# 基于高通量培养的胶球藻 C-169 生物量和油脂积累能力的快速评价

魏东，李露

（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

**摘要：**本研究利用 $CO_2$ 培养箱内 48 孔板振荡光照培养专利设计的微藻高通量培养体系，结合细胞组学技术，系统评价了氮源和盐度梯度下胶球藻 C-169 细胞的生长速率、生物量浓度和油脂积累能力。结果表明，该培养体系的均一性和稳定性良好，可实现微藻的高通量及多处理培养。富氮培养基可显著提高胶球藻 C-169 的细胞生长速率和生物量浓度，缺氮培养基显著驱动了细胞积累中性脂。在含 1/4 氮的培养基中藻细胞的生物量浓度是 4 倍氮培养基中的 25%，而中性脂含量（平均荧光强度表示）则高达后者的 16 倍以上。在 0~15‰盐度范围内胶球藻 C-169 的生长状况良好且无显著差异（$p>0.05$），15‰以上盐度藻细胞生长受到明显抑制。10‰盐度下中性脂含量（以平均荧光强度表示）显著高于所有其他组（$p<0.05$），说明该盐度有利于驱动细胞积累中性脂。

**关键词：**胶球藻 C-169；高通量；氮源；盐度；细胞生长

**文章篇号：**1673-9078(2016)12-113-119 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.018

# Rapid Evaluation of Biomass and Lipid Accumulation Capacity in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 Cultured in a High-throughput System

**WEI Dong, LI Lu**

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cells were cultured using a high-throughput microalgal culture system with a patented design, 48-well microplate with shaking and illumination in a $CO_2$ incubator. Combined with cytomics technology, the growth rate, biomass concentration, and lipid accumulation capacity in *C. subellipsoidea* C-169 cells under nitrogen and salinity gradients were systematically evaluated. The results showed that the culture system had excellent uniformity and stability, and could achieve high-throughput and multi-treatment microalgae culture. Cell growth and biomass concentration were significantly enhanced in nitrogen-rich medium; whereas neutral lipid accumulation was significantly enhanced in nitrogen-deficient medium. Biomass concentration in the medium containing 1/4 nitrogen concentration was 25% of that in medium containing four times as much nitrogen; however, neutral lipid content (shown as average fluorescence intensity) was more than 16 times higher. At salinity levels of 0~15%, *C. subellipsoidea* C-169 cells grew well, but rates were not significantly different ($p>0.05$). However, cell growth was significantly inhibited when salinity was higher than 15%. The neutral lipid content (shown as average fluorescence intensity) at a salinity of 10% was significantly higher than that of all other groups ($p<0.05$), indicating that this salinity level could facilitate accumulation of neutral lipids.

**Key words:** *Coccomyxa subellipsoid*ea C-169; high-throughput; nitrogen; salinity; cell growth

能源为人类生活提供动力，化石燃料具有不可再生性，且燃烧后会产生大量有害物质污染环境。微藻来源广泛，光合效率高，生长周期短，可同化 $CO_2$ 合成积累油脂，并能有效减少 CO、$CO_2$、$SO_x$ 及烃类物质等的排放，是制备生物柴油的极好原料[1,2]。高生物量和高油脂含量是能源微藻的理想特质，一般可通过优化培养基组成及改变环境条件来提高微藻的生物量和油脂含量。实验室中通常使用锥形瓶，辅以通气或摇床摇动培养微藻，常面临光照不均一等问题，耗费大量人力物力，耗时低效。而专利设计的高通量培养装置以 $CO_2$ 培养箱和微孔板为载体在微量水平上对微藻实现多参数多平行培养，大大节省培养空间，提高培养效率。同时结合基于荧光分子探针技术的流式细胞术、激光共聚焦显微镜术和图像分析术等细胞组学

收稿日期：2015-12-11

基金项目：国家自然科学基金项目（31370383）；国家 863 计划项目（2013AA065802）；广东省海洋渔业科技与产业发展专项（A201401C01）；广东省公益研究与能力建设项目（2015A020216003）

作者简介：魏东（1966-），男，博士，教授，博士生导师，研究方向：工业生物技术

分析技术平台，可实现细胞多参数多元化的综合分析，定性定量测定细胞的基础生物学信息，快速评价营养及环境因子对其细胞生长和产油能力的影响。

氮元素是微藻生长繁殖必需的基本营养元素，是构成藻细胞蛋白质、核酸及色素等的基本成分，硝态氮是微藻培养过程中常用的无机氮源，不同氮源浓度对藻细胞的生长速率和油脂积累有着较为显著的影响[3]。盐度也是微藻生长环境的重要理化因子，通过影响各种膜结构的完整性和流动性，引起细胞渗透压和光合效率的改变，调节代谢活动最终影响细胞生长和油脂合成[4,5]。胶球藻（*Coccomyxa subellipsoidea*）C-169、绿藻门和胶球藻属，是首个完成基因组测序的极地真核藻种，并且细胞壁较薄易于油脂提取。本文以胶球藻 C-169 为研究对象，通过构建均一稳定的高通量培养体系和 Nile Red 荧光探针技术与多功能酶标仪、流式细胞术和激光共聚焦显微镜术等细胞组学分析技术联用的高通量评价体系，快速评估氮源浓度与盐度等因子对胶球藻 C-169 细胞生长和油脂积累产生的影响，有助于全面掌握能源微藻 C-169 的基础生物学信息，为其规模化培养和生长产油机理研究提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

胶球藻（*Coccomyxa subellipsoidea*）C-169 购自日本 NIES 藻种库，编号 2166；尼罗红（Nile Red）染料购自 Sigma 公司；硝酸钠、氯化钠和二甲基亚砜（DMSO）等试剂均为国产分析纯。

水套式 $CO_2$ 培养箱购自美国 Thermo 公司；Modulyod 型冷冻干燥机购自美国 Thermo electron 公司；FLUOstar OPTIMA 多功能酶标仪购自德国 BMG 公司；C6 Accuri 流式细胞仪购自美国 BD 公司；TCS SP5X 激光共聚焦扫描显微镜购于德国 Leica 公司；MX100-4A 微孔板振荡器购自杭州奥盛仪器有限公司；48 微孔板购自美国 Costar 公司。#

### 1.2 培养基及培养条件

胶球藻 C-169 使用 Bold’s basal medium（BBM）培养基[6]。培养装置参照实用新型发明专利 ZL 2014 2 0378727.9；$CO_2$ 培养箱内温度维持在 25.5±1 ℃，光照强度 2150±150 lx，$CO_2$ 浓度设置 2%，振荡速率 600 r/min，连续光照培养。将配置好的藻液加入 Costar 48 孔板中，每孔装液量 1 mL，每浓度设定 4 个平行样，取平均值，计算标准偏差。

### 1.3 实验设计

#### 1.3.1 不同氮浓度对胶球藻 C-169 生长季油脂积累的影响

培养基（除硝酸钠外）按 BBM 培养基配方配置，硝酸钠浓度分别设置为 0 倍 N、0.25 倍 N、0.5 倍 N、1 倍 N、2 倍 N 和 4 倍 N 共六个梯度，每个梯度四个平行，其中 1 倍 N 质量浓度为 0.25 g/L。

#### 1.3.2 不同盐浓度对胶球藻 C-169 生长季油脂积累的影响

培养基（除氯化钠外）按 BBM 培养基配方配置，氯化钠质量分数分别设置为 0.025‰、5‰、10‰、15‰、20‰和 25‰共六个梯度，每个梯度四个平行，其中培养基中原始氯化钠质量分数为 0.025‰。

### 1.4 分析测试与计算

#### 1.4.1 细胞浓度及比生长速率

使用 FLUOstar OPTIMA 多功能酶标仪在 690 nm 波长处测定 48 孔板中胶球藻 C-169 的吸光值，制作生长曲线。比生长速率 $\mu=(\ln OD_2-\ln OD_1)/t$，其中 $OD_2$ 和 $OD_1$ 分别是培养开始和结束后测得的 $OD_{690}$ 值，t 为培养时间间隔，单位为/d。

#### 1.4.2 生物量干重

培养结束后，将 48 孔板中的藻液吸出，在 10000 r/min 下离心 10 min，弃上清液，用去离子水洗涤离心 3 次，然后用冷冻干燥机真空冷冻干燥 36 h 制备干粉称重。

#### 1.4.3 叶绿素 a 和中性脂含量

采用流式细胞仪与尼罗红染料联用测定藻细胞中性脂含量（相对荧光强度）和叶绿素荧光。具体方法：用蒸馏水将冻干藻粉重悬至浓度为 $10^6$ 细胞/mL，加入尼罗红使其终浓度为 0.05 μg/mL，常温下避光染色 10 min[7,8]。通过流式细胞仪使用 488 nm 激发，采集 FL2 通道（575±40 nm）黄色荧光，荧光强度与细胞内中性脂的含量正相关；采集 FL3 通道（>670 nm）红色荧光，荧光强度直接反应细胞内叶绿素 a 含量[9]。

#### 1.4.4 藻细胞荧光特性

经 Nile Red 染色后制片，用 TCS SP5X 激光共聚焦显微镜扫描，激光在 543 nm 激发，560~615 nm 发射，调节电压和分辨率，选择信号最强的断层及具有代表性的清晰细胞拍照，用软件 LAS AF Lite 定性观测细胞荧光强度，荧光强度可反映细胞油脂含量[10]。

#### 1.4.5 数理统计方法

利用BD C6软件、Microsoft Office Excel 2007及Origin 8对数据进行分析处理，分别使用单因素方差分

析和成对数据t-检验分析实验数据的差异显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胶球藻 C-169 的高通量培养体系的建立

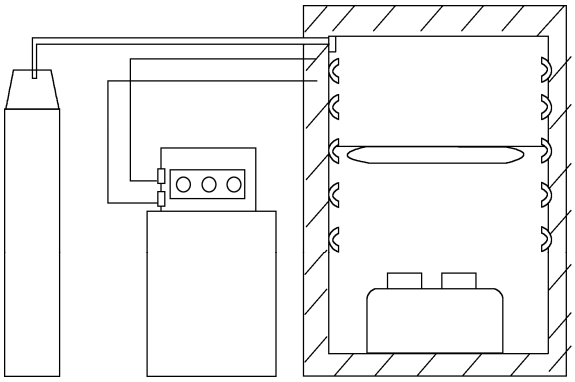


图 1 胶球藻 C-169 的高通量培养装置简图

**Fig.1 Schematic of high-throughput *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 culture system**

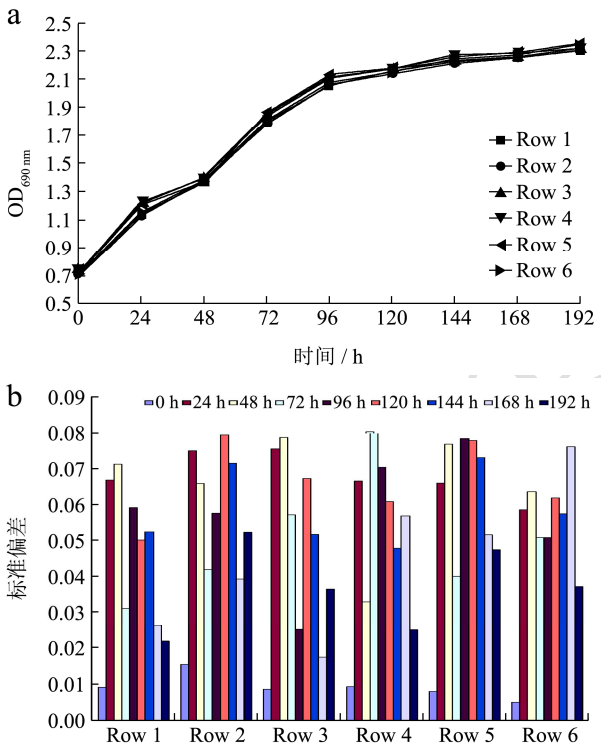



图 2 胶球藻 C-169 在不同行间细胞生长情况（a）；每 24 h 同行生长情况的标准偏差（b）

**Fig.2 Growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in different rows (a); STDEV of growth in the same row every 24 h (b)**

如图 1 所示，通过水套式 $CO_2$ 培养箱、振荡器、微孔板和日光灯等巧妙联用构建微藻的高通量培养装置，调整 $CO_2$ 培养箱内循环水温度、灯管数量及照射距离，维持箱体恒定适宜的温度湿度和光照强度。为降低培养过程水分蒸发损失及最大程度实现高通量，从 24、48 和 96 孔不同容量体积的微孔板中确定 48 孔板。48 微孔板共设置 6 个梯度，每个梯度 4 个平行，周围 24 个孔为防止产生边缘效应分别加入 1 mL 灭菌蒸馏水，每 24 h 测试一次，取平均值并计算标准偏差。Arensberg[11]等为探讨不同容器材料对藻生长的影响，用玻璃瓶作对照，研究了微孔板对微藻生长的影响，发现 Corning, Costar（这两品牌现已合并）和 Falcon3 家厂商生产的微孔板中，Costar 微板对藻细胞的生长延迟抑制作用最小，因此本研究采用 Costar 的聚苯乙烯材质微孔板。

为了验证该培养体系中微孔板的孔间是否存在差异性，同一批藻种置于 48 孔板中培养 8 d 后绘制行间藻细胞的生长曲线，并计算同行孔间藻细胞生长状况的标准偏差(STDEV)，由图 2a 和 2b 中可知，胶球藻 C-169 行间生长状况并无显著差异，同行孔间差异均小于 10%，差异不显著（$p$<0.05）。培养后观测微孔板表面无积水现象，水分蒸发量小于总体积的 5%，生长繁殖情况良好，证明 48 孔板、微孔板振荡器与 $CO_2$ 培养箱联用构建的高通量培养体系是均一稳定的。

### 2.2 不同氮源浓度对胶球藻C-169生长和油脂积累的影响

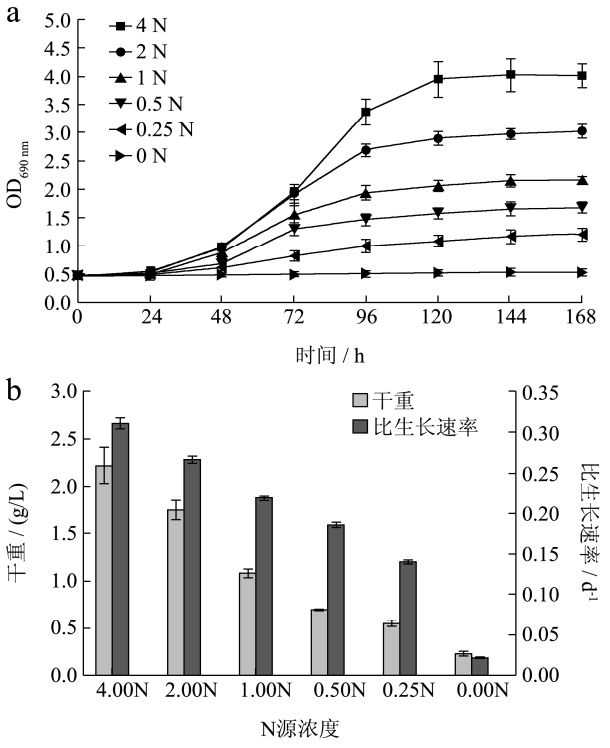



图 3 氮源浓度对胶球藻 C-169 生长情况的影响

**Fig.3 Effect of nitrogen concentration on *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cell growth**

注：a，$OD_{690}$ 值；b，生物量干重和比生长速率。

采用微孔板体系培养胶球藻 C-169，选择不同浓

度的硝酸钠作为氮源，其藻细胞的生长曲线和生物量干重见图 3，可知 0~48 h 内微藻生长速度缓慢，72 h 后进入对数生长期氮源浓度成为限制因子，120 h 后藻细胞进入稳定期。随着氮源浓度的增加，藻细胞的比生长速率和生物量干重随之增加，通过统计检验分析，6 个处理组间差异显著（$p$<0.05）。其中无氮培养条件下细胞几乎不生长，很快呈现死亡状态，说明氮源是藻细胞生长必需的营养元素之一。4 倍氮源培养可获得最高比生长速率，培养一周后胶球藻 C-169 的光密度值和生物量干重最高，分别可达 4.02 和 2.21 g/L。在氮限制培养条件下，细胞生长速度明显受到抑制，始终处于缓慢生长状态，0.5 倍和 0.25 倍氮源供给下藻细胞培养结束后的 $OD_{690}$ 分别为 1.68 和 1.20，生物量干重分别为 0.69 g/L 和 0.55 g/L，显著低于 1 倍氮培养条件下 2.16 的光密度值和 1.08 g/L 的生物量干重。这说明富氮培养胶球藻 C-169 有助于提高细胞比生长速率和生物量干重。

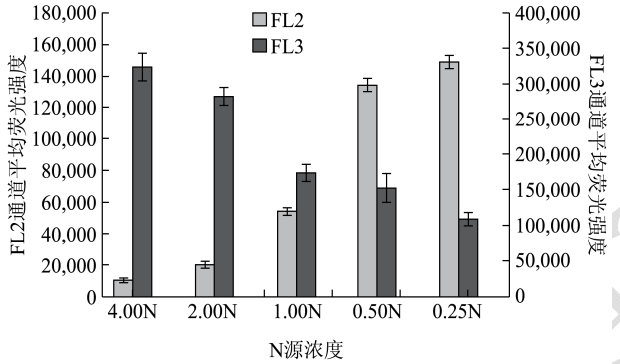



图 4 氮源浓度对胶球藻 C-169 中性脂（FL2）和叶绿素 a（FL3）相对荧光强度的影响

**Fig.4 Effect of nitrogen concentration on relative fluorescence intensity of neutral lipids (FL2) and chlorophyll a (FL3) in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169**

使用 C6 流式细胞仪在 488 nm 波长下激发，采集 FL3 通道（>670 nm）红色荧光，可快速定量测定藻细胞内叶绿素 a 的相对平均荧光强度；对藻细胞进行 Nile Red 染色，以 488 nm 为激发波长，采集 FL2 通道（575±40 nm）黄色荧光可定性定量检测藻细胞中性脂的相对荧光强度。通过 C6 软件和 Origin 软件绘制不同氮源浓度下藻细胞中性脂和叶绿素 a 的平均荧光强度图。由图 4 可知，随着氮源浓度的降低，FL2 通道平均荧光强度依次升高，FL3 通道平均荧光强度依次降低。说明氮饥饿有助于细胞由绿色转为黄色，促使细胞进入油脂积累阶段。培养结束后 0.25 倍氮培养条件下藻细胞的中性脂含量（即 FL2 相对荧光强度）是 4 倍氮培养条件下的 15.1 倍，是 1 倍氮培养体系下的 2.79 倍，由此可见缺氮培养能显著提高藻细胞的中性脂含量。图 5 可以看出激光共聚焦显微镜下不同氮源浓度下中性脂受到激发后的荧光图像，氮浓度越低细胞的黄色荧光面积越大，表明中性脂含量越高，其结果与流式细胞仪所得结果保持一致，直观分析了脂质含量与氮浓度变化的关联，表明了富氮有助于提高藻细胞的光合效率，缺氮条件有助于藻细胞油脂积累。

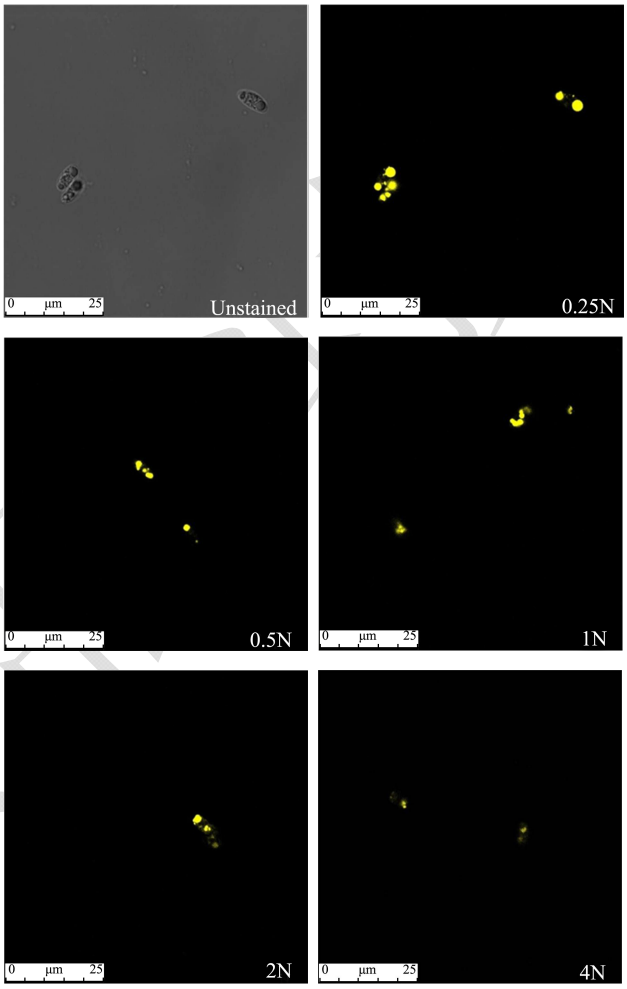



图 5 不同氮源浓度下胶球藻 C-169 的 Nile-Red 染色荧光图像

**Fig.5 Fluorescent images of Nile red-stained *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cells at different nitrogen concentrations**

## 2.3 不同盐度对胶球藻 C-169 生长和油脂积累的影响

如图 6 所示，胶球藻 C-169 在 0~15‰盐度条件下生长速率较快，15‰以上盐度胁迫培养生长明显受到抑制，使用 BBM 培养基作为对照组培养 8 d 后可收获最高的光密度值（$OD_{690}$）2.40，最高的生物量干重 2.21 g/L，最大比生长速率 0.31 $d^{-1}$。5‰和 10‰盐度条件下培养最终收获生物量干重分别为 2.18 g/L 和 2.10 g/L，与对照组无显著差异（$p$>0.05）。然而胶球藻 C-169 在 20‰和 25‰浓度 NaCl 胁迫下的比生长速率分别仅为

0.11 $d^{-1}$ 和 0.70 $d^{-1}$，远远低于对照组的生长速率，且培养过程中细胞出现发白、沉底现象，细胞结构遭受一定程度的破坏，生长被显著抑制，可知胶球藻 C-169 的 NaCl 胁迫最大耐受量为 15‰。这可能是因为高盐度导致细胞膜的流动性和渗透性下降，影响了细胞结构稳定性和正常生理代谢活动。

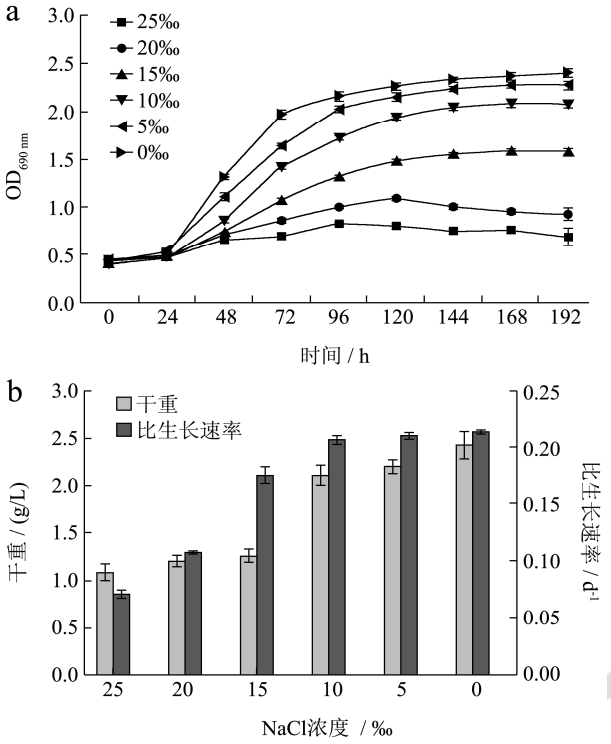
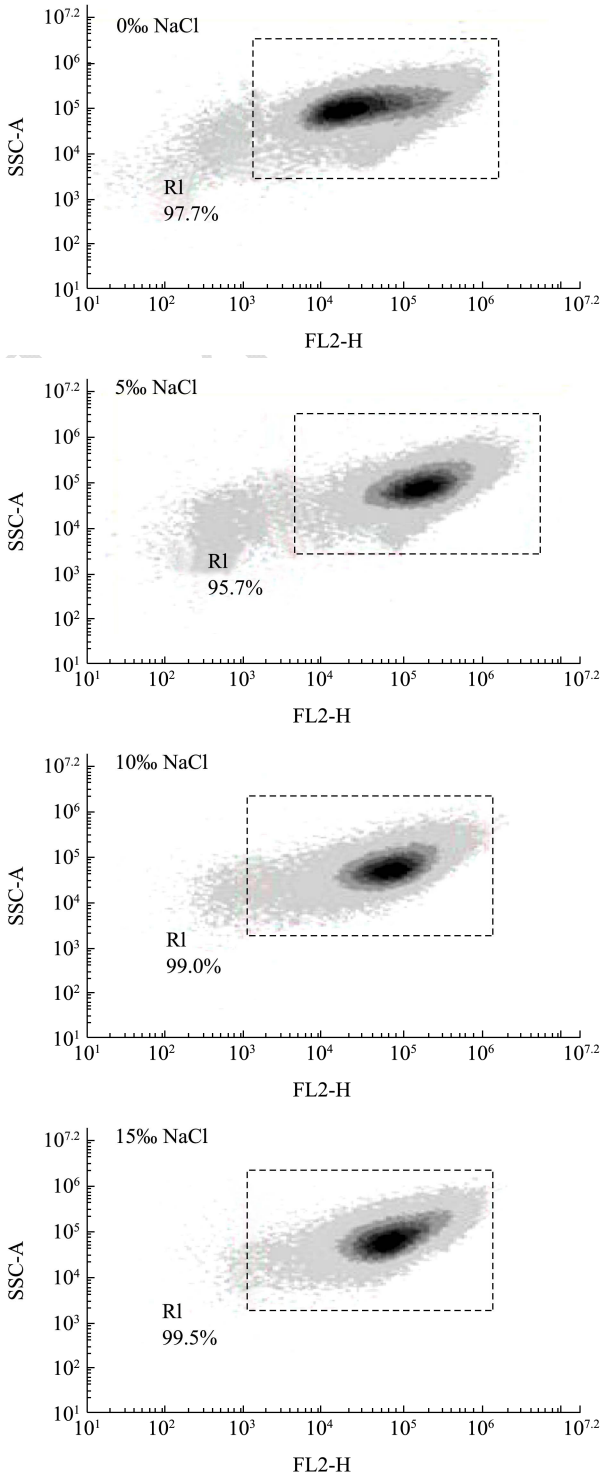



图 6 不同盐度对胶球藻 C-169 生长情况的影响

**Fig.6 Effect of salinity on growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cells**

注：a，$OD_{690}$ 值；b，生物量干重和比生长速率。

藻细胞样品经 Nile Red 染色后，使用流式细胞仪和激光共聚焦显微镜定性定量分析不同 NaCl 浓度对胶球藻中性脂含量的影响，图 7 是由流式细胞仪得到的 FL2~SSC 二维散点图，首先在散点图中设“门”R1 和 R2，通过 C6 软件分析细胞的形态特征和中性脂含量，可知在 0~15‰盐度范围内，藻细胞的生理形态特征未发生显著变化，细胞生长状况良好。在盐度为 20‰和 25‰条件下，藻细胞明显出现了分群，R1 门内的细胞比例逐渐减少，高盐度使部分藻细胞呈现死亡状态导致细胞内颗粒结构复杂程度的降低。从图 8 的单因子方差分析结果表明，盐度升高可以显著促进胶球藻 C-169 中性脂含量的积累（$p$<0.05），10‰盐度条件下胶球藻 C-169 中性脂平均荧光强度达到最大值，显著高于其他盐度条件下的中性脂含量（$p$<0.01）。图 9 显示胶球藻 C-169 经 Nile Red 染色后的激光共聚焦荧光图像，图中黄色荧光强度与中性脂含量呈正相关，从该图中可直观看出盐度对胶球藻 C-169 产油能力的影响，与图 8 流式细胞术所测结果保持一致。目前盐度影响藻细胞的生长和油脂积累的报道不多。Sharma 等发现高盐度能够改变脂质合成机制来应对胁迫压力[12]。冯雷等研究表明，小球藻属 C19 株在盐度为 16‰时油脂含量最高，裂丝藻在盐度 28‰时总脂含量最高[13]。而盐度变化对藻细胞的影响主要是通过渗透压的变化影响细胞生物膜的流动性、结构和功能，最终调节细胞的代谢从而对细胞的生长和油脂的合成施加影响。



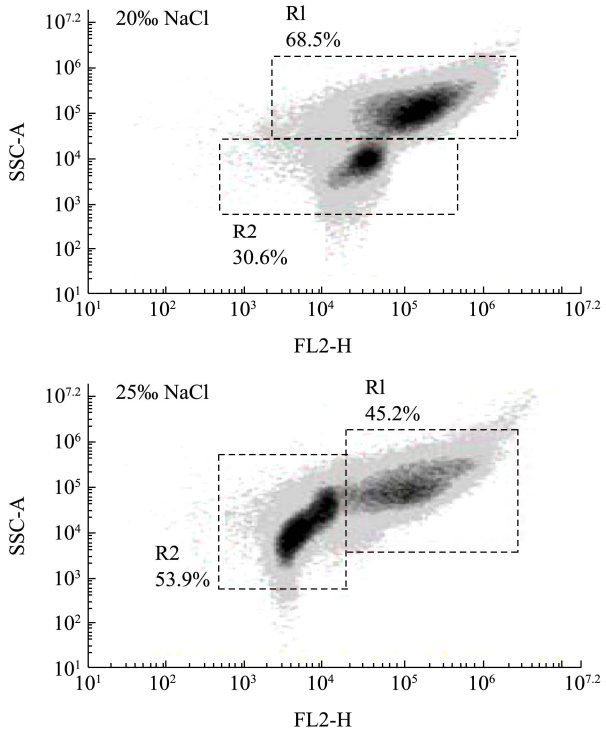



图 7 胶球藻 C-169 在不同 NaCl 浓度下的细胞流式图

**Fig.7 Flow cytometry plots of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 at different NaCl concentrations**

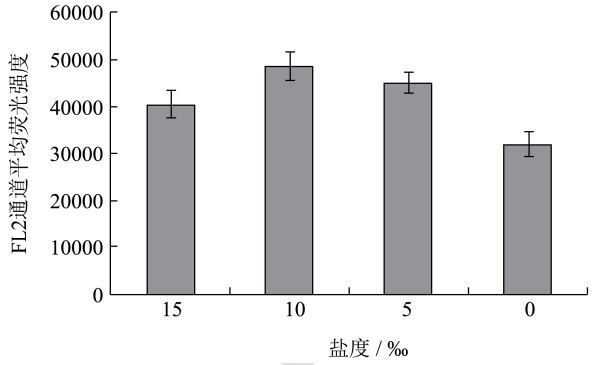



图 8 不同盐度对胶球藻 C-169 中性脂（FL2）的相对荧光强度的影响

**Fig.8 Effect of salinity on relative fluorescence intensity of neutral lipids in *Coccomyxa subellipsoidea* C-169**

## 3 结论

本研究通过$CO_2$培养箱、48孔板及振荡器联用构建微藻的高通量培养装置，并采用多功能酶标仪、流式细胞仪及激光共聚焦显微镜等细胞组学技术平台，建立了快速评价胶球藻C-169生长情况和油脂积累的高通量评价体系，且该体系均一性和稳定性良好。同时也证实富氮培养能显著提高胶球藻C-169的生长速率和生物量干重，缺氮培养能显著提高藻细胞中性脂的积累。胶球藻C-169生长的最适盐度范围为0~15‰，其中10‰的盐度最有利于藻细胞积累中性脂。此结果为全面掌握胶球藻C-169的基础生物学信息，深入研究其产油机理至关重要，同时也为其他能源微藻采用此体系评价其细胞生长和油脂积累提供了方法学依据。

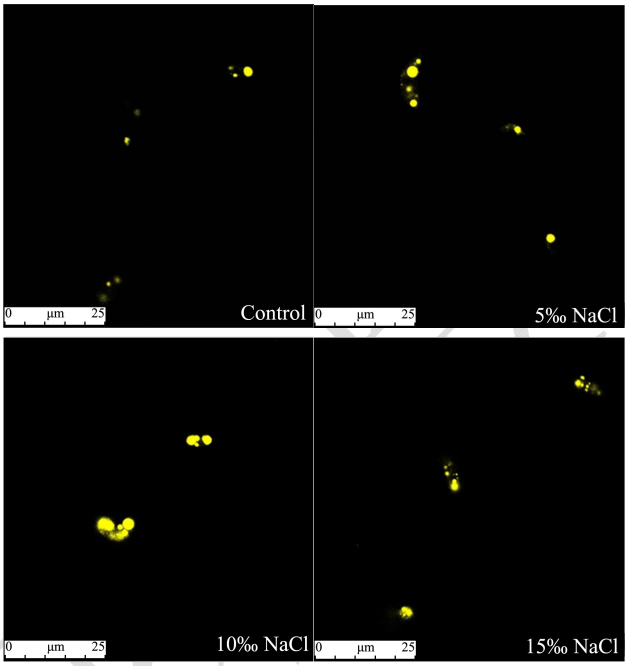



图 9 胶球藻 C-169 在不同盐度下 Nile-Red 染色荧光图像

**Fig.9 Fluorescent images of Nile red-stained *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 cells at different salinities**

## 参考文献

[1] Huang Y Y, Beal C M, Cai W W, et al. Micro-Raman spectroscopy of algae: composition analysis and fluorescence background behavior [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105: 889-898

[2] Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 57-70

[3] 杨艳婧,王冰芳,廖晓霞,等.木薯淀粉水解液对小球藻生物量和油脂含量的影响[J].现代食品科技,2009,25(11):1275-1278
YANG Yan-jing, WANG Bing-fang, LIAO Xiao-xia, et al. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of heterotrophic microalgae chlorella protothecoides [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(11): 1275-1278

[4] 吴瑞珊,魏东.盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和EPA积累的影响[J].现代食品科技,2007,23(12):5-8
WU Rui-shan WEI Dong. Effects of salinity and its regulation ways on growth and EPA accumulation of nannochloropsis oculata [J]. Modern Food Science and

Technology, 2007, 23(12): 5-8

[5] Carvalho A P, I Pontes, H Gaspar, et al. Metabolic relationships between macro-and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of Pavlova lutheri [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3): 358-366

[6] Bold H C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov [J]. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1949,76: 101-108

[7] Chen W, C Zhang, L Song, et al. A high throughput nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1): 41-47

[8] Huang G, G Chen, F Chen. Rapid screening method for lipid production in alga based on nile red fluorescence [J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(10): 1386-1392

[9] Darzynkiewicz Z, J P Robinson, H A Crissman. Flow cytometry [M]. America: Academic Press, 1994

[10] Diaz G, Melis M, Batetta B, et al. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by nile red red/yellow emission ratio [J]. Micron., 2008, 39: 819-824

[11] Arensberg P, V H Hemmingsen, N Nyholm. A miniscale algal toxicity test [J]. Chemosphere, 1995, 30(11): 2103-2115

[12] Sharma K K, Schuhmann H, Schenk P M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production [J]. Energie, 2012, 5: 1532-1553

[13] 冯雷,郭永恩.盐度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J].天津科技大学学报,2009,24(4):22-28
FENG Lei, GUO Yong-en. Effects of salinity on the total lipids contents and fatty acids composition of 4 strains of marine green algae [J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2009, 24(4): 22-28

现代食品科技