

季 祥,成 杰,廖利民,等. 1株斜生栅藻扩大培养条件的优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):303-305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.100

1株斜生栅藻扩大培养条件的优化

季 祥^{1,2},成 杰²,廖利民²,巩东辉²,蔡 禄²,齐 云¹,陈冠益^{1*}

(1. 天津大学环境科学与工程学院,天津 300072;2. 内蒙古科技大学生物工程与技术研究所,内蒙古包头 014010)

摘要:为了促进微藻快速生长、提高微藻生物量,在试验室条件下对1株含油量相对较高、长势较好的斜生栅藻进行10 L扩大培养,并通过单因素和正交试验对4种主要营养盐进行优化。结果表明,在扩大培养的10 L反应器中,斜生栅藻的最适生长条件为:NaNO₃ 1.0 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 0.10 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.100 g/L、FeCl₃·6H₂O 0.008 g/L,斜生栅藻在该优化后的10 L培养基中生长情况良好,且最大生物量($D_{680\text{nm}}$)可达1.91,分别是10 L-BG11、250 mL-BG11条件下的1.20、1.28倍。

关键词:斜生栅藻;扩大培养;生物量;生长条件;优化

中图分类号: Q968.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0303-03

随着人类社会资源的短缺和环境问题的日益突出,世界各国正面临着能源匮乏和生态环境破坏的危机,因此寻求一种新型的可再生能源成为世界各国科学家普遍关注的科学问题和发展趋势^[1]。生物柴油是清洁的、环境友好的可再生能源,但由于其原材料成本较高,目前生物柴油的价格仍高于传统柴油。而在众多的能源微生物中,微藻具有种类繁多、光合利用度高、自身合成油脂能力强等优点^[2]。利用藻类油脂生产生物柴油具有缓解温室效应,不与人争粮、不与粮争地的众多优点,通过微藻油转化生产生物柴油具有广阔的开发利用前景。为了快速获得较大的微藻生物量,对微藻的扩大培养显得至关重要,而在不同反应器中,微藻对营养盐的需求也不一样。因此,笔者对试验室的1株含油量较高的斜生栅藻进行了10 L扩大培养研究,对其生长条件进行了优化,最大限度地提高该藻的生物量,为其工业化生产应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种来源

试验藻种为斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*),保存于内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室。

1.2 培养条件

试验采用10 L广口瓶为反应器,以前期工作^[3]改进的BG11培养基作为基础培养基,装液量为7 L,接种量5%,置于环境温度(25±1)℃、光照强度5 000 lx、光照周期

14 L/10 d的条件下培养。

1.3 微藻生物量的测定

微藻生物量的测定采用浊度比色法^[4]。本试验采用752紫外可见分光光度计,在波长680 nm处测定培养液的吸光度($D_{680\text{nm}}$),试验结果数据采用SPSS Statistics 17.0、Origin Pro 8.0和Microsoft Office Excell 2007软件进行分析处理。

1.4 斜生栅藻生长条件的优化

1.4.1 4种主要营养盐单因子试验 试验对影响斜生栅藻生长最主要的N、P、Mg、Fe营养盐进行研究,在接种前1 d分别换上不加N、P、Mg、Fe营养盐的改进BG11培养基,培养24 h后按0、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L的质量浓度加入NaNO₃,按0、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 g/L的质量浓度加入K₂HPO₄·3H₂O,按0、0.050、0.075、0.100、0.125 g/L的质量浓度加入MgSO₄·7H₂O,按0、0.002、0.004、0.006、0.008、0.010 g/L的质量浓度加入FeCl₃·6H₂O。每组均作3个平行试验,待微藻处于稳定生长期,取最大的 $D_{680\text{nm}}$ 平均值,考察在不同浓度的N、P、Mg、Fe营养盐条件下斜生栅藻的生长情况。

1.4.2 正交试验 在单因素试验的基础上进行正交试验,按表1因素水平表中各水平分别加入NaNO₃、K₂HPO₄·3H₂O、MgSO₄·7H₂O和FeCl₃·6H₂O营养盐,参照正交试验法^[5]选用L₉(3⁴)设计进行正交试验。

表1 斜生栅藻生长条件的优化L₉(3⁴)正交试验因素水平

水 平	各营养盐的质量浓度(g/L)			
	A:NaNO ₃	B:K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	C:MgSO ₄ ·7H ₂ O	D:FeCl ₃ ·6H ₂ O
1	0.5	0.05	0.075	0.004
2	1.0	0.10	0.100	0.006
3	1.5	0.15	0.125	0.008

2 结果与分析

2.1 NaNO₃对斜生栅藻生长的影响

微藻在增殖过程中需要营养物质,氮是微藻体内许多重要有机化合物的组成成分之一,在许多方面影响植物的代谢

收稿日期:2014-10-22

基金项目:内蒙古自治区重大基础研究开放课题(编号:20120908);内蒙古自治区教育厅自然科学基金重点项目(编号:NJZZ14162);内蒙古自治区自然科学基金(编号:2015MS0335);天津市海洋局科技兴海项目(编号:KX2010-0005)。

作者简介:季 祥(1978—),男,内蒙古包头人,硕士,副教授,主要从事生物质能、能源微藻研究。Tel:(0472)5951554;E-mail:jixiang@imust.cn。

通信作者:陈冠益,博士,教授,主要从事生物质能源、废弃物资源化利用、污泥能源化研究。E-mail:leexer@163.com。

过程和生长发育。其中,氮是微藻细胞蛋白质叶绿素的组成成分,是组成核酸的重要元素之一,同时微藻体内的各种生物酶也含有氮^[6]。微藻在生长过程中通常能利用铵盐、硝酸盐及尿素作氮源,本试验以 NaNO_3 为氮源,在培养基中加入不同质量浓度的 NaNO_3 ,考察不同质量浓度的 NaNO_3 在 10 L 培养体系中对斜生栅藻生长的影响,结果如图 1 所示。

从整体上看,随着 NaNO_3 质量浓度的不断增加,斜生栅藻的生物量呈现出先上升后下降的趋势。利用软件分析可知, NaNO_3 质量浓度与斜生栅藻生物量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),且各组间生物量差异显著 ($P < 0.05$)。当 NaNO_3 质量浓度为 0 时,生物量最低;随着 NaNO_3 质量浓度的增加,栅藻生物量逐渐上升,当质量浓度为 1.0 g/L 时,斜生栅藻生物量在各组间最大, $D_{680 \text{ nm}}$ 为 1.59,而持续增加 NaNO_3 质量浓度并不能促进微藻的生长,生物量开始逐渐降低,说明过高质量浓度的 NaNO_3 会抑制斜生栅藻的生长。由此得出, NaNO_3 最适质量浓度为 1.0 g/L (图 1)。

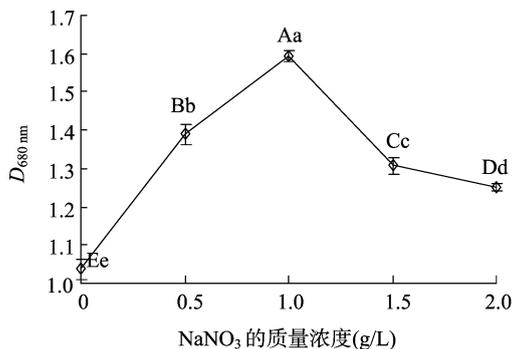


图1 不同质量浓度的 NaNO_3 对斜生栅藻生长的影响

2.2 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响

磷是植物生长发育必需的营养元素之一,是微藻体内许多有机化合物的组成成分,同时磷以多种方式参与微藻体内的各种代谢过程,是生物体内 ATP、GTP、核酸、磷脂、辅酶等化合物合成的基本元素,在微藻生长发育中起重要的作用。本试验以 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 为磷源,研究不同质量浓度的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响,结果如图 2 所示。

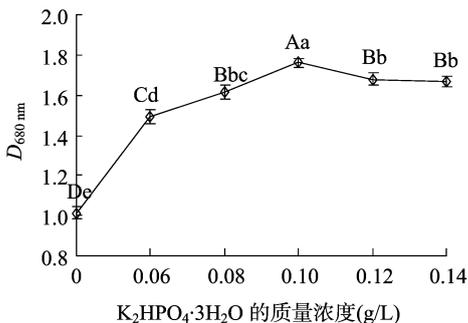


图2 不同质量浓度的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响

由图 2 可知, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度在 0 ~ 0.14 g/L 范围内均能促进斜生栅藻生长,且生物量与其呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。当 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0 ~ 0.10 g/L 时,磷盐对斜生栅藻生物量的促进作用明显,同时在 0.10 g/L 时生物量达到最大;而当 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度大于 0.10 g/L 时,该藻的生物量呈现下降趋势,但随着磷盐质量

浓度缓慢增加,栅藻生长表现出一定的耐受性。因此,在 10 L 培养体系中,斜生栅藻的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 最适质量浓度为 0.10 g/L。

2.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻的生长影响

镁是叶绿素的组成成分,在叶绿素合成和光合作用中起重要作用^[7],镁还参与生物体内的氮代谢和活性氧代谢。在试验中选取 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供镁元素,研究不同质量浓度的 Mg^{2+} 对斜生栅藻扩大培养时生长的影响,试验结果如图 3 所示。

由图 3 可知,斜生栅藻在不同质量浓度的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 条件下所达到的最大生物量有所差异。当培养液中不含镁时,斜生栅藻生物量较低,当培养液中镁元素存在时,可见其生物量迅速增加,由软件分析可知,镁质量浓度与微藻生物量是显著正相关的 ($P < 0.01$),同时含有 Mg^{2+} 与缺镁条件下的生物量差异显著 ($P < 0.05$)。而当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度达 0.05 g/L 后,生物量表现出一定程度的先下降后上升的趋势,但趋势较缓,增量不明显,差异也不显著 ($P > 0.05$)。这可能主要是由于培养液中持续镁质量浓度的增加,对微藻生长产生了一定的抑制作用,同时由于微藻机体自身的耐受能力,在微藻适应了较高质量浓度下的 Mg^{2+} 后,出现一定程度的生长现象,可以推测后续持续增加镁质量浓度会造成微藻生物量急剧降低。综合以上分析结果可知,0.100 g/L 为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的最适质量浓度。

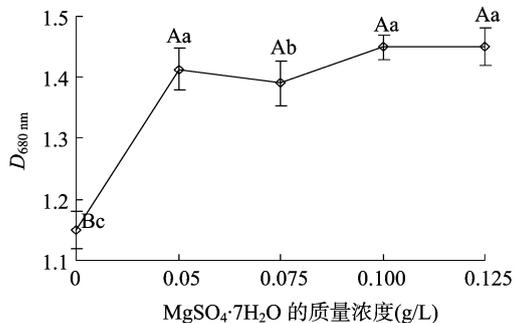


图3 不同质量浓度 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响

2.4 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响

铁元素在微藻生理上有重要作用,是一些重要的氧化-还原酶催化部分的组分。铁虽然不是叶绿素的组成成分,但缺铁时,叶绿体的片层结构发生很大变化,严重时甚至使叶绿体发生崩解。而且铁在微藻体内以各种形式与蛋白质结合,作为重要的电子传递体或催化剂参与许多生命活动。本试验以 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为铁盐,考察不同质量浓度的 Fe^{3+} 对斜生栅藻扩大培养时生长的影响,试验结果如图 4 所示。

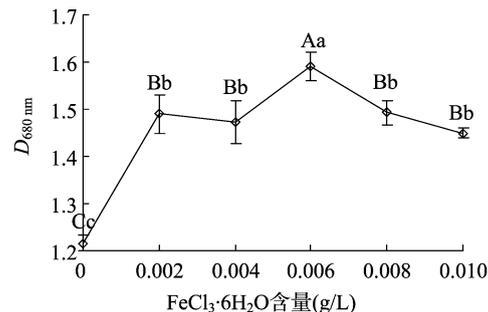


图4 不同质量浓度的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对斜生栅藻生长的影响

由图4可知,尽管培养液中对 Fe^{3+} 含量要求较低,但对微藻生物量的影响很大。由软件分析结果可知, Fe^{3+} 与斜生栅藻生物量呈极显著正相关($P < 0.01$)。当培养液中缺铁时,斜生栅藻生物量较低; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的增加能够迅速促进微藻生物量的积累,当 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度达 0.006 g/L 时,生物量达到最高, $D_{680 \text{ nm}}$ 为 1.59 ;而随着质量浓度的进一步增加,微藻生物量开始降低,表现出抑制作用。说明适宜的 Fe^{3+} 质量浓度能够促进微藻细胞增殖,有利于生物量积累。因此, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的最适质量浓度为 0.006 g/L 。

2.5 4种营养盐对斜生栅藻生长影响程度和优化水平组合

在不同条件下,斜生栅藻对营养盐的需求有很大的差异,为了研究斜生栅藻在扩大培养时的最佳培养基配比,采用正交设计对这4种营养盐进行多因子组合试验,按表1因素水平表分别加入营养盐,在10 L反应器中培养,结果见表2。

表2 4种营养盐对斜生栅藻生长的影响正交试验结果

编号	A	B	C	D	$D_{680 \text{ nm}}$
1	1	1	1	1	1.579
2	1	2	2	2	1.723
3	1	3	3	3	1.614
4	2	1	2	3	1.845
5	2	2	3	1	1.735
6	2	3	1	2	1.752
7	3	1	3	2	1.641
8	3	2	1	3	1.678
9	3	3	2	1	1.516
k_1	1.639	1.688	1.670	1.610	
k_2	1.777	1.712	1.695	1.705	
k_3	1.612	1.627	1.663	1.712	
R	0.165	0.085	0.032	0.102	

由表2可知,4种营养盐对斜生栅藻生长的影响程度从大到小为 $A > D > B > C$,即 NaNO_3 质量浓度 $> \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度 $> \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度 $> \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度, NaNO_3 质量浓度水平对斜生栅藻生长的影响最大,其次为 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度。通过分析4因素的均值可知,4种营养盐的最优水平组合为 $A_2B_2C_2D_3$,即 NaNO_3 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的最佳质量浓度为 1.0 、 0.10 、 0.008 g/L ,通过后续试验验证可知,斜生栅藻在该优化条件下的生物量 $D_{680 \text{ nm}}$ 可达 1.91 ,是各试验设计组中最高的。此外,在正交试验中4种营养盐的最适质量浓度与单因素的最适质量浓度相吻合的有 NaNO_3 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,而 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 较单因素试验中的质量浓度不同,这可能是由于各因素的交互作用所致。因此,以正交试验分析所得的最适优化组合培养基对斜生栅藻进行10 L扩大培养,可以获得斜生栅藻的最大生物量。

2.6 斜生栅藻在不同培养条件的生长情况

为了进一步验证斜生栅藻10 L扩大培养的最佳营养盐条件,将经正交试验所得的营养盐条件与BG11基础培养条件分别在250 mL以及10 L培养体系下进行微藻整个生长周期的培养,试验结果如图5所示。

由图5可知,斜生栅藻均能在3种不同培养条件下生长,总体生长趋势相当,前6 d为调整期,6~15 d为对数生长期,18 d以后斜生栅藻逐渐进入到稳定生长期,27 d后藻细胞开始衰亡;在优化后的10 L培养体系条件下,斜生栅藻生长趋

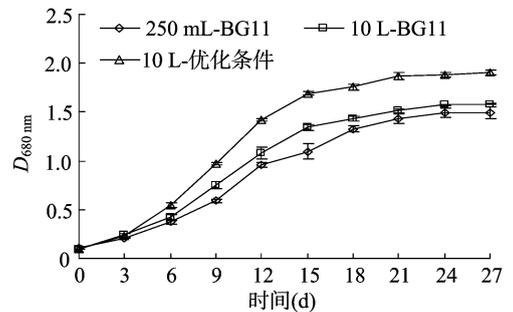


图5 斜生栅藻在不同培养条件的生长情况

势明显好于其余2组,且稳定期收获的生物量最大, $D_{680 \text{ nm}}$ 可达 1.91 ,远高于10 L-BG11、250 mL-BG11条件下的 $D_{680 \text{ nm}}$ (1.58)、 $D_{680 \text{ nm}}$ (1.48),分别是该2组的 1.20 、 1.28 倍。此外,在外界环境条件、营养盐条件相同的情况下,微藻反应体系对其生长影响较大,250 mL体系生物量小于10 L体系,这可能是由于较大反应器更有利于微藻的生长繁殖,特别是在微藻生长繁殖后期,由于微藻细胞密度不断增大,光遮蔽效应日益明显,微藻生长对环境空间以及营养盐的需求表现得更加突显。

3 结论

在单因素试验中, NaNO_3 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的最佳质量浓度为 1.0 、 0.10 、 0.100 、 0.006 g/L 。在10 L反应体系中, NaNO_3 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的最佳质量浓度为 1.0 、 0.10 、 0.10 、 0.008 g/L 。后续试验证明,斜生栅藻在10 L-优化培养中的生物量远高于BG11基础培养基,分别是10 L-BG11、250 mL-BG11培养条件的 1.20 、 1.28 倍,同时10 L反应体系更利于微藻生长繁殖和生物量的积累,该研究也为微藻的扩大培养提供了依据。

参考文献:

- [1] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(2): 557-577.
- [2] Singh A, Nigam P S, Murphy J D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 10-16.
- [3] 季祥,王金荣,丁潇,等.一株斜生栅藻的筛选及生长条件的优化[J].水产科技情报,2010,37(6):265-268.
- [4] Mandotra S K, Kumar P, Suseela M R, et al. Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: a potential feedstock for high quality biodiesel production [J]. Bioresource Technology, 2014, 156(101): 42-47.
- [5] 倪海儿. 生物试验设计与分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2013: 156-160.
- [6] Seppälä J, Tamminen T, Kaitala S. Experimental evaluation of nutrient limitation of phytoplankton communities in the Gulf of Riga [J]. Journal of Marine Systems, 1999, 23(1/2/3): 107-126.
- [7] Huber S C, Maury W. Effects of magnesium on intact chloroplasts [J]. Plant Physiol, 1980, 65: 350-354.