

研究报告

热带普通小球藻培养模式的筛选及其培养基的优化

丁丽欢¹ 王珺^{1,2,3*} 严虹羽¹ 符新欢¹

(1. 海南大学海洋学院 海南 海口 570228)

(2. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室 海南 海口 570228)

(3. 海南大学海洋生物实验教学中心 海南 海口 570228)

摘要:【背景】从海南热带海区中分离得到一株微藻，其生长速度快、适应力强，经鉴定该微藻为普通小球藻。【目的】提高热带普通小球藻的生长速率。【方法】以“宁波大学 3#微藻培养液配方”为基础培养液，分别添加有机碳(C₆H₁₂O₆和 CH₃COONa)对热带普通小球藻进行自养、兼养及异养培养，获得促进热带普通小球藻快速生长的培养方式。在“宁波大学 3#微藻培养液配方”的基础上对热带普通小球藻的兼养培养基配方进行优化，并用优化兼养培养基与“宁波大学 3#微藻培养基”对比培养热带普通小球藻。【结果】添加 6 g/L CH₃COONa 的兼养模式促进热带普通小球藻生长效果最好；优化的兼养培养基配方为：6 g/L CH₃COONa, 20 mg/L (NH₄)₂SO₄-N, 5 mg/L NaH₂PO₄-P, 3 mg/L FeSO₄-Fe, 1 mg/L Vitamin B₁和 0.000 5 mg/L Vitamin B₁₂。对比培养实验结果显示，培养第 6 天，兼养培养液收获的生物量(细胞密度)达 4.20×10⁷ cells/mL，是“宁波大学 3#配方微藻培养液”的 2.30 倍。【结论】兼养培养模式为热带普通小球藻的最佳培养模式，优化的兼养培养基极显著地提高了热带普通小球藻的生物量(P<0.01)。

关键词: 普通小球藻，兼养培养基，优化，生长

Optimization of tropical *Chlorella vulgaris* culture method and its medium formulation

DING Li-Huan¹ WANG Jun^{1,2,3*} YAN Hong-Yu¹ FU Xin-Huan¹

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

(2. Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

(3. Experimental Teaching Center of Marine Biology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: [Background] A strain of microalgae was isolated from the tropical sea of Hainan province, and it has a high growth rate and strong adaptability. The microalga was identified as *Chlorella vulgaris*. [Objective] To improve the growth rate of *C. vulgaris*. [Methods] Based on the formulation of “Ningbo University 3#” medium, organic carbon of C₆H₁₂O₆ and CH₃COONa were added for the

Foundation item: Key Research and Development Program of Hainan Province (ZDYF2016087)

*Corresponding author: Tel: 86-898-66274214; E-mail: 72206wj@163.com

Received: July 31, 2017; Accepted: October 23, 2017; Published online (www.cnki.net): November 01, 2017

基金项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2016087)

*通信作者: Tel: 86-898-66274214; E-mail: 72206wj@163.com

收稿日期: 2017-07-31; 接受日期: 2017-10-23; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-01

autotrophic culture, mixed culture and heterotrophic culture, respectively, and also, the mixotrophy medium of *C. vulgaris* was further optimized. **[Results]** The mixed culture method with 6 g/L CH_3COONa showed the highest growth rate of *C. vulgaris*, comparing with heterotrophic and autotrophic culture method. The optimal formulation of mixotrophy medium was as followed as 6 g/L CH_3COONa , 20 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$, 5 mg/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-P}$, 3 mg/L $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$, 1 mg/L Vitamin B_1 and 0.000 5 mg/L Vitamin B_{12} . The biomass (cell density) of the “mixotrophy medium” was up to 4.20×10^7 cells/mL by the end of the sixth day, being 2.30 times higher than the cell density of “Ningbo University 3#” medium. **[Conclusion]** The mixotrophic mode is optimal to the cultivation of *C. vulgaris* as compared with other two cultivation modes, and the optimized mixotrophic medium significantly enhanced the biomass ($P < 0.01$).

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Mixotrophy medium, Optimization, Growth

热带普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)属于绿藻门(Chlorophyta)绿藻纲(Chlorophyceae)绿球藻目(Chlorococcales)卵囊藻科(Oocystaceae)小球藻属(*Chlorella*), 是一类普生性的单细胞绿藻^[1]。其细胞中含有丰富的蛋白质、脂质、多糖、维生素、叶绿素、微量元素和一些生物活性代谢产物^[2], 能进行放氧光合作用, 繁殖速度快。普通小球藻可作为水产养殖幼体的饵料, 并具有净化水质及提取生物柴油等功能。如何提高人工培养小球藻的生物物质产量和促进其资源化高效利用是目前急需解决的问题。早在40年前, 国外就有相关研究证明小球藻可以利用有机碳源进行异养、兼养生长^[3-4]。采用异养和兼养培养模式可以在一定程度上有效提高小球藻的藻细胞密度和缩短培养时间^[5-7]。然而, 异养培养的微藻品质下降(叶绿素及蛋白质含量较低), 因而出现了利用异养-稀释-光诱导串联培养技术培养小球藻, 可以解决普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)异养培养品质下降的问题, 也可实现小球藻高密度高品质培养^[8-10]。也有研究表明, 小球藻(*Chloralla* sp. HN08)利用葡萄糖进行兼养生长效果优于自养生长, 但不能利用葡萄糖进行异养生长^[11]。因此筛选热带普通小球藻最适的生长模式是提高藻细胞密度关键的第一步。除此之外, 微藻的生长与营养液的配方密切相关, 同一种藻在不同的营养液中生长效果不一样, 也就是说藻类对营养的需求有适宜及最适的种类及浓度。越是符合该藻营

养需求的配方, 越能获得较理想的培养效果。

我们在海南热带海域分离获得一株生长速度快、抗污染能力强的耐高温热带普通小球藻(*Chlorella vulgaris* HN2016)。为提高其培养密度, 获得较高的生物物质产量, 本研究探讨了自养、异养与兼养3种培养模式及有机碳源种类、质量浓度对小球藻的生长效应, 获得最优的培养模式。优化其培养基, 即在最优模式的基础上依次研究不同种类及质量浓度的氮盐、磷盐、铁盐、维生素 B_1 (VB_1)、维生素 B_{12} (VB_{12})和维生素H (VH)等主要营养元素对热带普通小球藻的生长效应。获得优化的兼养培养基配方, 为人工培养高密度热带普通小球藻提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验藻种

实验用热带普通小球藻取自海南大学海洋学院保种室, 原种于2016年3月取自海南省临高县新盈镇自然海水, 并采用平板划线法反复纯化得到的新藻株, 为单细胞, 小型。细胞为球形或椭圆形, 直径为3-6 μm , 细胞壁厚或薄比较坚硬。色素体1个, 同生, 杯状或片状。实验前将热带普通小球藻种进行纯化扩培, 取指数生长期的藻液进行实验。

1.1.2 主要试剂和仪器

硫酸锰、乙二胺四乙酸二钠、硝酸钠、硫酸铵、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、柠檬酸铁和硫酸亚铁, 天津市大茂化学试剂厂; 葡萄糖、乙酸钠和尿素,

广州化工试剂厂; 青霉素、链霉素和卡那霉素, 深圳华药南方制药有限公司; 维生素 B₁、维生素 B₁₂ 和维生素 H, 广东省揭阳市龙阳动物药业有限公司。

电热鼓风干燥箱, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; 光照培养箱, 上海医疗新苗器械制造有限公司; 可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 奥林巴斯生物显微镜, 奥林巴斯股份有限公司。

1.1.3 实验条件

实验用海水取自海口市新埠岛海区。经过滤、煮沸消毒, 自然冷却后使用。海水 pH 8.04, 盐度 30.5。250 mL 三角瓶经过洗液洗涤, 130 °C 恒温消毒 2 h。实验温度保持在 25±1 °C, 光照控制在 120 μmol/(m²·s), 培养时间为 4 d 或 6 d。每天摇瓶 3 次, 并随机交换培养瓶的位置, 减少光照差异。实验使用的培养液为常用的“宁波大学 3#微藻培养液配方^[12]”。

1.2 研究方法

1.2.1 实验设计

(1) 热带普通小球藻培养模式和有机碳源的筛选: 微藻的培养模式主要有: 自养、异养和兼养 3 种培养模式。实验在“宁波大学 3#微藻培养液配方”的基础上, 分别添加 C₆H₁₂O₆ 和 CH₃COONa 作为有机碳源, 设置 C₆H₁₂O₆ 的质量浓度梯度为: 0、15、20、25、30 g/L; CH₃COONa 的质量浓度梯度为: 0、3、6、9、12 g/L。异养培养瓶放置在黑暗的箱子里培养, 兼养培养瓶置于光照为 120 μmol/(m²·s) 的培养架上, 兼养的空白组为自养培养。均设置两个平行实验, 培养 4 d 后测其吸光度。筛选出促进热带普通小球藻快速生长的培养模式及其有机碳的最佳质量浓度。

(2) 氮、磷、铁源种类和最适质量浓度的筛选: 采用上述热带普通小球藻培养模式和有机碳源的筛选实验结果。选用最适的培养模式, 并添加其最适的有机碳源分别进行氮、磷、铁源种类和最适质量浓度的筛选实验: 以“宁波大学 3#微藻培养液配方”为基础培养基, 分别配制缺氮盐、缺磷盐、缺铁盐的培养液。氮盐种类和最适质量浓度的筛选: 分别选用 (NH₄)₂SO₄、NaNO₃ 和

NH₂CONH₂ 为氮盐, 其氮的质量浓度梯度为: 0、20、35、50、70 mg/L。磷盐种类和最适质量浓度的筛选: 选用 NaH₂PO₄、KH₂PO₄ 为磷盐, 其磷的质量浓度梯度为: 0、1、2、3、4、5、6 mg/L。铁盐种类和最适质量浓度的筛选: 选用 FeSO₄、C₆H₅O₇Fe 为铁盐, 其铁的质量浓度梯度为: 0、0.5、1、2、3、4、5、6 mg/L。均设置 2 个平行实验, 在培养 4 d 后测其吸光度。

(3) VB₁、VB₁₂ 和 VH 的正交实验: 根据热带普通小球藻对 VB₁、VB₁₂ 和 VH 的营养需求, 选用 L₁₆(4³)设计的 3 因素 4 水平的正交实验(表 1)。均设置 2 个平行实验, 在培养 4 d 后测其吸光度。

(4) 培养基的验证实验: 选取热带普通小球藻生长繁殖最优的培养模式及单因子、正交实验中获得优化培养基配方, 并与“宁波大学 3#微藻培养液配方”对比培养热带普通小球藻, 初始接种密度及培养条件相同, 连续培养 6 d, 每天上午定时计数, 均设置 2 个平行实验。

1.2.2 藻细胞密度的测定

先用血球计数板及分光光度计确定藻细胞密度与藻液 OD₇₂₀ 值的线性关系^[13], 确定曲线方程如下:

$$\text{自养: } y_1 = 0.822 0x_1 + 0.015 2 \quad (R^2 = 0.999 8) \quad (1)$$

$$\text{兼养: } y_2 = 0.731 8x_2 + 0.077 2 \quad (R^2 = 0.991 2) \quad (2)$$

式中, y_1 、 y_2 为热带普通小球藻细胞密度 ($\times 10^7$ cells/mL), x_1 、 x_2 为小球藻 OD₇₂₀ 值。

测定实验藻液的 OD₇₂₀ 值, 根据藻细胞密度与藻液 OD₇₂₀ 的线性关系换算出藻细胞密度。

1.2.3 比生长速率的测定

$$\text{藻细胞的比生长速率}(K): K = (\ln B_t - \ln B_0) / t$$

B_0 : 初始藻细胞密度; B_t : 经过 t 时间培养后的藻细胞密度; t : 培养时间(d)。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments (mg/L)

水平 Levels	因素值 Factor value		
	维生素 B ₁ VB ₁	维生素 B ₁₂ VB ₁₂	维生素 H VH
1	0.000 0	0.000 0	0.000 0
2	0.010 0	0.000 5	0.000 5
3	0.100 0	0.005 0	0.005 0
4	1.000 0	0.100 0	0.100 0

1.2.4 统计分析

运用 Excel 2003 软件对实验数据进行处理, 并使用 DPS 14.5 数据处理软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养模式和有机碳源对热带普通小球藻的生长效应

CH_3COONa 与 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 对热带普通小球藻自养、异养和兼养的生长效应见图 1。由图 1 可知,

热带普通小球藻既能够进行光合自养生长, 又可以在黑暗或有光条件下利用有机碳源进行异养或者兼养生长。培养模式的优劣顺序为: 兼养>自养>异养。实验结果还表明: 添加有机碳进行兼养培养的热带普通小球藻细胞饱满, 细胞个体比自养藻细胞大(图 2)。在兼养培养模式下, CH_3COONa 促生长的效果显著高于 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ($P<0.05$), 以质量浓度为 6 g/L CH_3COONa 促生长的效果最佳。

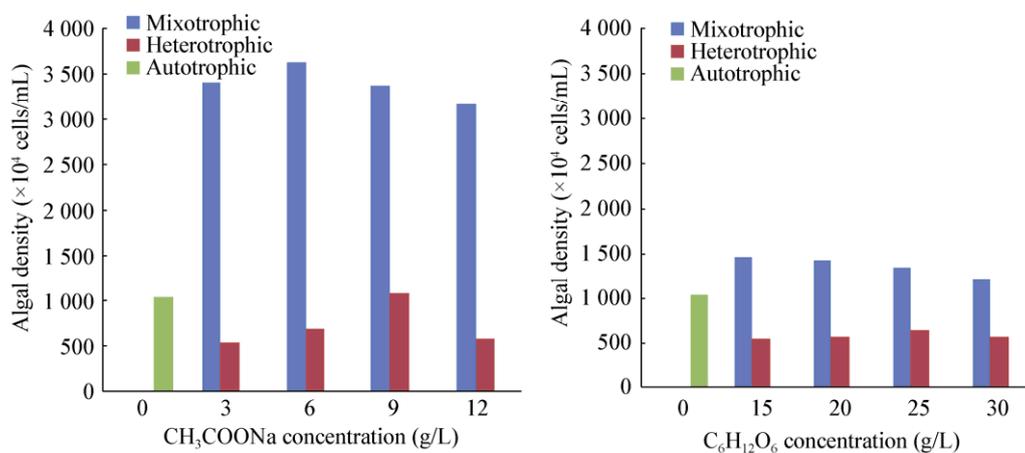


图 1 初始 CH_3COONa 及 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 浓度对热带普通小球藻自养、异养与兼养的影响

Figure 1 Effects of different initial CH_3COONa and $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ concentrations on the growth of tropical *Chlorella vulgaris* cultured using autotrophic, heterotrophic and mixotrophic modes

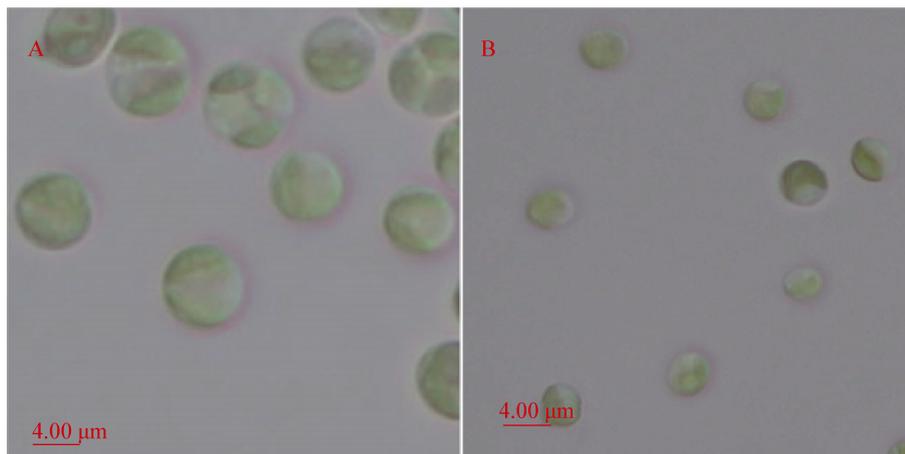


图 2 自养与兼养培养条件下的热带普通小球藻细胞大小

Figure 2 Cell sizes of tropical *Chlorella vulgaris* cultured under autotrophic and mixotrophic conditions

注: A: 兼养的藻细胞; B: 自养的藻细胞。

Note: A: Mixotrophic cell; B: Autotrophic cell.

2.2 不同氮盐对热带普通小球藻的生长效应

在 CH_3COONa 初始浓度为 6 g/L 下, 氮盐对热带普通小球藻的生长效应见图 3。 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_2CONH_2 均可作为热带普通小球藻的氮盐。经单因素方差分析, 3 种氮盐对热带普通小球藻的生长均具有极显著性影响 ($P < 0.01$)。其中以质量浓度为 20 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$ 为最好。

2.3 不同磷盐对热带普通小球藻的生长效应

在 CH_3COONa 初始浓度为 6 g/L 下, 磷盐对热带普通小球藻的生长效应见图 4, NaH_2PO_4 和 KH_2PO_4 均可以作为热带普通小球藻的磷盐。 NaH_2PO_4 作为磷盐的热带普通小球藻生长速率高于 KH_2PO_4 作为磷盐的生长速率, 其中以质量浓度为 5 mg/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 对热带普通小球藻的生长效果最好。经单因素方差分析可得知, 磷盐对热带普通小球藻的生长具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。磷盐质量浓度的变化, 对热带普通小球藻的生长速率作用效果不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 不同铁盐对热带普通小球藻的生长效应

在 CH_3COONa 初始浓度为 6 g/L 下, 铁盐对热带普通小球藻的生长效应见图 5, 实验结果表明, FeSO_4 和 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ 均可以作为热带普通小球藻的

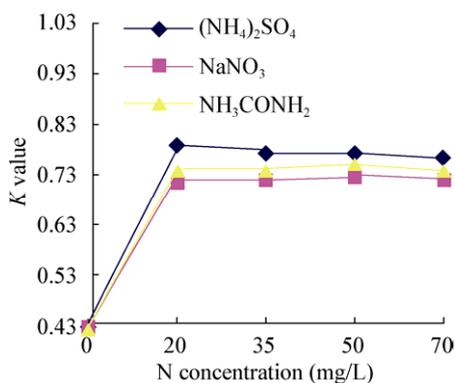


图 3 氮源及其浓度对热带普通小球藻生长的影响
Figure 3 Effects of different N sources and concentrations on the growth of tropical *Chlorella vulgaris*

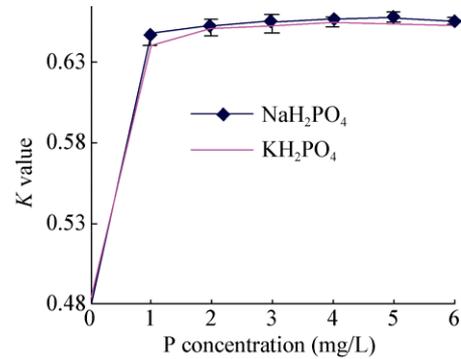


图 4 磷源及其浓度对热带普通小球藻生长的影响
Figure 4 Effects of different P sources and concentrations on the growth of tropical *Chlorella vulgaris*

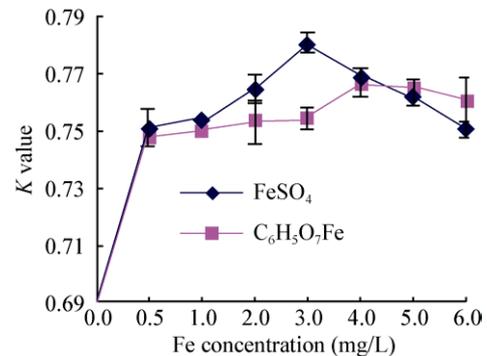


图 5 铁源及其浓度对热带普通小球藻生长的影响
Figure 5 Effects of different Fe sources and concentrations on the growth of tropical *Chlorella vulgaris*

铁盐, FeSO_4 为铁盐的热带普通小球藻生长速率高于 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ 作为铁盐时的生长速率, 以质量浓度为 3 mg/L 的 FeSO_4 对热带普通小球藻的生长效果最好。经过方差分析得知, 铁盐对热带普通小球藻的生长有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.5 VB_1 、 VB_{12} 和 VH 的正交试验

VB_1 、 VB_{12} 和 VH 的正交试验结果见表 2。经正交分析和多重比较得知, 14 号组合最适合热带普通小球藻的生长。即 VB_1 和 VB_{12} 的质量浓度分别为 1 mg/L 和 0.0005 mg/L 。

2.6 优化培养基的验证

兼养培养基与“宁波大学 3# 微藻培养液

配方”对比培养热带普通小球藻，接种密度为 8.10×10^5 cells/mL，光照强度为 $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，盐度为 30.5，pH 值为 8.04，每天摇瓶 3 次，每 24 h 定时测定藻细胞密度，共培养 6 d，设置 2 个平行组，取平均值。从图 6 可看出，热带普通小球藻在兼养培养基上具有明显的生长优势，培养第 4 天优化兼养培养基的藻细胞密度是“宁波大学 3#微藻培养液培养基”的 2.64 倍。培养第 6 天优化兼养培养基的藻细胞密度达 4.20×10^7 cells/mL，是“宁波大学 3#微藻培养液配方”的 2.30 倍。

表 2 维生素的正交实验结果

Table 2 Results of vitamins orthogonal experiments

实验号 Test No.	维生素 B ₁ Vitamin B ₁	维生素 B ₁₂ Vitamin B ₁₂	维生素 H Vitamin H	K 值 K value
1	水平 1 (0.000 0)	水平 1 (0.000 0)	水平 1 (0.000 0)	0.638±0.002 ^f
2	水平 1	水平 2 (0.000 5)	水平 2 (0.000 5)	0.681±0.003 ^{cd}
3	水平 1	水平 3 (0.005 0)	水平 3 (0.005 0)	0.709±0.001 ^{ab}
4	水平 1	水平 4 (0.100 0)	水平 4 (0.100 0)	0.708±0.001 ^{ab}
5	水平 2 (0.010 0)	水平 1	水平 2	0.691±0.002 ^{cd}
6	水平 2	水平 2	水平 3	0.713±0.003 ^{ab}
7	水平 2	水平 3	水平 4	0.712±0.001 ^{ab}
8	水平 2	水平 4	水平 1	0.709±0.006 ^{ab}
9	水平 3 (0.100 0)	水平 1	水平 3	0.683±0.005 ^{cd}
10	水平 3	水平 2	水平 4	0.711±0.002 ^{ab}
11	水平 3	水平 3	水平 1	0.717±0.004 ^{ab}
12	水平 3	水平 4	水平 2	0.709±0.001 ^{ab}
13	水平 4 (1.000 0)	水平 1	水平 4	0.689±0.001 ^{cd}
14	水平 4	水平 2	水平 1	0.718±0.003 ^a
15	水平 4	水平 3	水平 2	0.711±0.004 ^{ab}
16	水平 4	水平 4	水平 3	0.712±0.001 ^{ab}

注：括号里的数据为不同水平数字代表的维生素含量(单位：mg/L)；上标字母相同表示 K 值间无显著性差异($P>0.05$)，上标字母相连表示 K 值有显著性差异($P<0.05$)，上标字母相间表示有极显著差异($P<0.01$)。

Note: Data in parenthesis are contents of vitamins (unit: mg/L); The same superscript letters represents no significant difference between K value ($P>0.05$), connected superscript letters represent significant differences ($P<0.05$), interval superscript letters represent extremer significant differences ($P<0.01$).

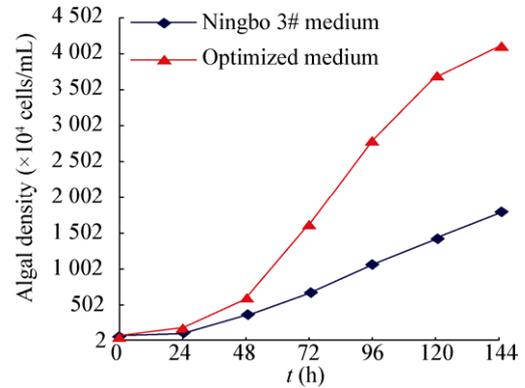


图 6 热带普通小球藻在不同培养基中的生长情况

Figure 6 Growth of tropical *Chlorella vulgaris* in different culture media

3 讨论

藻类对营养的需求有适宜及最适的种类及浓度。越接近该藻最佳营养需求的配方，越能获得较理想的培养效果。

3.1 热带普通小球藻培养方式和有机碳源的筛选

有些微藻在得到有机质后，生长更加适宜。在有机酸碳源中，最重要的是 CH_3COONa ，它比任何脂肪酸或其它有机酸更有效，可以是异养时的良好碳源^[12]。兼养培养由光合自养及异养两部分组成，既可以利用光能又可以利用有机碳源进行生长繁殖，兼养培养有机碳源提供的能量减轻了微藻自养生长对光能的依赖，因而，有些微藻得到有机碳源后生长发育更快、更好。已有很多实验表明兼养生长优于自养和异养生长。桂林^[14]研究发现蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)最佳的培养方式为兼养，兼养藻细胞密度显著高于异养和自养，自养时的藻细胞密度最低；牛海亚等^[15]研究表明发现，小球藻(*Chlorella* sp.)的最佳生长模式为混养生长；王超等^[16]研究表明，小球藻(*Chlorella sorokiniana*)混养培养的生长速度和最终的生物量均高于其它营养方式。本实验结果表明(图 1)：以 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 和 CH_3COONa 为有机碳源，热带普通小球藻兼养模式的藻细胞密度极显著高于自养和异养的藻细胞密度 ($P<0.01$)，异养的效果最差； CH_3COONa 为有机碳的培养效果优于 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。

3.2 氮盐

氮属于细胞原生质结构中的重要组成成分,对细胞的生长代谢活动有重要的意义^[17]。余颖和陈必铤^[18]研究表明,最适合微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)生长的氮源及质量浓度为 10 mg/L NaNO_3 , 过高的氮源抑制其生长。赵华等^[19]研究表明, 硝酸氮更适合小球藻(*Chlorella* sp.)的生长。季祥等^[20]用 NH_2CONH_2 和 NaNO_3 对比培养小球藻(*Chlorella* spp.)结果表明, NH_2CONH_2 比 NaNO_3 更适合小球藻的生长。本实验结果表明(图 3), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_2CONH_2 和 NaNO_3 均可以作为热带普通小球藻的氮盐, 培养效果顺序为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NH}_2\text{CONH}_2 > \text{NaNO}_3$, 其中 20 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$ 对热带普通小球藻的生长效果最佳; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$ 质量浓度越接近 20 mg/L, 热带普通小球藻的生长效果越好, 质量浓度大于 20 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$ 抑制热带普通小球藻生长。经方差分析, 氮源对兼养热带普通小球藻的生长具有极显著性差异($P < 0.01$)。本研究结果与前人的研究结果有共同点, 也有差异, 原因主要有: 一是培养方式不同, 是自养与兼养所需氮源的差异; 二是实验小球藻的品系不同。

3.3 磷盐

磷为无机矿物元素, 也是微藻正常生长繁殖所需要的大量营养元素之一。本实验结果表明, KH_2PO_4 和 NaH_2PO_4 均可以作为热带普通小球藻的磷盐, 其对热带普通小球藻生长速率的影响均具有极显著性差异($P < 0.01$)。其中 NaH_2PO_4 的作用效果稍微优于 KH_2PO_4 的作用效果; 在磷质量浓度为 1–6 mg/L 范围内, 磷质量浓度的变化对热带普通小球藻生长速率变化没有显著性差异($P > 0.05$)。江怀真等^[21]研究表明磷盐浓度变化对小球藻(*Chlorella* sp.)生长的影响不大, 低磷条件并不明显抑制小球藻的生长。该结果与本论文研究结果相似。还有文献表明, 有些藻类能吸收的磷远远超过它实际需要的量, 这些过剩的磷虽然不对藻的生长有作用, 但能被转到低磷环境时利用过剩

的磷^[12]。这点也充分解释了本实验结果, 磷质量浓度在 1–6 mg/L 范围内, 浓度的变化对小球藻生长速率的影响不显著($P > 0.05$)。

3.4 铁盐

Fe^{3+} 是藻类细胞内某些氧化还原的载体及辅酶、叶绿素的组成成分, 缺铁会影响多种代谢, 甚至会抑制藻细胞的生长^[22]。刘彩霞^[23]研究表明, 在缺铁条件下培养的小球藻(*Chlorella vulgaris*)生长速率降低。凌娜等^[24]研究表明, 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长的最适铁的浓度为 1.4 mg/L。本实验结果表明, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ 和 FeSO_4 均可作为热带普通小球藻的铁盐, 其中 FeSO_4 比 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ 更加适合热带普通小球藻的生长, 添加质量浓度为 3 mg/L FeSO_4 时热带普通小球藻的生长速率最大。在实验设置的 0–3 mg/L 质量浓度范围内, 热带普通小球藻的生长速率随 FeSO_4 质量浓度的升高而上升。但超过该浓度时, 热带普通小球藻的生长速率则随着铁质量浓度的升高而下降, 即质量浓度高于 3 mg/L $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$ 对热带普通小球藻有抑制作用。方差分析表明, 铁盐对热带普通小球藻的生长有极显著性影响($P < 0.01$)。

3.5 维生素正交实验

维生素对海洋微藻生长繁殖的影响因种类而异。胡桂坤等^[25]指出 VB_1 促小球藻(*Chlorella* sp.)分裂作用极显著, VB_{12} 和 VH 无显著影响。王逸云等^[26]通过正交实验获得小球藻(*Chlorella* sp.)优化培养基的 VB_1 、 VB_{12} 质量浓度分别为 0.3 mg/L 和 0.001 mg/L。本实验结果表明, VB_1 、 VB_{12} 混合使用对热带普通小球藻的生长有极显著影响($P < 0.01$), VB_1 和 VB_{12} 的质量浓度分别为 1 mg/L 和 0.000 5 mg/L, 而 VH 无显著影响。这是由于小球藻属的不同种或不同品系对维生素的需求量不同。

3.6 兼养培养基的验证

据报道, 兼养条件下的藻细胞生长速率可以大约看作是自养和异养生长速率之和^[27]。然而, 也有研究表明, 微藻兼养的培养效果并非异养与自养的简单叠加, 而是多种因素的综合效应^[28–29]。

本实验结果显示以乙酸钠为有机碳, 热带普通小球藻兼养培养的藻细胞密度大于自养培养与异养培养藻细胞密度之和, 并且兼养及异养的密度随乙酸钠质量浓度的变化而变化; 以葡萄糖为有机碳, 热带普通小球藻兼养培养的藻细胞密度大于自养培养及异养培养, 但小于自养培养与异养培养藻细胞密度之和(图 1)。本研究结果表明, 热带普通小球藻的兼养培养效果并非自养与异养的简单累加, 而是多种环境因素的综合效应。本论文用优化兼养培养基与“宁波大学 3#微藻培养液配方”对比培养热带普通小球藻, 结果表明, 培养第 1 天热带普通小球藻在 2 种培养基中的生长速率差异不大。从第 2-6 天热带普通小球藻在优化兼养培养基中显示出较大的生长优势, 培养第 4 天“优化兼养培养基”中的藻细胞密度是“宁波大学 3#微藻培养液配方”的 2.64 倍。培养第 6 天“优化兼养培养基”收获的生物量(细胞密度)达到 (4.20×10^7) cells/mL, 是“宁波大学 3#微藻培养液配方”的 2.30 倍。可见优化兼养配方可以实现热带普通小球藻高密度培养。

4 结论

(1) 兼养能够实现热带普通小球藻的高密度培养, 以乙酸钠为有机碳的兼养培养效果优于葡萄糖的兼养培养效果; 以 6 g/L 乙酸钠为有机碳, 兼养生长藻细胞密度是自养生长与异养生长藻细胞密度之和的 2 倍。

(2) 获得热带普通小球藻兼养培养基配方为: 6 g/L CH_3COONa , 20 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-N}$, 5 mg/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-P}$, 3 mg/L $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$, 1 mg/L VB_1 和 0.000 5 mg/L VB_{12} 。

(3) 热带普通小球藻细胞增殖最快出现在培养第 4 天的“优化兼养培养基”中, 藻细胞密度是“宁波大学 3#微藻培养液配方”的 2.64 倍。

REFERENCES

- [1] Ding YC, Gao Q, Liu JY, et al. Effect of environmental factors on growth of *Chlorella* sp. and optimization of culture conditions for high oil production[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(18): 5307-5315 (in Chinese)
- [2] Zhang LJ, Yang RD, Xiao H. The heterotrophic culture of *Chlorella* and optimization of growth condition[J]. Guihaia, 2001, 21(4): 353-357 (in Chinese)
张丽君, 杨汝德, 肖恒. 小球藻的异养生长及培养条件优化[J]. 广西植物, 2001, 21(4): 353-357
- [3] van Thinh L, Griffiths DJ. Amino acid composition of autotrophic and heterotrophic cultures of the emerson strain, of *Chlorella*[J]. Plant & Cell Physiology, 1976, 17(1): 193-196
- [4] Endo H, Hosoya H, Koibuchi T. Growth yields of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous cultures using acetate: Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain (III)[J]. Journal of Fermentation Technology, 1977, 55(4): 369-379
- [5] Yang SL, Meng YT, Liu GJ, et al. Characteristics of auto-, hetero- and mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2013, 41(18): 7748-7749, 7863 (in Chinese)
杨素玲, 孟佑婷, 刘桂君, 等. 小球藻自养、异养和混养特性的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(18): 7748-7749, 7863
- [6] Yu RQ, Liu XM, Liang SZ, et al. Study on the heterotrophic growth characteristics of *Chlorella vulgaris*[J]. Marine Science Bulletin, 2000, 19(3): 57-62 (in Chinese)
余若黔, 刘学铭, 梁世中, 等. 小球藻(*Chlorella vulgaris*)的异养生长特性研究[J]. 海洋通报, 2000, 19(3): 57-62
- [7] Wang FF, Du FG, Liu Y, et al. Medium optimization and screening of *Heterotrophic chlorella*[J]. Food and Fermentation Technology, 2015, 51(3): 23-26, 36 (in Chinese)
王方方, 杜风光, 刘钺, 等. 异养小球藻培养基优化筛选[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(3): 23-26, 36
- [8] Huang JK. Investigation of key parameters for photobioreactor performance and pilot research on heterotrophy-dilution-photoinduction sequential cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2014 (in Chinese)
黄建科. 光生物反应器敏感性参数及小球藻异养-稀释-光诱导串联培养工艺中试研究[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2014
- [9] Yun YS, Park J. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(6): 765-770
- [10] Li XW, Li YG, Shen GM, et al. Medium for culturing *Chlorella vulgaris* with sequential heterotrophic-autotrophic model[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(2): 277-280 (in Chinese)
李兴武, 李元广, 沈国敏, 等. 普通小球藻异养-光自养串联培养的培养基[J]. 过程工程学报, 2006, 6(2): 277-280
- [11] Lang XY, Liu ZY, Xu M, et al. Effects of glucose on photosynthesis and growth of *Chloralla* sp. HN08 cells[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(4): 550-559 (in Chinese)
郎筱宇, 刘志媛, 徐梦, 等. 葡萄糖对小球藻(*Chloralla* sp.)

- HN08)光合作用和生长的影响[J]. 微生物学报, 2017, 57(4): 550-559
- [12] Cheng YX. Culture of Living Feeds[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 74-75 (in Chinese)
成永旭. 生物饵料培养学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 74-75
- [13] Wang J, Wang YQ, Chen GH, et al. Effects of ecological and nutritional factors on growth of *Asterionella japonica*[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(4): 329-334 (in Chinese)
王珺, 王永强, 陈国华, 等. 生态和营养条件对日本星杆藻生长的影响[J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 329-334
- [14] Gui L. Comparison among the cultivation systems for *Chlorella pyrenoidosa* and extraction and determination of its lutein[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2001 (in Chinese)
桂林. 蛋白核小球藻培养方式的比较及其叶黄素的提取检测[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2001
- [15] Niu HY, Ma YL, Shi XX, et al. Studies on the optimum carbon sources and trophic modes of *Chlorella* sp.[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2013, 52(24): 6030-6033 (in Chinese)
牛海亚, 马玉龙, 石勋祥, 等. 小球藻适宜碳源及营养方式研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(24): 6030-6033
- [16] Wang C, Sun CX, Qiao HJ, et al. Variation of growth and photosynthesis in *Chlorella sorokiniana* under different trophic modes[J]. Guangxi Sciences, 2016, 23(2): 115-119 (in Chinese)
王超, 孙春晓, 乔洪金, 等. 不同营养方式下小球藻生长与光合作用的变化[J]. 广西科学, 2016, 23(2): 115-119
- [17] Zhang ZQ. Resource allocations strategies of eight grassland species as influenced by nitrogen rate[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2006 (in Chinese)
张振琦. 内蒙古温带典型草原八种植物的资源分配策略及其对氮素水平的响应[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2006
- [18] Yu Y, Chen BL. Progress of the studies on *Nannochloropsis*[J]. Marine Science Bulletin, 2005, 24(6): 75-81 (in Chinese)
余颖, 陈必链. 微绿球藻的研究进展[J]. 海洋通报, 2005, 24(6): 75-81
- [19] Zhao H, Dong XY, Xia YY, et al. Effects of nitrogen source on photosynthesis and pigment accumulation of *Chlorella* sp. TCCC45058[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 367-370,373 (in Chinese)
赵华, 董晓宇, 夏媛媛, 等. 氮源对小球藻光合作用和色素积累的影响[J]. 现代食品科技, 2012, 28(4): 367-370,373
- [20] Ji X, Zhang ZH, Zhang XY, et al. Culture of *Chlorella* spp. and optimization of growth condition[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(34): 16763-16764,16834 (in Chinese)
季祥, 张智慧, 张雪艳, 等. 小球藻培养条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(34): 16763-16764,16834
- [21] Jiang HZ, Zhang W, Liu TZ, et al. Effect of nitrogen and phosphorus concentrations on cell growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 204-207,211 (in Chinese)
江怀真, 张维, 刘天中, 等. 氮、磷浓度对小球藻生长及油脂积累的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 204-207,211
- [22] Ou MM, Zhang MP, Feng YY. Effects of various iron forms on the growth of *Chlorella vulgaris* in seawater[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 32(4): 627-633 (in Chinese)
欧明明, 张曼平, 冯媛媛. 海水中铁的几种形态对海生小球藻生长的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(4): 627-633
- [23] Liu CX. Proteomic analysis on *Chlorella vulgaris* under different iron concentrations[D]. Qingdao: Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 23-24 (in Chinese)
刘彩霞. 小球藻(*Chlorella vulgaris*)在不同浓度 Fe^{3+} 培养下的蛋白质组学初步研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所硕士学位论文, 2016: 23-24
- [24] Ling N, Sun QY, Mao YX, et al. Effect of iron on growth and nutritional quality of *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(4): 45-49 (in Chinese)
凌娜, 孙庆岩, 茅云翔, 等. 铁对蛋白核小球藻生长及营养品质的影响[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(4): 45-49
- [25] Hu GK, Zhang QT, Pang JX. Effects of three kinds of vitamin on growth of *Chlorella*[J]. Sea-lake Salt and Chemical Industry, 2005, 34(4): 22-25 (in Chinese)
胡桂坤, 张青田, 庞金鑫. 三种维生素对小球藻的增殖效应研究[J]. 海湖盐与化工, 2005, 34(4): 22-25
- [26] Wang YY, Wang CH. Culture condition optimization of *Chlorella* sp.[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2006, 19(2): 125-129 (in Chinese)
王逸云, 王长海. 无菌条件下的小球藻培养条件优化[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2006, 19(2): 125-129
- [27] Ogawa T, Aiba S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1981, 23(5): 1121-1132
- [28] Long YR, Liu JG, Zhang LT. The cell growth enhancement and difference of 4 strains of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic culture mode[J]. Marine Sciences, 2014, 38(12): 1-7 (in Chinese)
龙元霁, 刘建国, 张立涛. 兼养对雨生红球藻细胞生长的促进作用及藻株差异性[J]. 海洋科学, 2014, 38(12): 1-7
- [29] Yu HF, Jia SR, Dai YJ. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation[J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(1): 127-133