

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.07.013

磷源对蛋白核小球藻生长和产油性能的影响

刘婷婷¹, 程莉蓉¹, 谢恩², 郑蕾¹, 丁爱中¹, 黄绵松^{3,4}

(1. 北京师范大学水科学研究院, 北京 100875; 2. 中国农业大学水利与土木工程学院, 北京 100083; 3. 北京首创股份有限公司, 北京 100000; 4. 宁夏首创海绵城市建设发展有限公司, 宁夏 固原 756000)

摘要: 微藻产油因其清洁无毒的特点被广泛关注,然而培养成本高、产油效率低成为其大量生产的瓶颈。为解决这一难题,探究了典型无机磷、常见有机磷、核苷磷酸、环形核苷磷酸四类磷源对单藻培养及菌藻共培养体系中蛋白核小球藻生长及产油情况的影响,用紫外分析和尼罗红染色法检测不同培养体系中藻细胞生长数目、中性脂产量及磷与碱性磷酸酶的变化情况。结果显示,两个体系对磷的利用情况无显著差异;纯藻培养条件下藻细胞数目(4.94×10^8 个/ $10 \mu\text{L}$)高于菌藻共培养体系的(3.38×10^8 个/ $10 \mu\text{L}$),而菌藻共培养体系的产油情况较好。以磷酸盐、三偏磷酸盐、磷酸三乙酯、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸为磷源的菌藻共培养体系生长与产油情况较优。

关键词: 蛋白核小球藻; 磷源; 产油; 共培养; 中性脂

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2023)07-0081-08

Effects of Different Kinds of Phosphorus Source on Growth and Lipid Production of *Chlorella pyrenoidosa*

LIU Ting-ting¹, CHENG Li-rong¹, XIE En², ZHENG Lei¹, DING Ai-zhong¹, HUANG Mian-song^{3,4}

(1. College of Water Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. Beijing Capital Co. Ltd., Beijing 100000, China; 4. Ningxia Capital Sponge City Construction & Development Co. Ltd., Guyuan 756000, China)

Abstract: Lipid production of microalgae has been widely concerned because of its clean and non-toxic characteristics. However, high cultivation cost and low lipid production efficiency have restricted its engineering application. To solve this problem, the effects of four kinds of phosphorus source including typical inorganic phosphorus, common organic phosphorus, nucleoside monophosphate and cyclic nucleoside monophosphate on the growth and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* in mono-algae culture and bacteria-algae co-culture system were investigated, and the number of algal cells growing, neutral lipid yield and changes of phosphorus and alkaline phosphatase contents in different culture systems were detected by ultraviolet analysis and Nile red staining. There was no significant difference in phosphorus utilization between the two systems. The number of algal cells (4.94×10^8 cells/ 10

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07103-004); 北京市科技计划项目(Z181100005518012)
通信作者: 郑蕾 E-mail: zhengleilei@bnu.edu.cn

μL) in the mono-algal culture system was higher than that in the co-culture system (3.38×10^8 cells/ $10 \mu\text{L}$), but the lipid production in the co-culture system was higher. The growth and lipid production of the bacteria-algae co-culture system with phosphate, trimetaphosphate, triethyl phosphate and *O*-phospho-*L*-tyrosine as phosphorus sources was better.

Key words: *Chlorella pyrenoidesa*; phosphorous source; lipid production; co-culture system; neutral lipid

清洁、无毒、可再生的生物柴油能够解决传统能源结构方式带来的污染问题,其中微藻产油因其生长速度快、产量高的特点而引起广泛关注^[1]。但微藻的产油率受环境因素影响较大^[2],因此,很多研究通过改变微藻的营养环境,如碳氮磷元素的种类、比例及含量,培养pH、盐度^[3]和铁盐^[4]等,对微藻生物量及产油能力产生影响。有研究表明^[5],磷作为生物生存必不可少的营养元素对微藻生长及产油效果的影响十分突出。当磷浓度为0.1~1.0 mg/L时,铜绿微囊藻生长情况最佳^[6];低磷情况下还将引起莱茵衣藻的光合性能降低,从而影响脂质的产生^[5];然而,过高浓度的 NaH_2PO_4 对小球藻产油效能有明显抑制作用^[7]。

此外,有研究表明,在生物能够获取的磷源中,正磷酸盐是藻细胞优先利用的磷源^[8],而有机磷(OP)则需经过磷酸酶的水解转化成为正磷酸盐,才能被生物利用^[9]。目前,碱性磷酸酶(AKP)是被广泛研究的一种磷酸酶。当环境中溶解性无机磷含量很低时,碱性磷酸酶的合成程序会被激活^[10]。不同藻类在不同磷源培养条件下碱性磷酸酶活性具有差异性^[11],且藻类对磷的利用具有多样性。此外还有研究发现,藻细胞在与其他藻种细胞或细菌共培养过程中具有协同促进作用^[12],可有效提高油脂产量。例如,在小球藻与细菌共培养体系中十八烯酸C18-1的含量显著提升^[13];与酵母共培养时产生了高含量饱和脂肪酸的脂质^[14]。这种细菌与微藻的共生理和互相调控可作为提高微藻产油效率的利用机制。

目前的研究普遍只做了一两种或数种磷源^[15]对藻类生长量的影响,而没有对几十种磷源影响微藻产油的情况和作用机制进行系统研究;同时,也缺乏与细菌共培养条件下不同磷源对微藻的生长和产油率的研究。笔者选用产油量较高的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidesa*)作为研究对象,选择

19种典型磷作为磷源,根据磷元素在化合物中与碳、氧等元素成键的结合方式分为无机磷(IP)、常见有机磷(OP)、核苷磷酸(NMP)、环形核苷磷酸(cNMP),利用紫外检测细胞浓度、AKP活性,通过尼罗红染色法测定中性脂的荧光强度,并表征了细胞生长、磷利用情况及油脂相对产量,探究蛋白核小球藻分别在单藻培养及菌藻共培养体系下的生长及产油情况,以筛选出具有促进生长与产油作用的磷源,优化培养方式,旨在为降低培养成本、提高产油效率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻种(编号FACHB-5)购自中国科学院淡水藻种库。收到藻种后先用BG11培养基进行扩大培养,置于光照培养箱中,设定培养条件为25℃,光的照度为2 000 lx,光暗比为12 h:12 h。BG11培养基的配制方法见文献[16]。

根据富营养化河湖中常见的无机磷,选择磷酸盐、三偏磷酸盐、次磷酸盐、二硫代磷酸盐为无机磷源;筛选湖泊中常见的、具有促藻类生长的有机磷,包括磷酸三乙酯(TEP)、3-磷酸甘油酸(GYP)、*D*-葡萄糖-6-磷酸(*D*-G6P)、半胱胺-*S*-磷酸、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸为有机磷源;选择核苷酸中常见且易获取的核苷磷酸与环形核苷磷酸各5种,NMP选择腺苷-3'-单磷酸、鸟苷-3'-单磷酸、胞苷-3'-单磷酸、尿苷-3'-单磷酸、胸苷-3'-单磷酸,cNMP选择腺苷-3',5'-环磷酸、鸟苷-3',5'-环磷酸、胞苷-3',5'-环磷酸、尿苷-3',5'-环磷酸、胸苷-3',5'-环磷酸。初始磷浓度设置为 $(0.4 \pm 0.05) \text{ mg/L}$ 。

纯藻培养体系:将藻种以3 000 r/min的转速离心10 min,弃去上清液,用灭菌无磷的BG11培养基洗涤后离心,重复3次,接入无磷BG11培养体系,初始接种后体系在540 nm处的吸光度 $A_{540} \approx 0.08$ 。以12孔无菌培养板作为培养容器,加入相应磷源;对

照组选择无磷培养的方式,在对应孔板中加入等量无菌水,构建的培养体系为5 mL,每个样品设置3组平行。

菌藻共培养体系:将取自北京市通州区北运河河岸的10 g土壤加入250 mL无菌水中,加入玻璃珠充分搅拌2 h;静置30 min后将上清液加入到灭菌BG11培养基中,于30℃、150 r/min条件下培养3~4 d,制成土壤菌悬液。培养结束后以3 000 r/min的转速离心10 min,弃去上清液,用无磷BG11培养液洗涤后离心,重复3次,之后与上一步骤同样方法准备的藻培养液混合。以12孔培养板作为培养皿,分别加入相应磷源;对照组选择无磷培养的方式,在对应孔板中加入等量无菌水,构建的培养体系为5 mL,每个样品设置3组平行。

纯藻、菌藻共培养体系制备完成后置于光照培养箱中培养。光照培养箱温度为(25±1)℃,光的照度为2 000 lx,光暗比为12 h:12 h。

1.2 藻细胞生长动态监测

用酶标仪每隔12 h测定12孔培养板 A_{540} 的吸光度值,当 A_{540} 达到1.0以上并稳定后停止测定。取一定量达到稳定期的藻液,并按一定稀释倍数进行稀释,分别测定 A_{540} 。取10 μ L稀释液缓慢加到血球计数板上盖玻片的边缘,菌液流入血球计数室后用显微镜观察并计数,根据血球计数结果与吸光度值进行相关性曲线拟合,藻细胞数目与吸光度值呈良好的线性关系($R^2=0.9655$),标准曲线为:

$$y=5\times 10^8x-4\times 10^6 \quad (1)$$

式中: y 为藻细胞数量; x 为吸光度值。

1.3 碱性磷酸酶活性测定

培养体系构建完成后,测定培养初期及培养结束时碱性磷酸酶活性的变化。碱性磷酸酶测定方法:选用碱性磷酸酶测定试剂盒^[17],以Biotek公司Synergy 2酶标仪在激发波长为360 nm、发射波长为460 nm条件下中速检测2 h,测定间隔为1 min。测定试剂盒自带土豆磷酸酶的活性作为标准曲线,测定步骤同前。

1.4 磷利用情况

培养体系构建完成后,采用钼锑抗分光光度法测定培养初、末期的正磷酸盐浓度,用式(2)表征体系对磷的利用情况:

$$R_p=(P_0-P_t)/P_0\times 100\% \quad (2)$$

式中: R_p 为磷利用率; P_0 为初态正磷酸盐浓度;

P_t 为末态正磷酸盐浓度。

1.5 油脂荧光强度测定

采用尼罗红染色法测定藻细胞里中性脂的含量。使用20%的二甲基亚砜(DMSO)作为渗透剂^[18],对 A_{540} 值为0.8~1.1的藻液进行重悬,将混合物在35℃条件下水浴20 min,然后向每1 mL藻液加入15 μ L尼罗红-丙酮溶液(0.1 mg/mL)进行染色,染色时间为5 min,利用酶标仪在激发波长为480 nm处测定混合液在575 nm时的荧光强度,以表征藻细胞的含油量。

2 结果与讨论

2.1 不同培养体系细胞生长情况

经过172 h的培养,19个样本藻细胞浓度均有所增加,生长情况如图1所示。

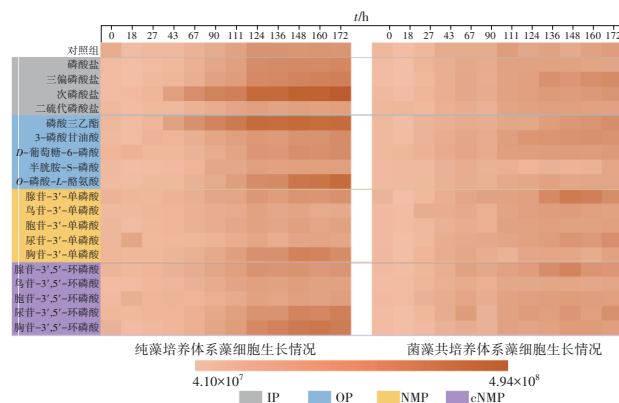


图1 纯藻与菌藻共培养体系藻细胞的生长情况

Fig.1 Growth of algae cells in mono-algae culture and bacteria-algae co-culture systems

相对于菌藻混合培养体系(平均藻细胞浓度为 1.92×10^8 个/10 μ L),纯藻培养体系的藻细胞数目(平均藻细胞浓度为 2.56×10^8 个/10 μ L)增长更明显,且两个体系差异显著(t 检验Sig.=0.023)。纯藻培养体系中高于对照组藻细胞数目(2.15×10^8 个/10 μ L)的磷源有11个,生长最好的磷源为次磷酸盐(藻细胞浓度为 4.94×10^8 个/10 μ L),比对照组高129.69%;生长最差的磷源为鸟苷-3'-单磷酸(藻细胞浓度为 1.29×10^8 个/10 μ L),比对照组低40.08%。菌藻混合培养体系中高于对照组藻细胞数目(1.92×10^8 个/10 μ L)的磷源有9个,生长最好的磷源为三偏磷酸盐(藻细胞浓度为 2.59×10^8 个/10 μ L),比对照组高41.71%;最差的为鸟苷-3',5'-环磷酸(藻细胞浓度为 1.46×10^8 个/10 μ L),比对照组低20.49%。

表 1 为经 t 检验分析以后筛选出的引起两种培养体系藻细胞数目显著差异的磷源。结合两种培养体系藻细胞的生长情况可以发现,除菌藻体系中腺苷-3'-单磷酸和尿苷-3'-单磷酸样本的藻细胞数目高于纯藻体系(分别高出 1.42%、36.46%)外,其他磷源培养下纯藻体系的藻细胞数目均比菌藻体系高,尤其以次磷酸盐、磷酸三乙酯(TEP)、 O -磷酸- L -酪氨酸为磷源时藻细胞数目最多,分别比菌藻体系高 124.30%、64.82%、186.46%。

表 1 不同培养体系下藻细胞数目有显著差异的磷源

Tab.1 Phosphorus source with significant differences in algal cell number under different cultured systems

项 目		Sig.	藻细胞数/ (个·10 μL ⁻¹)	
			纯藻 体系	菌藻混 合体系
IP	三偏磷酸盐	0.032*	3.16×10 ⁸	2.59×10 ⁸
	次磷酸盐	0.001**	4.94×10 ⁸	2.20×10 ⁸
OP	磷酸三乙酯	0.001**	4.20×10 ⁸	2.53×10 ⁸
	<i>O</i> -磷酸- <i>L</i> -酪氨酸	0.025*	4.16×10 ⁸	1.45×10 ⁸
NMP	腺苷-3'-单磷酸	0.003**	2.39×10 ⁸	3.38×10 ⁸
	胸苷-3'-单磷酸	0.012*	3.09×10 ⁸	1.54×10 ⁸
cNMP	胸苷-3',5'-环磷酸	0.006**	3.58×10 ⁸	1.90×10 ⁸
注: *表示 Sig.<0.05, 差异显著; **表示 Sig.<0.01, 差异极显著。				

2.2 不同培养体系细胞产油情况

将纯藻与菌藻共培养体系产生的中性脂经尼罗红染色后进行相对荧光强度测定,结果表明,菌藻共培养体系的中性脂相对荧光强度(平均值为 287)总体高于纯藻培养体系(平均值为 136), t 检验结果表明两种培养体系具有显著差异(Sig. = 0.018*)。

纯藻和菌藻共培养体系中性酯的相对荧光强度如图 2 所示。纯藻培养体系中,中性脂相对产量高于对照组的只有 4 个,最高的为 D -葡萄糖-6-磷酸(D -G6P),比对照组高 81.13%;菌藻共培养体系中,中性脂相对产量高于对照组的有 12 个,大部分属于 IP 及 OP,以 O -磷酸- L -酪氨酸最高(比对照组高 512.06%)。对比两种培养体系发现,在所有磷源中,菌藻体系中性脂相对含量比纯藻体系高的有 13 种,大部分属于 IP、OP 及 cNMP,以磷酸盐、三偏磷酸盐、 O -磷酸- L -酪氨酸为磷源时最高,分别比纯

藻体系中同种磷源高出 591.45%、538.96%、529.93%。

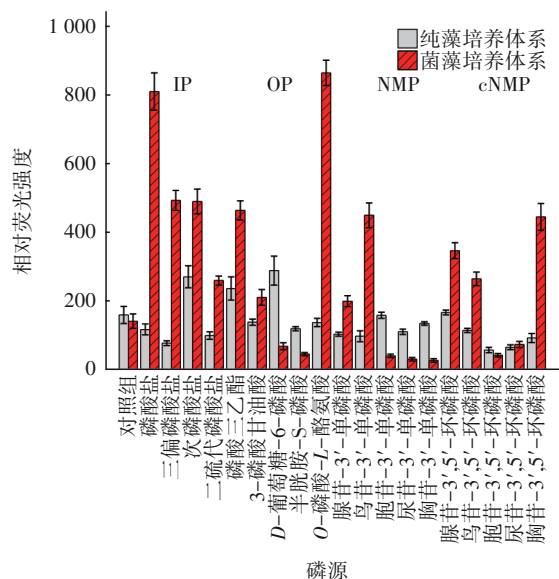


图 2 纯藻与菌藻共培养体系中性脂的相对荧光强度

Fig.2 Relative fluorescence intensity of neutral lipid in mono-algae culture and bacteria-algae co-culture systems

2.3 不同培养体系磷源的利用情况

根据纯藻与菌藻共培养体系磷利用率与培养末态 AKP 含量情况(见图 3),探究两种体系对藻细胞生长与产油效能的影响,Spearman 相关性分析结果显示,只有磷利用率与中性脂相对产量显著相关(Sig. = 0.007**),其他各组之间并无相关关系。

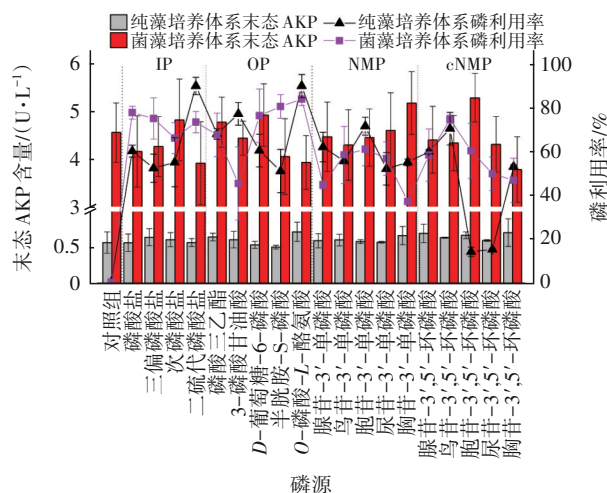


图 3 纯藻与菌藻共培养体系磷利用情况的差异

Fig.3 Difference of phosphorus utilization in mono-algae culture and bacteria-algae co-culture systems

纯藻培养体系对磷的利用率在 $(14 \pm 2.4)\%$ ~ $(90 \pm 5.3)\%$ 之间,菌藻共培养体系在 $(37 \pm 0.5)\%$ ~

(84±3.0)%之间,两种体系无显著差异(Sig. = 0.364)。纯藻培养体系中除胞苷-3',5'-环磷酸为(14±2.1)%、尿苷-3',5'-环磷酸为(15±0.5)%以外,其他磷源的利用率均高于50%(消耗量平均为0.13 mg/L);菌藻共培养体系中除胸苷-3'-单磷酸为(37±0.5)%、胸苷-3',5'-环磷酸为(46±10.2)%外,其他磷源利用率均高于50%(消耗量平均为0.17 mg/L)。

纯藻体系中末态 AKP 活性[均值为(0.62±0.06) U/L]相差不大(*t* 检验 Sig. =0.812);相反,菌藻共培养体系中 AKP 活性[(4.44±0.39) U/L]显著高于纯藻培养体系(Sig. =0.000**),这可能是由于菌藻体系中磷源不足,蛋白核小球藻与细菌共同产生 AKP,从而导致 AKP 活性较高。整体来看,纯藻培养体系中磷利用率与 AKP 活性呈正相关(Sig. = 0.033*);菌藻体系中无明显相关性,表明该体系中微生物对磷源的利用方式更复杂。

2.4 影响因素分析与效应检验

利用 SPSS 探究培养方式、磷源及二者的交互作用对培养体系藻细胞生长及中性脂产量的影响情况,结果见表 2。不同培养方式与磷源均对两种培养体系中藻细胞数目及中性脂相对产量有极显著影响,这与 2.1 节和 2.2 节结果一致;不同培养方式与磷源均对磷利用率有显著影响,对 AKP 活性有显著影响的只有培养方式,也就是说磷源种类并非影响藻类 AKP 活性的主要因素。此外,培养方式与磷源的交互作用仅对藻细胞生长与中性脂产量产生影响,对磷利用与 AKP 的产生无显著影响。

表 2 不同影响因素对体系藻细胞生长、代谢的影响

Tab.2 Effects of different impact factors on algae cell growth and metabolism			
项 目	培养方式 (Sig.)	磷源 (Sig.)	培养方式与磷源的交互作用 (Sig.)
藻细胞数目	0.000**	0.000**	0.000**
中性脂相对产量	0.000**	0.000**	0.000**
磷利用率	0.012*	0.001**	0.061
末态 AKP 含量	0.000**	0.950	0.911
注: *表示 Sig.<0.05,差异显著;**表示 Sig.<0.01,差异极显著。			

两种培养体系中 19 种磷源之间细胞数目与中性脂产量的差异性检验见图 4。从图 4(a)可知,磷

酸三乙酯、次磷酸盐为磷源的样本与其他 18 个样本的细胞浓度均存在显著差异(此二者无显著差异),表明这两种磷源可有效促进藻细胞的生长。图 4(b)表明,磷酸盐、三偏磷酸盐、次磷酸盐、磷酸三乙酯、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸、胞苷-3'-单磷酸、腺苷-3',5'-环磷酸、胞苷-3',5'-环磷酸为磷源的样本与其他样本的中性脂相对产量均存在显著差异。结合图 2 发现,当胞苷-3'-单磷酸为磷源时,纯藻体系中中性脂相对产量较高,故与图 4(a)中其他磷源产生显著差异;胞苷-3',5'-环磷酸则是由于中性脂相对产量低而产生显著差异,故不认为此两种磷源可促进菌藻体系中藻细胞的产油效能,其他为可促进藻细胞产油的磷源。

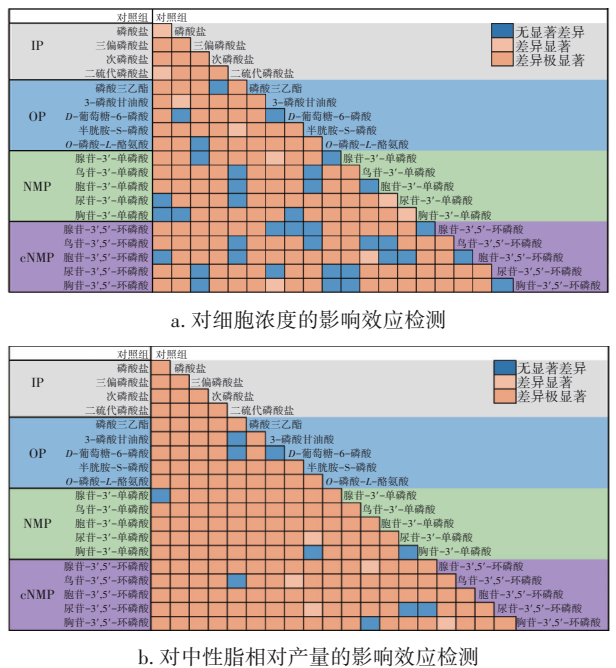


图 4 不同磷源对藻细胞浓度和中性脂相对产量的影响效应检验

Fig.4 Effect of different phosphorus sources on algae cell concentration and neutral lipid yield

2.5 讨论

纯藻体系总体上表现出较高的藻细胞浓度,原因可能有以下 3 点:一是菌藻共培养体系存在竞争^[19],体系中磷源不足,而细菌在低磷环境下相比藻类而言具有生长优势^[20],故对蛋白核小球藻的生长有抑制作用。研究证实^[19],在一些共培养体系中细菌具有生长优势,抑制了微藻的生长,如细菌和中肋条骨藻混合培养时,细菌会对磷酸盐摄入存在竞争,从而抑制共培养微藻的生长,但微藻释放有

机物则促进细菌的生长。二是某些细菌对微藻具有杀藻活性,如在 Lenneman 等^[21]的研究中发现,假单胞菌和嗜水气单胞菌对新绿油囊藻和三孢杜氏藻有降解作用。三是由于附生的细菌可能影响光的射入,继而影响藻的光合作用。Wang 等^[11]的研究发现,藻类在磷酸单酯(G6P 和 GYP)中的生长情况比在无机磷中的更好,这与本研究结果类似。菌藻体系在腺苷-3'-单磷酸为磷源时的生长优于纯藻体系,可能是由于腺苷-3'-单磷酸与合成能量物质 ATP 的原料腺苷-5-单磷酸(AMP)结构相似有关。

整体来讲,菌藻共培养体系下油脂积累情况优于纯藻体系,共培养体系有利于藻细胞产油。陈丽萍等^[22]认为,在活性污泥与小球藻、栅藻的菌藻固定化共培养体系中,固定化产物可以提高微藻生物量,且在低氮、磷浓度条件下也达到了较高的油脂产量。而 Li 等^[23]发现,单培养体系中磷对微藻产油并无促进作用,如小球藻在培养初期 C/N 值较高时可使油脂含量提高 23.9%,期间磷主要对小球藻的生长产生影响,对油脂积累无显著作用。本研究中,菌藻体系在 *O*-磷酸-*L*-酪氨酸为磷源时中性脂相对荧光强度明显比纯藻体系要高,因为 *O*-磷酸盐-*L*-酪氨酸可作为氮、磷混合营养源对体系的生长与产油情况均有促进作用,而氮源中酪氨酸有利于单位细胞内叶绿素和油脂的合成^[24]。此外,当以 *D*-G6P 为磷源时,纯藻培养体系的生长与产油效果也较好,有研究显示,*D*-G6P 可被链状亚历山大藻^[25]、固氮藻青菌^[26]吸收利用,而且,前者与东海原甲藻在共培养体系中存在竞争优势,对 *D*-G6P、 KH_2PO_4 的利用能力较强,而在东海原甲藻与其他藻类(中肋骨条藻)共培养体系中主要利用高分子有机磷、卵磷脂^[25],说明 *D*-G6P 被某一类特定的藻类所吸收,进而增强其竞争优势。

藻类对磷的利用情况各不相同^[11],一些藻类(如栅藻)通过消耗细胞内部磷而非外源磷来维持生长、叶绿素含量、光合作用与产油情况的稳定^[27]。本研究中,无论纯藻还是菌藻细胞对无机磷和部分有机磷的吸收利用及后续的生长、产油情况均优于对核苷类磷酸的利用。通常情况下,由于湖泊藻类中磷源主要由正磷酸盐、单酯磷、二酯磷及焦磷酸盐组成,以单酯磷含量最高^[28],故正磷酸盐是常被藻类直接吸收利用的磷源,对于较大分子质量的邻苯二甲酸二辛酯(DOP),则需经碱性磷酸酶降解后

进行吸收利用,而且碱性磷酸酶的底物通常不包括 cNMP^[15]。然而研究发现,外源 cNMP 的加入可使酶合成水平提高 50%~60%^[29],且部分藻类能利用大多数的核苷酸^[11];拟多甲藻对 AMP 的利用有竞争优势^[30];部分藻类如拟柱孢藻可以利用磷酸盐酯的 C—O—P 键作为磷源而较少选择 C—P 键^[26];小球藻除水解磷酸单酯类化合物外,也能水解三聚磷酸类和环形磷酸酯类化合物^[31];本研究也发现,在以 NMP 和 cNMP 为磷源的培养体系中,腺苷-3'-单磷酸、鸟苷-3'-单磷酸、腺苷-3',5'-环磷酸、胸苷-3',5'-环磷酸对体系的磷利用、细胞生长及产油情况均具有正向作用,故推断环形核苷磷酸被分解利用是可行的。

3 结论

综合来看,两种培养体系对磷酸盐和磷酸三乙酯、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸的吸收利用及后续的生长、产油情况均优于 NMP 与 cNMP。不同培养方式、磷源及其交互作用对纯藻和菌藻共培养体系藻细胞的生长、产油情况产生了影响。培养方式方面,纯藻培养体系的藻细胞数量总体上高于菌藻共培养体系;磷源方面,纯藻培养体系在以次磷酸盐为磷源时藻细胞数目最多;菌藻共培养体系在三偏磷酸盐为磷源时藻细胞数目最多,总体来讲,以磷酸盐、磷酸三乙酯、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸为磷源时其生长情况较好。对于蛋白核小球藻的产油能力,除培养方式、磷源及其交互作用外,还有磷利用率也对中性脂产量具有影响。总体来看,蛋白核小球藻在共培养体系下产油情况优于纯藻培养体系。当磷源为磷酸盐、三偏磷酸盐、磷酸三乙酯、*O*-磷酸-*L*-酪氨酸时,菌藻体系中藻细胞的中性脂产出能力较高。

参考文献:

- [1] MALCATA F X. Microalgae and biofuels: a promising partnership? [J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29 (11): 542-549.
- [2] PIEMONTE V, DI-PAOLA L, IAQUANIELLO G, et al. Biodiesel production from microalgae: ionic liquid process simulation [J]. Journal of Cleaner Production, 2016, 111: 62-68.
- [3] ARAUJO G S, MATOS L J B L, GONCALVES L R B, et al. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten

- microalgal strains [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(8): 5248–5250.
- [4] SINGH P, GULDHE A, KUMARI S, *et al.* Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 94: 22–29.
- [5] KAMALANATHAN M, GLEADOW R, BEARDALL J. Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Algal Research*, 2015, 12: 191–196.
- [6] 丰茂武, 吴云海, 冯仕训, 等. 不同氮磷比对藻类生长的影响[J]. *生态环境*, 2008, 17(5): 1759–1763.
FENG Maowu, WU Yunhai, FENG Shixun, *et al.* Effect of different N/P ratios on algal growth [J]. *China Ecology and Environment*, 2008, 17(5): 1759–1763 (in Chinese).
- [7] 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(6): 204–207, 211.
JIANG Huaizhen, ZHANG Wei, LIU Tianzhong, *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(6): 204–207, 211 (in Chinese).
- [8] ZHENG L, REN M L, XIE E, *et al.* Roles of phosphorus sources in microbial community assembly for the removal of organic matters and ammonia in activated sludge [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1023.
- [9] NICHOLSON D, DYHRMAN S, CHAVEZ F, *et al.* Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay [J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51(2): 874–883.
- [10] 王举, 陈荣, 雷振, 等. 不同磷源条件下铜绿微囊藻生长的锰作用特性[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(11): 9–14.
WANG Ju, CHEN Rong, LEI Zhen, *et al.* Effects of manganese on growth of *Microcystis aeruginosa* under different phosphorus sources [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(11): 9–14 (in Chinese).
- [11] WANG Z H, LIANG Y, KANG W. Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa [J]. *Harmful Algae*, 2011, 12: 113–118.
- [12] ALAM M A, VANDAMME D, CHUN W, *et al.* Biofloculation as an innovative harvesting strategy for microalgae [J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2016, 15(4): 573–583.
- [13] 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.
SHANG Hai, XUE Lingui, MA Ping, *et al.* Characteristics of *Chlorella* microalgal–bacterial condorticin oil production [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(10): 2280–2288 (in Chinese).
- [14] KITCHA S, CHEIRSILP B. Enhanced lipid production by co-cultivation and co-encapsulation of oleaginous yeast *Trichosporonoides spathulata* with microalgae in alginate gel beads [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(2): 522–534.
- [15] COTNER J B, WETZEL R G. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton [J]. *Limnology and Oceanography*, 1992, 37(2): 232–243.
- [16] RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY J B, *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 111(1): 1–61.
- [17] ZHU Z X, CHEN Y, GU Y, *et al.* Catalytic degradation of recalcitrant pollutants by Fenton-like process using polyacrylonitrile-supported iron (II) phthalocyanine nanofibers: intermediates and pathway [J]. *Water Research*, 2016, 93: 296–305.
- [18] 王海英, 符茹, 黄宝祥. 基于尼罗红荧光染色的小球藻脂质快速检测方法研究[J]. *中国油脂*, 2012, 37(3): 78–81.
WANG Haiying, FU Ru, HUANG Baoxiang. Rapid determination of lipid in *Chlorella* based on Nile red fluorescence [J]. *China Oils and Fats*, 2012, 37(3): 78–81 (in Chinese).
- [19] 张艳敏, 王江涛, 谭丽菊. 海水中藻菌共培养体系对碳氮磷的吸收转化[J]. *生态学报*, 2017, 37(14): 4843–4851.
ZHANG Yanmin, WANG Jiangtao, TAN Liju. Uptake and transformation of carbon, nitrogen and phosphorus in the co-culture system of algae and bacteria in seawater [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(14): 4843–4851 (in Chinese).
- [20] SONG C L, SØNDERGAARD M, CAO X Y, *et al.* Nutrient utilization strategies of algae and bacteria after

- the termination of nutrient amendment with different phosphorus dosage: a mesocosm case [J]. Geomicrobiology Journal, 2018, 35(4): 294-299.
- [21] LENNEMAN E M, WANG P, BARNEY B M. Potential application of algicidal bacteria for improved lipid recovery with specific algae [J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 354(2): 102-110.
- [22] 陈丽萍, 沈俏会, 方文哲, 等. 藻菌固定化用于市政污水深度脱氮除磷及藻体产油研究[J]. 科技导报, 2015, 33(14): 65-69.
- CHEN Liping, SHEN Qiaohui, FANG Wenzhe, *et al.* Removal of nitrogen and phosphorus and the lipid production by co-immobilized microalgae and bacteria in municipal wastewater [J]. Science & Technology Review, 2015, 33(14): 65-69(in Chinese).
- [23] LI C, YU Y L, ZHANG D W, *et al.* Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2016, 91(3): 680-684.
- [24] 朱义平, 宋东辉, 杨国兰. 不同氮源对异养小球藻生物量和油脂积累的影响[J]. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1027-1034.
- ZHU Yiping, SONG Donghui, YANG Guolan. Effects of different nitrogen sources on growth and lipid accumulation of a heterotrophic microalgae-*Chlorella vulgaris* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(6): 1027-1034(in Chinese).
- [25] OU L J, HUANG X Y, HUANG B Q, *et al.* Growth and competition for different forms of organic phosphorus by the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* with the dinoflagellate *Alexandrium catenella* and the diatom *Skeletonema costatum* s. l. [J]. Hydrobiologia, 2015, 754(1): 29-41.
- [26] BAI F, LIU R, YANG Y J, *et al.* Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* [J]. Harmful Algae, 2014, 39: 112-120.
- [27] WU Y H, YU Y, HU H Y. Microalgal growth with intracellular phosphorus for achieving high biomass growth rate and high lipid/triacylglycerol content simultaneously [J]. Bioresource Technology, 2015, 192: 374-381.
- [28] 冯伟莹, 朱元荣, 吴丰昌, 等. ^{31}P -NMR分析湖泊植物和藻类有机磷方法优化及形态研究[J]. 中国环境科学, 2016, 36(2): 562-568.
- FENG Weiyang, ZHU Yuanrong, WU Fengchang, *et al.* Optimization of extraction and parameters for ^{31}P -NMR analysis of organic phosphorus extracted from aquatic plants and algae [J]. China Environmental Science, 2016, 36(2): 562-568(in Chinese).
- [29] 王冬, 曲音波, 高培基. 腺苷三磷酸和环腺苷单磷酸对丝状真菌纤维素酶合成的调节[J]. 微生物学报, 1996, 36(1): 12-18.
- WANG Dong, QU Yinbo, GAO Peiji. Studies on the regulation of cellulose system by ATP and cAMP in mycelial fungi [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1996, 36(1): 12-18(in Chinese).
- [30] 苏玉萍, 张立香, 陈杨锋, 等. 有机磷培养下水体浮游植物竞争与群落结构演替[J]. 生态学报, 2018, 38(16): 5679-5687.
- SU Yuping, ZHANG Lixiang, CHEN Yangfeng, *et al.* Study on the competition and community succession of phytoplankton cultivated with organic phosphorus [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(16): 5679-5687(in Chinese).
- [31] 钱善勤, 孔繁翔, 张民, 等. 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻对不同形态有机磷的利用及其生长[J]. 湖泊科学, 2010, 22(3): 411-415.
- QIAN Shanqin, KONG Fanxiang, ZHANG Min, *et al.* Utilization of dissolved organic phosphorus and the growth of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Journal of Lake Sciences, 2010, 22(3): 411-415(in Chinese).

作者简介: 刘婷婷(1994-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物资源化。

E-mail: 923728878@qq.com

收稿日期: 2020-01-17

修回日期: 2020-04-11

(编辑: 任莹莹)