

## 研究报告

共生真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 促进衣藻  
生长和脂类合成

董庆霖\* 王瑜琴 邢向英 邵海娇 李彤彤

(河北工业大学化工学院 天津 300130)

**摘要:**【背景】藻类是生产生物柴油的主要原料,而一些真菌和细菌能够与藻类共生并提高生物柴油产量,因此藻-菌共生培养技术成为国内外研究的热点。【目的】研究共生真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 对衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 细胞生长和脂类合成的影响。【方法】将分离的蓝藻共生真菌和衣藻混合(共生)培养。【结果】与衣藻单独培养相比,混合培养衣藻的比生长速率( $0.20\text{ d}^{-1}$ )、细胞产率[ $0.17\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ]和生物量( $2.85\text{ g/L}$ )分别提高了 10.3%、51.3%和 55.7%;脂类比合成速率[ $0.68\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ]、合成速率[ $1.95\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ]和含量( $220.4\text{ mg/g}$ )分别提高了 33.3%、107.5%和 32.0%,并且脂类中的饱和脂肪酸以及单不饱和脂肪酸 C18-1 和 C18-2 的比例上升,有利于生物柴油的加工。【结论】真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 能够促进衣藻的生长和脂类合成,因此藻-菌混合培养可用于生物柴油原料的生产。

**关键词:** 共生真菌, 衣藻, 混合培养, 细胞生长, 脂类合成

Enhancing cell growth and lipid production of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-culturing with the fungus *Simplicillium lanosoniveum*

DONG Qing-Lin\* WANG Yu-Qin XING Xiang-Ying GAO Hai-Jiao LI Tong-Tong

(School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

**Abstract:** [Background] Algae are the major feed-stocks for biofuel production, and some fungi and bacteria can establish symbiotic relationships with algae and promote their productivities. Hence, co-culture of algae with fungi or bacteria becomes the research hotspot worldwide. [Objective] To study the effects of cyanobacterium-symbiotic fungus *Simplicillium lanosoniveum* on the cell growth and lipid synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. [Methods] *C. reinhardtii* was co-cultured with *Simplicillium lanosoniveum*. [Results] Compared to *C. reinhardtii* monoculture, the specific growth rate ( $0.20\text{ d}^{-1}$ ), cell productivity ( $0.17\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ) and biomass ( $2.85\text{ g/L}$ ) of *C. reinhardtii* in co-culture increased 10.3%, 51.3% and 55.7% respectively. The specific lipid synthetic rate ( $0.68\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ), lipid productivity ( $1.95\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ) and lipid content ( $220.4\text{ mg/g}$ ) increased 33.3%, 107.5% and

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Hebei Province (B2008000029)

**\*Corresponding author:** E-mail: qldong@hebut.edu.cn

**Received:** January 31, 2018; **Accepted:** May 14, 2018; **Published online** (www.cnki.net): July 02, 2018

**基金项目:** 河北省自然科学基金(B2008000029)

**\*通信作者:** E-mail: qldong@hebut.edu.cn

**收稿日期:** 2018-01-31; **接受日期:** 2018-05-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-07-02

32.0% respectively. Also, the proportions of saturated fatty acids and monounsaturated fatty acids C18-1 and C18-2 in the lipid elevated, indicating the suitability for biofuel production. **[Conclusion]** *Simplicillium lanosoniveum* promotes cell growth and lipid synthesis of *C. reinhardtii*, and thus algae-fungi co-cultivation can be considered in biofuel feedstock production.

**Keywords:** Symbiotic fungus, *Chlamydomonas reinhardtii*, Co-culture, Cell growth, Lipid synthesis

微藻(单细胞藻类)生长速率快,脂类含量高,是生物柴油原料的主要来源<sup>[1]</sup>。然而,其目前的产量和成本还不能满足生物柴油可持续工业化生产的要求<sup>[2]</sup>。因此如何提高藻类的产量,即如何提高其生物量和脂类含量是藻类培养过程中的关键问题。

微藻在自然环境中能够与微生物(细菌和真菌)互利共生,例如绿藻与真菌共生形成地衣:藻细胞进行光合作用并分泌胞外有机物质供真菌代谢,而真菌则保护并促进藻类细胞生长<sup>[3-4]</sup>。基于这种原因,藻类与微生物的混合(共生)培养成为最近几年研究的热点<sup>[5-6]</sup>。培养方式分为两类:即光合自养(不添加有机碳源)和混合营养(光照并添加有机碳源)。在光合自养条件下,细菌<sup>[7-10]</sup>、单细胞真菌即酵母<sup>[11]</sup>和丝状真菌<sup>[12-14]</sup>能够促进藻细胞的生长和脂类合成。与此相似,在混合营养状态下,细菌<sup>[15]</sup>、酵母<sup>[16-23]</sup>和丝状真菌<sup>[24-27]</sup>与共生微藻的总生物量和脂类产量均得到提升,并且丝状真菌形成的菌丝球有利于藻细胞的沉降和采收。

在前期的研究中,我们从蓝藻培养液中分离到一种共生真菌 *Simplicillium lanosoniveum* DT06<sup>[28]</sup>。鉴于真核的绿藻与原核的蓝藻具有相似的生境和生理特性,并且绿藻的脂类含量高于蓝藻,是生物柴油的主要原料,因此本实验将模式绿藻——衣藻与真菌 DT06 进行混合培养,以研究 DT06 对衣藻细胞生长和脂类合成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和藻种

真菌 DT06 (*Simplicillium lanosoniveum*)由本实验室分离并保存于中国科学院微生物研究所菌物标本馆(编号 HMAS 242045);衣藻(编号 FACHB-359)

购自中国科学院武汉水生生物研究所。

### 1.2 主要试剂和仪器

氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素,天根生化科技有限公司;十二烷基苯磺酸钠、氯仿、甲醇、氢氧化钠、硫酸,金海华星生物科技有限公司。

光照摇床,北京东联哈尔仪器制造有限公司;光照培养箱,宁波江南仪器厂;紫外分光光度计,上海精科仪器厂;有机碳分析仪,Analytik Jena 公司;气相色谱质谱联用仪,Agilent 公司。

### 1.3 无菌藻种的制备

在装有 100 mL 藻液的锥形瓶中加入氨苄青霉素(800  $\mu\text{g/mL}$ )、庆大霉素(200  $\mu\text{g/L}$ )、卡那霉素(100  $\mu\text{g/L}$ )和新霉素(1 000  $\mu\text{g/L}$ ),置于光照摇床内培养 8 d [25  $^{\circ}\text{C}$ , 130 r/min, 光照强度 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]。9 000 r/min 离心 8 min 收集藻细胞,用无菌水洗涤并将藻液稀释至  $10^{-5}$  后,涂布于 BBM<sup>[16]</sup>固体培养基,然后置于光照培养箱中培养[25  $^{\circ}\text{C}$ , 光照强度 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]。挑选单藻落并转接到 BBM 液体培养基中培养。

### 1.4 衣藻胞外产物的总有机碳分析

取纯化后的衣藻培养液 10 mL 接种于 100 mL BBM 液体培养基中,置于光照摇床培养[25  $^{\circ}\text{C}$ , 130 r/min, 光照强度 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ] 15 d。隔日采样,样品经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,用有机碳分析仪测定胞外有机碳(Extracellular organic carbon, EOC)的浓度。

### 1.5 DT06 孢子悬浮液的制备

将试管中 DT06 划线接种于 PDA<sup>[28]</sup>固体培养基,于恒温培养箱中(27  $^{\circ}\text{C}$ )培养 2 周后,用无菌水轻轻冲洗菌落采收孢子,制备孢子悬浮液( $5\times 10^8$  孢子/mL)。

### 1.6 DT06 在添加衣藻培养液的培养基中生长

采收培养 15 d 的藻液 9 000 r/min 离心 8 min 后, 将 50 mL 的上清液与等体积的 BBM 培养基混合, 以 BBM 培养基为对照, 分别接种 1 mL 的孢子悬浮液, 25 °C、130 r/min 避光培养, 测定  $OD_{580}$  的变化。

### 1.7 菌藻混合培养

衣藻接种液的制备: 将 5 mL 纯化的衣藻培养液接种于装有 60 mL BBM 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 置于光照培养箱中培养[25 °C, 光照强度 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ], 每天摇动 2 次。达到稳定生长期后, 9 000 r/min 离心 8 min 收集细胞, 并用 BBM 培养基洗涤 2 次, 制备成接种液( $8\times 10^9$  藻细胞/mL)。

混合培养: 将真菌 DT06 孢子分散液和衣藻接种液按比例加入装有 100 mL BBM 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 使孢子与藻细胞的比例达到 1:10。以不加孢子的藻细胞培养液作为对照, 每组设 2 个平行。接种后的锥形瓶置于光照摇床内培养[25 °C, 130 r/min, 光照强度 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]。

## 1.8 参数测定

### 1.8.1 生物量

衣藻单独培养的生物量即细胞干重(Dry cell weight, DCW)参照雨生红球藻生物量的分析方法<sup>[16]</sup>进行测定。混合培养的生物量测定, 向混合培养液中加入 1 mL 2% (质量比)的十二烷基苯磺酸钠, 超声波(40 kHz, 160 W)处理 30 s, 然后 2 500 r/min 低速离心 6 min, 将衣藻细胞(沉淀于离心管底部)和 DT06 菌丝(悬浮于上清液中)分离后测定干重。

细胞比生长速率:

$$\mu(\text{d}^{-1}) = \frac{\ln X_n - \ln X_0}{t_n - t_0}$$

其中,  $X_0$  和  $X_n$  分别是时间  $t_0$  和  $t_n$  时的生物量(g/L)。

细胞生长速率:

$$r(\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})) = \frac{X_n - X_0}{t_n - t_0}$$

细胞倍增时间:

$$DT(\text{d}) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

### 1.8.2 脂类含量及脂肪酸组成

(1) 脂类含量。取 50 mL 藻液 9 000 r/min 离心 8 min 收集细胞, 用氯仿-甲醇(2:1, 体积比)溶液, 超声波破碎与研磨相结合的方法进行细胞破碎和脂类提取, 然后再用氯仿-甲醇(1:1, 体积比)溶液提取 2 次, 取下层氯仿相烘干得称重( $G_L$ )。

脂类含量:

$$G(\text{mg/g}) = \frac{G_L}{VX}$$

其中,  $V$  和  $X$  分别是藻液体积和生物量(细胞浓度)。

脂类合成速率:

$$r(\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})) = \frac{X_n G_n - X_0 G_0}{t_n - t_0}$$

脂类比合成速率:

$$q(\text{d}^{-1}) = \frac{r}{X_n}$$

其中,  $X_0$ 、 $G_0$  和  $X_n$ 、 $G_n$ , 分别是实验开始( $t_0$ )时和结束( $t_n$ )时的生物量和脂类含量。

(2) 脂肪酸组成分析。取烘干后的总脂样加入 2 mL NaOH-甲醇溶液进行皂化, 在沸水浴中水浴加热 30 min。待冷却至室温后, 加入 2 mL HCl-甲醇溶液, 1 mL 甲醇-硫酸溶液进行甲酯化, 在 80 °C 水浴中加热 10 min, 然后置于-20 °C 急冷。取出后自然升温至室温, 加入 0.5 mL 的正己烷进行萃取, 静置分层, 然后分离上层浅黄色脂肪酸甲酯。脂肪酸采用气相色谱-质谱联机分析, 氢火焰检测器, 毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ), 载气流速 30 mL/min, 进样量为 0.5  $\mu\text{L}$ , 进样温度 250 °C。程序升温: 50 °C 保持 3 min, 再以 5 °C/min 升温至 110 °C, 然后 5 °C/min 升温至 250 °C。测定数据与数据库标准谱图比对确认脂肪酸种类, 并采用归一化法计算脂肪酸的相对含量。

### 1.8.3 叶绿素及类胡萝卜素含量

参考文献[29]的方法分析计算。

### 1.8.4 蛋白质和碳水化合物(多糖)含量

分别按照 Dong 等<sup>[30]</sup>和 Cai 等<sup>[17]</sup>的方法进行分析。

### 1.8.5 培养液中氮浓度

按照 Dong 等<sup>[16]</sup>的方法进行分析。

### 1.8.6 培养液 pH

用 pH 计测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 衣藻无菌种

多种抗生素的组合使用有效抑制了异养微生物的生长,进一步稀释涂布后,衣藻在平板上形成了单藻落(图 1)。将单藻落转接到 BBM 液体培养基中培养一周后,再划线鉴定,未发现其它杂菌,说明由单藻类制备的藻种为无菌种。

### 2.2 衣藻胞外产物的总有机碳

随着衣藻细胞生长和浓度的提高,EOC 持续上升。当衣藻细胞生长进入稳定期后(14 d),EOC 趋于平稳,最高值达到了 135 mg/L (图 2),说明衣藻 EOC 的分泌与细胞生长相关。类似于初级产物的合成,其组成可能与其它藻类相似,主要是碳水化合物、蛋白质或氨基酸以及有机酸如乙醇酸等<sup>[31]</sup>。

### 2.3 DT06 利用衣藻胞外产物进行代谢

如图 3 所示,在添加衣藻培养液的 BBM 培养基中,DT06 的生物量( $OD_{580}$ ) 6 h 后开始显著上升,18 h 后趋于稳定。相比之下,未添加衣藻培养液的培养基的  $OD$  值基本没有变化。这一结果表明,

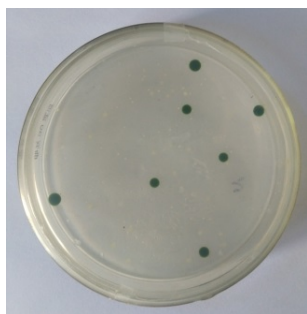


图 1 衣藻在平板上形成的藻落

Figure 1 Colonies of *C. reinhardtii* on petri dish

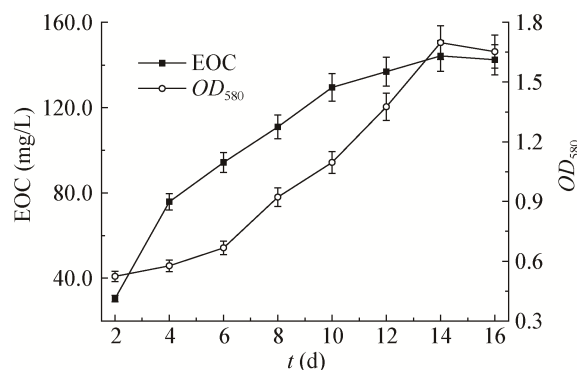


图 2 衣藻细胞浓度和 EOC 的时间曲线

Figure 2 Time curves of cell concentration and EOC

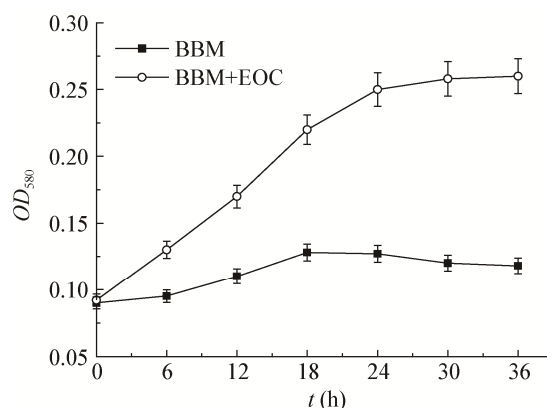


图 3 DT06 在添加 EOC 培养基中的生长曲线

Figure 3 Growth curves of DT06 in medium with and without EOC

DT06 能够利用衣藻分泌的 EOC 进行生长和增殖。但由于 EOC 的浓度较低,DT06 的生长持续时间较短,生物量也较低。

### 2.4 衣藻的生物量和比生长速率

如图 4 所示,衣藻单独培养过程中,生物量在前 6 天缓慢上升(停滞或适应期),第 8 天快速增加,细胞进入指数生长期,12 d 后趋于平稳(稳定期),最终达到 1.83 g/L。与此相比,混合培养过程中,衣藻的适应期较短,生物量在第 6 天即快速升高,实验结束时达到 2.85 g/L,比衣藻单独培养的生物量提高了 55.7%。

进一步的生长动力学(图 5)分析表明,混合培养时衣藻的比生长速率在第 2 天就高于单独培养的

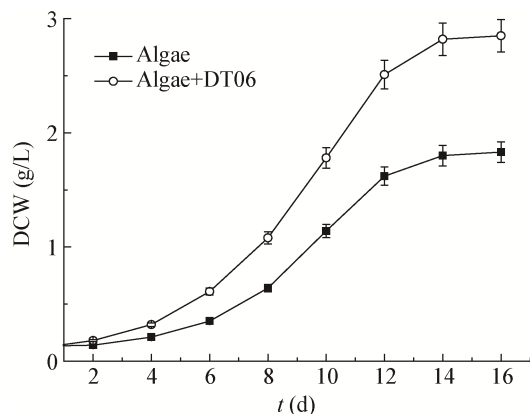


图4 衣藻的生长曲线

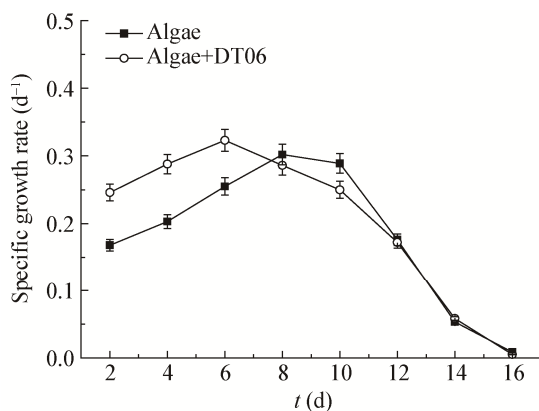
Figure 4 Growth curves of *C. reinhardtii*

图5 衣藻比生长速率的变化曲线

Figure 5 Time curves of the specific growth rate of *C. reinhardtii*

比生长速率( $0.17 \text{ d}^{-1}$ ), 达到  $0.25 \text{ d}^{-1}$ , 然后快速上升, 第6天达到最高值  $0.33 \text{ d}^{-1}$  后开始缓慢下降; 而单独培养时衣藻的比生长速率上升缓慢, 第8天达到最大值  $0.27 \text{ d}^{-1}$ , 第10天开始急剧下降。因此衣藻混合培养前期的比生长速率显著高于单独培养, 而后期基本接近。整个培养过程中, 衣藻混合培养的总(平均)比生长速率为  $0.203 \text{ d}^{-1}$ , 倍增时间为  $3.415 \text{ d}$ , 较单独培养的比生长速率  $0.184 \text{ d}^{-1}$  和倍增时间  $3.767 \text{ d}$  分别提高和降低了  $10.3\%$  和  $9.3\%$ , 因此衣藻混合培养的生长速率即产率  $0.171 \text{ g/(L} \cdot \text{d)}$  比单独培养的生长速率  $0.113 \text{ g/(L} \cdot \text{d)}$  提高了  $51.3\%$  (图6)。

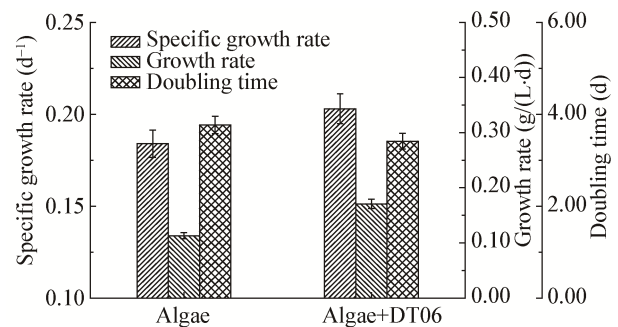


图6 衣藻的比生长速率、生长速率和倍增时间

Figure 6 The general specific growth rate, growth rate and doubling time of *C. reinhardtii*

## 2.5 衣藻叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

叶绿素和类胡萝卜素是衣藻的主要光合色素, 与光合作用效率和细胞生长密切相关, 但二者的变化趋势不完全相同。衣藻在单独混合和培养过程中, 前期叶绿素含量均上升, 在12 d达到最高值后开始下降, 实验结束时含量分别为  $13.3 \text{ mg/g}$  和  $11.2 \text{ mg/g}$ , 前者较后者提高了  $17.9\%$  (图7)。

与叶绿素不同, 衣藻的类胡萝卜素含量在混合和单独培养过程中始终处于上升趋势, 12 d 以前上升较快, 但此后上升较慢, 最终分别达到  $26 \text{ mg/g}$  和  $17 \text{ mg/g}$ , 前者较后者提高了  $52.9\%$  (图8)。由于类胡萝卜素是脂溶性色素, 具有双重功能, 前期合成的可能是参与光合作用的初级类胡萝卜素, 而后期合成的主要是不参与光合作用但与脂类合成相关的次级类胡萝卜素。

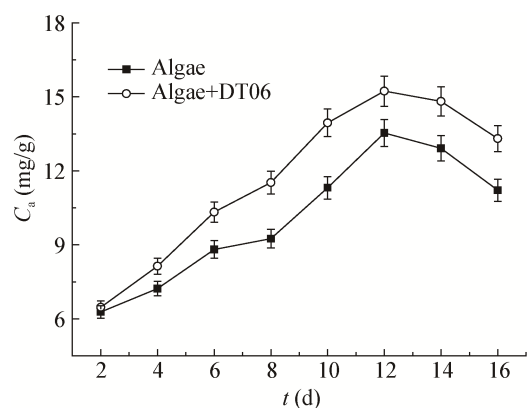


图7 衣藻叶绿素含量的变化曲线

Figure 7 Time course of chlorophyll contents in *C. reinhardtii*

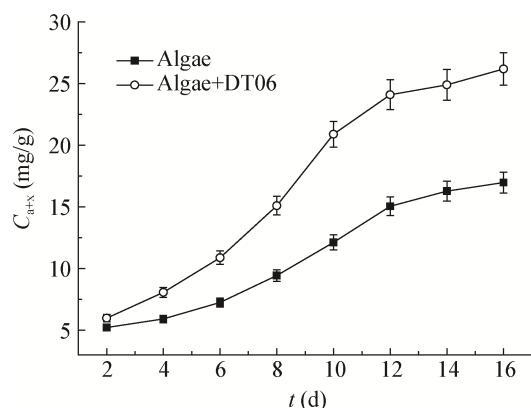


图 8 衣藻类胡萝卜素含量的变化曲线

Figure 8 Time course of carotenoids contents in *C. reinhardtii*

## 2.6 衣藻碳水化合物和蛋白质含量的变化

如图 9 所示, 单独培养所得衣藻的碳水化合物和蛋白质含量分别为 42.6% 和 37.8%; 混合培养所得衣藻二者的含量分别为 39.2% 和 36.1%。与单独培养相比, 混合培养的衣藻的碳水化合物和蛋白质含量均下降, 分别降低了 8.0% 和 4.5%, 这可能是混合培养过程的后期衣藻细胞内碳水化合物和蛋白质降解造成的。

## 2.7 藻细胞脂类含量及脂肪酸组成的变化

经过 16 d 的培养, 衣藻单独和混合培养的脂类含量分别达到 167 mg/g 和 220.4 mg/g, 后者较前者提高了 31.97% (图 10)。进一步将脂类含量与细胞生物量整合的动力学分析结果表明, 衣藻混合和单独培养的脂类合成速率(产率)分别为 0.94 mg/(L·d) 和 1.95 mg/(L·d), 提高了 107.45%;

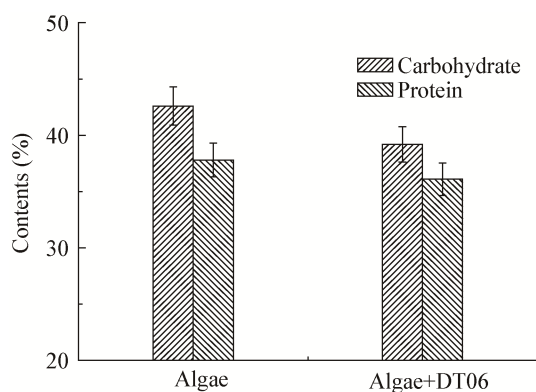


图 9 衣藻碳水化合物和蛋白质含量

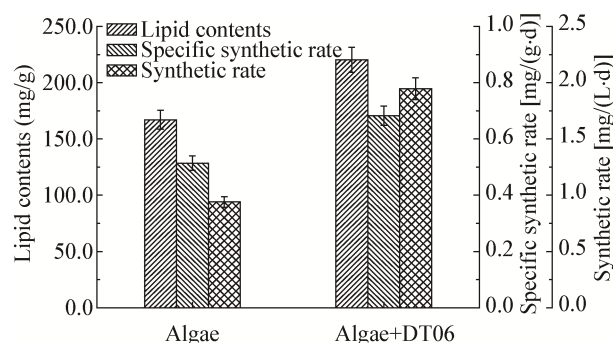
Figure 9 Carbohydrate and protein contents of *C. reinhardtii*

图 10 衣藻脂类含量、比合成速率和合成速率

Figure 10 Lipid contents, specific synthetic and synthetic rates of *C. reinhardtii*

比合成速率分别为 0.51 mg/(g·d) 和 0.68 mg/(g·d), 提高了 33.3%。

培养结束时衣藻的脂肪酸组成分析结果(表 1)表明: 与单独培养相比, 衣藻混合培养时不饱和脂肪酸的相对含量均有不同程度的提高, 其中 C18-0 上升幅度最大, 达到 28.61%, 而 C14-0、C16-0 和 C20-0 分别提高 20.28%、5.61% 和 6.62%; 不饱和脂肪酸相对含量除 C18-1 和 C18-2 分别提高 14.97% 和 8.31% 外, 其余均有不同程度下降。由此可以看出, 混合培养能提高饱和脂肪酸的含量, 并且生物柴油的标志性成分 C18-1 也有较大幅度的提高, 因此混合培养比单独培养的衣藻脂肪酸更适合于生物柴油的加工。

表 1 衣藻的脂肪酸组成

Table 1 Fatty acid composition of *C. reinhardtii*

脂肪酸组成	衣藻	衣藻+DT06
Fatty acid composition	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i> +DT06
C14-0	2.12	2.55
C16-0	15.87	16.76
C16-1	6.34	5.23
C16-2	5.22	4.47
C16-3	3.49	3.15
C18-0	3.95	5.08
C18-1	7.28	8.37
C18-2	20.46	22.16
C18-3	19.33	17.89
C18-4	5.71	3.89
C20-0	8.16	8.70
C20-1	2.07	1.75



## 2.8 培养液中氮浓度的变化

氮浓度是培养液中总氮的浓度, 包括  $\text{NO}_3^-$  及其被藻细胞还原利用过程中产生的  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NH}_4^+$ , 以及藻细胞分泌的氨基酸等有机氮。如图 11 所示, 衣藻单独培养过程中培养液的氮浓度缓慢下降, 第 6 天为 1.92 mmol, 实验结束时 0.61 mmol。这一趋势与雨生红球藻培养液中氮浓度的变化相似<sup>[32]</sup>。由于衣藻和其它绿藻培养过程中培养基的初始态氮如  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NH}_4^+$  能够被藻细胞迅速吸收和吸附, 导致其浓度快速下降至趋近零<sup>[33-34]</sup>, 因此衣藻单独培养液中氮浓度下降缓慢说明衣藻分泌的 EOC (图 2) 中含有大量的有机氮。与单独培养不同, 衣藻混合培养液中氮浓度前 6 天快速下降至 0.86 mmol, 实验结束时降至 0.18 mmol 左右(图 11)。这一结果表明, 混合培养过程中衣藻分泌的有机氮被真菌 DT06 吸收利用。

## 2.9 培养液 pH

衣藻单独培养过程中, pH 由初始的 6.8 逐渐上升至 9.5 左右; 而混合培养液的 pH 在第 4 天上升至 7.5 后, 基本稳定在 7.0–8.0 之间(图 12)。pH 上升的原因有两点: (1) 衣藻细胞生长过程中吸收利用生理碱性盐, 如硝酸盐和磷酸盐等导致碱性离子的积累; (2) 衣藻可能与其它绿藻如红球藻相似, 能够分泌碱性物质如蛋白和铵离子<sup>[30]</sup>。由于 DT06 不能合成有机酸<sup>[35]</sup>, 因此混合培养过程中 pH 基本稳定的原因可能是 DT06 吸收利用了衣藻细胞分泌

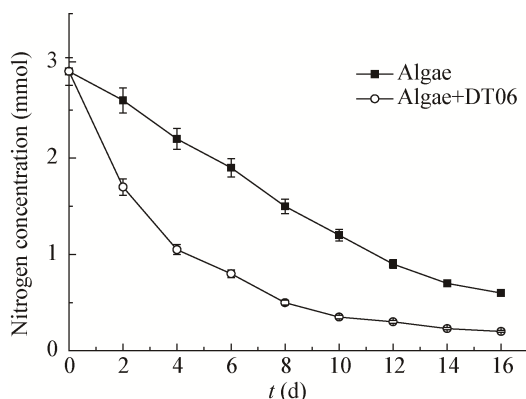


图 11 培养液氮浓度的变化曲线

Figure 11 Change of nitrogen concentration

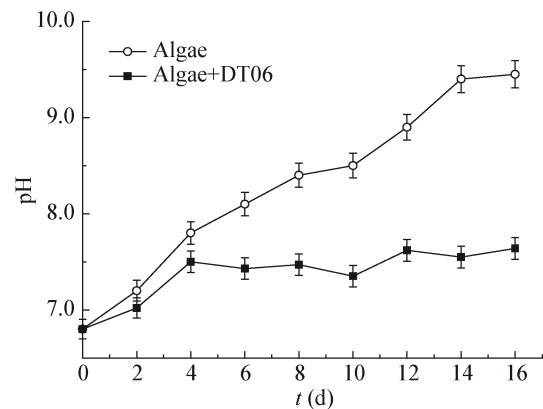


图 12 培养液的 pH 变化曲线

Figure 12 Time course of culture broth pH

的碱性物质, 并且其释放的  $\text{CO}_2$  呈酸性, 中和了生理碱性盐的阳离子。

## 3 讨论

真菌和细菌能够与衣藻共生并产生协同作用, 然而其机理不尽相同。此前的研究表明: (1) 真菌(*Alternaria*)和细菌(*Azotobacter*)通过分泌有机氮和固氮促进衣藻的生长<sup>[35]</sup>; (2) 细菌 *Bradyrhizobium japonicum* (固氮根瘤菌)<sup>[36-38]</sup>, 以及 *Stenotrophomonas*、*Microbacterium* 和 *Pseudomonas* 属的细菌<sup>[39]</sup>能够促进衣藻的呼吸作用进而提高衣藻的生物量和氢气产量; (3) 细菌 *Sinorhizobium meliloti* 和 *Mesorhizobium* sp. 通过合成维生素  $\text{B}_{12}$  促进衣藻的生长并提高其耐热性<sup>[40-41]</sup>。本实验中真菌 DT06 促进衣藻细胞生长的原因有如下 3 个方面: (1) DT06 代谢衣藻胞外产物的过程中吸收氧气并释放二氧化碳, 从而导致培养液中二氧化碳的上升和氧浓度的下降, 即  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  分率的提高。二氧化碳是光合作用的底物, 其浓度与光合作用速率呈正相关; 而  $\text{O}_2$  是光合作用的产物, 能够抑制光合作用, 并且高浓度的  $\text{O}_2$  引发光呼吸, 降解光合作用的中间产物。因此  $\text{CO}_2$  浓度的上升和  $\text{O}_2$  浓度的下降产生正向的叠加效应, 提高衣藻的光合反应速率。这一点与其它的丝状真菌和酵母促进藻类生长的机理相似。(2) DT06 分泌的代谢产物有利于或刺激衣藻的生长。DT06 对环境变化的适应能力极强, 代谢产物也复杂多样。在单独发酵过

程中除能够合成一种新的抗生素外,还分泌胞外多糖、色素、蛋白质以及其它未知产物等<sup>[42]</sup>。而在混合培养过程中 DT06 可能合成同样的产物,虽然其浓度较低,但能够促进藻细胞的生长:(1) 衣藻在混合培养过程中叶绿素含量比单独培养时高(图 7),能够促进光合作用。由于叶绿素的合成与藻细胞的氮代谢密切相关,其含量在氮源缺乏时下降,而氮源充足时上升,说明 DT06 分泌的蛋白质和其它含氮物质被衣藻细胞吸收,用以合成叶绿素;(2) 一般微生物胞外多糖具有絮凝性,能够促进藻细胞聚集沉降,因而常用于藻细胞采收。而 DT06 多糖则具有分散性,能够使藻细胞在培养液中均匀分散而不沉降,降低了藻细胞间的遮光效应,提高了衣藻细胞的捕光效率;(3) DT06 的未知产物中可能含有类似植物激素如吲哚乙酸等,能够刺激藻细胞的分裂和生长。(4) DT06 代谢稳定了混合培养液的 pH,使 pH 稳定在 7.5 左右有利于衣藻的生长;而 pH 高于 8.0 时衣藻的生长会受到抑制。

DT06 促进衣藻脂类合成和改变脂肪酸组成的主要原因可能有两方面:(1) DT06 释放的 CO<sub>2</sub> 导致培养液中 CO<sub>2</sub> 的浓度上升,而高浓度的 CO<sub>2</sub> 不仅提高衣藻脂类合成速率,而且影响其脂肪酸组成<sup>[43]</sup>;(2) 衣藻在混合培养过程中快速生长,培养液中的氮浓度迅速下降(图 11),导致氮源不足即“氮饥饿(Nitrogen starvation)”,因此其比生长速率较单独培养提前开始下降(图 5),即生长受到抑制。此前对于雨生红球藻、小球藻和栅藻等绿藻的研究表明,“氮饥饿”能够抑制蛋白质和多糖的合成,促进脂类和脂溶性次级类胡萝卜素的合成,并且最终导致蛋白质和多糖的降解,使碳通量流向脂类合成的方向<sup>[30,44-45]</sup>。衣藻混合培养比单独培养时的碳水化合物和蛋白质含量分别降低了 8.0%和 4.5%(图 9),而脂溶性类胡萝卜素含量调高了 52.9%(图 8)。因此将上述实验数据综合分析可以看出:DT06 促进衣藻脂类合成与细胞氮代谢不平衡有关,即混合培养后期的“氮饥饿”促进了衣藻的脂类合成。

## 4 结论

蓝藻共生真菌 DT06 能够代谢利用衣藻的胞外产物,并在混合培养过程中促进衣藻细胞的生长和脂类的合成,因此藻-菌混合培养模式在生物柴油原料的生产中有潜在应用价值。

## REFERENCES

- [1] Moreno-Garcia L, Adjallé K, Barnabé S, et al. Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 76: 493-506
- [2] Chisti Y. Constraints to commercialization of algal fuels[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(3): 201-214
- [3] Ahmadjian V, Jacobs JB. Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck[J]. Nature, 1981, 289(5794): 169-172
- [4] Magdouli S, Brar SK, Blais JF. Co-culture for lipid production: advances and challenges[J]. Biomass and Bioenergy, 2016, 92: 20-30
- [5] Padmaperuma G, Kapoore RV, Gilmour DJ, et al. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(5): 690-703
- [6] Tandon P, Jin Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 80: 1089-1099
- [7] Guo Z, Tong YW. The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(3): 1483-1492
- [8] Qu L, Wang RJ, Zhao P, et al. Interaction between *Chlorella vulgaris* and bacteria: interference and resource competition[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 33(1): 135-140
- [9] Shang H, Xue LG, Ma P, et al. Characteristics of *Chlorella* microalgal-bacterial condorcicin oil production[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2280-2288 (in Chinese)  
尚海, 薛林贵, 马萍, 等. 小球藻藻菌共生体系在产油方面的特性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2280-2288
- [10] Shi YQ, Zhao Y. Growth and lipid accumulation promotion of *Chlorella* by endophytic *Pantoea* sp. from rice seeds[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(8): 1429-1442 (in Chinese)  
史玉倩, 赵艳. 水稻种子内生泛菌促进小球藻生长和油脂积累[J]. 中国农业科学, 2016, 49(8): 1429-1442
- [11] Wang RM, Tian Y, Xue SZ, et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of *Scenedesmus obliquus* and *Candida tropicalis* in an autotrophic system[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016, 91(5): 1387-1396
- [12] Watanabe K, Takihana N, Aoyagi H, et al. Symbiotic association in *Chlorella* culture[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 51(2): 187-196
- [13] Lőrincz Z, Preininger É, Kósa A, et al. Artificial tripartite symbiosis involving a green alga (*Chlamydomonas*), a bacterium (*Azotobacter*) and a fungus (*Alternaria*): morphological and physiological characterization[J]. Folia Microbiologica, 2010, 55(4): 393-400



- [14] Mackay S, Gomes E, Holliger C, et al. Harvesting of *Chlorella sorokiniana* by co-culture with the filamentous fungus *Isaria fumosorosea*: a potential sustainable feedstock for hydrothermal gasification[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 353-361
- [15] Han JC, Zhang L, Wang S, et al. Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium[J]. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 2016, 23: 8
- [16] Dong QL, Zhao XM. *In situ* carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*[J]. *Catalysis Today*, 2004, 98(4): 537-544
- [17] Cai SQ, Hu CQ, Du SB. Comparisons of growth and biochemical composition between mixed culture of alga and yeast and monocultures[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(5): 391-397
- [18] Shu CH, Tsai CC, Liao WH, et al. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2012, 87(5): 601-607
- [19] Shu CH, Tsai CC, Chen KY, et al. Enhancing high quality oil accumulation and carbon dioxide fixation by a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2013, 44(6): 936-942
- [20] Papone T, Kookkhunthod S, Leesing R. Microbial oil production by monoculture and mixed cultures of microalgae and oleaginous yeasts using sugarcane juice as substrate[J]. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2012, 64(4): 1127-1131
- [21] Zhang ZP, Ji HR, Gong GP, et al. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 93-99
- [22] Yen HW, Chen PW, Chen LJ. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 148-152
- [23] Wang SK, Wu Y, Wang X. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 615-620
- [24] Zhang JG, Hu B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 529-535
- [25] Zhou WG, Cheng YL, Li Y, et al. Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(2): 214-228
- [26] Xie SX, Sun S, Dai SY, et al. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi[J]. *Algal Research*, 2013, 2(1): 28-33
- [27] Wrede D, Taha M, Miranda AF, et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113497
- [28] Dong QL, Lin TY, Xing XY, et al. Identification of a symbiotic fungus from blue-green alga and its extracellular polysaccharide[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 58(4): 303-310
- [29] Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144(3): 307-313
- [30] Dong QL, Zhao XM, Xing XY, et al. Concomitant  $\text{NH}_4^+$  secretion during astaxanthin synthesis in *haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, 15(2): 162-166
- [31] Stewart WDP. *Algal Physiology and Biochemistry*[M]. Oxford: University of California Press, 1974: 838-863
- [32] Dong QL, Zhao XM, Xing XY. Inducing mechanism of acetate on astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(2): 256-260 (in Chinese)  
董庆霖, 赵学明, 邢向英. 乙酸钠诱导雨生红球藻合成虾青素的机理[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 256-260
- [33] Kropat J, Hong-Hermesdorf A, Casero D, et al. A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(5): 770-780
- [34] Wang QY, Luo SH, Zhang Y, et al. Assimilation of nitrate-nitrogen and carbon dioxide by *Scenedesmus acuminatus* under different initial nitrogen concentrations[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 583-591 (in Chinese)  
王倩雅, 罗舒怀, 张莹, 等. 不同初始氮浓度下尖状栅藻同化硝态氮和  $\text{CO}_2$  的研究[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 583-591
- [35] Dong QL, Dong RZ, Xing XY, et al. A new antibiotic produced by the cyanobacterium-symbiotic fungus *Simplicillium lanosoniveum*[J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(11): 1348-1352
- [36] Wu SX, Li XX, Yu J, et al. Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 184-188
- [37] Xu LL, Wang QX, Wu SX, et al. Optimization of co-cultivation conditions of transgenic alga hemHc-lbac and *Bradyrhizobium japonicum* for hydrogen production[J]. *Ecological Science*, 2014, 33(1): 106-112 (in Chinese)  
许丽丽, 王全喜, 吴双秀, 等. 转基因莱茵衣藻 hemHc-lbac 和根瘤菌共培养提高产氢培养条件的优化[J]. *生态科学*, 2014, 33(1): 106-112
- [38] Xu LL, Xu X, Wu SX, et al. Optimization of co-cultivation conditions of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum* for hydrogen production[J]. *Acta Energetica Sinica*, 2015, 36(10): 2565-2570 (in Chinese)  
许丽丽, 徐潇, 吴双秀, 等. 莱茵衣藻和根瘤菌共培养提高产氢条件的优化[J]. *太阳能学报*, 2015, 36(10): 2565-2570
- [39] Li XX, Huang S, Yu J, et al. Improvement of hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-cultivation with isolated bacteria[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38(25): 10779-10787
- [40] Xie B, Bishop S, Stessman D, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B<sub>12</sub>-producing bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(8): 1544-1555
- [41] Xia JR, Gao KS. Impacts of elevated  $\text{CO}_2$  concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6): 668-675
- [42] Ho SH, Chen CY, Chang JS. Effect of light intensity and nitrogen starvation on  $\text{CO}_2$  fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 113: 244-252
- [43] Zhu SN, Huang W, Xu J, et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 292-298