诱变优势株的生长状况如图 1 所示,小球藻 M4 和盐藻 M02 的生长状况最佳,藻液颜色碧绿,细胞悬浮良好,几乎无贴壁(盐藻有少量贴壁)。培养第 8 天,M4 和 M02 的细胞生长速率分别为 $2.92 \sim 3.05$ 和 $3.09 \sim 3.13$,第 15 天的细胞密度分别为 $36.99 \times 10^6 \sim 37.43 \times 10^6$ 个细胞/ml 和 $32.39 \times 10^6 \sim 32.67 \times 10^6$ 个细胞/ml。生化成分分析结果表明,和对照相比,M4 和 M02 的胞外蛋白和胞内外多糖的含量无明显变化, β -胡萝卜素含量分别增加 8.4% 和 10.5%,但 M4 和 M02 的胞内蛋白含量分别高于对照组 18.2% 和 14.5%,叶绿素含量分别高于对照组 22.6% 和 15.3%,这表明紫外诱变使小球藻 M4 和盐藻 M02 均获得了比原始藻株更旺盛的生长能力,可以用于降解利用石油中带共轭双键的烃类化合物并在细胞内富集油脂的实验。

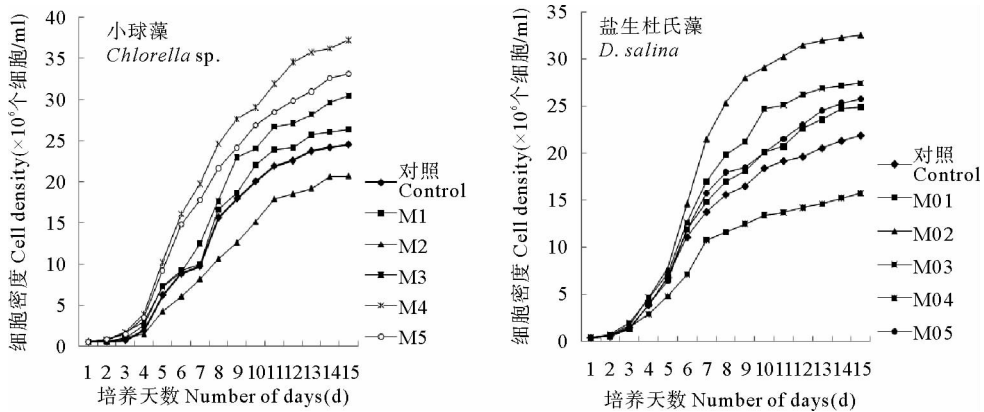


图 1 诱变优势株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of the mutagenesis dominant algal strains

2.3 降解带共轭双键的烃类化合物(CHC)能力的分析

如图 2 所示,在不同油浓度下,小球藻和盐藻均能有效降解利用 CHC,在石油浓度为 $1.5 \sim 10.0 \mu\text{g/ml}$ 范围内,两种海洋微藻培养第 15 天,CHC 降解率分别为 25.3%~35.5% 和 17.9%~24.0%,小球藻的降解能力略优于盐藻。在油浓度为 $1.5, 3.5 \mu\text{g/ml}$ 的藻液中,CHC 含量先升高后降低,这可能是由于较低油浓度下,微藻可以更好地利用石油成分作为营养物质,生长代谢旺盛,更多的代谢产物分泌到细胞外,代谢产物对藻液中 CHC 含量测定影响很大,因而在培养初期表现出 CHC 含量增加,但随着培养时间延长,微藻不断降解 CHC,同时受到石油成分的胁迫影响日趋显现,生长缓慢,代谢产物趋于平衡,微藻降解 CHC 作用凸现,从而表现出含量降低。

2.4 降解石油芳烃能力的分析

如图 3 所示,在不同油浓度下,小球藻和盐藻也均能有效降解石油芳烃,作用也很相似,在实验浓度范围内培养第 15 天,小球藻和盐藻的芳烃降解率分别为 22.1%~30.2% 和 18.7%~26.2%,小球藻的降解能力也略优于盐藻。CHC 中包含了芳烃类化合物,多数结构较复杂的芳烃比烷烃难于降解。

2.5 小球藻和盐藻胞内油脂含量分析

如图 4 所示,石油浓度为 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 时,小球藻和盐藻的细胞内油脂含量均增加,培养至第 15

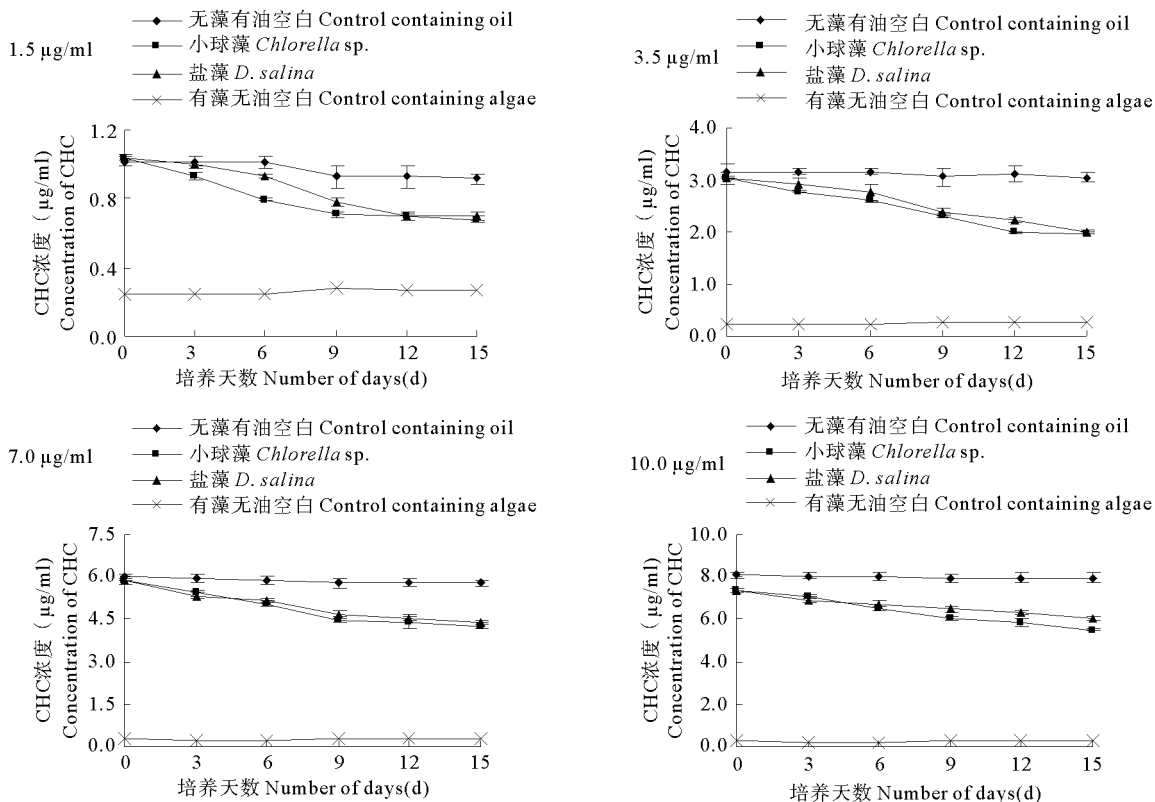


图2 不同浓度石油的海水中带共轭双键的烃类化合物的降解

Fig. 2 The degradation of conjugated hydrocarbons in oily seawater with different oil concentrations

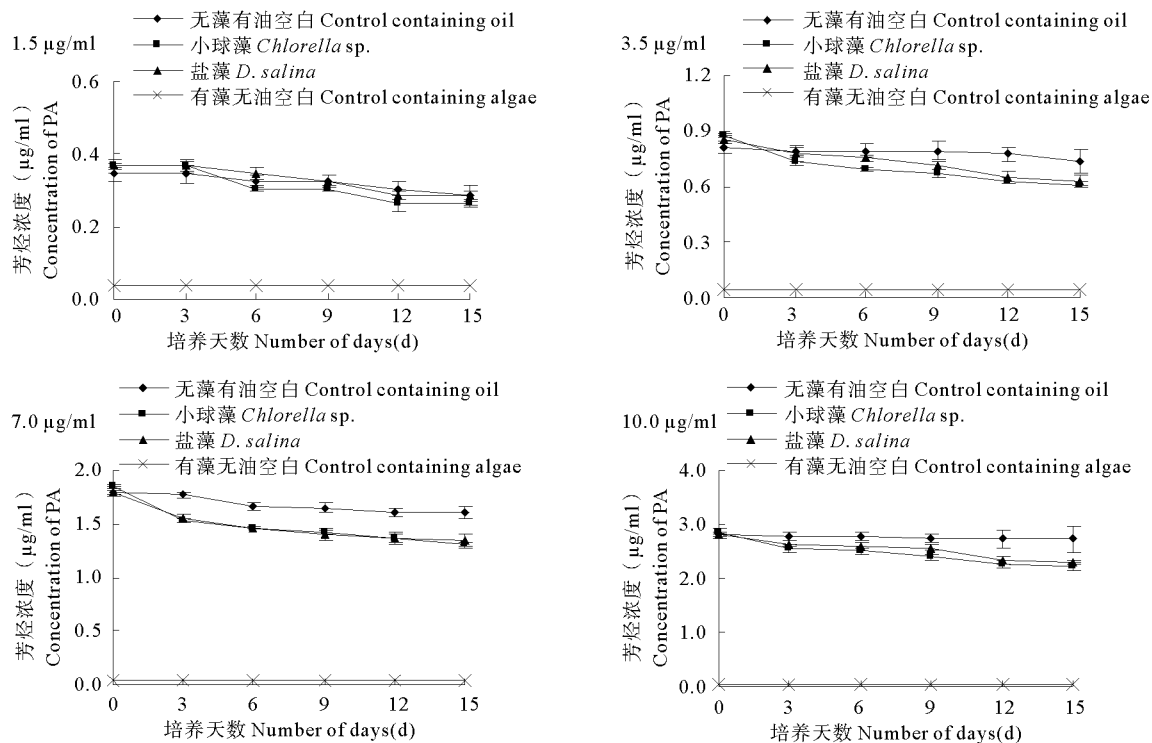


图3 不同浓度石油的海水中石油芳烃的降解

Fig. 3 The degradation of petroleum aromatic hydrocarbons in oily seawater with different oil concentrations

天,分别占细胞干重的 14.0%和 25.5%,分别是对照组的 1.5 倍和 1.2 倍,其中石油浓度为 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时两种微藻的胞内油脂含量最多;当石油浓度 $\geq 7.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,细胞内的油脂含量先增高后降低,培养至第 15 天时,小球藻和盐藻的胞内油脂含量分别减少了 4.2%和 3.1%。这可能是由于较低油浓度下,微藻可以转化石油成分并以油脂形式进行储存,但在较高油浓度下,随着培养时间的延长,环境胁迫对两种微藻的油脂合成造成抑制影响。

3 结论

筛选获得两株生长最旺盛的诱变优势株(海水小球藻 M4 和盐藻 M02),用于降解利用石油中带共轭双键的烃类化合物并在细胞内富集油脂。

在 1.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 石油浓度范围内,海水小球藻和盐藻均能有效降解、利用带共轭双键的烃类化合物,降解率最高分别可达 35.5%和 24.0%,其中芳烃的降解率最高分别可达 30.2%和 26.2%。但微藻对于带共轭双键的烃类化合物的降解效率与石油浓度之间无明显线性关系。石油浓度为 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,小球藻和盐藻对带共轭双键的烃类化合物的降解效率最高。

在较低石油浓度下,培养至第 15 天时,小球藻和盐藻的细胞内油脂含量均升高,石油浓度为 3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,两种微藻的胞内油脂含量最多,均为对照组的 1.5 倍。因此,可以利用石油污染海水培养微藻使其富集油脂,为今后开发微藻燃料奠定基础。

参 考 文 献

- 韦芳三,李纯厚,戴明,吕国敏,齐占会,肖雅元. 2011. 索氏提取法测定海洋微藻粗脂肪含量及其优化方法的研究. 上海海洋大学学报, 20(4): 619-623
- 刘青,张晓芳,李太武,苏秀榕. 2006. 光照对 4 种单胞藻生长速率、叶绿素含量及细胞周期的影响. 大连水产学报, 21(1): 24-30
- 刘邻渭,陶健,毕磊. 2004. 双缩脲法测定荞麦蛋白质. 食品科学, 25(10): 258-261
- 华栋,刘文,倪士峰. 1998. 盐生杜氏藻新品系的选育. 徐州师范大学学报(自然科学版), 16(2): 60-62
- 许宾,王能飞,孙云飞,许晶,臧家业. 2011. 海洋能源微藻的分离纯化和特征研究. 海洋科学进展, 29(增 1): 103-109
- 宋东辉,侯李君,施定基. 2008. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用. 生物工程学报, 24(3): 341-348
- 陈祖林,彭相林,王细超,张敏. 2010. 中性氧化铝对原油链状烷烃和芳香烃组分吸附行为. 地质科技情报, 29(2): 68-70
- 陈晖. 1988. 关于用紫外法、荧光法评价海洋环境中石油污染的讨论. 海洋环境科学, 7(3): 90-93
- 邹峥嵘,袁宜如,赖海华. 2007. 虫草头孢菌粉多糖的理化性质和含量测定研究. 食品科学, 28(9): 86-88
- 国家海洋局. 1979. 海洋污染调查暂行规范. 北京: 科学出版社, 122-131
- 郑旭龙. 2006. 转植酸酶基因小球藻的培养及其生理生化分析. 见:大连理工大学硕士研究生学位论文
- 贾秀明,林海,崔永强,刘江江. 2007. 石油醚脱芳实验研究. 工业水处理, 27(6): 64-66
- 陶永华,殷明,伍俊荣. 2006. 高效原油降解小球藻株用于油污废水净化的实验研究. 海军医学杂志, 27(2): 136-138
- 郭金耀,杨晓玲. 2007. 营养方式对盐藻生长与物质累积的影响. 江苏农业科学, 01: 138-139
- 戴荣继,黄春,佟斌. 2004. 藻类叶绿素及其降解产物的测定方法. 中国民族大学学报, 13(1): 75-80
- Borowitzka MA. 1998. Microalgae Biotechnology. London: Cambridge University Press, 457-465
- Chisti Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in Biotechnology 26(3): 126-131
- Hossain ABM, Salleh A, Boyce AN and 2 others. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4(3): 250-254
- Rene HW, Maria JB. 2010. An outlook on microalgal biofuels. Science 796-799
- Wang XC, Zhao HM. 2007. Uptake and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine seaweed. Journal of Coastal Research, 50: 1056-1061

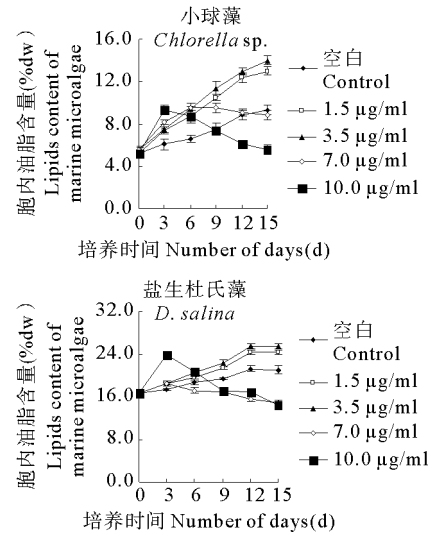


图 4 不同浓度石油的海水中微藻胞内油脂的含量

Fig. 4 The lipid content of marine microalgae in oily seawater with different oil concentrations