

微藻生物膜同步光合自养-异养生长特性及 调控



重庆大学硕士学位论文
(学术学位)

学生姓名：叶杨丽

指导教师：黄 云 副教授

专 业：动力工程及工程热物理

学科门类：工 学

重庆大学能源与动力工程学院

二〇一九年五月

Growth characteristics and regulation of synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm



A Thesis Submitted to Chongqing University
in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master's Degree of Engineering

By
Ye YangLi

Supervised by Dr. Huang Yun
Specialty: Power Engineering and
Engineering Thermophysics

College of Energy and Power Engineering of
Chongqing University, Chongqing, China

May, 2019

摘 要

由于化石燃料的过度利用, 人类面临着能源枯竭与气候变暖的双重危机, 世界各国致力于寻找一种清洁、高效、环境友好型的可再生能源, 而微藻通过光合作用可将 CO_2 转化为有机生物质, 具有生长速率快、光合效率高、油脂积累多和环境适宜性强等诸多优点, 因此, 以微藻为主的第三代生物燃料被认为是一种极具潜力的替代能源。微藻能源化利用的前提是实现生物质的规模化培养, 与悬浮式微藻培养相比, 生物膜培养系统由于耗水少, 运行稳定, 生物质密度高以及采收能耗低, 得到了广泛的应用。生物膜是微藻细胞在范德华力、静电力及胞外聚合物粘附力等作用下吸附于载体表面经过生长繁殖形成成熟的群落, 涉及多种生化反应与物质传递等关键过程, 已有研究表明生物膜培养方式虽然可以高度集中生物质, 但在生长后期, 随着细胞的持续累积, 生物膜厚度增加, 有效光穿透能力降低, 生物膜底层细胞活性较差, 导致生物膜脱落, 生物量明显减少, 且油脂含量很低, 为了克服上述缺点, 一种新型的同步光合自养-异养微藻生物膜培养方式一时兴起。然而, 目前微藻生物膜以光合自养-异养同步生长的作用机理尚不清晰, 反应机制尚不明确, 数学模型研究匮乏, 无法针对性地对其进行生长调控, 因此, 研究微藻生物膜的生长特性, 建立生物膜生长动力学模型, 并在此基础上进行生长过程的强化和调控尤为重要。

本文以微藻生物膜同步光合自养-异养培养技术为背景, 立足于强化微藻生物膜内的物质传递和生化转化过程, 首先, 明确了微藻生物膜生长的主要影响因素(光强、 CO_2 、葡萄糖和硝酸盐), 针对每一个影响因素, 设置了一系列的浓度梯度动力学实验, 在充分了解微藻生物膜生长特性的基础上构建了综合多因子生长动力学模型, 同时, 针对底物消耗建立了吸收动力学模型。然后, 基于微藻生物膜生长动力学的研究结果, 提出了微藻生物膜培养液中关键营养物质的优化调控方案, 主要研究了不同碳/氮源、无机碳与有机碳摩尔比及总碳与总氮摩尔比对微藻生物膜生长的影响, 此外, 通过不同光照测试实验对同步光合自养-异养微藻生物膜与单纯光合自养生物膜的光穿透能力进行了对比。最后, 基于丹麦 Unisense 微电极测试技术对微藻生物膜内的微观特征参数的分布情况进行了检测, 并通过调控葡萄糖利用方式和气相环境中 CO_2 与 O_2 体积比来进一步优化微藻生长。主要研究成果如下:

① 利用单因素梯度浓度的营养物质对微藻生物膜进行培养时, 发现微藻生物膜的最大生物质密度随着底物浓度的增加而增加, 直至达到饱和生长点, 超过饱和点之后, 生物质密度不再明显增加, 然后, 基于微藻的生长动力学特性研究构

建了生物膜的多因子生长动力学模型，该模型能够精准地评估和预测微藻生物膜生长系统的生产潜能，其吻合度高达 0.99，此外，通过研究微藻生物膜对营养底物的消耗情况建立了吸收动力学模型，微藻对底物消耗的反应速率常数和半饱和常数分别为：对于葡萄糖的吸收 $k = 0.0518 \text{ (g L}^{-1}) / \text{(g m}^{-2}) / \text{h}$ ， $K_m = 20 \text{ g L}^{-1}$ ，对于硝酸根的吸收 $k = 2.225 \text{ (g L}^{-1}) / \text{(g m}^{-2}) / \text{h}$ ， $K_m = 1.177 \text{ g L}^{-1}$ 。

② 与光合自养微藻生物膜相比，同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透能力更强，提高了 64%，同时，获得了优化后的营养物质组合，当总无机碳与总有机碳的摩尔比为 20:1，总碳与总氮摩尔比为 72:1 时，藻细胞的比生长速率比优化前提高了 78%，油脂含量与产量为 47.53% 和 41.95 g m^{-2} ，分别提高了 120% 和 147%。此外，同步光合自养-异养微藻生物膜内结构更疏松、孔隙率更高，有利于气体与营养物质的转化与利用。

③ 同步光合自养-异养微藻生物膜内 pH 值为 7.6 左右，呈中性，溶解氧浓度约为 8.3 mg L^{-1} ，且溶解氧浓度随培养时间的增加先增大后降低。之后通过对微藻生物膜生长环境进行调控发现，在同等葡萄糖用量下，涂抹法培养的生物膜中异养生长作用更强，可使油脂含量提高 32%，当 CO_2 与 O_2 体积比为 1:1 时，就已满足同步光合自养-异养微藻生物膜的正常生长需求，其最大生物质密度与油脂含量分别为 89.43 g m^{-2} 和 36.68%。

关键词：微藻生物膜，同步光合自养-异养，生长动力学模型，优化调控，微观特征参数分布

ABSTRACT

Nowadays, due to the large consumption of fossil fuels, the world faces the double crisis of energy depletion and climate warming. Countries around the world are striving to find a clean, efficient and environment-friendly new energy source. While microalgae can convert CO₂ into organic biomass through photosynthesis with many advantages such as fast growth rate, high photosynthetic efficiency, high oil accumulation and environmental suitability. The third generation biofuel based on microalgae is considered to be a potential alternative energy source. The premise of energy utilization of microalgae is the large-scale cultivation of biomass. Compared with suspension microalgae culture, biofilm culture system has been widely used due to low water consumption, stable operation, high biomass density and low energy consumption. Microalgal biofilm is a community in which microalgal cells grow to maturity after adsorbing on the carrier surface under the action of van der Waals force, electrostatic force and the adhesion force of extracellular polymers. Previous studies have shown that biomass can be highly concentrated through biofilm culture, but in the late growth stage, with the continuous accumulation of cells, the thickness of biofilm increases, the effective light penetration decreases, and the activity of the underlying cells of biofilm is poor, leading to the shedding of biofilm, the decrease of biomass, and the low lipid content. In order to overcome these shortcomings, a new method of simultaneous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm culture was developed. However, at present, the growth mechanism of synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm is still unclear, the reaction process is still unclear, the mathematical model research is lacking, and the growth regulation of microalgae biofilm is not studied. Therefore, it is particularly important to study the growth characteristics of microalgae biofilms, establish a biofilm growth kinetics model, and strengthen the growth process on this basis.

In this paper, the synchronous autotrophic-heterotrophic culture technique of microalgae biofilm is used as background to strengthen the material transfer and biochemical transformation in microalgae biofilm. first of all, the main factors affecting the growth of microalgae biofilm (light intensity, CO₂, glucose and nitrate) were identified, for each influencing factor, a series of concentration gradient kinetic experiments were set up. Based on the full understanding of the growth characteristics

of microalgae biofilm, a comprehensive multi-factor growth kinetics model was constructed. Meantime, absorption kinetics model was established. Then, based on the research conclusions of microalgae biofilm growth kinetics, an optimal regulation scheme for key nutrients in medium was proposed, the effects of different carbon/nitrogen sources, the ratio of inorganic carbon to organic carbon, and the ratio of total carbon to total nitrogen on the growth of microalgae biofilms were mainly studied. In addition, the light penetration ability of photoautotrophic/heterotrophic microalgae biofilm and pure photosynthetic autotrophic biofilm was compared by different illumination experiments. Finally, the distribution of microscopic characteristic parameters in the microalgae biofilm was measured based on the Unisense microelectrode test technology, and the growth of microalgae was further optimized by adjusting the ratio of CO₂ and O₂ in the gas phase environment. The main research results are as follows:

① When biofilms were cultured with different concentrations of nutrients, the maximum biomass density of microalgae increased with the augment of the substrate concentration until the saturated growth point was reached. Beyond the saturation point, the microalgae biofilm density no longer increased significantly. Then a multi-factor growth kinetic model of microalgae biofilm was established, which could accurately evaluate and predict the production capacity of microalgae biofilm growth system, the degree of coincidence was up to 0.99. In addition, an absorption kinetic model was constructed by studying the consumption of substrate by microalgae biofilm. The reaction rate constant and half-saturation constant of the microalgae were as follows: absorption for glucose $k = 0.0518 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$, $K_m = 20 \text{ g L}^{-1}$; absorption for nitrate $k = 2.225 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$, $K_m = 1.177 \text{ g L}^{-1}$.

② Compared with the autotrophic microalgae biofilm, the synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm showed a 64% increase in light penetration. Meantime, an optimized molar ratio of total inorganic carbon (CO₂) to total organic carbon (glucose) (20:1) and a molar ratio of total carbon to total nitrogen (72:1) were obtained, when microalgae biofilms were cultured with the optimized nutrients, the specific growth rate of biofilm was increased by 78% compared with that before optimization, and the oil content and yield were 47.53% and 41.95 g m⁻², which were increased by 120% and 147%, respectively. In addition, the structure of the synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm was looser and more porous, which was conducive to the conversion and utilization of gas and nutrients.

③ pH in the syntrophic autotrophic and heterotrophic microalgae biofilm was about 7.6 and it was neutral. Dissolved oxygen concentration was about 8.3 mg L⁻¹, which increased first and then decreased over time. Under the same amount of glucose, the heterotrophic growth effect of the biofilm cultured with the smear method was stronger, and the oil content increased by 32%. In addition, when the volume ratio of CO₂ and O₂ was 1:1, the normal growth demand of the biofilm of syntrophic photoautotrophy-heterotrophic microalgae was met and the maximum biomass density and lipid content were 89.43 g m⁻² and 36.68% respectively.

Keywords: microalgae biofilm; synchronous photoautotrophic-heterotrophic; growth kinetics model; optimal regulation; microscopic characteristic parameters.

目 录

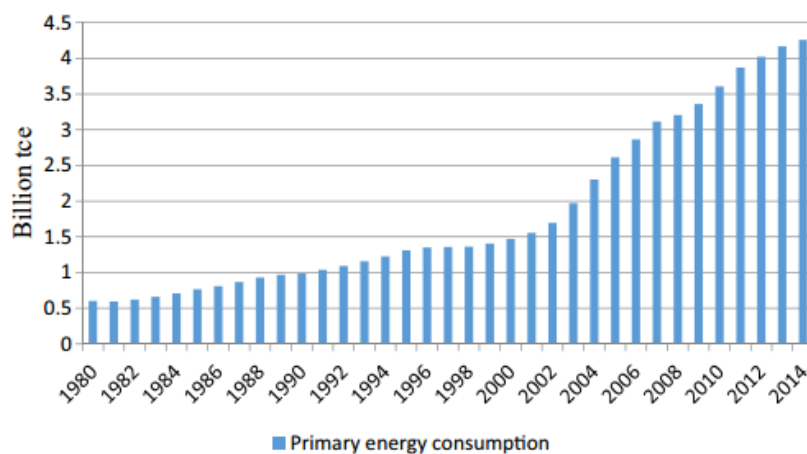
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
1 绪 论.....	1
1.1 概述	1
1.2 微藻光合固碳与能源化利用技术.....	3
1.2.1 微藻光合固碳原理	3
1.2.2 微藻的生长方式和营养环境	4
1.2.3 微藻悬浮式培养系统	8
1.2.4 微藻吸附式培养系统	9
1.3 同步光合自养-异养微藻生物膜生长的影响因素	14
1.4 同步光合自养-异养微藻生物膜的能质传输特性	18
1.5 微藻生物膜生长的动力学研究.....	21
1.6 本课题的主要工作	23
1.6.1 已有研究工作的不足	23
1.6.2 本课题的研究内容及意义	24
1.6.3 本课题的主要创新点	25
2 同步光合自养-异养微藻生物膜的多因子生长动力学模型	27
2.1 引言	27
2.2 实验材料与方法	28
2.2.1 藻种和培养基	28
2.2.2 实验系统与方案设计	29
2.2.3 生长动力学模型的构建	30
2.2.4 分析方法	32
2.3 实验结果与分析	34
2.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜的生长动力学特性研究	34
2.3.2 微藻生物膜多因子生长动力学模型的建立	39
2.3.3 微藻生物膜多因子生长动力学模型的验证	41
2.3.4 微藻生物膜对底物消耗的吸收动力学模型	45
2.4 本章小结	48
3 同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透特性与营养物质优化	50
3.1 引言	50

3.2 材料与方法	51
3.2.1 藻种与培养基	51
3.2.2 实验系统	51
3.2.3 方案设计	51
3.2.4 分析方法	53
3.3 实验结果与分析	54
3.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透特性	54
3.3.2 微藻生物膜生长碳源的优化调控	56
3.3.3 微藻生物膜生长氮源的优化调控	58
3.3.4 营养物质优化后微藻生物膜的生长特性研究	60
3.4 本章小结	64
4 基于微电极技术的微藻生物膜的生长环境检测及调控研究	66
4.1 引言	66
4.2 材料与方法	68
4.2.1 藻种与培养基	68
4.2.2 实验系统	68
4.2.3 方案设计	69
4.2.4 分析方法	69
4.3 实验结果与分析	71
4.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜内溶解氧与 pH 的分布特征	71
4.3.2 葡萄糖利用方式对微藻生物膜生长及膜内 pH 分布的影响	79
4.3.3 气相环境中 CO ₂ 与 O ₂ 比例对微藻生物膜生长及膜内 pH 分布的影响	83
4.4 本章小结	89
5 结 论	91
6 后续研究工作及展望	93
参考文献	95
附 录	111
A. 攻读硕士学位期间发表及撰写的论文	111
B. 攻读硕士学位期间获得的奖励	111
C. 攻读硕士学位期间参与的科研项目	111
致 谢	113

1 绪 论

1.1 概述

自 20 世纪 70 年代末改革开放以来,中国经济发展取得了举世瞩目的成就。2010 年以来,中国国内生产总值(GDP)达到 5.88 万亿美元,超过日本,居世界第二位^[1, 2],同时,能源消耗也在以一个惊人的速度不断增长,且中国已经成为近年来最大的能源消耗国和二氧化碳(CO₂)排放国^[3, 4],一次能源消耗量从 1980 年的 6 亿吨急剧增加到 2014 年的 42.6 亿吨标准煤(图 1.1a)。2007 年以来,中国已成为净能源进口国,近 60%的原油需求来自国外,对国家能源安全造成了巨大的威胁^[5, 6],2015 年,中国进口 3.97 亿吨原油,占据全年石油消费总量的 72%,成为世界第二大石油进口国。中国的能源结构一直以化石能源为主,其占据中国能源消费总量的 90%以上(图 1.1b),同时,化石能源在燃烧过程中产生大量的气相产物(例如 CO₂ 和 SO₂),严重污染了大气环境,预计近年来中国的碳排放量将占据全球碳排放总量的 1/3^[7, 8],因此,为了缓解温室气体排放,确保长期能源的安全性等问题,中国乃至世界各国需致力寻找一种可再生、可持续、高效、环境友好和经济上可行的替代能源,其中,生物燃料被认为是最可持续、最环保的能源,在全球范围内受到越来越多的关注^[9]。



(a)

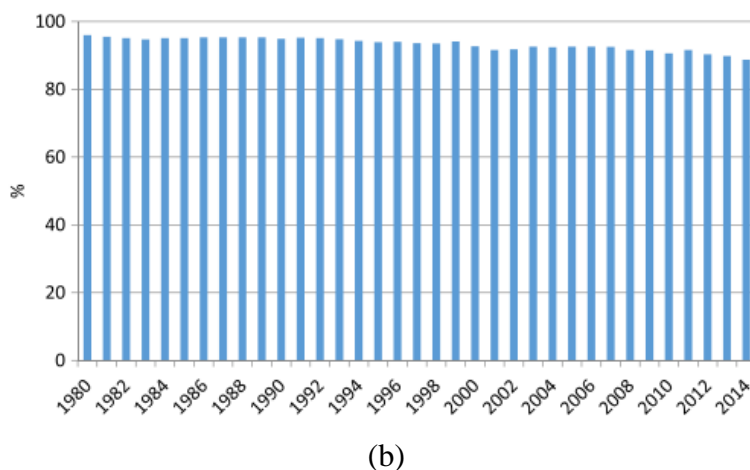


图 1.1 (a) 1980-2014 年中国一次能源的消费情况；(b) 1980-2014 年化石能源消费占中国能源消费总量的比重情况^[10]

Fig.1.1 (a) Primary energy consumption in China and (b) the proportion of fossil energy consumption accounts for the total energy consumption in China, 1980–2014^[10].

生物燃料是可再生油脂资源经过酯化或酯交换工艺制得的富含长链脂肪酸甲酯液体燃料^[11]。根据生物质来源的不同，生物燃料经历了三代的演变，第一代生物燃料来源于淀粉、糖、脂肪和植物油等食用原料，存在着与人争粮，与粮争地的问题；第二代生物燃料是从纤维素生物质（纤维素、半纤维素和木质素）中提取出来的，具备持续性但无经济性；第三代生物燃料主要来源于藻类作物，具有生长速率快，光合效率高、种类多、分布广、占地面积小和油脂含量高等优势，被认为是唯一一种可完全替代化石能源的生物燃料^[9]。从 1990 年到 2014 年，关于第一代生物燃料的研究论文占生物燃料文献的 46%，而关于木质纤维素和藻类生物燃料的论文分别占生物燃料文献的 40%和 14%，以含油蔬菜为原料生产生物柴油的研究约占传统液体生物燃料文献的 60%，而其余的研究几乎平均分布在淀粉和糖作物生产的生物乙醇上，麻疯树和棕榈油是这一组中研究最广泛的原料，其余原料包括玉米、大豆、甘蔗和油菜籽（图 1.2）^[12]。藻类作物生物燃料可以解决一些从陆地生物量中提取生物燃料相关的问题，成为生物燃料科学发展最快的分支之一^[13-14]。

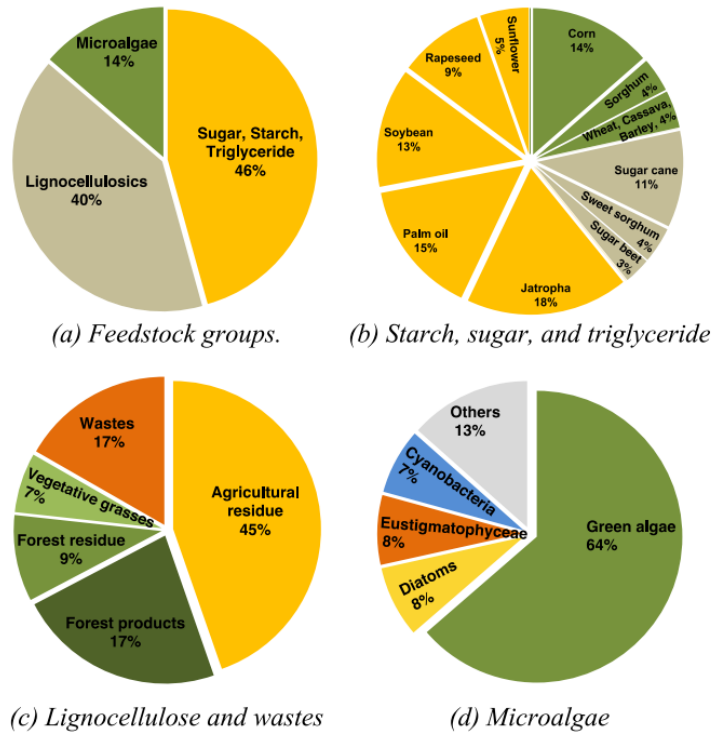


图 1.2 按论文数量划分的生物燃料文献中不同类型原料的份额(1990 - 2014)^[12]

Fig1.2 Share of different types of feedstocks in biofuel literature by number of papers (1990–2014)^[12]

1.2 微藻光合固碳与能源化利用技术

1.2.1 微藻光合固碳原理

藻类是一类多样的简单水生生物，没有高等植物的复杂细胞结构，广泛生存在不同的外界环境中，一些物种可以在淡水中繁殖，而一些物种在盐水和海水条件下也能生存^[15]。藻类是一种真核、单细胞光合微生物，大小从几微米到数百微米不等，可通过光合作用将太阳能转化为化学能^[15]，其与蓝藻产生的大量 O_2 是实现全球碳循环的重要组成部分^[16]。据统计，地球上共有 5 万多种微藻，其中已被鉴定的藻种为 3 万种^[17]，但只有 100 种藻种被商业生产化^[18]，由于藻类品种间的多样性，栽培的藻种类型对藻类生物燃料生产链中的各个环节都有着重要的影响，目前使用最多的是单细胞含油微藻（细胞尺寸 1-30 μm ）^[19, 20]。此外，藻类生物质实现大量生产的同时可捕获水资源中的气态 CO_2 ，蓝藻和真核藻类可使用碳酸氢盐作为 CO_2 的来源^[21]，当 pH 值介于 6.4-10.3 之间，水中 CO_2 （50%）的主要化学物质是碳酸氢盐，非气态，该补集碳可通过真核藻类的质膜和叶绿体包膜中的碳酸氢盐转运蛋白输送到藻细胞^[22]，在藻细胞叶绿体中，碳酸氢盐被转化为 CO_2 ，进而被二磷酸核酮糖羧化酶加氧酶（Rubisco）固定产生两个三磷酸甘油分子，之后通过一系列的生化反应，三碳有机酸被还原成糖，最终合成淀粉和油脂^[23]（图

1.3)。

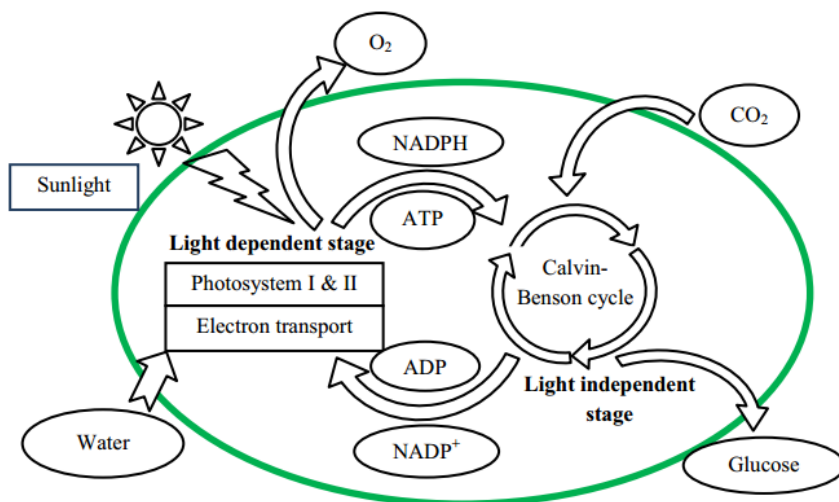


图 1.3 光合作用中的光反应和暗反应的原理图^[23]

Fig.1.3 Light dependent and light independent stage during photosynthesis ^[23]

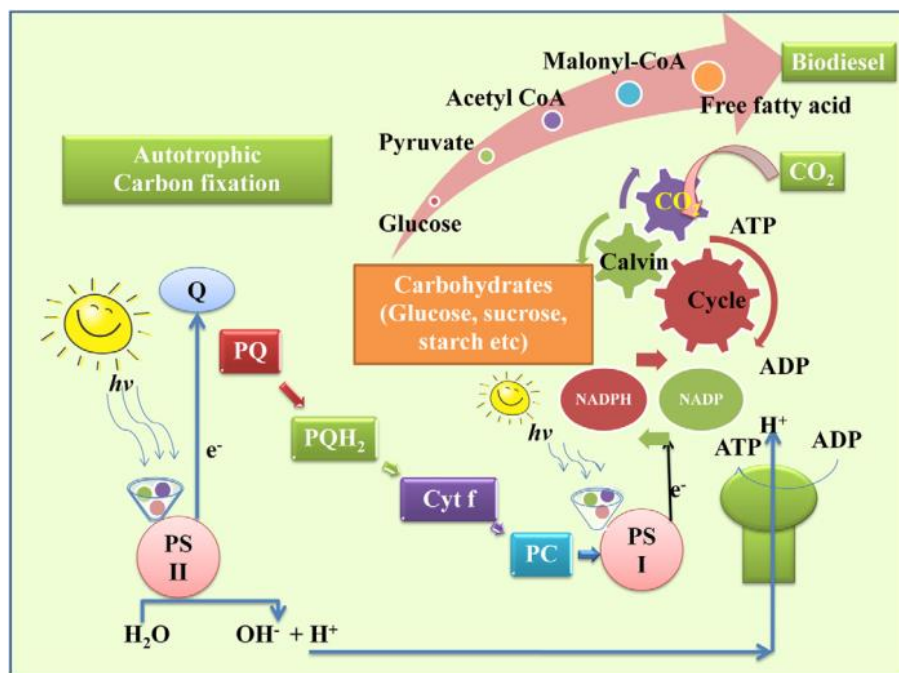
当 O_2 和 CO_2 同时被 Rubisco 固定时，加氧酶反应的产物是 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸，进而代谢生成甘氨酸，当其与另一种甘氨酸分子进行缩合产生丝氨酸时，会导致 CO_2 损失，这种碳损失会影响卡尔文循环合成 5-碳糖二磷酸核酮糖（用于 Rubisco 固定 CO_2 ）的能力，进而显著降低光合作用的效率，由于该过程主要发生在光照条件下，因此被称为光呼吸。有研究表明，光呼吸过程会降低光合作用效率的 20%-30%^[24]，为了减少 O_2 对碳固定的竞争性抑制作用，必须向藻细胞提供充足的碳酸氢盐，使得细胞内的二氧化碳浓度高于空气平衡时的浓度，从而抑制光呼吸作用^[25]。综上所述，微藻光合固碳不仅仅是一个将太阳能转变为化学能的简单反应，它是包括一系列光化学步骤和物质转化的复杂过程，研究光合作用原理在实践层面和理论层面上都具有十分重大的意义，其不仅能揭示细胞的起源、生命的进化等奥秘，还能促进自然科学等相关学科的发展。

1.22 微藻的生长方式和营养环境

微藻的生长特征和成分组成在很大程度上取决于生存环境^[26]，不同的生存环境提供不同的营养物质和能量来源，导致微藻的生物量和油脂含量不尽相同。油脂含量的高低并不是微藻产油能力的唯一指标，在通常情况下，为了获得较高的油脂含量往往以较低的生物量为代价，因此，涵盖油脂含量和生物量综合效应的油脂生产率才是表征微藻产油能力的合适性能指标^[27]。通常微藻根据不同的生长环境来获取自身所需的营养或资源，并通过消耗和储存这些有限资源来提高资源利用率，即微藻在不同的生存条件下会通过改变细胞内的代谢途径来进行增长繁殖^[28]，微藻具有 4 种典型的生长方式：光合自养、异养、兼养以及光异养生长^[29]。

① 光合自养

微藻的光合自养是一种以光照为能源，以 CO_2 等无机碳为碳源，通过细胞的光合作用将太阳能转化为化学能的生长方式^[30]，是微藻生长采用的最古老、最常用的一种生长方式。此外，根据藻种类别的不同，油脂含量大约在 5%-68% 之间^[27]，通常采用氮限制或营养匮乏等恶劣条件来提高微藻的油脂含量^[28]，氮限制是一个提高油脂含量的有效手段，但需要注意的是，油脂积累与微藻收获时间两者之间需要权衡^[31]。有研究表明^[32]，在 CO_2 浓度为 2%，曝气为 0.25vvm 条件下对小球藻进行生长培养，可获得自养微藻的最高油脂生产率，高达 $179 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ 。由于微藻消耗大气中的 CO_2 作为生长碳源有利于减少全球的碳排放，故非常提倡在 CO_2 排放厂或发电厂附件修建微藻养殖场地。与微藻的其他生长方式相比，光合自养培养过程中受到污染的风险较小，因此，微藻的室外规模化培养系统通常采用光合自养生长方式，但其生物质浓度很低，生物质的收获成本较高，不具备经济性^[33]。

图 1.4 微藻光合自养代谢途径^[34]Fig. 1.4. Autotrophic cultivation^[34]

② 异养

异养是指微藻利用有机化合物作为碳源和能源进行生长^[35]，一些藻种既可以在光照条件下进行光合自养培养，也可以在黑暗环境下进行异养生长，且微藻异养可有效避免自养生长过程中由于光源受限而导致细胞密度降低的影响^[30]。微藻能够异养生长必须具备以下特征^[36]：1) 在黑暗条件下藻细胞能够正常分裂与代谢；

2) 可以在无菌有机物环境中进行生长，且异养生长所需的能量必须由有机物的氧化过程提供；3) 能够快速地适应外界环境的变化；4) 能够抵抗发酵系统内部流体力学应力。从广义上讲，所有的生物（包括微藻）都使用相同的代谢途径进行呼吸，微藻的新陈代谢与高等植物的新陈代谢大体相似，但略有不同，对于任何给定的微藻，不可能精确地预测到它可以利用或偏爱哪种特定的底物^[37]。暗呼吸作用在微藻生长过程中起着两个重要作用：a) 是微藻在黑暗环境下维持生长和合成生物质的唯一能量能源。b) 为生物质的合成提供碳骨架，此外，氧供应是微藻异养培养的关键因素，若培养体系中 O_2 的供给受到限制就会大大降低微藻的比生长速率，从而影响微藻生物质整体的生产率^[38]。

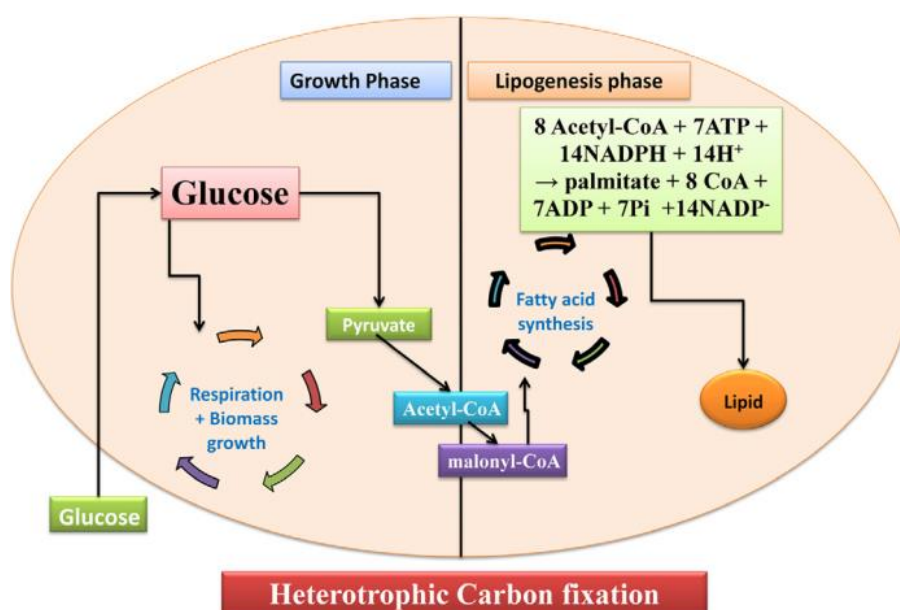


图 1.5 微藻异养代谢途径^[34]

Fig. 1.5. Heterotrophic cultivation^[34]

微藻进行异养培养可以获得较高的油脂含量，比如将原始小球藻的光合自养培养换成异养生长之后，其油脂含量提高 40%^[39]。微藻异养生长消耗的有机碳源为蔗糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖和果糖等等^[40]，有研究表明当采用 5 L 发酵罐并改善分批培养方法时可使异养微藻产生最高的油脂产量（3700 mg L⁻¹d⁻¹）^[41]，然而，有机碳源的加入使这种培养方式存在着严重的细菌污染等问题^[27]，因此密封发酵罐或常规微生物反应器是进行微藻异养最合适的培养介质。此外，作为碳源和能源的有机化合物的投入提高了微藻生长所需的底物支出，从而增加了异养生长的生产成本。

③ 兼养

兼养是指微藻以光合作用为主要能量来源，以 CO_2 和有机化合物为碳源进行生长，这意味着适合兼养的藻种，既可以进行光自养或异养生长，也可以在两者同时共存的条件下进行生长，主要取决于有机化合物的浓度和光照强度^[42]。*Cyanobacteria spirulina platensis* 和 *Chlamydomonas reinhardtii* 是两种非常典型的可兼养生长的藻种^[43]，在微藻兼养生长过程中，有机碳源和 CO_2 同时充当碳源，其中，光合作用利用光能，有氧呼吸利用有机碳源。有学者认为^[44]微藻兼养主要分为两个生长阶段，在生长初期，由于初始有机化合物含量较高，主要进行异养生长，然后，当有机碳源被分解消耗至一定的浓度之后，藻细胞开始诱导光合作用，同化 CO_2 ，正式进入第二阶段，此外，采用恰当的光暗循环，可使自养和异养分别处于最佳的生长状态，这时微藻兼养获得的生物量和油脂含量将远远高于自养与异养的总和。但迄今为止，与自养和异养生长相比，兼养培养很少运用于微藻生物物质的大规模生产中。

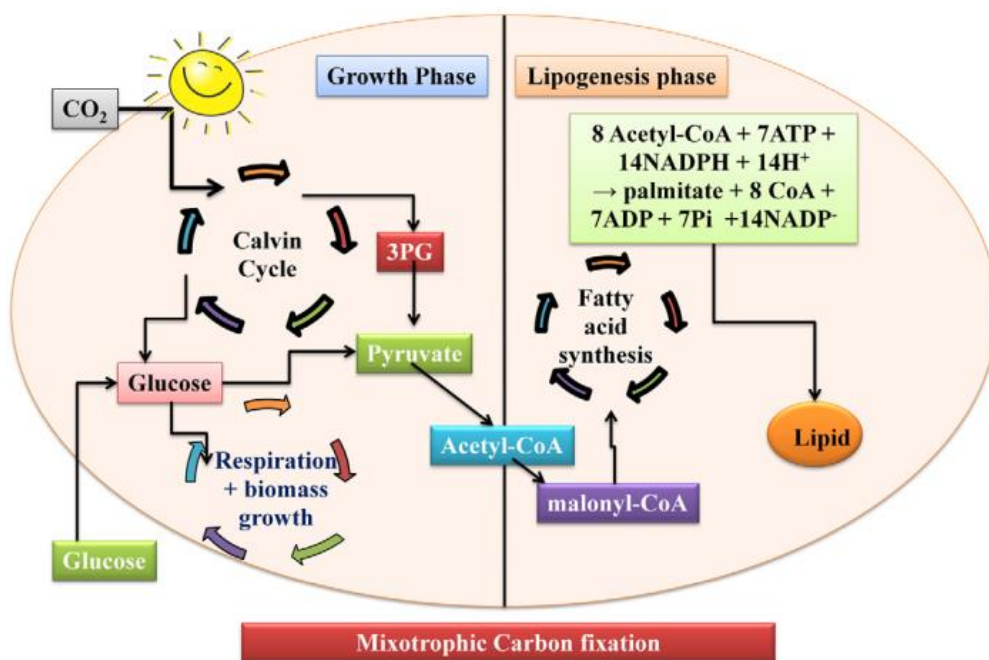


图 1.6 微藻兼养代谢途径^[34]

Fig. 1.6. Mixotrophic cultivation^[34]

④ 光异养

光异养是指微藻在光照条件下，以有机化合物为碳源进行生长，亦称为光同化或光代谢^[28]，与兼养生长不同，光异养必须利用光能获取能量，而兼养可通过氧化有机化合物来达到这一目的^[27]，也就是说光异养生长必须保证有机化合物和光源同时存在。通过光异养可以提高光诱导产物的产量，但是该培养方式很少运

用于生物柴油的生产中^[45]，与异养和兼养培养类似，有机化合物（糖类）的引入往往会产生细菌污染现象，同时，光异养实现规模化生产中通常需要特殊的光生物反应器作为生长介质，从而明显增加培养的资金成本和操作成本。此外，不同的碳源和能源适用于不同的培养工况，且细胞密度随着营养物来源的不同而不同。

综上所述，微藻的生长产油特性与藻种类别息息相关，不同的生长方式表明异养培养最适用于微藻生长，即有机碳源的加入使异养比自养获得更高的生物量和油脂含量，能够使微藻产油的利润实现最大化，但污染现象始终是异养培养的关键问题，尤其在大型的开放培养系统中，会严重阻碍微藻生物物质的大规模生产，另外，有机化合物的成本也是一个主要的商业问题。由于光合自养能将工厂废气中的 CO_2 转化为油脂，减少废气排放，培养规模易扩大，对环境友好，成为一种使用频率最高的培养方式，但光自养获得的生物量和油脂产量很低，经济上不可行，而且较低的细胞密度会进一步增加收获成本。目前，关于采用兼养和光异养运用于微藻油脂生产的相关文献较少，且这两种培养模式对光照条件和无菌环境的要求苛刻，需要设计十分高效的光生物反应器来实现生产的规模化。

1.2.3 微藻悬浮式培养系统

目前，微藻光合自养是唯一一种技术上和经济上都可行的适用于大规模生物物质生产的生长方式^[46]，常用的两种悬浮培养体系是开放池系统和封闭式光生物反应器系统^[47]（图 1.7）。开放式系统是指全部暴露在外界环境中的开放池，通常采用的是跑道和圆形开放式池塘，封闭式光生物反应器分为管式、柱式、平板式以及搅拌式培养系统。两种悬浮培养体系各有优缺点，封闭式培养系统由于更可控性具有易于优化、传质能力强、生产效率高、避免污染等优势，但是在实际的运用过程中，该系统的成本很高，操作较复杂。开放式培养系统初始投资较少、维修费用低、操作步骤简单，但是外界环境不受控制，培养液污染现象严重，生产效率很低。通常微藻培养体系的选择取决于所需的目标产物，对于生物燃料的生产，可以使用开放式或封闭式培养系统，但对于医用药物的生产，要求减少污染，只能采用封闭式培养系统。值得说明的是，由于悬浮式培养系统中生物物质密度低，水含量高达 99.5%，微藻细胞尺寸 θ 较小，密度与水相似，为微藻的采收过程带来了巨大的困难，在微藻生物能源利用技术的整个产业链中，微藻采收及脱水干燥能耗占到 30% 以上，显著提高了微藻生产过程中的技术要求和成本投入，严重阻碍了微藻生物物质能源的大规模推广应用，因此，吸附式微藻培养技术应运而生。

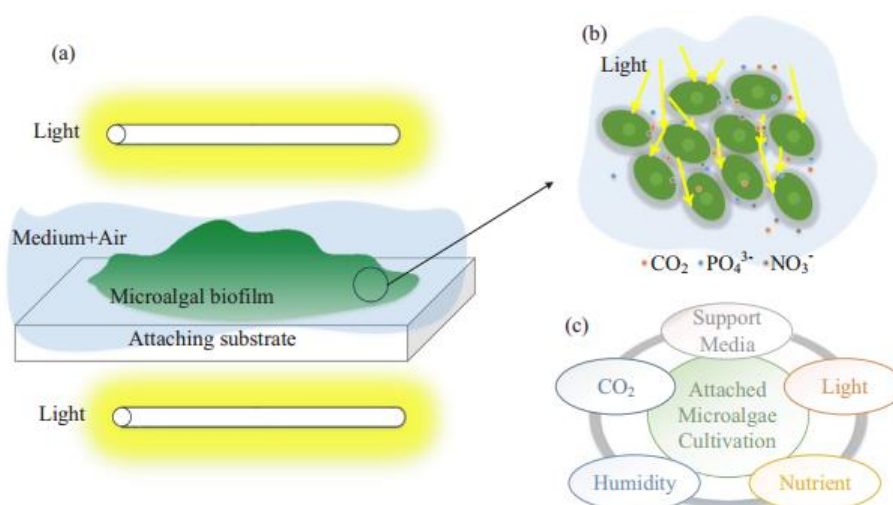


图 1.7 微藻开放式及封闭式培养系统

Fig.1.7 Open ponds and closed systems for microalgae cultivation

1.2.4 微藻吸附式培养系统

在悬浮式培养体系中,细胞尺寸小、分散密度低,收获过程困难且能耗较高^[48],近年来人们提出了一种吸附式微藻培养模式(图 1.8),在培养过程中,藻细胞高度集中,密度较大,刮取生物膜表面就可收获微藻,可实现低成本的收获工艺^[49, 50],且浓缩的生物质可作为精炼生物柴油的原料。

图 1.8 微藻吸附式生长示意图^[51]Fig. 1.8 sketch and elements of attached microalgae cultivation^[51]

吸附式培养是指藻细胞附着于载体表面以生物膜的形式进行生长，其中，吸附作用力可能是疏水作用、酸碱相互作用或细胞与基质表面的其他作用力等^[52]。无论是悬浮式培养还是吸附式培养，微藻生长所需的基本要素（光照、无机盐、CO₂ 和 H₂O）都是相同的，但吸附式微藻培养系统需要额外的支撑介质^[53, 54]，其中，靠近支撑介质的表面为内侧，远离支撑介质的表面为外侧，通常光照和营养液由生物膜表面供给（图 1.9B），若支撑介质是多孔或透明材料，则可从内部提供光照和营养液（图 1.9C），与传统的悬浮式培养方式相比，其显著降低了光生物反应器的总体积，此外，吸附式微藻培养有效地缩短了气体扩散途径，减小了细胞的水动力应力。由于吸附式培养是将藻细胞形成生物膜进行生长，因此也被称为生物膜式培养。

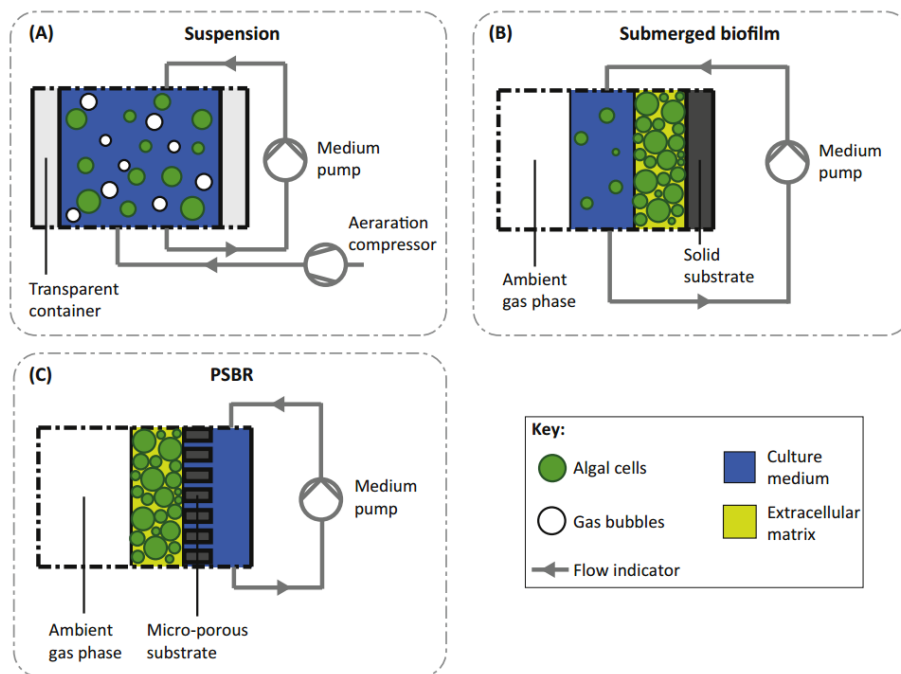


图 1.9 悬浮式培养与生物膜培养反应器示意图 (A) 封闭式光生物反应器 (B) 液体淹没式生物膜反应器 (C) 多孔基质生物膜反应器^[55]

Figure .1.9 Schematic representation of different photobioreactor types for cultivation of microalgae in suspension and immobilized in biofilms. (A) closed suspension photobioreactor; (B) submerged biofilm photobioreactor; (C) porous substrate biofilm bioreactor^[55]

与悬浮式微藻培养系统相比，吸附式培养的脱水能耗降低了 99.7%^[56]，该系统中藻细胞高度集中，密度较大。Jorquera 等通过吸附式培养获得的微藻生物质密度为 96.4 kg m⁻³，是开放池培养体系的 300 倍，同时节省了更多空间，而且采用缺氮培养液替代富氮培养液可明显诱导油脂的积累^[57]，生物膜反应器与开放池培养

体系中产生 1 kg 的生物质分别需要 1618 L 和 2857 L 的耗水量^[58, 59], 此外, 由于藻细胞能够同化利用水体中的氮磷, 净化水资源, 且废水处理过的微藻还可运用于生物柴油的生产中, 微藻生物质生产与废水处理的耦合技术在近几十年来得到了广泛的应用^[60, 61]。

根据不同的系统取向和细胞与液体的相对位置, 学者们设计出各种各样的生物膜光生物反应器。根据支撑介质的方向不同, 吸附式微藻培养系统可分为水平、垂直、旋转和径向四种类型(图 1.10)。一般水平系统中倾角低于 10 度来确保培养液流经整个生物膜表面^[60, 62-64], 同时, 由于培养基储存、生物质收获和脱水等非生产性领域的需求, 吸附生物膜的区域通常小于整个系统的占地面积。垂直培养系统通过垂直布列基质, 实现了最大限度地利用空间, 大大节省了用地面积^[65, 66], 理论上, 增加支撑介质的高度可提高微藻生物质生产力, 然而, 在实际生产过程中, 系统的高度通常只有几米, 这是因为当高度过大时, 垂直介质下层的排列需要十分稀疏才能保证基质底层的微藻能够接收足够的光强, 这样不仅会降低单位占地面积的生产率, 还会提高系统建设的要求和成本^[67]。对于旋转式生物膜培养系统, 介质底层的藻细胞间歇性地进入培养液, 其余时间则完全暴露在大气中进行气体交换, 其中, 旋转基质的结构多种多样, 可以通过优化基质底面与占地面积的比值来有效地利用培养系统整体的用地面积^[68, 69]。此外, 圆周速度是旋转系统中的主要控制参数, 这是因为旋转速度过快会对吸附的藻细胞产生强大的剪切应力, 过慢则容易导致生长所需的营养物质供应不足, 通常情况下, 适合生物质大量积累的转速范围为 $0.05-0.15 \text{ m s}^{-1}$ ^[70, 71]。径向系统又称为悬浮-吸附系统, 在该系统中有大量的小型生长基质淹没在培养液中, 可同时收获吸附细胞和游离细胞^[72, 73]。事实上, 这种装置广泛地被用于活性污泥处理废水^[74], 近年来这一理念逐渐被引入微藻培养系统中, 而且大多数的研究都集中在污水净化领域^[75, 76], 并非是生物质的生产^[77]。基质材料的大小和用量是该系统中重要的控制参数^[72, 78], 此外, 基质底层在培养液中的滞留时间也需要精确控制, 这是因为滞留时间太短使得生物质收获步骤过于频繁, 滞留时间太长会由于基质之间的碰撞作用而导致生物膜脱落和细胞死亡。

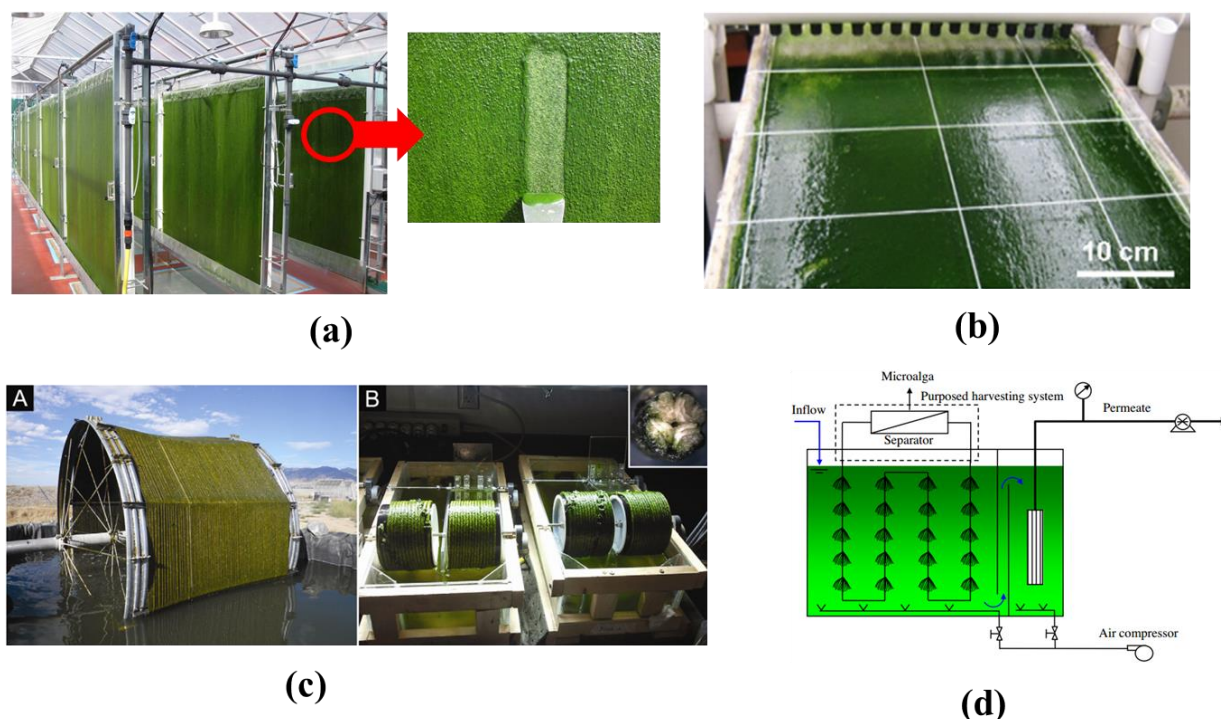


图 1.10 基于不同介质方向的生物膜反应器分类(a)垂直系统;
(b)水平系统;(c)旋转系统;(d)径向系统^[64, 69, 76, 79]

Fig.1.10 Classification of attached microalgae systems based on substratum orientation. (a) Vertical system; (b) Horizontal system; (c) Rotating system; (d)Radial system^[64, 69, 76, 79]

此外, Berner^[80]等根据不同的营养液供给条件和生物膜布置方式将微藻生物膜反应器划分为持续淹没系统、间歇淹没系统与灌注系统 3 大类 (图 1.11), 即吸附式微藻培养系统可以分为: 1) 持续淹没于培养液中的生物膜; 2) 在气相和液相之间相互交替的生物膜; 3) 多孔介质渗透作用的生物膜。对于持续淹没生物膜培养系统, Shen^[81]等设计了一种结构简单的反应器即将 4 层玻璃纤维增强塑料层置于 500 mL 烧杯中作为微藻吸附材料, 之后倒入适当的液体培养基将其完全覆盖进行淹没式生物膜培养, 用来提高微拟球藻的油脂产率。Godos^[82] 等提出一种新型的封闭式管状生物膜反应器用来吸收猪场废水中 C 、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 等物质, 该培养体系由水平排列的 14 米长的透明 PVC 管构成, 还包括用于污水处理和培养液循环的蓄水池。对于气液两相交替生长的微藻生物膜, Gross^[83]等设计了一种旋转式生物膜光生物反应器, 即置于摇床上的有机玻璃反应器内, 采用多种材料作为微藻细胞吸附载体, 用来测试吸附材料的粘附能力, 由于该反应器可以旋转, 当三角形的一个角浸入液体基质时, 其他两个角就暴露在空气中, 因此, 微藻生物膜既可以暴露在大气中的 CO_2 氛围中, 也可以充分吸收营养物质。Blanken^[84]等研发了一种基于旋转生物接触器的生物膜反应器, 即将 4 个圆盘浸润在容器中(42%),

测试不锈钢编织网和聚碳酸酯圆盘等材料对细胞吸附的效果，最后评估了这种设计在光合效率、生产力和生长稳定性等方面的潜力。对于多孔介质渗透生物膜培养系统，Ozkan^[64]等设计了一种简单的生物膜反应器，以木板为支撑介质，以较厚的混凝土层为生长基质，通过生长表面的倾斜角来实现营养液（由生长表面上方的滴管提供）的流动。Liu^[85]等介绍了两种类型的生物膜反应器，第一种反应器是由单层垂直玻璃板组成，将其置于玻璃腔室中，平板的一面用来接收光照，另一面则粘上滤纸用于微藻吸附。第二种反应器是对第一种反应器的延伸和优化，即在玻璃腔室中，有多个平板排列组成，其中，每一块玻璃板都能接收到不同强度的光照，液体培养基是通过滴入玻璃板和滤纸的界面来实现供给。

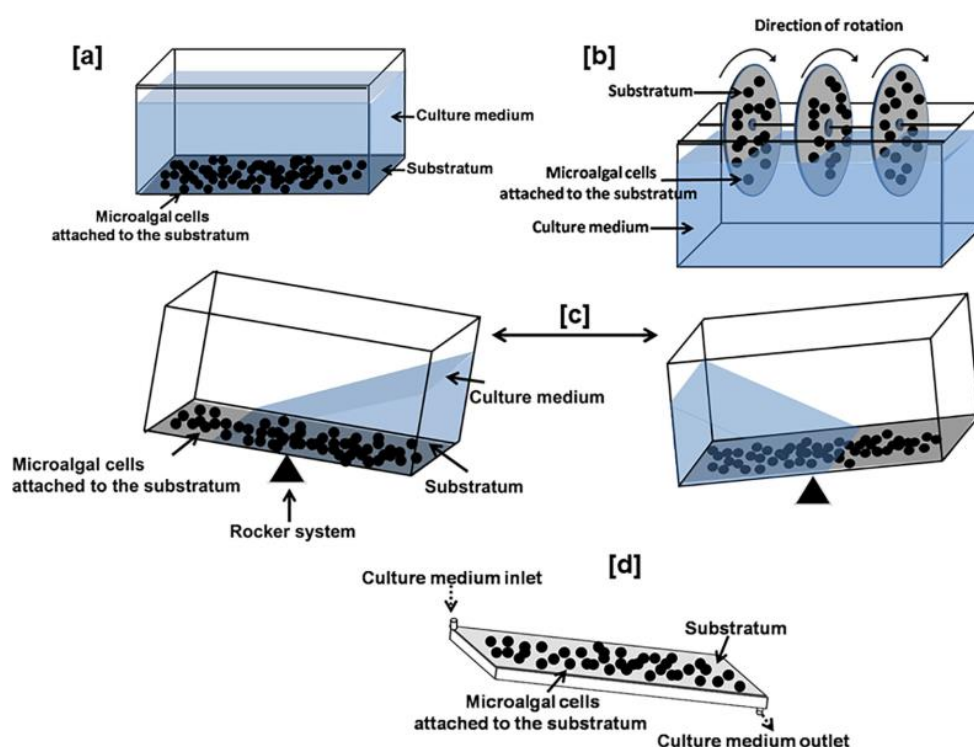


图 1.11 微藻生物膜反应器的不同类别^[86]

Fig. 1.11 Simplified designs of some microalgal biofilm systems: [a] System of permanently immersed biofilms; [b] and [c] biofilms between two phases; [d] permeated biofilm system^[86]

目前，吸附式微藻培养系统大多基于光合作用进行生长，可以实现微藻细胞的高度集中，但是在生长后期，随着越来越多细胞的堆积，生物膜厚度增加，在垂直于生物膜表面沿着膜厚度方向上光强逐渐减弱，产生光衰减，甚至在生物膜厚度方向某一处光强为零，严重阻碍了生物膜底层细胞的光合生长行为，底层细胞不断降解自身的有机物，导致最终的微藻生物质密度提高受限，且已有研究表明光合自养吸附式微藻培养的油脂含量较低，不利于微藻生物质燃料的开发与利

用, 因此, 本文提出了一种同步光合自养-异养微藻生物膜培养方式, 其中, 在生物膜上表面, 在光照条件下, CO_2 气体直接与藻细胞接触并进入生物膜内部的多孔网络向内扩散参与细胞的光合作用, 而在光照和 CO_2 难以到达的生物膜底层区域, 藻细胞在有氧条件下利用有机碳源进行异养生长, 实现微藻生物膜同步光合自养-异养生长, 保证了生物膜底层细胞的活性, 从而达到生物膜稳定生长的目的, 同时, 光合自养层释放的 O_2 部分传输至异养生长层, 异养代谢产生的 CO_2 也会扩散至自养层维持光合作用, 使得微藻光合自养与异养同步生长且相互促进。

1.3 同步光合自养-异养微藻生物膜生长的影响因素

生物膜的形成与结构取决于微藻生长的影响参数及其之间的相互作用, 与细菌生物膜相比, 微藻生物膜生长因素研究的相关文献十分匮乏^[87], 针对同步光合自养-异养生物膜培养的实验研究尚未报道, 同时, 各种环境条件下的生长优化仍然是一个很大的挑战, 并成为微藻生物膜实现规模运用的重大瓶颈, 尤其是在废水处理领域^[61]。因此, 深入研究影响参数的作用对于微藻生物膜技术的设计和发展至关重要, 有助于实现对整个生物膜培养系统进行有效地控制。

① 藻种的影响

不同种类的藻种在吸附式培养体系中通常表现出不同的性质和行为, 一些藻种在悬浮液中生长迅速, 而另一些藻种则倾向吸附于固体基质表面, 故选择合适的藻种是生物膜式培养的最关键因素^[88]。有研究发现, 小球藻和栅藻是生物膜体系中研究最多的两个藻种^[51], 同时, 还有多物种共同培养来模拟自然环境, 优势藻种将决定整个系统的生产力^[56]。此外, 藻种的选择要充分考虑生物物质生产能力、对支撑基质的粘附性、细胞的形状与大小、胞外聚合物的多少、副产品的价值以及抗菌能力等因素^[89], 其中, 微藻的生产能力和副产品的价值高低是实现生物物质生产的关键因素, 细胞高度的粘附性使得生物膜生长更牢固, 细胞的形态、大小和胞外聚合物能够进一步地加强微藻的粘附性。Shen 等研究了二形栅藻 (UTEX 417)、原始小球藻 (UTEX1806)、普通小球藻 (FACHB-31)、斜生栅藻 (FACHB-416)、二形栅藻 (FACHB-496) 和绿球藻 6 种淡水藻在不锈钢基质上面的吸附率, 实验结果表明, 球形或椭球型、直径大约为 10-12 微米的藻细胞具有最高的粘附率, 高达 53.3%, 此外, 胞外聚合物可以产生一种三维水合基质, 促使细胞快速形成生物膜^[90]。Irving and Allen^[87]等研究发现当不同藻种在无菌环境条件下吸附在不同基质的表面上时, 普通小球藻的初始吸附率远远低于斜生栅藻。事实上, 各种藻种的吸附机理与成膜特性都是不尽相同的, 大多数硅藻的吸附是随着胞外聚合物的分泌而进行的, 而丝状绿藻的吸附则非常牢固, 蓝细菌吸附过程与硅藻和细菌类似, 主要是通过胞外聚合物的粘附性吸附在固体基质表面^[91]。

② 吸附材料的影响

吸附材料是微藻生物膜培养体系的重要组成部分，材料的选择取决于其粗糙度、亲水性、表面能、硬度、生物相容性、孔隙率和价格等等。已有研究表明多孔、粗糙和亲水性的载体更容易吸附生物膜，而铜和纸板等具有生物毒性或易降解等缺点不适用于微藻吸附^[68, 71, 83, 92]。文献报道中常用的吸附材料为醋酸纤维膜、聚碳酸酯膜和棉花等^[50, 90, 93-95]，90%以上的吸附式微藻培养研究是在实验室规模中进行的，醋酸纤维膜和聚碳酸酯膜是两种使用频率最高的吸附材料，但这些材料的硬度很低，并不适用于吸附式微藻培养的规模化生产。**Shen** 等采用棉绳、聚酯、棉线、黄麻、丙烯酸等作为微藻初始吸附材料进行实验比较，结果发现棉绳是用于微藻生长的最佳吸附基质^[68, 92]，棉花质地粗糙、亲水性好、无生物毒性、孔隙率较大以及价格低廉，是一种很有潜力的吸附材料。**Kim** ^[92]等采用尼龙膜、聚乙烯膜、聚丙烯束，聚碳酸酯板和粘胶人造丝等材料对丝状微藻 *Stigeoclonium sp* 进行吸附培养，结果表明聚丙烯束作为吸附基质具有更牢固的附着性，最高生物量可达 53.22 g m^{-2} 。**Sekar** 等使用疏水材料（有机玻璃、不锈钢、钛）、亲水材料（玻璃）和生物毒性材料（铝、铜及其合金）进行微藻生物膜培养时发现藻细胞在疏水材料表面的吸附效果优于亲水材料，且提高材料表面的粗糙度可以有效提高微藻的吸附量。此外，吸附基质的选择还取决于微藻生物膜反应器的结构形式，对于水平式培养体系，由于游离藻细胞在重力作用下可以进行沉降且要实现生物质的低成本收获，因此最常用的材料是表面光滑的玻璃^[54]，而在垂直培养体系中，采用光滑的吸附材料将是一个很大的挑战，这是因为在初始生物膜形成后，细胞释放的 EPS 具有长期的粘附性，使得生物膜结构更牢固，这时微藻的生长速率是由微藻的种类决定，与吸附基质的类型无关。

③ 光照的影响

光是微藻进行光合作用的主要能量来源，生物膜生长对光照具有很大的依赖性^[96]。悬浮培养系统中藻细胞在曝气条件下可在浅层和深层培养液之间循环，而藻细胞在吸附式培养系统中处于固定的位置，生物膜表面的细胞由于光照很强容易受到光抑制作用，远离生物膜表面的细胞接收光照太弱容易受到光限制作用^[97]。通常微藻生物膜的厚度是几百微米^[98]，在位于生物膜表面之下 $20 \text{ }\mu\text{m}$ 处藻细胞已经开始受到光限制作用，在 $200\text{-}350 \text{ }\mu\text{m}$ 处无法接收到光照^[99, 100]，因此微藻倾向于以浅层生物膜的形式进行生长^[101]。此外，距生物膜表层 $200 \text{ }\mu\text{m}$ 内藻细胞的叶绿素 α 与光合色素的比值远远高于底层，说明膜表面的藻细胞生理状态更好，光合效率更高^[102]，随着光合色素的减少，尤其在生物膜底层，吸附的藻细胞通常会完全失去光合作用的能力^[93]。微藻生物量达到最高值时采用的最小光强被称为光饱和点（LSP），根据不同的微藻种类和生长环境，吸附式微藻培养的光照范围在

60-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [57, 85, 89, 103]。Liu 等在吸附式系统对斜生栅藻进行培养并测量了距光源处不同生物膜厚度方向的生物质密度, 结果表明随着光线的减弱, 细胞的生长速率逐渐降低[85]。此外, 光循环、光波长、打光方向等也会影响微藻生物膜的生长。其中, 闪光效应可以提供周期性的光暗循环, 研究表明当光分数为 0.5 和 0.33 时, 与持续光照相比, 藻细胞的光合速率分别提高了 118.8% 和 143.3%[49]。Genin 等为了提高微藻的光合效率, 采用红色 LED 灯作为微藻生物膜生长的光源, 这是因为藻细胞更倾向于利用红光或蓝光, 而且, 若吸附材料透明, 可以从生物膜内部打光, 也可以设计不同形状的吸附基质来优化光分布进而提高微藻生物量[104]。Sukačová 等研究了微藻生物膜对磷酸盐的利用情况, 结果表明光照条件的变化会显著影响细胞对营养物质的吸收特性[62], Hultberg 等比较了在连续人工光照和自然太阳光两种情况下微藻对磷酸盐的去除效率, 发现前者的除磷效率远远高于后者, 高达 97%[105]。

④ CO_2 和 O_2 传递

碳是微藻细胞进行光合作用的必需元素[83], 微藻既可以利用废水中的碳 (CO_2 和 HCO_3^-), 也可以利用大气中的 CO_2 和有机碳降解产生的 CO_2 [61]。微藻光合自养时, CO_2 是最主要的碳源, 若 CO_2 的消耗大于 CO_2 的供应, 生物质密度会由于碳限制作用而明显降低[106]。在悬浮培养系统中, CO_2 气体通过曝气的方式供给, CO_2 气体被细胞利用前首先充分溶解于培养基进行大量地稀释, 然而, 在吸附式微藻培养系统中, 藻细胞直接暴露于气相中, CO_2 气体直接通过一层薄薄的液膜供应, 类似于直接的气固接触, 因此, 吸附式培养系统能够更彻底的利用 CO_2 , 转化效率更高[89]。Huang [56]等通过比较悬浮式和吸附式两种培养方法来研究微藻的光传输特性及对 CO_2 气体的亲和力, 结果发现在吸附式微藻培养系统中, 藻细胞对 CO_2 的亲和力更高, CO_2 的饱和浓度为 1.5%, 然而, 微藻悬浮系统中 CO_2 的饱和浓度为 4.5%。Blanken 等发现当 CO_2 浓度从 0.625% 提高到 1.25% 时, 微藻的生物质密度得到了显著的提高, 但是当 CO_2 浓度从 4% 进一步提高到 10% 时, 微藻的生长并无变化[107], 换言之, 约 1% 浓度的 CO_2 即可满足微藻生物膜的生长需求, 而在悬浮式培养系统中, 2%-5% 浓度的 CO_2 才能维持细胞的正常生长[56, 59, 93]。Gross [83]等研究了不同浓度的 CO_2 对微藻生物膜生长的影响, 结果发现即使采用空气作为碳源也能满足微藻生长的需求。微藻生长情况取决于光强、 CO_2 浓度、培养基等因素的综合作用[93, 108], 研究表明微藻的生产率随着 CO_2 浓度和光强的增大而增大, 但是, 当其中一个成为限制性因素时, 提高其他的因素并不能促进微藻的生长[79, 108, 109], Benstein's [110]等发现当光照强度从 73 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 提高至 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时, 微藻的生物量并没有得到明显的增加, 但是, 若同时增加光照强度和 CO_2 浓度, 藻细胞的生长速率提高了 4 倍左右。

微藻在进行光合作用时会产 O_2 , 若 O_2 积累过多就会对细胞产生损害作用, 即光氧化损伤^[111], 这是因为 O_2 浓度过高会强化加氧酶的活性, 使得越来越多的 O_2 被藻细胞进行呼吸消耗, 光合作用积累的有机营养物也会被消耗殆尽, 最终大大降低微藻生产率, 因此, 通常情况下 O_2 的溶解浓度应低于 30 mg L^{-1} ^[112]。在吸附式培养系统中, 细胞位置相对固定, 并不存在机械搅拌或流动混合, CO_2 和 O_2 的传递完全依靠扩散作用。

⑤ 营养物质的影响

微藻生长所需的营养物质主要包括有机碳、氮盐、磷酸盐以及其他微量营养元素, 其对细胞的生长和产物的合成有着显著的影响作用。有机碳源是微藻异养培养过程中的重要物质, 有研究表明绿藻 *C. protothecoides* 既可以光合自养也可以进行异养生长, 当微藻以乙酸盐、葡萄糖或其他有机化合物为碳源进行异养生长时, 微藻的生物量和油脂含量均可以得到显著提高^[113]。由于藻种类别的不同, 微藻异养还可利用乙醇、甘油和果糖等其他碳源^[114], Liu 等研究了不同的碳源对微藻异养生长的影响, 发现葡萄糖是最适用的有机碳源^[115]。目前, 为了降低微藻生物柴油的生产成本, 学者们尽力寻找一种廉价有机碳源, 比如玉米淀粉水解物或糖蜜等, Xu 等研究发现玉米淀粉水解物含有对小球藻生长有益的特殊成分, 其培养效果优于葡萄糖, 细胞浓度高达 15.5 g L^{-1} , 油脂含量提高至 55.2%, 换言之, 采用玉米淀粉水解物代替葡萄糖作为异养生长的有机碳源可以大大降低微藻生产成本, 显著提高微藻生物柴油生产的经济性。氮是油脂生产过程中必不可少的大量营养素, 其作为生命元素, 是细胞内合成核酸、蛋白质和酶等重要化合物的组成部分。对于异养微藻, 复合氮源可同时提供氨基酸、维生素和生长因子等重要物质, 其培养效果优于单一氮源, 且含氮丰富的工业废水也可用于微藻培养。有研究表明氮饥饿对油脂储存和脂质成分的影响很大, 可以明显促进微藻油脂的积累, 油脂含量高达 70-85%, 同时可使 *Prophyridium cruentum* 的总脂质含量 (主要成分是中性油脂) 增加一倍^[116], 对于光自养微藻, 吸收利用的氮以无机氮为主, 即硝态氮 (NO_3^- 、 NO_2^-) 和铵态氮 (NH_4^+ 或 NH_3) 等。磷是细胞内合成核酸、磷脂等的重要元素, 其在微藻细胞中的含量约为 1% (w/w)^[117], 细胞对磷元素的吸收机制一般分为 3 种: 生长吸收, 饥饿吸收及贮存吸收, 当磷酸盐过量时, 通常以聚磷盐的形式储存在细胞内, 当磷源充足时, 微藻细胞可进行正常生长代谢, 当磷源匮乏时, 细胞则分解利用储存的聚磷盐来维持细胞的正常生长。相对于氮源, 细胞对磷源的需求量较少, 这是因为细胞内磷酸盐、ATP 等含磷化合物含量较低。

在微藻吸附式培养与悬浮式培养中, 细胞的生理状态和生存环境截然不同, 对营养物的吸收特性和利用情况存在差异^[118]。其中, 营养盐的有效利用对微藻生

物膜的形成至关重要^[88]，对于吸附式微藻培养，在生长初期，由于存在着细胞的重力沉降和自我适应阶段，营养盐的利用量相对较少，在指数生长期，生长速率快速增加，营养盐消耗加快，转化效率较高，而在生长后期，细胞脱落，生物膜失去完整性，几乎不再消耗营养盐^[61]，此外，营养物质可直接或间接地影响胞外聚合物的分泌，进而影响细胞的粘附性及生物质生产率^[68, 90]，且胞外聚合物能够富集较丰富的营养物质供给微藻生长^[63]，导致生物膜周边环境的营养物质浓度高于均相培养液。Zhuang 等发现附着在生物膜周围的总氮浓度和总磷浓度分别是培养液中的 2.1 倍和 15.5 倍^[119]。Ji 等发现当氮浓度从 0 mmol L^{-1} 增加到 8.8 mmol L^{-1} 时，微藻生长速率急剧增加 ($5\text{--}8 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$)，最后趋于稳定，这一变化规律同样适用于磷^[59]。Schnurr 等研究了 *Scenedesmus obliquus* 和 *Nitzschia palea* 两种微藻生物膜在营养物质匮乏条件下的油脂反馈机制，结果表明营养物质缺乏并不能促进微藻生物膜油脂的积累，这一结论与悬浮式培养恰恰相反^[54]。总而言之，适用于微藻悬浮培养的营养物质浓度并不能直接应用于吸附式微藻培养系统中。

1.4 同步光合自养-异养微藻生物膜的能质传输特性

与悬浮式培养相比，吸附式培养大大减少了生长所需的用水量，但是大多数的生物膜体系都是完全淹没在液体中，厚厚的液体边界层将微藻细胞和周围的气相环境远远隔开，使得生物膜内的气体吸收和营养渗透的阻力很大，不利于微藻生长。近年来，有学者研发了一种新型的生物膜光生物反应器--多孔介质生物膜反应器 (PSBR) ^[120]，其中，生物膜表面完全没有水，藻细胞与气相环境直接接触，这一原理最初是在 2003 年被提出^[120]，近年来该体系被广泛应用于吸附式微藻培养过程中^[121, 122]。

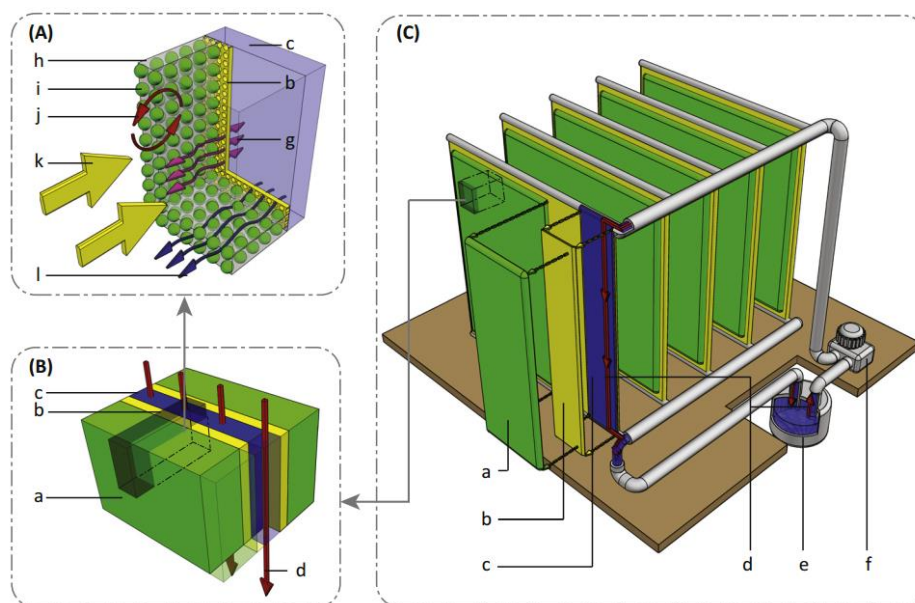


图 1.12 多孔介质生物膜(PSBR)反应器内的物质传输示意图 (A) PSBR 的原理 (B)垂直 PSBR 内各层的排列 (C)大型垂直多片的 PSBR: a 藻类生物膜; b 微孔膜; c 培养基; d 介质流动方向; e 培养基储存器; f 流动泵; g 扩散; h 细胞外基质; i 藻细胞; j 气体交换; k 辐照度; l 蒸发

Figure 1.12 Schematic Representation of a Porous Substrate Biofilm Photobioreactor (PSBR). (A) Principle of a PSBR (B) Arrangement of layers in a vertical PSBR. (C) Large-scale vertical PSBR with multiple sheets: a, algal biofilm; b, microporous membrane; c, culture medium; d, direction of medium flow; e, medium reservoir; f, medium pump; g, diffusion; h, extracellular matrix; i, algal cells; j, gas exchange; k, irradiance; and l, evaporation.

PSBR 的核心部件是一种薄而多孔的片状材料, 可以通过粘附作用来吸附微藻, 其功能特性是实现细胞与培养液的完全分离, 同时, 允许气体、溶解营养物和水等通过扩散和蒸发作用向生物膜内传递, 此外, 为了保证细胞生长所需水分和营养物的充分供应, 培养液循环流向吸附基质的表面, 通过重力作用垂直分布。总之, 与传统浸润式生物膜反应器相比, PSBR 的创新之处在于成功地将培养液迁移至生物膜的“背面”, 消除了薄层液膜对光照、气体和营养盐传输的阻碍作用, 进一步地降低了生物膜含水率。

① 光分布与利用

光照的有效分布对藻细胞的光合作用至关重要。对于 PSBR, 即使是在高达 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的高光稀释率的培养体系中, 其仍能拥有较高的光合效率^[85, 123], 微藻生物膜可以适应超过 $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的高光强环境, 这种条件在悬浮培养液中被认为是十分有害的^[108]。我们可以从生物物理学的 3 个角度来解释该现象产生的原因: 1) 藻细胞的吸收和散射都会引发光衰减现象, 其中, 散射, 尤其是正向

散射, 有利于强化微藻悬浮液的光穿透特性, 且这种效果随着生物膜浓度的增大而显著, PSBR 可被视为一个非常致密的悬浮生长体系, 光的正向辐射越强, 生物膜内的光穿透效果越好^[97, 124]。2) 与充分混合的悬浮液相比, 藻细胞在生物膜中的位置相对固定, 在垂直于生物膜表面的深度方向上会产生光强逐渐衰减的现象, 此时细胞会通过调节色素含量来适应光强的梯度变化, 一般情况下可通过改善生物膜表面的光衰减来增强生物膜的透光性。3) 在光的有效利用方面, PSBR 中的生物膜表面不存在液相, 节省了由于悬浮粒子的反射和吸收作用而投入的光能。

② CO₂ 和 O₂ 的传递

在 PSBR 中, 气相物质与生物膜直接进行气体交换, 光合作用产生的 O₂ 不会在生物膜内过度积累, 在一定程度上减少了光抑制或光氧化对光合作用的负面作用^[99, 120], 同时, 藻细胞可以直接从大气中吸收 CO₂^[125]。若生物膜内溶解 CO₂ 消耗较快, 则生物膜的 pH 会显著升高, 会进一步促进 CO₂ 的溶解和转移^[99], 这也很好地解释了 PSBR 的光合效率高于传统淹没式生物膜培养系统的原因。此外, 额外添加有机碳源可使微藻生物膜同时进行光合生长和异养培养, 其中, 光合自养产生的 O₂ 和异养代谢释放的 CO₂ 在微藻细胞组成的多孔介质结构内异向传递及再次生化转化。

③ 营养物质传输

与悬浮式微藻培养相比, PSBR 中营养物质的混合不需要进行机械搅拌, 溶解的大量营养素 (C、N、P 等) 直接通过扩散作用从生长基质表面传输到生物膜内供细胞生长^[120], 如果在新鲜培养液中提供充足的营养物质, 即使生物膜很厚, 营养元素的扩散路径很长, 也不会影响到营养物的可用性^[99, 124]。此外, 蒸发驱动的液体通量是促进营养物质向生物膜内运输的另一因素, 但在中等光照强度和温度下, 其对营养物质传输的影响相对较小^[124], 总之, 在 PSBR 中, 气体和可溶性营养物质的传输能力主要取决于其在生物膜表面到多孔支撑基质中的浓度梯度, 浓度梯度越大, 传质效果越好。Li^[124]等在生物膜内物质传输模型的基础上, 建立了描述多孔介质生物膜 (non-submerged) 反应器内沿着膜厚度方向上物质传输动态过程的一维模型, 该反应器中气相物质直接与生物膜进行气体交换, 流动和传质边界层均不存在, 生物膜表面的蒸发通量使得营养物质沿着生物膜厚度方向上进行传递, 该一维模型中光传输主要包括光吸收和散射, 物质传输主要包括蒸发驱动的营养物的扩散和对流, 生理过程主要包括光合作用、呼吸作用及色素对光照的适应机制, 化学过程主要包括无机碳和磷酸盐的酸碱平衡以及 CO₂ 和 O₂ 在生物膜表面的溶解和释放过程等, 即综合考虑了光传递、物质传输、生化反应平衡和细胞生理过程等多种因素的影响。

综上所述, 生物膜内的能质传输是耦合反应器设计、生物膜内营养物传输和

藻细胞生理过程的多尺度多相生化转化反应过程，营养物质与能量的传输特性与生化反应机制相互作用与影响，一方面，营养物质和光照等能够显著影响生化反应速率，另一方面，生化反应过程也会相应地影响营养物质和光能等的传输作用。

1.5 微藻生物膜生长的动力学研究

微藻生物柴油生产技术虽然已经获得了很多研究^[28]，但全面实施微藻培养在技术可行性和经济可行性方面仍存在一些挑战^[126]，尤其难以控制微藻生长的最佳条件和有效扩大培养体系。Ahmad^[126]等研究表明与第一代和第二代生物燃料相比，微藻生物柴油技术由于生产成本过高而受到严重限制，Murphy^[126]等指出生产微藻消耗的能量远远超过了微藻储存的能量，因此，为了更好的评估和优化微藻在不同培养环境下的生产潜力，需要借助数值模拟手段等提供微藻生产能力的有用信息。在模拟微藻生长的动态过程中，生长动力学模型是一个至关重要的因素。目前，学者们建立了许多动力学模型来了解微藻细胞的生长规律，这些模型可以分为两种类型：描述性模型和解释性模型^[127]。解释性模型主要用于解释因果关系或潜在的体系行为，该模型具有极其复杂的组成结构和数学公式，根据一些相关的规则可对其进行简化来降低复杂度，研究表明大多数的动力学模型都属于解释性模型。而描述性模型主要用于预测系统的性能，并非解释机理，大多数由经验发展起来的动力学模型都属于描述性模型，该模型是在对实验数据进行回归分析的基础上建立的，难以推广。迄今为止，动力学模型采用了影响微藻生长的单个或多个因素的函数，包括光强、营养物质的利用率、溶解 CO₂ 的浓度、温度或溶解氧浓度等，此外，还有一些考虑了因素之间相互作用的复杂动力学模型。

① 考虑单一因素的生长动力学模型

在光饱和条件下，微藻生长情况取决于营养液中碳、氮、磷等元素的可用性，很多学者将生长动力学模型表示为单一因素的影响函数，共有两种类型。第一种模型的假设是微藻生长速率主要受外界营养物质的浓度控制，由于培养液中营养物质的浓度容易测量，该模型得到了广泛的应用，其中，只考虑营养物质限制作用的 Monod 方程是典型的代表性模型^[128]。Xin^[129]等研究表明在不同的初始 N、P 浓度下，*Scenedesmus sp* 的生长情况与 Monod 模型互相吻合；Goldman^[130]等指出若溶解 CO₂ 浓度作为单一影响因素，Monod 方程能够很好地诠释 *Scenedesmus quadricauda* 和 *Selenastrum capricornulum* 的生长规律；Hsueh^[131]等运用 Monod 模型成功解释了 *Thermosynechococcus sp* 和 *Nannochloropsis oculata* 在不同无机碳浓度下的生长速率情况。通常 Monod 模型是用来描述中低等物质浓度下微藻的生长情况，若营养物质浓度很高，对微藻生长起着抑制作用，则该模型不再适用^[132]。为了克服这一缺点，近年来有学者提出了一种基于 Haldane^[133]抑制方程的改进

Monod 模型, 即 Andrews 模型^[134], 该方程表达式的分母中含有一项因子可用于描述高浓度营养物对微藻生长的抑制作用。Kurano 和 Miyachi^[135]指出 Andrews 模型能够很好地解释在 0-20% CO₂ 浓度下 *Chlorococcum littorale* 的生长速率变化, Wijanarko^[136]等发现 Andrews 模型比 Monod 模型更能精确地描述在 CO₂ 浓度为 0-30% 条件下普通小球藻的生长速率变化。

第二种模型的假设是微藻细胞的生长速率主要取决于细胞内的营养物质浓度, 通常由单个细胞内的营养成分来衡量, 该模型表达式为限制性因素在细胞内分量的函数, 既适用于稳态条件, 也适用于非稳态条件^[127]。稳态指营养物质从培养基到细胞内的转化速率等于细胞内该物质降解速率的状态, 由于该模型可以清楚地解释在外界营养物质缺乏的条件下微藻仍能利用细胞内积累的物质进行生长这个现象, 因此它可以真实地描述细胞生长速率的变化情况, 目前, 该模型已被用于描述自然环境中由于资源限制导致的藻类物种间的竞争现象^[137]。然而, 与第一种模型相比, 第二种模型的适用性有限, 这是因为细胞内的物质浓度无法测量且很难清楚地解释胞内物质变化的原因^[138], 为了解决这一难题, Droop^[139]模型、Caperon 模型、Meyer 模型应运而生^[140]。Grover^[141]指出与 Monod 模型相比, Droop 模型能够更好地说明 *Chlorella sp* 和 *Scenedesmus sp* 的生长速率与细胞内营养物浓度的关系, Sommer^[138] 等分别采用了 Monod 和 Droop 两种模型来说明在富营养化湖泊中藻类的生长速率变化, 结果表明在以氮源为限制性因素时, Droop 模型可以更好地描述微藻细胞的生长行为。

② 考虑多种因素的生长动力学模型

在自然环境中, 微藻生长受到多种营养物质和光照的影响作用, 即共限制作用^[142], 为了准确评估微藻的生长情况, 这一概念被应用到动力学模型中, 它的基本假设是多种营养物质、光照及它们之间的相互作用共同影响着微藻的生长情况^[143], 基于共限制作用的模型可分为阈值模型和乘法模型两种。阈值模型的假设是细胞的生长速率取决于所有生长因子中影响最大的因素, 该模型综合考虑了所有的外界影响因素, 模型的表达式如下^[127]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \min \left(f_1(x), f_2(x), \dots, f_i(x) \right) \quad (1.1)$$

$\mu_{\max, \min}$ 指细胞针对某一限制影响因素可获得最大生长速率, $f(x_i)$ 是包含多种影响因子的函数, 如 N、P、CO₂ 或光强等。通常采用阈值模型来描述两种营养物质对微藻生长的影响, 如 N 和 P 等^[144-145], 其中, Droop 模型被频繁地用作细胞在限制性影响因素条件下的生长速率表达式, 此外, Monod 模型也被用作 CO₂ 和 P 条件下的细胞速率表达式。

与阈值模型不同, 乘法模型的假设是所有生长因子同等程度地影响着细胞的

生长情况，简言之，所有的影响因素共同决定着细胞的生长速率，该模型的表达式如下所示^[127]：

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(\chi_1) \cdot f(\chi_2) \cdot f(\chi_3) \cdots f(\chi_i) \quad (1.2)$$

μ_{\max} 是细胞的最大比生长速率，该乘法模型能够很好地解释光强、温度、营养物质和 CO_2 等多种环境因素对微藻生长速率的影响作用，该模型很少使用 Droop 速率表达式，最常用的公式是 Monod 动力学模型。Spijkerman^[138]等分别采用了基于阈值和乘法理论的 4 种动力学模型来阐述 P 和 CO_2 对微藻细胞生长的影响机制，结论表明乘法模型与实验结果更吻合。

Aiba 等早在 1982 年就对光合微生物的生长动力学研究进行了全面的综述^[146]，目前，关于微藻生长动力学模型的研究越来越成熟。Li^[124]等通过研究多孔介质生物膜反应器内的动力学行为对膜内物质传输和浓度分布的影响提出了一维动力学模型，该模型的数值结果可以准确地评估生物膜内光照分布、溶解无机碳与溶解氧的浓度梯度以及沿着生物膜厚度方向上的 pH 分布，而且还可预测出生物总量，该模型适用于微藻生物质能源的规模化生产。Gundula^[125]等针对微藻生物膜提出了 PHOBIA 动力学模型，该模型考虑了生物膜内的光合自养、光异养、呼吸代谢等多种生理行为，着重研究了生物膜内的微观物质浓度分布，例如胞外聚合物，营养元素的浓度梯度、酸碱平衡以及无机碳的各种形式等，该模型为以后的实验研究打下了牢固的基础。Melkonian^[99]等借助微传感器技术成功测量了多孔基质生物膜内的 DO 和 pH 等分布情况，并进行了光合潜能的相关研究，结果表明生物膜内的有效光穿透厚度高于 Lambert-Beer 定律的预测值，其中，生物膜表面的光合作用最强，气体交换速率较快，但暗呼吸作用使得微藻生物量不断减少，该研究有利于我们进一步地掌握生物膜内细胞代谢的相关理论知识。综上所述，微藻生长动力学模型的研究是实现高密度培养、降低生产成本的理论基础，虽然动力学模型已经从单一限制因素发展为多个限制因素，但是，限制作用的具体机制尚不清晰，在选择多因素生长模型时缺乏理论指导，因此，微藻生长动力学的相关研究还需进一步优化。

1.6 本课题的主要工作

1.6.1 已有研究工作的不足

吸附式微藻培养技术以其高产量、低能耗和操作简单等诸多优势得到了广泛的应用，可渗透多孔介质生物膜内存在着复杂的气液流动行为、物质传递特性和生化转化机制，对其进行深入的研究有利于实施对微藻生长过程的实时调控，而且，细胞的生长和产物的合成又会影晌生物膜内的气液两相分布和物质传输过程，此外，建立微藻生物膜生长动力学模型进行数值模拟分析成为近代工程界的普遍

趋势。因此,深入研究并调控强化生物膜内的生化物理过程对微藻生物质能源的发展和推广具有重要的指导意义。然而,目前关于微藻生物膜的相关研究仍处于起步阶段,已有工作仍存在以下不足:

① 关于微藻生物膜的相关研究大多集中在细胞生长特性和宏观参数测量等方面,缺乏对可渗透多孔介质生物膜内的气液两相行为和物质传递特性的研究,同时,细胞代谢生成的产物是否会影响微藻生物膜的发展也尚未报道。

② 微藻生长动力学行为的相关研究大多只考虑了单一影响因素,缺乏两因素或多因素相结合的动力学研究,并且没有考虑各个因素之间相互作用与耦合关系,因此,考虑多因素共同影响及各因素之间的相互作用是建立微藻生长动力学模型和可靠前提,可为微藻生长的强化与调控打下坚实的基础。

③ 目前,微藻兼养生长在悬浮式培养系统中得到了广泛的应用,但是在微藻生物膜培养系统中研究较少。微藻细胞在悬浮液与生物膜内是处于两种完全不同的生理状态,相应地,营养物质吸收特性和生化反应过程也不尽相同,虽然悬浮式微藻兼养的生长强化相关研究比较成熟,但是兼养生物膜生长的营养物质优化研究还尚未报道,因此,研究生物膜内营养物质的吸收特性和转化机理对微藻生物膜的规模化培养具有重要的理论指导作用。

1.6.2 本课题的研究内容及意义

鉴于以上研究工作的不足,本文在建立光合/自养微藻生物膜多因子生长动力学模型的基础上,对生物膜生长所需的营养物质和环境条件进行了优化和调控,强化了微藻生物膜的生长,主要展开了以下几方面的研究:

① 在明确了同步光合自养-异养微藻生物膜生长的 4 个主要影响因素(光强、 CO_2 , 有机碳源和氮源)的基础上,针对每个影响因素设置相应的梯度浓度动力学实验,研究微藻生物膜在不同生长条件的生长特性,通过对生物膜的比生长速率进行线性拟合获得动力学参数,最终建立综合考虑光强、 CO_2 、葡萄糖和硝酸盐耦合影响的生物膜生长动力学模型,该模型与实验结果高度吻合,能够真实地评估生物膜系统的生产潜能,为微藻生物膜系统的能源化利用提供了理论指导作用。

② 在建立综合微藻生物膜生长动力学模型的基础上,通过改变营养物质的成分与含量对生物膜的生长条件进行优化。由于在同步光合自养-异养微藻生物膜中光合生长和异养生长同时存在并独立进行,首先研究不同的有机碳源和无机碳与有机碳的比例(TIC:TOC)对微藻生物膜的影响,确定适合生物膜生长的最佳碳源和 TIC:TOC 比值,然后对培养基中的氮源种类及总碳与总氮之比进行优化调控,最后根据生物膜在不同条件下的生长特性选择最适宜的营养物质组合。

③ 为了进一步研究生物膜内的气液分布及物质传输特性,采用丹 Unisense 微米级别的微电极测试系统对生物膜内的物质分布进行测量,即微电极技术使得空

间上微米级的分析成为可能,通过微电极技术表征特征参数(DO 和 pH)在垂直生物膜表面的厚度方向上的梯度分布,获得生物膜内细胞生理行为和物质传输的重要信息,有利于实现对微藻生物膜生长环境的优化调控。

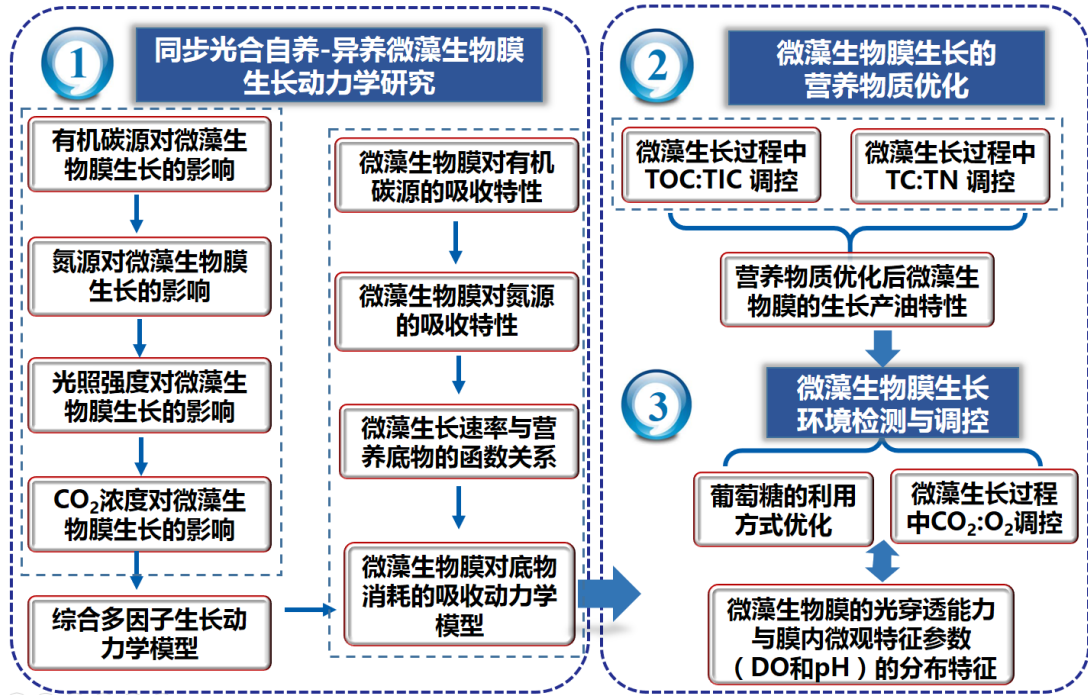


图 1.13 本课题的技术路线图

Figure .1.13 Technical route of this subject

本文主要研究微藻能源利用技术中的关键工程热物理问题,通过高效的生物膜式微藻培养可有效缓解生物质高成本生产问题,同时,研究同步光合-异养微藻生物膜的生长产油特性将大大促进微藻生物质制取清洁油气燃料的发展和应用,具有重要的经济效益和社会价值。

1.6.3 本课题的主要创新点

① 构建了同时考虑光强、 CO_2 浓度、葡萄糖和硝酸盐影响的综合多因子微藻生物膜生长动力学模型,该模型能够真实地反映同步光合自养-异养微藻生物膜培养系统的生产潜能。

② 通过对液体环境中的营养物质进行优化调控,达到了生物膜生物量和油脂含量同时提高的目的。

③ 本文利用丹麦 Unisense 微米级测试系统实现了在没有破坏生物膜结构的基础上对生物膜的特征参数进行了微观研究,相当于在宏观实验现象和微观内在机理之间搭建了一座桥梁,进一步地明确了生物膜内的气液两相行为和物质传输特性,并对微藻生物膜生长环境进行了优化调控。

2 同步光合自养-异养微藻生物膜的多因子生长动力学模型

2.1 引言

与悬浮式微藻培养相比, 吸附式微藻培养的运用不仅可以得到较高浓度的生物质密度, 而且通过简单的机械刮取就可收获生物质, 使得收获与脱水能耗降低了 99.7%^[64]。然而, 微藻生物膜培养技术的发展历程较短, 直到 2010 年第一个微藻生物膜培养系统才正式运行^[94], 关于微藻吸附过程的内在机理、生物膜生长的重要影响因素、用于生物质培养的潜能与评估以及能否实现未来的推广和应用等相关信息还尚未报道, 因此有必要对微藻生物膜系统进行深一步的研究。目前, 微藻生物膜培养大多采用光合自养生长方式^[56], 即藻细胞利用 CO_2 、 H_2O 和简单无机盐在光照条件下合成生物质, 但是, 由于细胞在生物膜内的位置相对固定, 细胞之间存在相互遮挡作用, 严重阻碍了光的有效穿透, 而且研究表明细胞的油脂含量通常低于 13.42%^[147]。因此, 为了实现同时增加生物质密度和油脂含量的双重目的, 本课题提出了一种新型的同步光合自养-异养微藻生物膜培养方式^[148], 该培养模式类似于光合生长和异养生长的有机结合体, 其中, 微藻生物膜是一个含多孔介质的多元多组分多相传递的复杂生化反应体系, CO_2 和 O_2 的混合气体与营养液分别置于多孔介质两侧, 气相物质直接与藻细胞接触并扩散进入生物膜内多孔网络结构, 参与藻细胞的光合自养和异养生长作用, 异养所需要的有机碳源预先溶解于培养液中, 在聚氨酯多孔高分子材料(弹性海绵)表面形成稳定的液膜, 然后在蒸发驱动传质和毛细力的共同作用下, 液相营养物质扩散传递至聚氨酯多孔材料内部, 使其达到一定的液相饱和度, 通过混合纤维水系微孔滤膜的扩散作用实现异养辅助光合自养微藻生物膜的协同生长, 且光合自养产生的 O_2 和异养代谢释放的 CO_2 又在微藻细胞组成的多孔介质结构内异向传递及再次生化转化, 有研究表明, 采用该生长模式对斜生栅藻进行批次培养可获得高达 57.19% 的油脂含量^[148]。然而, 同步光合自养-异养生长过程的内在机理和影响机制还相对匮乏, 没有直接的理论知识给予支撑, 此外, 寻找一种适宜生物膜生长的最佳生长条件进行扩大化培养仍然是一个重大的挑战^[149], 因此, 为了更好的评估和优化生物膜培养系统的生产能力, 需要对生长过程构建模型来获得生物膜系统的相关信息, 其中, 生长动力学模型是一个关键部分。

迄今为止, 学者们已经建立了考虑单个或多个限制因素影响的多种微藻生长动力学模型, 一些模型还综合考虑了各个因素之间的相互影响作用, 构建了以复杂数学公式为基础的综合动力学模型^[127, 150], 由于对微藻细胞生理活动的相关知识比较匮乏, 大多数微藻生长动力学的模型都采用了与实际生长过程不太相符的

前提假设^[151-153]，然而，随着对微藻生长模型研究的不断深入，学者们发现了考虑多种影响因素及各个因素之间相互影响作用的综合模型-阈值模型或乘法模型，其能够真实地反映微藻细胞的生长情况^[154, 155]。其中，乘法模型认为所有的营养物质共同决定着微藻细胞的生长情况，而阈值模型假设微藻整体的生长速率仅仅取决于所有营养物质中最具限制性的营养元素^[145]，例如，有研究表明 N 和 P 两种元素对微藻生长的影响遵循阈值模型^[145, 156]，而 N、CO₂ 和光强等对微藻生长速率的影响符合乘法模型^[157, 158]，但是，已有的生长动力学模型仅仅针对某一特定领域的微藻培养系统，不具有广泛的适用性，且模型中并没有同时考虑到所有重要的影响因素（如 N、P、CO₂、光强等）^[159]，因此，建立一种结构更完善，运用更广泛的新型微藻生长动力学模型尤为重要。

微藻细胞生长特性取决于营养物质的转化利用机制，除了研究微藻生长的动力学模型，还有必要构建微藻对营养物质的吸收动力学模型，这是因为培养基中的碳源和氮源是影响微藻生长的根本因素，基本决定了细胞生长的动力学特性^[129]，其中，吸收利用是微藻去除营养物的主要内在机理，建立微藻对营养物质的去除反应动力学模型具有重要的理论指导意义。因此，为了弥补上述研究的缺陷，本章建立了一个综合考虑光强、CO₂、葡萄糖和硝酸盐等影响因素及各因素之间相互作用的多因子生长动力学模型，该模型有效地结合了阈值理论和乘法理论，能够真实可靠地对微藻生物膜培养系统的生产能力进行评估，此外，本章还研究了微藻去除营养物质的反应动力学机制，确定了细胞利用葡萄糖和硝酸盐等营养物质的反应速率常数，从理论上讲，这些模型的建立代表着微藻生物质能源在工程上的应用向前迈出了一大步。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 藻种和培养基

本章采用的藻种为直径为 3-8 μm ，具有单细胞球状结构的普通小球藻 *Chlorella vulgaris* FACHB-31，购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库。用于藻种生长的培养基为标准 BG-11 培养基，标准 BG-11 培养基的配方如表 2.1 所示。

配置标准 BG-11 培养基所采用的药品均购自国药集团化学试剂有限公司，将配置好的培养基置于高温高压灭菌锅中(Boxun YXQ-LS-755 II, China)于 121 °C、0.1 MPa 条件下灭菌 20 min，冷却至室温后，利用 0.1 M 的 HCl 或 NaOH 试剂将 pH 值调至 7.0 左右，然后进行微藻生物膜的接种步骤与生长实验，温度控制在 25 °C，光照强度为 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

表 2.1 BG11 培养基的方案

Table 2.1 Formulations of BG11 medium	
成分	含量
NaNO ₃	1.5 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0.04 g L ⁻¹
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.075 g L ⁻¹
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.036 g L ⁻¹
Citric acid	0.006 g L ⁻¹
Ferric ammonium citrate	0.006 g L ⁻¹
EDTA Na ₂	0.001 g L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	0.02 g L ⁻¹
A ₅ solution	1.0 mL L ⁻¹

A₅ solution 溶液的配置方法为：分别取 H₃BO₃ 286 mg、MnCl₂•4H₂O 181 mg、ZnSO₄•7H₂O 22.2 mg、Na₂MoO₄•2H₂O 39 mg、CuSO₄•5H₂O 7.9 mg、Co(NO₃)₂•6H₂O 4.9 mg，加入蒸馏水定容至 100 mL。

2.2.2 实验系统与方案设计

微藻生物膜生长系统如图 2.1 所示，整个实验装置由培养单元（培养腔室尺寸 3000 mm×1500 mm×460 mm）、配气单元和光照单元构成。其中，聚氨酯多孔高分子聚合物（弹性海绵）作为微藻细胞吸附生长的基质材料，能够实现培养液与细胞的完全分离，同时，允许溶解营养物质、水和 CO₂ 等通过扩散或蒸发驱动作用等传递到生物膜内部，另外，弹性海绵底部设有塑料网格板来提供支撑作用，藻液经过真空抽滤形成微藻生物膜之后，置于平整的海绵表面进行生长。实验系统中，CO₂ 和 O₂ 的混合气体通过气体流量控制器(PNEU, FLC-2-D, 中国)以 100 mL min⁻¹ 的流量通入培养腔室内，利用平行排布的荧光灯作为光源，可通过调整荧光灯数量或荧光灯与反应器之间的距离来控制光照强弱，连续光照强度为 100 μmol m⁻²s⁻¹，整个实验系统置于恒温人工气候室，温度控制在 25℃。

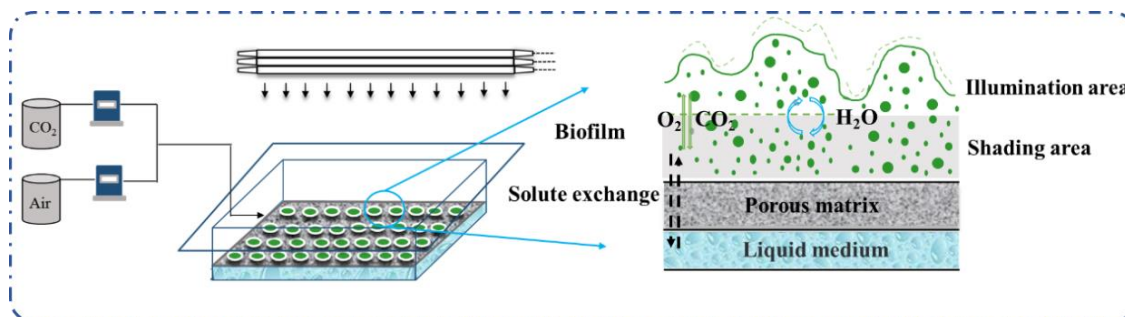


图 2.1 同步光合自养-异养微藻生物膜生长系统图

Fig.2.1 Schematic of the cultivation system of the heterotrophic-assisted photoautotrophic microalgal biofilm

微藻生物膜光生物反应器的有效培养体积为 620 mL，实验周期为 3-5 天，微藻生物膜的接种浓度为 5 g m^{-2} ，微藻生长的动力学实验的标准培养条件为： 10 g L^{-1} 葡萄糖、 1.5 g L^{-1} 硝酸钠、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 光照强度以及 5% CO_2 和 19% O_2 (v/v) 的混合气体。此外，为了研究光照强度、 CO_2 浓度、葡萄糖和硝酸钠等对微藻生物膜生长的影响，对相关的营养物质设置了 5-7 个梯度浓度的生长实验，其余培养条件与标准工况相同，其中，葡萄糖浓度范围在 $1\text{-}20 \text{ g L}^{-1}$ 之间，硝酸钠浓度范围在 $0.08\text{-}1.8 \text{ g L}^{-1}$ 之间， CO_2 浓度在 0.03-12% (v/v) 之间以及光照强度的变化范围在 $40\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 之间，每组实验均重复 2 次。

2.2.3 生长动力学模型的建立

同步光合自养-异养微藻生物膜生长是一个富含多种生化反应的复杂过程，容易受到营养物质和外界环境的影响，其中，营养物质主要包括大量营养素（C、N、P、S、K 等）和微量营养素（Fe、Mn、Co、Zn、B、Cu、Ni 等），外界环境涉及光照强弱、气相浓度、温度控制等^[160]。有研究表明，光强和 CO_2 对细胞光合生长具有显著的影响作用^[161-163]，此外，C、N、P 作为微藻细胞的三大元素，对微藻细胞生长的特性起着决定性作用^[33, 164-166]，因此，在微藻生物膜生长动力学模型中，主要选取了光强、 CO_2 浓度、葡萄糖、硝酸盐和磷酸盐作为主要影响因素，并综合考虑了各个因素之间的相互影响作用。

为了充分解释各个因素以及各个因素之间相互作用对微藻生物膜生长的影响，本章提出了一个乘法理论和阈值理论相结合的综合多因子生长动力学模型，Groot^[167]等发现在微藻生长过程中，N 和 P 对细胞生长速率的影响服从阈值理论，因此，该综合生长动力学模型的假设是 N 和 P 对微藻生物膜生长的影响遵循阈值理论，而其他因素则服从乘法理论，生长动力学模型建立如下所示：

$$\mu = \mu_{\max} \cdot ((f(\text{N}), f(\text{P})) \cdot f(\text{CO}_2) \cdot f(I) \cdot f(\text{Glucose})) \quad (2.1)$$

其中， μ 是微藻细胞的比生长速率， μ_{\max} 是微藻细胞比生长速率的最大值，

$f(N)$ 是氮源浓度的影响函数, $f(P)$ 是磷酸盐浓度的影响函数, $f(CO_2)$ 是 CO_2 浓度的影响函数, $f(I)$ 是光照强度的影响函数, $f(Glucose)$ 是葡萄糖浓度的影响函数。由于 N 和 P 元素对微藻生长的影响服从阈值模型, 此外, 与 P 元素相比, N 元素对微藻生长的限制性作用更强, 因此多因子综合生长动力学模型可简化为以下公式 (2.2):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot (f(N) \cdot f(CO_2) \cdot f(I) \cdot f(Glucose)) \quad (2.2)$$

关于光照强度、 CO_2 浓度、葡萄糖及氮源对微藻生长的影响函数采用了只考虑单一影响因素的动力学模型, 该模型的前提假设有: 1) 由于微藻细胞的生长处于相对平衡状态, 因此表征细胞生长能力的唯一变量是生物质密度; 2) 培养过程中只有一种营养底物是限制性因素, 其他营养元素成分充足, 不会影响微藻的生长; 3) 细胞生长被认为是一种简单的单一反应, 细胞产量是一个常数。基于以上假设, 通常采用 Monod 模型作为细胞生长速率的数学表达式, 即微藻细胞生长速率的变化取决于培养基中营养物质的浓度, Monod 模型公式简单, 很多学者用来描述微藻生长速率与单一营养物浓度之间的关系^[129, 131, 168, 169]。Hsueh^[131]等采用 Monod 模型解释了不同无机碳浓度下 *Thermosynechococcus sp.* 和 *Nannochloropsis oculata* 的生长速率变化; Xin^[129]等发现在不同的初始氮源和磷酸盐浓度下, *Scenedesmus sp.* 的生长情况吻合 Monod 模型; P. Popova^[169]等研究发现 Monod 模型能够真实反映出 CO_2 浓度与细胞生物量之间的关系。然而, Monod 模型仅适用于说明在中低等营养物质浓度下细胞的生长情况, 并不能应用于高物质浓度, 因此, 有学者提出了一种基于 Haldane^[170]抑制模型的修饰 Monod 方程, 在微藻细胞生长的应用背景下, 该模型又称为 Andrews 模型^[134], 可以用来描述高浓度的营养物质对细胞生长的抑制作用。Wijanarko^[136]等认为与 Monod 模型相比, Andrews 模型更适用于描述 0-30% 浓度的 CO_2 对普通小球藻生长的影响, Kurano^[135]等也发现了类似现象, 因此, 本文在中低等和较高的底物浓度下分别采用了 Monod 和 Andrews 模型。

吸收利用是细胞去除营养物质的主要机制, Michaelis-Menten 方程能够直观地表达出微藻生长与物质消耗之间的关系, 而且在已有的研究中被广泛地应用。本文采用批次培养实验研究了不同初始葡萄糖和硝酸钠浓度对微藻生物膜生长的影响及细胞对营养物的去除效果, 通过 Michaelis-Menten 模型进行数据拟合, 获得反应速率常数和半饱和常数等动力学参数, 直观地表示了细胞对营养物质的吸收特性, 模型的方程表达式如下所示:

$$R = R_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (2.3)$$

其中, R_{\max} 是底物的最大去除率, K_m 是半饱和常数, S 是底物的浓度, 相应地, 初始底物去除率的计算公式如下:

$$R_i = -\frac{S_0 - S_t}{t_0 - t_i} \quad (2.4)$$

其中, R_i 表示营养物质的去除率, S_0 表示初始底物浓度, S_t 表示当底物浓度没有明显变化时 ($t = t_i$ 时) 的相应浓度, 底物去除的比速率 R_i 是通过初始去除率与微藻密度的比值得到。

2.2.4 分析方法

① 微藻生物质密度

微藻培养过程中生物质密度采用称重法^[59]进行测量, 利用镊子取下两片微藻生物膜膜片, 加入 10 mL 的一级去离子水进行冲洗形成均匀的微藻悬浮液, 将其装入离心管中并放入高速冷冻离心机中 (GL-21M, Xiangyi Centrifuge Instrument Co.Ltd. China) 以 8000 r min^{-1} 转速离心 10 min, 去掉上清液, 向离心管内的藻泥中加入 8 mL 一级去离子水, 摇晃均匀后再次离心 10 min, 去掉上清液, 该过程重复 2 次, 用以清洗藻泥中残留的营养盐和微藻胞外产物, 然后将离心管放进 105°C 的烘箱内, 烘干 24 h, 最后取出已烘至恒重的离心管, 放入干燥器中冷却至室温, 之后将烘干的藻泥从离心管取出后置于电子分析天平 (Sartorius BP114, Germany) 上称其重量, 根据滤膜的表面面积, 即可计算出微藻生物膜的面积密度。此外, 本文采用能够表示在限制性条件下微藻生长与密度关系的经典模型 Logistic 模型来描述微藻生物膜生长的情况, 公式如下:

$$N = \frac{K}{1 + e^{a-rt}} \quad (2.5)$$

其中, N 是培养时间为 t 时的微藻密度, K 是整个培养过程中微藻细胞的最大生物质密度, a 是一个常数, 表示 Logistic 模型与原点的相对位置, r 是内在增长率, 然后通过线性回归可得如下方程:

$$\ln\left(\frac{K}{N} - 1\right) = a - rt \quad (2.6)$$

因此, 微藻生物膜生长速率和比生长速率如公式 (2.7), (2.8) 所示:

$$\frac{dN}{dt} = rN\left(\frac{K-N}{K}\right) \quad (2.7)$$

$$\mu = \frac{dN / dt}{N} \quad (2.8)$$

② 硝酸根浓度

本文采用紫外分光光度计法^[171]进行硝酸根浓度的测量, 即利用 NO_3^- 在 220 nm 波长处的吸收特性测定其浓度, 由于溶解有机物在 220 nm 处也会有吸收, 因此采用 275 nm 波长进行第二次测量来校正测量浓度值, 这是因为 NO_3^- 在 275 nm 波长处不会被吸收, 因此, NO_3^- 浓度的计算公式如下所示 (2.9), 其中, $A_{220\text{nm}}$ 和 $A_{275\text{nm}}$ 分别为培养液在 220 nm 和 270 nm 处的吸光度。

$$A_{校} = A_{220nm} - 2A_{275nm} \quad (2.9)$$

$A_{校}$ 与 NO_3^- 浓度之间的关系式可通过制定的标准曲线换算得到, 其中, 标准曲线的绘制方法是: 称取 0.1500 g NaNO_3 至 1 L 容量瓶中, 用一级去离子水定容至 1 L, 配制成 0.15 g L^{-1} 的 NaNO_3 标准溶液, 分别量取 0、1、2、4、6、8、10 mL 的 NaNO_3 标准溶液至 7 个 25 mL 的容量瓶中, 并用一级去离子水定容, 配成的相应 NaNO_3 溶液浓度分别为 0、6、12、24、36、48 和 60 mg L^{-1} , 然后测定不同 NO_3^- 溶液在 A_{220nm} 和 A_{275nm} 波长处的吸光度, 根据公式 2.9 可得到 $A_{校}$ 值, 最后将 $A_{校}$ 与 NO_3^- 浓度值一一对应, 便可获得 NO_3^- 浓度与 $A_{校}$ 之间的数学关系式, 如下图所示:

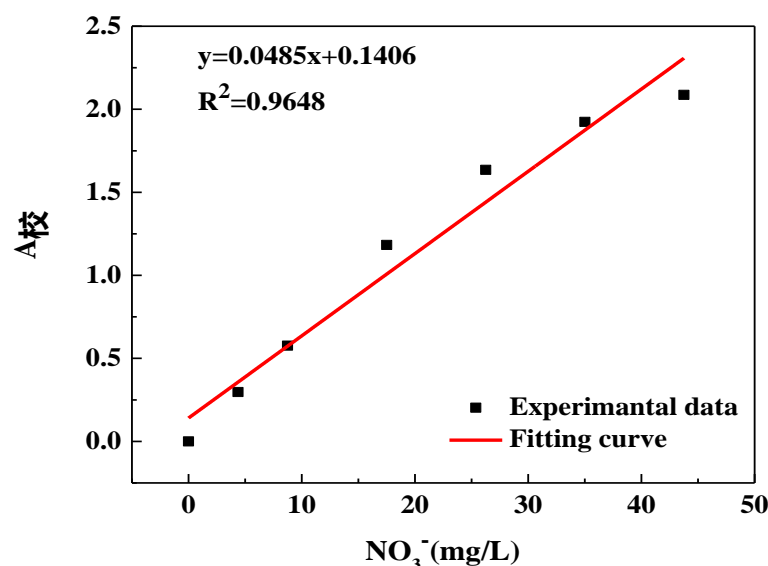
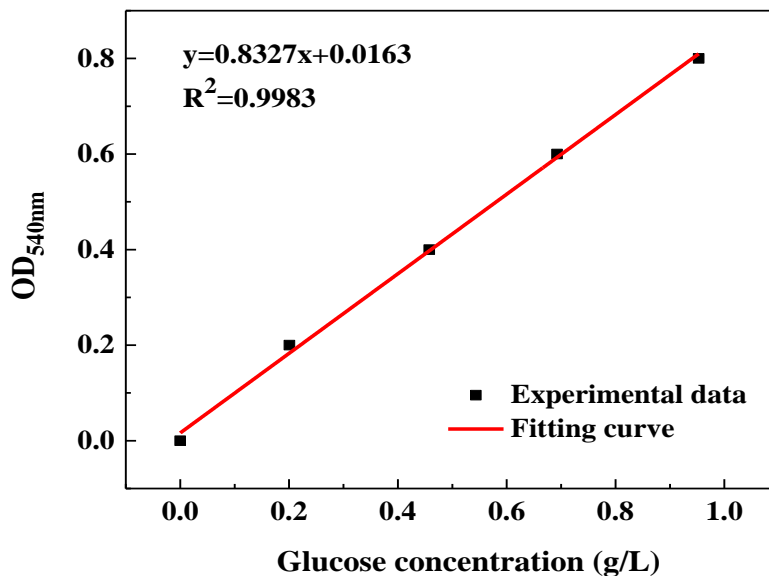


图 2.2 NO_3^- 浓度与 $A_{校}$ 之间的关系式

Fig. 2.2 The correlation of NO_3^- concentration versus $A_{校}$

③ 葡萄糖浓度

葡萄糖浓度采用 3,5-二硝基水杨酸法 (3,5-dinitrosalicylic acid method, DNS 法) 测定^[172]。取出适量培养液, 通过 $0.45 \mu\text{m}$ 的针孔过滤器去除颗粒物杂质等, 取 1 mL 培养液于玻璃试管中, 加入 2 mL 的 DNS 试剂, 在 100°C 温度下煮沸 5 min, 冷却至室温后, 加入 10 mL 一级去离子水进行稀释, 之后利用紫外分光光度计测定样品在 540 nm 处的吸光度, 最后根据标准曲线 (葡萄糖浓度与吸光度的线性关系式) 即可计算出葡萄糖的浓度, 其中, 标准曲线的关系式如下图:

图 2.3 葡萄糖浓度与 OD_{540nm} 之间的关系式Fig. 2.3 The correlation of glucose concentration versus OD_{540nm}

在利用 Michaelis-Menten 动力学关系式建立微藻对底物消耗的动力学模型时, 需要考虑在分批实验中初始底物浓度和初始底物去除率的影响, 如以下公式所示:

$$R_{s0} = \frac{R_{m0}S_0}{K_m + S_0} \quad (2.10)$$

其中, $R_{m0}=k * X_0$ 是底物去除的最大初始速率, 因此, 公式 2.10 可以改成:

$$R_{s0} = \frac{kX_0S_0}{K_m + S_0} \quad (2.11)$$

k 是反应速率常数, X_0 是微藻初始接种的浓度, 底物去除的比速率如公式 2.12 所示:

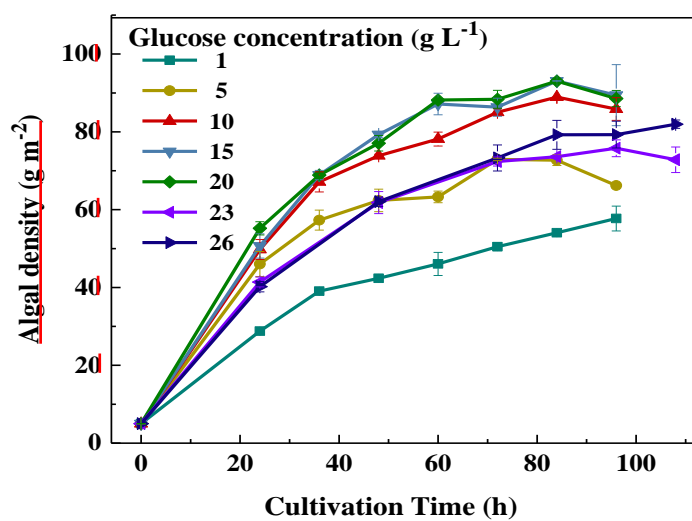
$$R_{xi} = \frac{R_{s0}}{X_0} = \frac{kS_0}{K_m + S_0} \quad (2.12)$$

动力学关系式建立后, 利用动力学模型预估的细胞生长率会与实验计算值进行吻合度比较, 用来评估这些模型的真实性及适用性, 对于微藻细胞的生长而言, 通常认为拟合度 $R^2 > 0.8$ 即可体现出模型值与实验值的高度一致性^[173]。

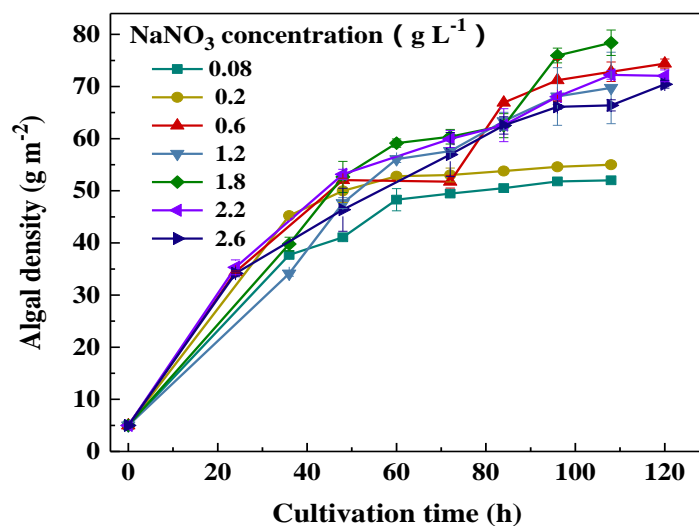
2.3 实验结果与分析

2.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜的生长动力学特性研究

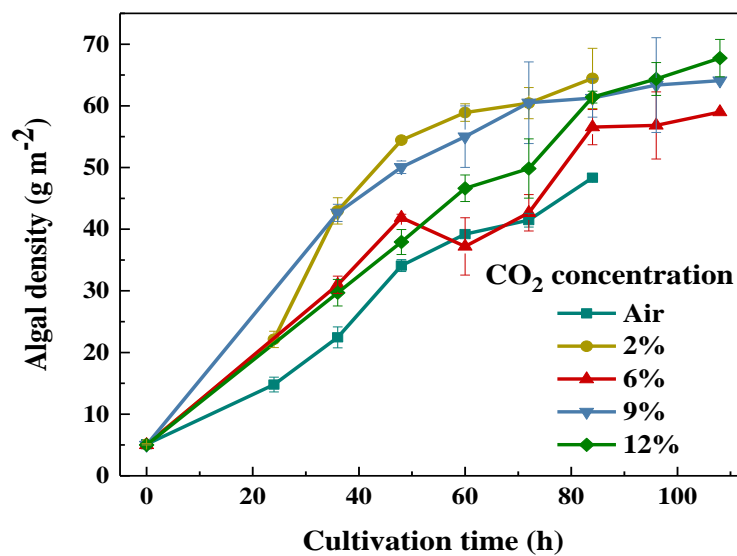
本章分别研究了不同光照强度、CO₂ 浓度、葡萄糖和硝酸钠浓度对微藻生物膜生长的影响, 微藻生长曲线如图 2.4 所示, 微藻生物质密度随底物浓度的增加而增大, 当浓度达到某一值时微藻生长会受到抑制作用。



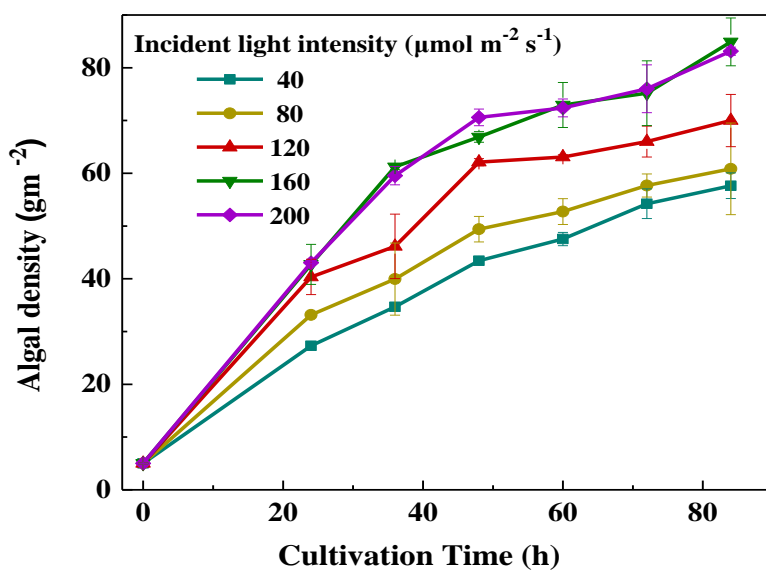
(a)



(b)



(c)



(d)

图 2.4 微藻生物膜在不同培养条件下的生长曲线: (a) 不同葡萄糖浓度对微藻生长的影响; (b) 不同硝酸钠浓度对微藻生长的影响; (c) 不同 CO_2 浓度对微藻生长的影响; (d) 不同光强对微藻生长的影响

Fig. 2.4 Growth characteristics of microalgae biofilm under different growth conditions: (a) varying initial glucose concentration; (b) varying initial sodium nitrate concentration; (c) varying CO_2 concentrations; (d) varying incident light intensity.

不同葡萄糖浓度对微藻生长的影响如图 2.4a 所示, 当初始葡萄糖浓度从 1 g L^{-1} 增加到 20 g L^{-1} 时, 同步光合自养-异养微藻生物膜密度由 57.725 g m^{-2} 增加至 93.040 g m^{-2} , 已有研究表明这种生长特征在微藻生长过程中是比较常见的, Shi^[174]等也发现 *Chlorella protothecoides* 的生物物质密度随着葡萄糖浓度的增加而增加。通常这种现象可以从两个方面进行解释, 一方面, 普通小球藻细胞内含有由葡萄糖或其类似物 (3-O-甲基葡萄糖或 6-脱氧葡萄糖) 诱导的己糖运输系统^[175], 能够吸收利用糖类物质为细胞生长所用, 另一方面, 随着葡萄糖投入量的增加, 浓度梯度越大, 传质能力越强, 生长效果越好^[176]。然而, 当初始葡萄糖浓度大于 20 g L^{-1} 时, 微藻生物膜的生长开始受到抑制作用 (尤其是葡萄糖浓度为 23 和 26 g L^{-1}), 导致最大生物物质密度显著下降, 发生这种现象的可能原因是当细胞利用葡萄糖作为有机碳源进行生长时, 其饱和点应低于 20 g L^{-1} , 若初始葡萄糖浓度高于该值, 则微藻细胞的生长会受到明显的抑制作用, 最终生物物质密度明显降低。

图 2.4b 表示不同硝酸钠浓度对微藻生物膜生长的影响, 与葡萄糖类似, 微藻生物物质密度随着初始硝酸钠浓度的增加而增加, 直至达到相应的饱和点, 当硝酸钠浓度高于饱和点时, 微藻细胞的生长开始受到抑制作用, 具体地讲, 当硝酸钠

浓度从 0.08 g L^{-1} 增加到 1.8 g L^{-1} 时,微藻生物质密度由 52 g m^{-2} 增加到 78.394 g m^{-2} ,然而,当提高硝酸钠的浓度至 2.2 和 2.6 g L^{-1} 时,生物质密度分别只有 72.240 和 70.438 g m^{-2} ,换言之,并不是硝酸钠的浓度越高,藻类生物质密度就越大,原因可能是当硝酸钠浓度不足或相对缺乏时,细胞内的三羧酸循环和叶绿素合成等活动无法进行,光合系统遭到损伤,光合效率降低,导致微藻细胞生长停滞^[177],而当硝酸钠浓度较高时,微藻细胞内氮源的同化率远远低于底物的供应率,细胞产生的铵类物质过度积累不能快速转化为氨基酸,产生铵中毒现象^[178],显著降低了微藻生物质密度,综上所述,微藻生长所需的碳氮源浓度始终存在相应的最优值。

与微藻悬浮液相比,生物膜培养体系中细胞与周围气相之间的水层被大大减少,只有一层薄薄的液膜,气相 CO_2 与藻细胞直接接触,通过自由扩散就可被细胞利用。不同 CO_2 浓度对微藻生物膜生长的影响如图 2.4c 所示,当 CO_2 浓度从大气浓度增加到 2% 时,微藻生物膜最高生物质密度由 48.355 g m^{-2} 增至 64.446 g m^{-2} ,但是,当 CO_2 浓度从 2% 增加至 12% 时,生物质密度没有明显的变化,微藻密度随着 CO_2 浓度的增加而增加,直至达到饱和点。**Schnurr**^[109] 等通过实验研究也发现了类似的现象。考虑到 CO_2 作为微藻生长的重要营养物质,向生物膜内部大规模传输比较困难,且所有微生物都会受到固有的生长限制,因此,随着 CO_2 浓度的增加,微藻密度先逐渐增加然后趋于稳定是正常的生理行为,此外,细胞在生物膜内的位置相对固定,高度集中,实现高效率转化成为一个潜在的挑战,通常认为增加 CO_2 的浓度会相应地增加其进入生物膜内的通量,从而会显著提高碳的利用率和生物质密度^[179]。本文实验表明,当 CO_2 浓度低于 2% 时,对微藻生长具有明显的限制性作用,原因可能是由于边界层和生物膜内部的传质阻力较大,营养物质利用受限,导致生物膜光合作用区碳源不足。但是,该结论与 **Schnurr**^[180] 等的研究结果不尽相同,**Schnurr** 认为可能有两个原因可以解释该实验结果:1) 光照强度和 CO_2 具有相互影响作用,2) 光生物反应器对 CO_2 传质的促进作用,总之,目前关于不同 CO_2 浓度对微藻生长的影响机制尚未定论。

光照在微藻培养过程中具有重要的影响作用,这是因为光照为光合作用提供主要能量,能够实现无机营养物向有机生物物质的高效转化^[181]。不同光照强度对同步光合自养-异养生物膜生长的影响如图 2.4 所示,当光照强度从 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 提高到 $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 时,微藻生物质密度由 57.642 g m^{-2} 增加到 84.911 g m^{-2} ,然而,当光照强度进一步提高到 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 时,生物质密度保持在 83.138 g m^{-2} ,换言之,藻类密度随着光强的增加而增加,直至达到饱和点,之后不再增长,这是因为较高的光照强度能够强化生物膜内部的有效光穿透,而且此时光系统吸收的光子较少,细胞不易受到损伤,光合效率较高,最终微藻密度大大增加^[106, 182],但是,过高的光照强度会产生光抑制现象,这是因为当光强超过细胞所能承受的

最大光照值时，多余的光子会使光系统一直处于超负荷运行状态，漂白色素，最终破坏微藻细胞的光合作用系统^[183]。

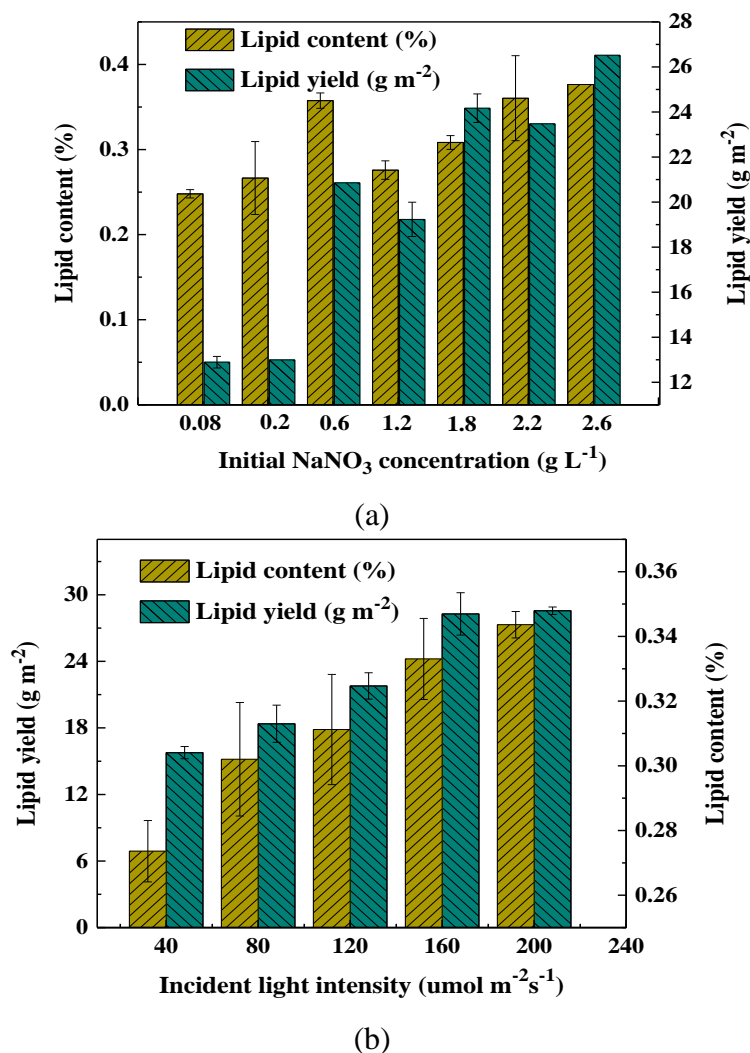


图 2.5 微藻生物膜在不同培养条件下的油脂产量 (a) 不同硝酸钠浓度对微藻产油影响 (b) 不同光照强度对微藻产油影响

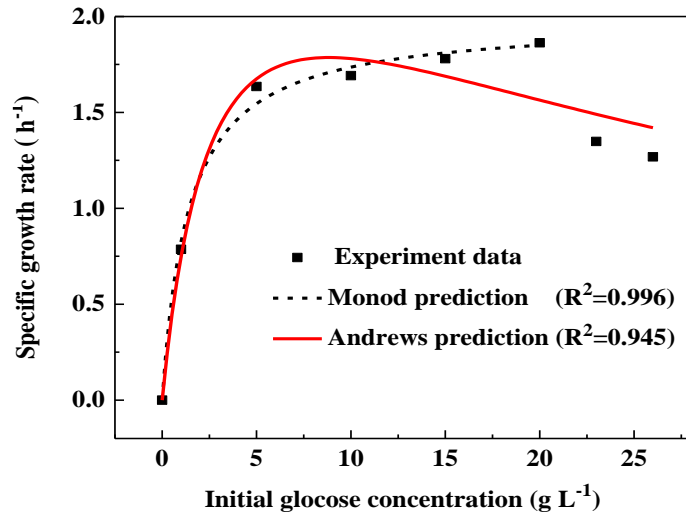
Fig. 2.5 Lipid production of microalgae biofilm under different culture conditions (a) the effect of different concentrations of sodium nitrate on lipid production (b) the effect of different light intensities on lipid production

同一氮源的不同浓度对微藻生物膜产油的影响不尽相同，在氮胁迫作用下微藻细胞能够积累大量油脂。不同培养条件下微藻生物膜产油情况如图 2.5 所示，以硝酸钠为氮源时，油脂含量随着氮源浓度的增加而增加，当硝酸钠浓度为 2.6 g L^{-1} 时，油脂含量与产量均达到最大值，分别为 37.65% 和 26.52 g m^{-2} ，这是因为氮源浓度越高，营养物质越充分，细胞利用更快，代谢作用更强，细胞内油脂大量积

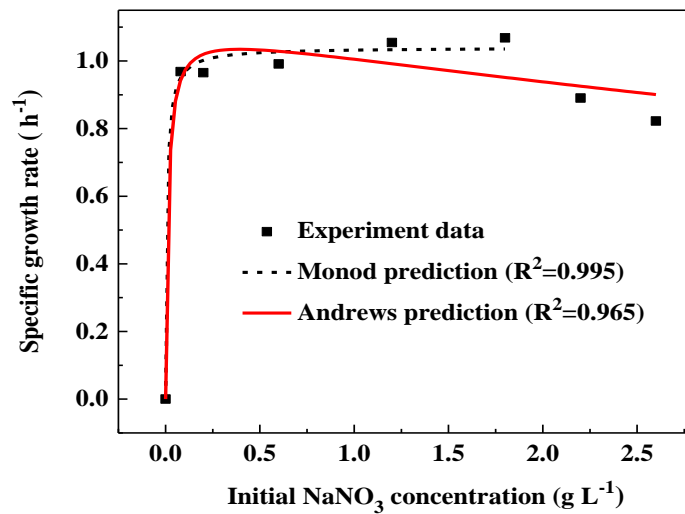
累，导致油脂含量及产量较多。不同光照强度对微藻产油影响如图 2.5b 所示，油脂含量与产量均随着光照强度的增大而增大，当外界的光照强度从 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 增加到 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时，细胞内的油脂含量从 27.36% 提高至 34.36%，油脂总产量从 15.77 g m^{-2} 提高到 28.57 g m^{-2} ，原因可能是当微藻细胞暴露在高光强环境时，在生长代谢过程中细胞会合成较多的油脂作为自身的储能介质，因此，光照强度越高，油脂积累越多。

2.3.2 微藻生物膜多因子生长动力学模型的建立

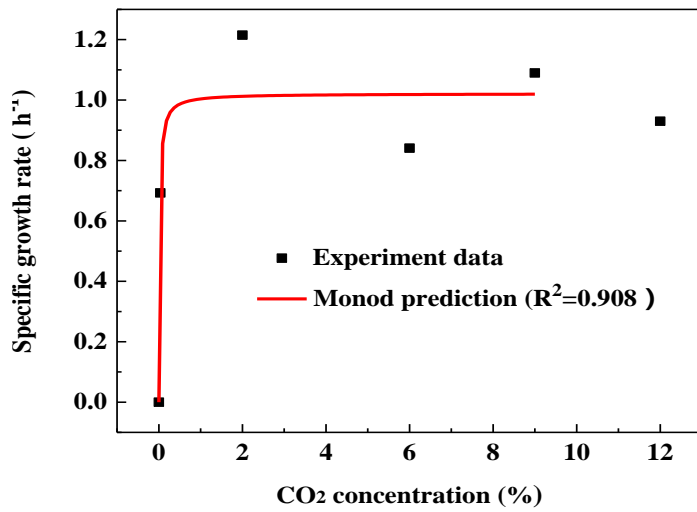
根据微藻生物膜在不同培养条件下的生长特性，可以建立细胞生长速率与营养物质之间的函数关系式，不同影响因素（光强、 CO_2 、葡萄糖及硝酸钠）与细胞生长速率之间的动力学拟合结果如图 2.6 所示，本文针对底物浓度的高低同时采用了 Monod 和 Andrews 两种动力学模型。



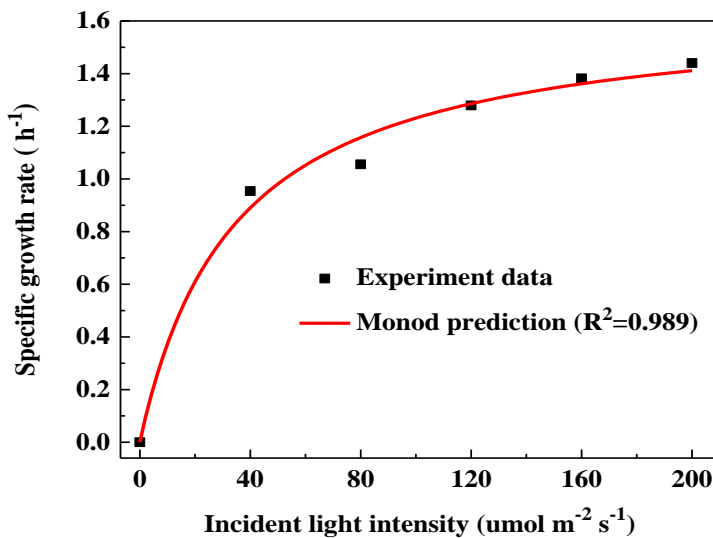
(a)



(b)



(c)



(d)

图2.6 微藻比生长速率与影响因子之间的函数关系：(a) 与葡萄糖浓度的函数关系；(b) 与硝酸钠浓度的函数关系；(c) 与 CO₂ 浓度的函数关系；(d) 与光照强度的函数关系；

Fig. 2.6 The specific growth rate of microalgae biofilm as a function of growth factors: (a) maximum population growth rate vs. initial glucose concentration; (b) maximum population growth rate vs. initial sodium nitrate concentration; (c) maximum population growth rate vs. CO₂ concentration; (d) maximum population growth rate vs. incident light intensity.

由于 Monod 方程中的数学公式相对简单，待拟合参数较少，在多因素生长动力学模型中被多次引用，但是，由于考虑到高浓度底物对生长的抑制作用，学者们提出了一种修饰性 Monod 方程，即 Andrews 模型。由图可知，在中低等与过高的底物浓度下，Monod 和 Andrews 模型均与实验结果高度地吻合，本文在葡萄糖浓度低于 20 g L⁻¹、硝酸钠浓度低于 1.8 g L⁻¹、CO₂ 浓度低于 12% 以及光照强度低

于 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时采用了 Monod 方程进行数据拟合:

$$\mu = \frac{\mu'_{\max} \bullet S}{K_s + S} \quad (2.13)$$

其中, S 是指培养过程中的底物浓度或光照强度, K_s 是半饱和常数、 μ'_{\max} 指的是细胞在环境饱和条件下比生长速率 μ 的最大值, 经过模型拟合获得的动力学参数为: $\mu'_{\max, \text{glucose}} = 1.98 \text{ h}^{-1}$, $K_{S, \text{glucose}} = 1.405 \text{ g L}^{-1}$; $\mu'_{\max, \text{nitrate}} = 1.14 \text{ h}^{-1}$, $K_{S, \text{nitrate}} = 0.00756 \text{ g L}^{-1}$; $\mu'_{\max, \text{CO}_2} = 0.01021 \text{ h}^{-1}$, $K_{S, \text{CO}_2} = 0.00018$ 以及 $\mu'_{\max, I} = 1.65 \text{ h}^{-1}$ 和 $K_{S, I} = 34.258 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 因此, 以光照强度、 CO_2 浓度、葡萄糖和硝酸钠分别为限制性生长底物的 Monod 方程如下所示:

$$\mu_{\text{glucose}} = 1.98 \times \frac{S_{\text{glucose}}}{1.405 + S_{\text{glucose}}} \quad (2.14)$$

$$\mu_{\text{nitrate}} = 1.04 \times \frac{S_{\text{nitrate}}}{0.00756 + S_{\text{nitrate}}} \quad (2.15)$$

$$\mu_{\text{CO}_2} = 1.021 \times \frac{S_{\text{CO}_2}}{0.01757 + S_{\text{CO}_2}} \quad (2.16)$$

$$\mu_I = 1.65 \times \frac{S_I}{34.258 + S_I} \quad (2.17)$$

若同时考虑光强、 CO_2 浓度、葡萄糖和硝酸钠作为限制性生长底物, 则 Monod 方程的综合方程式为:

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{S_{\text{glucose}}}{K_{s, \text{glucose}} + S_{\text{glucose}}} \times \frac{S_{\text{nitrate}}}{K_{s, \text{nitrate}} + S_{\text{nitrate}}} \times \frac{S_{\text{CO}_2}}{K_{s, \text{CO}_2} + S_{\text{CO}_2}} \times \frac{S_I}{K_{s, I} + S_I} \quad (2.18)$$

通过“FirstOpt”软件对实验数据进行线性回归分析, 多因子生长动力学模型的参数为: $\mu_{\max} = 1.868 \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.82$), $K_{S, \text{glucose}} = 0.7966 \text{ g L}^{-1}$, $K_{S, \text{nitrate}} = 0.042 \text{ g L}^{-1}$, $K_{S, \text{CO}_2} = 0.00032$ 及 $K_{S, I} = 31.29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 因此, 公式 2.18 可以写为:

$$\mu = 1.868 \times \frac{S_{\text{glucose}}}{0.7966 + S_{\text{glucose}}} \times \frac{S_{\text{nitrate}}}{0.042 + S_{\text{nitrate}}} \times \frac{S_{\text{CO}_2}}{0.03158 + S_{\text{CO}_2}} \times \frac{S_I}{31.29 + S_I} \quad (2.19)$$

同步光合自养-异养微藻生物膜的多因子生长动力学模型如公式 2.19 所示, 该模型综合考虑了光强、 CO_2 浓度、葡萄糖、硝酸钠浓度以及各个因素之间的相互作用等影响, 模型的框架有效结合了阈值理论和乘法理论, 能够真实地反映细胞生长与环境条件的动态关系, 为生物膜反应器设计、细胞生长的优化调控以及微藻能源的规模化利用提供了重要的理论指导作用。

2.3.3 微藻生物膜多因子生长动力学模型的验证

由于单因素与多因素生长动力学模型的考虑对象相同, 均是微藻细胞的生化转化行特性, 因此, 公式 (2.13) 中的动力学参数应该与公式 (2.18) 大致相同,

而且，公式（18）中的 “ $\mu'_{\max} \cdot \frac{S_{\text{nitrate}}}{K_{s,\text{nitrate}} + S_{\text{nitrate}}} \cdot \frac{S_{\text{CO}_2}}{K_{s,\text{CO}_2} + S_{\text{CO}_2}} \cdot \frac{S_I}{K_{s,I} + S_I}$ ” 这一部分应该与公式（13）中的 “ $\mu'_{\max, \text{glucose}}$ ” 这一部分一致，当然，其他影响因素也不例外，表 2.2 对两种模型的对应常数进行了一一比较，发现计算结果充分地证实了上述的前提假设，即在单因素和多因素生长动力学模型中各个对应的动力学常数大致相同，尤其是 $\mu'_{\max, PDF}$ 这一常数，该值在单因素生长模型中为 1.653 h^{-1} ，在多因素生长模型中为 1.672 h^{-1} ，多因子生长动力学模型计算值与实验值几乎完全吻合，说明该模型具备高度地精确性。

为了进一步地验证生长动力学模型的准确性，本文额外设置了 4 组不同工况的微藻生物膜生长实验，实验方案如表 2.3 所示。

表 2.2 不同生长条件下微藻生长的 Monod 参数

Table 2.2 Monod parameters of microalgae growth for different substrate concentrations

Parameters	μ'_{\max}	$\mu'_{\max, glucose}$	$\mu'_{\max, I}$	μ'_{\max, CO_2}	$\mu'_{\max, nitrate}$	$K_{s, glucose}$	$K_{S, I}$	K_{s, CO_2}	$K_{s, nitrate}$
$\mu_{glucose} = \frac{\mu'_{\max, glucose} \times S_{glucose}}{K_{s, glucose} + S_{glucose}}$		1.98				1.405			
$\mu_I = \frac{\mu'_{\max, I} \times S_I}{K_{S, I} + S_I}$			1.653				34.26		
$\mu_{CO_2} = \frac{\mu'_{\max, CO_2} \times S_{CO_2}}{K_{S, CO_2} + S_{CO_2}}$				1.021				0.018	
$\mu_{nitrate} = \frac{\mu'_{\max, nitrate} \times S_{nitrate}}{K_{S, nitrate} + S_{nitrate}}$					1.04				0.008
$\mu = \mu'_{\max} \times \frac{S_{glucose}}{K_{s, glucose} + S_{glucose}} \times \frac{S_{nitrate}}{K_{S, nitrate} + S_{nitrate}} \times \frac{S_I}{K_{S, I} + S_I} \times \frac{S_{CO_2}}{K_{S, CO_2} + S_{CO_2}}$	1.868	1.38	1.672	1.282	1.309	0.797	31.29	0.0316	0.042
	$R^2=0.82$								

表 2.3 微藻生物膜生长模型的验证实验

Table 2.3 Design of verification experiment for microalgae biofilm growth model

Serial number	Glucose (g L ⁻¹)	Nitrate (g L ⁻¹)	CO ₂ (%)	Light intensity (μmol m ⁻² s ⁻¹)	μ'_{\max} (experiment)	μ'_{\max} (model)	Goodness fit
1	10	1.5	10	100	1.270	1.278	0.99
2	6	0.8	6	100	1.210	1.190	0.98
3	10	1.5	0.5	100	1.439	1.206	0.84
4	10	4.5	5	100	1.604	1.297	0.81

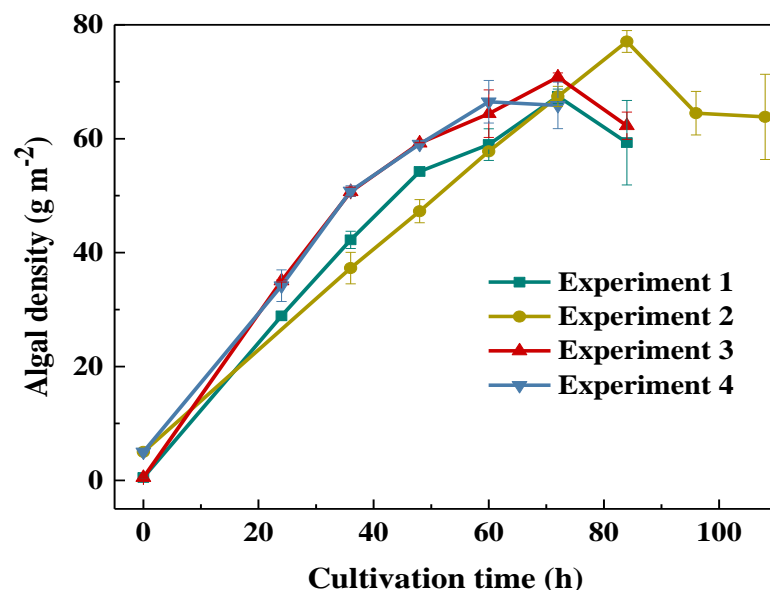


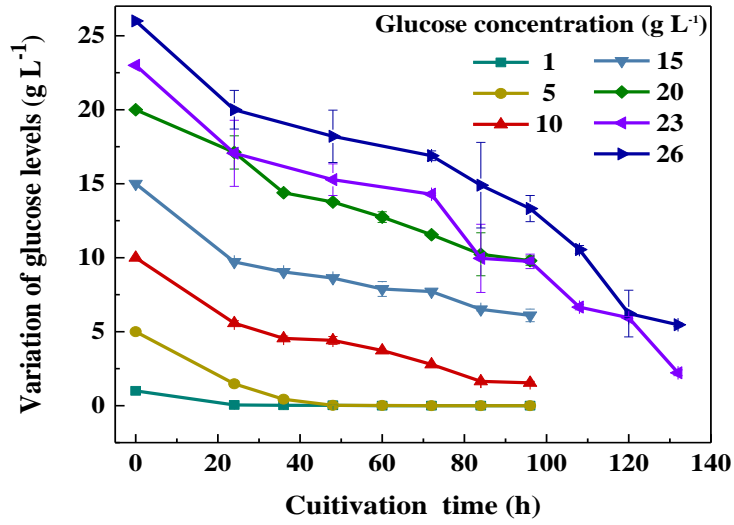
图 2.7 微藻生物膜生长模型的验证实验

Fig. 2.7 Verification experiments of microalgae biofilm growth model

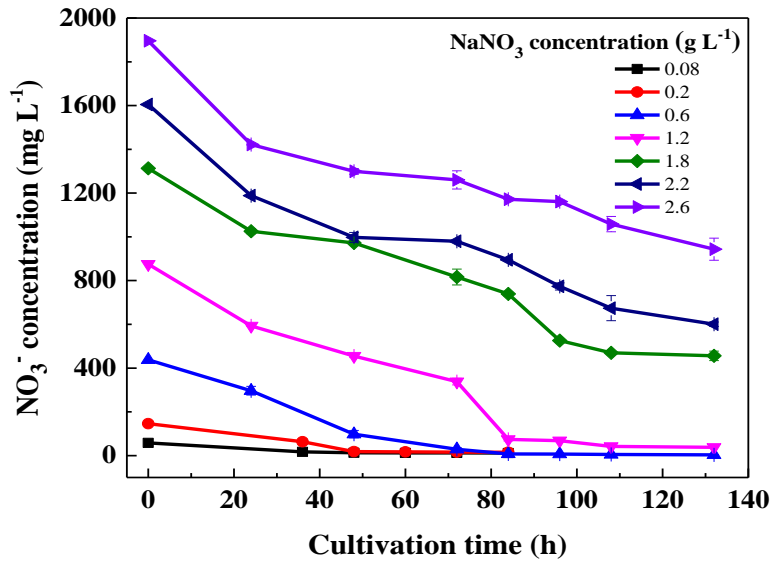
当葡萄糖浓度为 6 g L^{-1} ，硝酸钠浓度为 0.8 g L^{-1} ， CO_2 浓度为 6% 及光照强度为 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 时，细胞比生长速率为 1.21 h^{-1} ，将该实验工况代入到生长动力学模型中计算得到细胞比生长速率为 1.19 g h^{-1} ，此时实验值与模型计算值的吻合度高达 0.98。类似地，当葡萄糖浓度为 10 g L^{-1} ，硝酸钠浓度为 1.5 g L^{-1} ， CO_2 浓度为 6% 及光强为 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 时，细胞比生长速率为 1.270 h^{-1} ，与模型计算值 (1.278 h^{-1}) 的吻合度高达 0.99。综上所述，多因子生长动力学模型能够比较真实地反映出微藻细胞的生长情况，与单因素生长动力学模型相比，该模型虽然在数学公式上结构更复杂，但其具备一定的适用性和广泛性。

2.3.4 微藻生物膜对底物消耗的吸收动力学模型

本文通过批次培养实验研究了微藻生物膜对葡萄糖和硝酸钠的消耗反应机制，由于光合-异养微藻生物膜对营养底物的吸收遵循 Michaelis–Menten 酶解动力学方程，故采用 Michaelis–Menten 方程对反应速率进行拟合分析，获得了微藻生物膜对底物消耗的反应动力学模型。图 2.8 表示了不同批次培养条件下微藻对底物的利用情况，本文选取的葡萄糖浓度范围为 $1\text{--}26 \text{ g L}^{-1}$ ，硝酸钠浓度范围为 $0.08\text{--}2.6 \text{ g L}^{-1}$ ，由图可知，随着底物浓度的增加，藻细胞的消耗速率加快，这是因为底物的浓度越高，物质传输驱动力越大，传质能力越强，从而加速了微藻对底物的吸收，该结论与微藻细胞的生长情况互相吻合。



(a)



(b)

图 2.8 微藻生物膜对 (a) 葡萄糖和 (b) 硝酸钠的消耗情况

 Fig. 2.8 Variation of (a) glucose levels and (b) NO_3^- levels under different microalgae growth conditions

通过 Michaelis–Menten 方程对底物去除率和初始底物浓度进行动力学拟合，可获得反应动力学的相关参数，如图 2.9 所示，因此，微藻对底物消耗的反应动力学模型可写为：

$$R_{xi} = \frac{0.0518 \cdot S_{glucose}}{20 + S_{glucose}} \quad (2.20)$$

$$R_{xi} = \frac{2.225 \cdot S_{nitrate}}{1.17709 + S_{nitrate}} \quad (2.21)$$

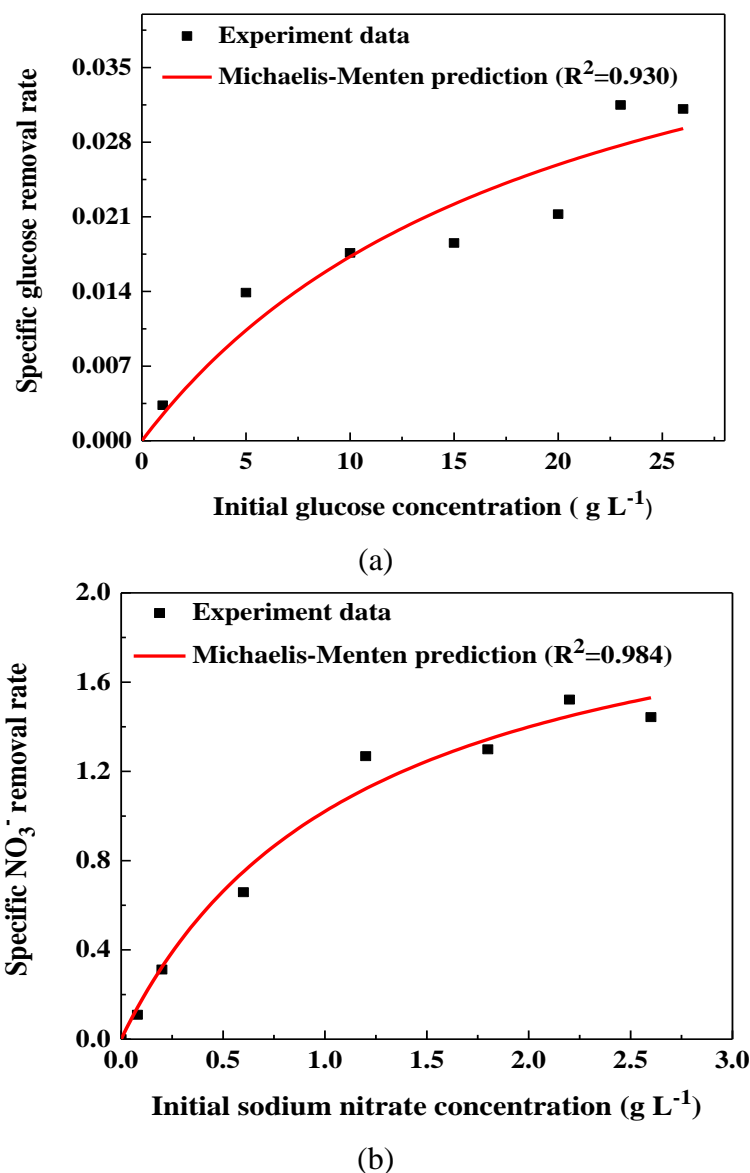


图 2.9 微藻细胞生长速率与 (a) 葡萄糖浓度 (b) 硝酸钠浓度之间的函数关系

Fig. 2.9 Specific removal rate of (a) glucose and (b) NO₃⁻ as a function of initial glucose concentration and initial sodium nitrate concentration respectively.

根据微藻对底物的吸收动力学模型可获得基质消耗的反应速率常数 k 和半饱和常数 K_m ，其中，半饱和常数 K_m 通常表示微生物在一定条件下对某种营养底物的适应效果，对于某个特定的藻种而言， K_m 是一个相对稳定的参数，它能反应某一藻种对营养物质的去除情况，可以用来比较藻种之间的生理特性^[184]。本文获得的反应动力学参数为：对于葡萄糖的吸收 $k = 0.0518 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$ ， $K_m = 20 \text{ g L}^{-1}$ ；对于硝酸钠的吸收 $k = 2.225 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$ ， $K_m = 1.177 \text{ g L}^{-1}$ 。综上所述，微藻生物膜在维持正常的生长代谢同时，还能有效去除有机碳源及氮源，由于农业污水中含有丰富的有机物和氮、磷等物质，因此，微藻生物膜在污水净化等方面具有

广阔的应用前景，目前已有研究表明微藻具有高效的水体净化能力，且操作成本低，可避免环境污染等问题，此外，污水处理后获得的微藻生物物质还可以进一步地被利用，如提取色素和油脂等，有利于实现微藻的能源化利用。

2.4 本章小结

为了进一步研究同步光合自养-异养微藻生物膜的生长特性，本章建立了一种综合考虑了光照强度、CO₂、葡萄糖和硝酸钠浓度及各个因素之间相互作用等影响并有效结合了阈值理论和乘法理论的多因子生长动力学模型，该模型与实验结果的吻合度高达 0.99，能够真实地反映微藻生物膜的生长情况，此外，本章结合 Michaelis–Menten 酶解动力学方程建立了微藻生物膜对营养底物的吸收动力学模型。主要结论如下：

① 利用梯度浓度营养物质对微藻生物膜进行培养时，微藻生物膜的最大生物物质密度随着底物浓度的增加而增加，直至达到饱和生长点，超过饱和点之后，微藻生物膜密度不再明显增加。

② 建立了微藻生物膜的多因子生长动力学模型，该模型的表达式为：

$$\mu = 1.868 \times \frac{S_{glucose}}{0.7966 + S_{glucose}} \times \frac{S_{nitrate}}{0.042 + S_{nitrate}} \times \frac{S_{CO_2}}{0.03158 + S_{CO_2}} \times \frac{S_I}{31.29 + S_I} \quad (2.22)$$

其中， $\mu_{max} = 1.868 \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.82$)， $K_{s,glucose} = 0.7966 \text{ g L}^{-1}$ ， $K_{s,nitrate} = 0.042 \text{ g L}^{-1}$ ， $K_{s,CO_2} = 0.00032$ 以及 $K_{s,I} = 31.29 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，验证实验表明该模型能够精准地评估和预测微藻生物膜生长系统的生产能力，吻合度高达 0.99。

③ 通过研究微藻生物膜对营养底物的消耗情况建立了相应的吸收动力学模型，微藻对底物的反应速率常数和半饱和常数分别为：对于葡萄糖的吸收 $k = 0.0518 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2}) / \text{h}$ ， $K_m = 20 \text{ g L}^{-1}$ ；对于硝酸根的吸收 $k = 2.225 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2}) / \text{h}$ ， $K_m = 1.177 \text{ g L}^{-1}$ 。

3 同步光合自养-异养微藻生物膜光穿透特性与营养物质优化

3.1 引言

微藻生物膜培养是一个利用物理或化学手段将具有一定活性的游离藻细胞限制或定位于一定空间内, 并使其保持生物活性的生物强化手段, 是一种经济上可行且极具发展潜能的培养技术^[180-185]。迄今为止, 微藻生物膜培养大多基于光合自养生长, 在培养初期, 生物膜厚度较薄, 光照、CO₂ 及营养物质的传输阻力较小, 传质能力更强, 生长速率较快, 生物量密度较高, 然而, 随着培养时间的增加, 细胞不断积累, 生物膜厚度提高, 形成紧实致密的微藻生物膜, 严重地影响了光照的有效穿透性及物质传输能力, 有研究表明在光合自养微藻生物膜培养系统中, 光照只能到达垂直于生物膜表面的厚度方向上的 40 μm 处^[56], 在生长后期, 生物膜底层处于完全黑暗区域, 藻细胞不断降解自身有机物, 导致生物量显著降低, 因此, 本文在第二章提出了同步光合自养-异养同时生长的新型生物膜培养模式, 并且根据微藻生物膜在不同培养条件下的生长动力学特性建立了多因子生长动力学模型, 结果表明除光照强度和 CO₂ 浓度外, 培养液中的碳氮源对微藻生物膜的生长起着决定性作用, 此外, 藻细胞光合自养与异养生长的代谢途径不同, 对营养物质与外界环境的要求不尽相同^[186], 例如, 细胞在异养生长作用下会分泌大量的酸性产物, 容易形成酸性环境, 使培养液中的 pH 明显降低, 影响细胞的正常生长^[35], 而且生物膜内可能存在自养、异养或兼养的分层生长行为等, 虽然学者们已在悬浮式微藻培养系统中开展了类似研究^[44], 但是针对生物膜培养系统的相关结论尚未报道。

此外, 已有研究表明微藻异养可明显提高细胞内的油脂含量, Wu 等通过研究悬浮式微藻异养产油特性发现异养生长更容易积累油脂, 其油脂产量比光合自养油脂产量提高了约 700 倍^[187]; Liang 等比较了普通小球藻在光合自养、异养和兼养生长条件下的微藻密度和油脂含量, 结果发现加入异养培养可使生物量和油脂含量分别高达 2 g L⁻¹ 与 54 mg L⁻¹d⁻¹^[40]; Hena 等采用光合自养、光合异养和异养三阶段培养方法对农场废水进行处理, 实验结果表明微藻通过异养生长可使油脂含量提高至 62.38%^[188]。

为了充分发挥微藻细胞的光合自养和异养的优势与潜能, 本章在建立多因子生长动力学模型的基础上, 首先研究了微藻生物膜内的光穿透特性, 确定了影响光穿透能力的主要影响因素, 然后通过优化调控培养液中的碳氮源种类、无机碳与有机碳比例及总碳与总氮的比例获得适宜微藻生物膜生长的最佳营养物质组合, 从而达到生物量和油脂含量同时提高的目的。

3.2 材料与方法

3.2.1 藻种与培养基

本章实验所用藻种为 *Chlorella vulgaris* FACHB-31 与 *Scenedesmus obliquus* FACHB-417, 均购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库, 微藻生长所用培养基的组分与含量与本文 2.2.1 节所述一致。

3.2.2 实验系统

同 2.22 节所述一致。

3.2.3 方案设计

关于微藻生物膜内的有效光穿透特性, 本章研究了 5、10、20、40、60、70、80、90、100 和 120 g m⁻² 微藻生物膜分别在 90、130、160 及 200 μmol m⁻² s⁻¹ 光照条件下的光穿透能力, 测量光穿透的实验装置如图 3.1 所示。本文针对微藻生物膜的营养物质优化实验设置了不同的碳/氮源种类及梯度浓度下微藻生长实验, 如表 3.1 所示, 其中, 总无机碳 (TIC) 与总有机碳 (TOC) 的之比指 CO₂ 供应量与所有碳源供应量的摩尔比, 总碳 (TC) 与总氮 (TN) 之比是指碳源供应量(CO₂ 和葡萄糖)与氮源供应量(硝酸钠)的摩尔比。

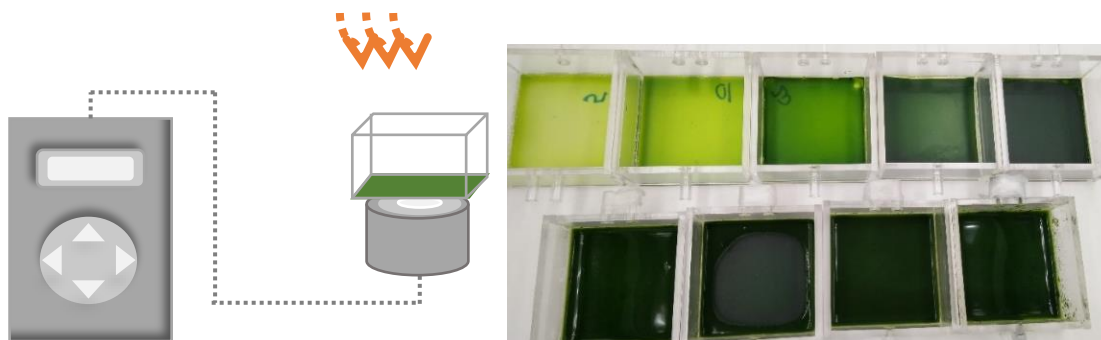


图 3.1 光穿透实验的测量系统

Fig. 3.1 The measuring system for light penetration experiment

表 3.1 基于 BG-11 培养基的优化实验方案

Table 3.1 Optimal design of experimental conditions based on BG11 medium

	Concentration (mM)				
Carbon source	Glucose	16	33	49	65
	Sucrose		33		
	Sodium acetate		33		
	Concentration (mM) (Concentration of glucose is 49 mM)				
Nitrogen source	Sodium nitrate	10	14	17	21
	Sodium nitrite		14		
	Urea		14		
	Ammonium chloride		14		

3.2.4 分析方法

① 光穿透特性

采用悬浮式培养对微藻进行 5 天的预培养之后，将藻液进行高速离心浓缩成为藻泥，利用一级去离子水将藻泥清洗干净移至透明的有机玻璃容器内，待藻细胞自然沉降，之后用滴管吸取全部上清液，最终形成面积密度为 5、10、20、40、60、70、80、90、100 和 120 g m⁻² 的微藻生物膜，通过调整生物膜与荧光灯之间的相对位置实现不同大小的光照强度，其中，光合量子传感器（Li-250A, Li-Cor, Lincoln, NE, USA）紧贴玻璃盒底部来测量出射光照强度。

② 微藻生物质密度

同 2.24 节所述一致。

③ 微藻细胞的油脂含量

细胞内油脂的含量采用一步法测定^[189]：将从载体基质表面采收并干燥后的微藻生物质用研钵充分研磨成粉末，称取 100 mg 的干燥藻粉放入 10 mL 离心管内并进行编号，同一样品，取 3 个平行样，依次向离心管内加入 4 mL 甲醇、4 mL 氯仿和 0.2 mL 浓硫酸，盖住离心管盖，充分震荡摇晃使藻粉与溶液混合均匀，随后用多层保鲜膜将离心管密封，密封后的离心管放入 60°C 的烘箱中烘干 8 h，将离心管从烘箱中取出，冷却至室温，高速离心后将上清液移至对应编号的 50 mL 离心管中，依次将 4 mL 氯仿和 4 mL 水加入上清液中，静置分层，分层后将下层的氯仿层分别取出至另一对号的 50 mL 离心管中，向取出的氯仿层中加入 8 mL 的水清洗残留的浓硫酸，重复 2-3 次直至上层液清澈，静置分层后，将氯仿层取出至预先称重的菌种瓶中，放入 60°C 的烘箱烘干至恒重，取出后将其放置在干燥器中冷却至室温，并称取烘干后的菌种瓶重量，菌种瓶前后的重量差即为微藻细胞中油脂的质量，据此可算出单位干重微藻细胞内的油脂含量。

④ 微藻细胞的叶绿素含量

由于叶绿素 α 和叶绿素 b 分别在 663 nm 和 646 nm 处存在最大的吸收峰，因此可通过分光光度法来测定叶绿素 α 和叶绿素 b 的 OD 值，再根据 Lambert-Beer 定律计算出微藻细胞内叶绿素 α 、叶绿素 b 以及总叶绿素的含量^[190]。具体测试步骤如下：取 0.5 mL 藻液置于 10 mL 离心管中，以 8000 r min⁻¹ 转速离心 10 min，去掉上清液，并用锡箔纸包裹离心管避光，然后加入 3 mL 的二甲基亚砜，盖紧试管盖后，65°C 水浴 20 h，水浴结束后进行常温离心，将上清液收集到铝箔纸包裹的 10 mL 离心管中，向倒掉上清液后的离心管中加入 6 mL 的 80% 丙酮混匀再离心（低温离心），离心后上清液倒入铝箔纸包裹的 10 mL 离心管中，并用二甲亚砜/80% 丙酮（1/2, v/v）定容至 9 mL，将上清液置于分光光度计中测量其在 646 nm 和 663 nm 波长下的吸光值 $A_{663\text{nm}}$ 与 $A_{646\text{nm}}$ ，按照公式

3.1 和 3.2 可以计算细胞内叶绿素 α 和总叶绿素的含量:

$$Chl_a = (12.7A_{680m} - 2.69A_{640m}) \times V \quad (3.1)$$

$$Chl_t = (20.2A_{680m} + 8.04A_{640m}) \times V \quad (3.2)$$

⑤ 光系统 II (PSII) 最大光化学量子效率 F_v/F_m

光系统 II 最大光量子效率可以表征微藻细胞的潜在最大光合能力, 数值越高表明光合作用潜能越大, 藻细胞活性越好, 通常用来判断微藻生长环境是否适宜^[191]。Fv/Fm 的测量方法: 取 3.5 mL 藻液于比色皿中, 将其放入手持便携式叶绿素荧光仪 (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, Czech Republic) 中, 在黑暗环境中处理 15 min 后进行测量^[192], 计算公式如下, 其中 F_v 为荧光变量, F_m 为最大荧光水平以及 F_0 为暗处理后的荧光水平。

$$\text{最大光量子效率: } F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (3.3)$$

⑥ 微藻生物膜微观形态观测

将微藻生物膜置于培养皿中, 利用一级去离子水清洗 3 次, 加入 2.5% 戊二醛缓冲液浸泡固定 30 min, 用离子水洗去缓冲液后利用梯度浓度的酒精 (10%、30%、50%、70% 和 90%) 进行脱水, 每种浓度取 5 mL, 脱水处理 20 min, 再添加叔丁醇/酒精 (1/1, V/V) 混合液进行脱水和二次固定, 处理时间为 40 min, 之后, 将样品置于冷冻干燥机中进行干燥处理, 结束后将其粘附在贴有导电胶的电镜载物台上, 经过离子溅射镀膜 (金) 制成电镜扫描标本, 最后利用扫描电子显微镜 (TESCAN VEGA 3 SBH) 进行形态观察^[193], 此外, 将微藻生物膜的电镜扫描标本置于微生物光学平台上, 利用 NanoFocus 移动式 3D 共聚焦显微镜 (μ surf custom) 对观察样品进行断层扫描和三维重构, 可以复原出生物膜的完整形貌图。藻细胞直径大小是通过光学显微镜 (BX63, OLYMPUS) 进行测量。取一滴藻液于载玻片上, 盖玻片压匀, 在 100 倍率条件下选取 5 个视野分别测量 20 个藻细胞的直径, 取其平均值作为藻细胞的直径大小。

3.3 实验结果与分析

3.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透特性

同步光合自养-异养微藻生物膜 (HAPB) 的光穿透特性如图 3.2a 所示, 其与单纯光合自养微藻生物膜 (PB) 的光穿透能力明显不同, 尤其当生物膜密度低于 40 g m^{-2} 时, 差异比较显著。具体的讲, 当入射光强为 $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 生物膜密度为 5 g m^{-2} 时, PB 与 HAPB 的出射光强分别为 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 和 $89 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 换言之, HAPB 的光穿透能力比 PB 提高了 48%, 类似的, 当入射光照强度为 $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 生物膜密度为 10 g m^{-2} 时, PB 与 HAPB 的出射光强分别为 $47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 和 $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 即 HAPB 的光穿透能力比 PB 提高了 64%, 此外, 当光强

为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时也不例外，综上，HAPB 光穿透能力更强。

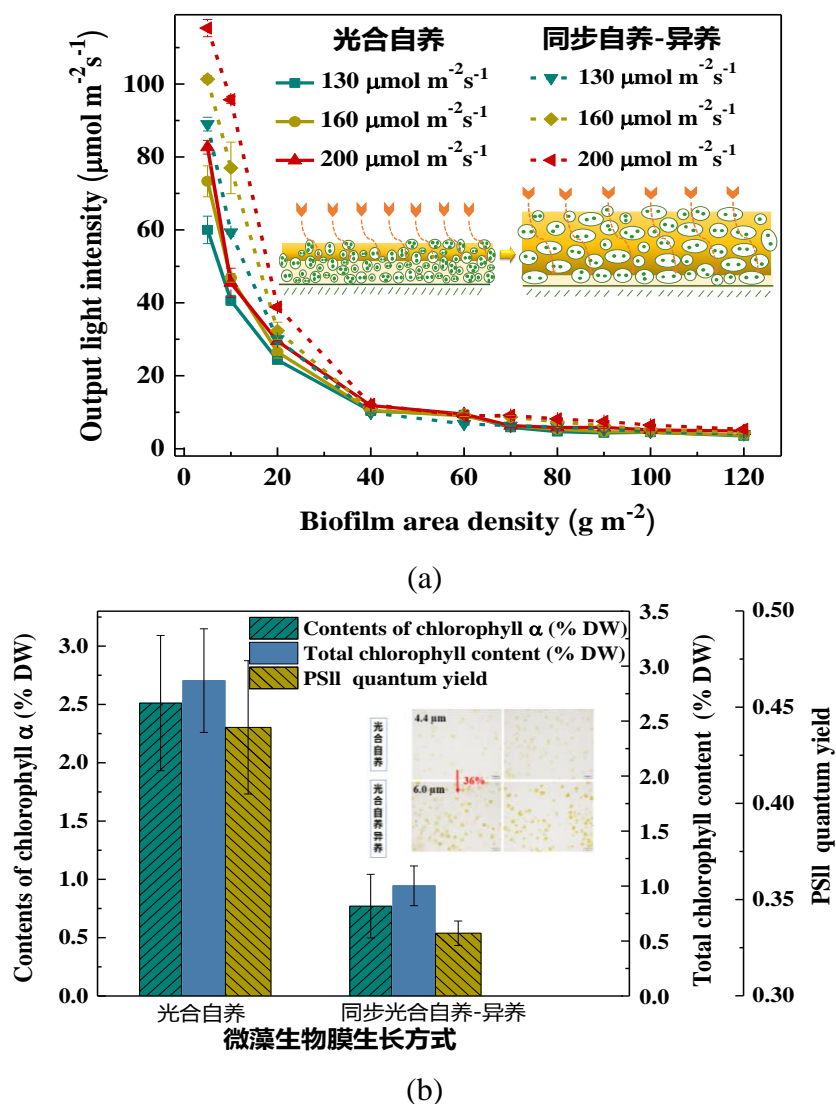


图 3.2 同步光合自养-异养与单纯光合自养微藻生物膜的 (a) 光穿透对比与
(b) 光合潜能对比

Fig.3.2 Comparison of (a) light penetration characteristics and (b) chlorophyll content and PSII quantum yield under PB and HAPB.

本文通过比较 PB 和 HAPB 中细胞直径大小和光合色素含量来解释该实验现象，结果发现与光合自养生物膜（细胞直径 $4.4 \mu\text{m}$ ）相比，同步光合自养-异养生物膜的细胞直径（ $6 \mu\text{m}$ ）提高了 36%，叶绿素和叶绿素 α 含量分别占光合自养细胞干重的 2.51% 和 2.87%，而它们在同步光合自养-异养细胞中的含量仅占 0.77% 和 1%，此外，光合自养细胞与同步光合自养-异养细胞的最大光量子效率 F_v/F_m 分别为 0.4395 与 0.3325。叶绿素 α 与最大光量子效率都是表征细胞光合潜能大小的关键

参数, 数值越高, 表示细胞活性越好, 光合效率越高, 数值越低, 表示细胞活性越差, 光和能力越低, 因此, 本文可从两个方面对同步光合自养-异养生物膜的更高光穿透能力进行解释, 一方面, 普通小球藻细胞呈椭球型, 直径越大说明生物膜内部结构较疏松, 孔隙率较高, 使得光穿透性能更好, 另一方面, 同步光合自养-异养细胞的叶绿素 α 含量与光量子效率较低, 意味沿着光照的路径方向上, 生物膜顶层细胞吸收的光子较少, 光系统的光合潜能低下, 使得光照可以穿透更深的生物膜厚度^[97], 从而提高同步光合自养-异养生物膜的整体活性及光合效率。

3.3.2 微藻生物膜生长碳源的优化调控

由于同步光合自养-异养微藻生物膜培养方式同时需要无机碳与有机碳用来产生能量和合成碳骨架, 其中, 藻细胞的光合作用与异养生长可能同时且独立进行, 也有可能有机碳源的加入改变了细胞光合自养生长行为^[194]。本文为了优化微藻生物膜生长的有机碳源, 考察了单糖、二糖及乙酸盐对微藻生长的影响。

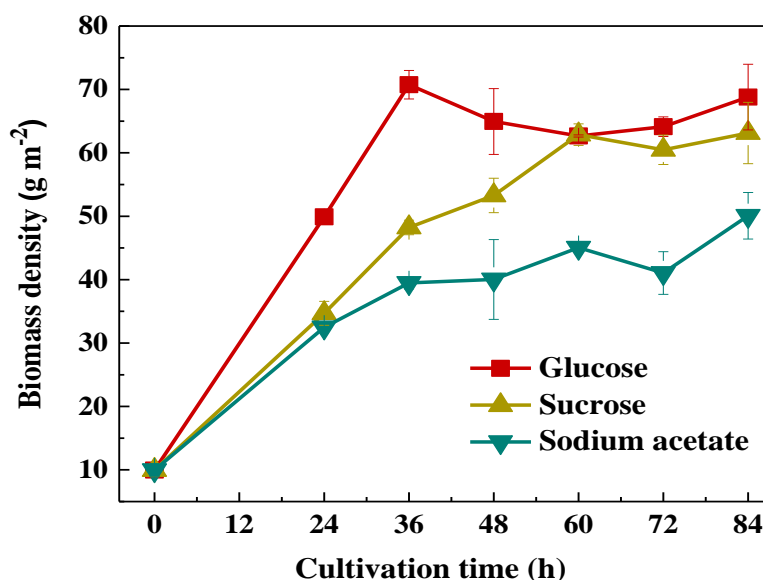
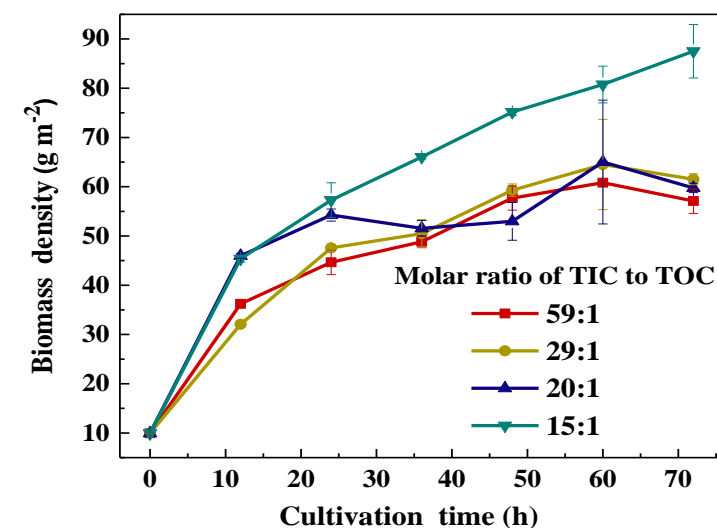


图 3.3 不同有机碳源种类下微藻生物膜生长情况 (浓度为 33mM)

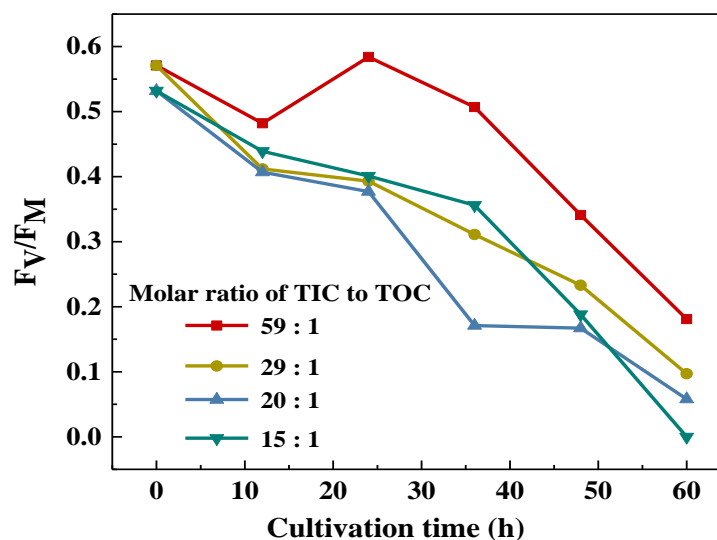
Fig. 3.3 Comparison of biomass density of HAPB of *Chlorella vulgaris* under different carbon sources (at a concentration of 33 mM)

不同碳源种类对同步光合自养-异养微藻生物膜生长的影响如图 3.3 所示, 微藻生物膜在利用不同碳源的条件下均呈现出随着时间的增加, 生物膜不断积累直至趋于稳定的趋势。其中, 以葡萄糖为碳源进行生长的微藻密度高达 70.75 g m^{-2} , 比蔗糖组高了 13%, 比乙酸钠组高了 42%, 这是因为普通小球藻细胞内含有被葡萄糖或其类似物 (3-O-甲基葡萄糖或 6-脱氧葡萄糖) 诱导的己糖运输系统^[175], 可以对葡萄糖进行吸收利用为生长所用, 以葡萄糖为有机碳源生长的微藻生物膜最

大比生长速率为 0.067 h^{-1} 也证明了这一点, 该值远远高于蔗糖组 (0.052 h^{-1}) 和乙酸钠组 (0.049 h^{-1})。因此, 考虑到应用生产中的经济性与效应性, 本文选取葡萄糖作为微藻生物膜生长的最优有机碳源。



(a)



(b)

图 3.4 不同 TIC 与 TOC 比例条件下微藻生物膜生物量与光量子效率的比较

Fig. 3.4 Comparison of (a) biomass density and (b) photosynthesis potential of the HAPB under different molar ratios of TIC to TOC.

不同无机碳与有机碳摩尔比 (TIC:TOC) 对微藻生长的影响如图 3.4a 所示, 在生长初期, 3 组低摩尔比培养的微藻生物膜密度均以 0.13 h^{-1} 的比生长速率从 9.940 g m^{-2} 增加到 45.98 g m^{-2} , 当 TIC 与 TOC 的摩尔比提高至 20:1 时, 微藻细胞

一直处于线性增长状态,直至 72 h 后生物质密度高达 88 g m^{-2} ,然而,当无机碳与有机碳的摩尔比越大时(无机碳与有机碳摩尔比为 29:1 和 59:1 时),藻细胞的比生长速率越慢,生物质密度越低,这是因为摩尔比越大,葡萄糖的相对浓度越低,藻细胞的异养生长受到限制,导致最终的生物质密度显著降低。此外, F_v/F_m 作为 PSII 最大光化学量子效率,是一种应用最广泛、使用频率最高的叶绿素荧光参数^[192],数值越低,表明藻类生长受到胁迫越严重,是研究各种环境胁迫对光合作用影响的重要指标。不同无机碳与有机碳摩尔比对藻细胞 F_v/F_m 的影响如图 3.4b 所示,当无机碳与有机碳的摩尔比较高时,异养生长作用较弱,光合能力较强,细胞代谢旺盛, F_v/F_m 较高。综上,由于要考虑藻细胞的生物活性、最大生物量、光合能力强弱与工业生产的经济性等综合影响,本文选取无机碳与有机碳摩尔比 19:1 作为最优值。

3.3.3 微藻生物膜生长氮源的优化调控

氮作为藻细胞内氨基酸、蛋白质、叶绿素和酶等物质合成的重要组成部分与调控细胞次级代谢的最有效因子,是微藻生长过程中需求最大的营养元素之一,据统计,氮元素占微藻细胞干重的 1%-10%^[195],微藻细胞可利用的氮源包括有机氮与无机氮,其对不同氮源的吸收同化速率与亲和力不尽相同。本文研究了等摩尔量的硝酸盐、亚硝酸盐、尿素和氯化铵对微藻生物膜生长的影响,如图 3.5 所示,采用硝酸钠培养的微藻生物膜在生长初期以 0.077 h^{-1} 比生长速率从 9.899 g m^{-2} 增加到 63.02 g m^{-2} ,之后细胞生长趋于稳定,生物膜密度高达 73.78 g m^{-2} ,这是因为硝酸根可以通过两个还原过程被藻细胞进行吸收利用,首先,进入细胞内的硝酸根在还原酶的催化作用下被还原成亚硝酸根,之后进入叶绿体中被亚硝酸根还原酶还原成铵根,最后,将铵根并入碳骨架^[196]。此外,本文通过实验发现采用氯化铵培养的生物膜面积密度最低,只有 25 g m^{-2} ,其最大比生长速率仅占硝酸钠的 1/2 (0.036 h^{-1}),这可能是因为氯化铵中的铵根离子在溶液进行了充分的水解作用,使得培养液的 pH 明显降低,抑制了细胞的新陈代谢与自我繁殖^[148]。因此,从生物量积累与工业生产的经济性等角度出发,本文选取硝酸钠作为同步光合自养-异养微藻生物膜生长的最优氮源。

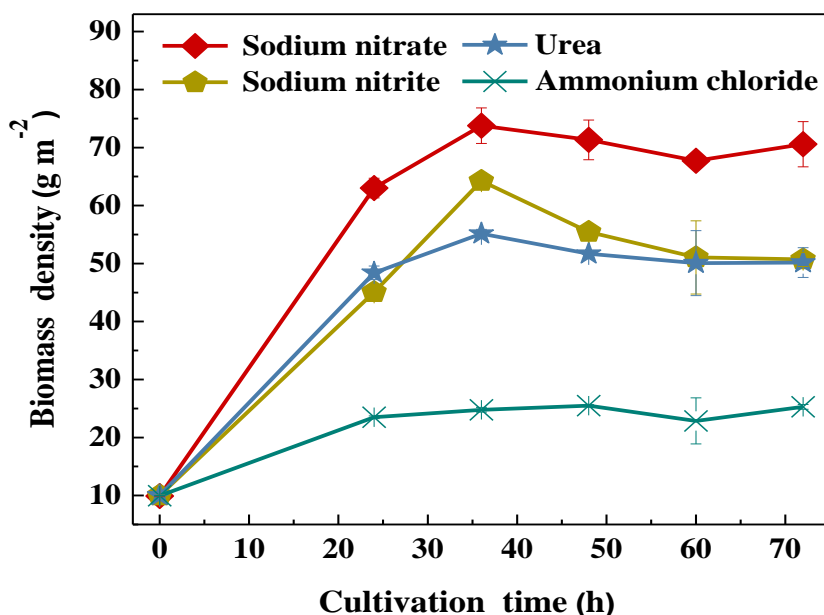
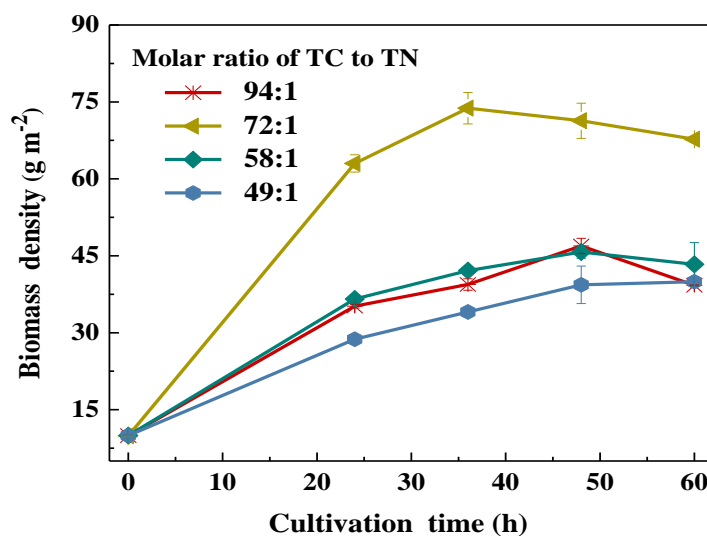


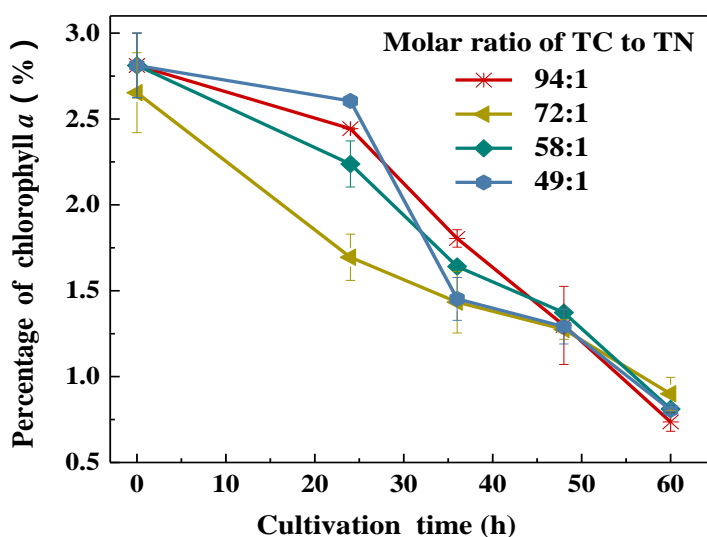
图 3.5 不同氮源种类下微藻生物膜生长情况

Fig. 3.5 Comparison of biomass density of HAPB of *Chlorella vulgaris* under different nitrogen sources (at a concentration of 14 mM)

不同总碳 (TC) 与总氮 (TN) 摩尔比对微藻生物膜生长的影响如图 3.6 所示, 当总碳与总氮的摩尔比为 72:1 时, 微藻生物膜以比生长速率 0.077 h^{-1} 从 10 g m^{-2} 快速增长到 63 g m^{-2} , 最终生物量高达 74 g m^{-2} , 然而, 总碳与总氮的摩尔比过高或过低均会影响藻细胞的正常生理活动, 明显降低生物质密度, 这是因为摩尔比过高会影响藻细胞内三羧酸循环与叶绿素的合成, 使得光合系统受损, 光合效率降低, 最终导致细胞生长停滞^[177], 而当摩尔比过低时, 氮源过多, 其在细胞内的同化速率远远低于供应速率, 铵根离子积累过多, 无法快速合成氨基酸, 产生铵中毒现象, 导致细胞大量死亡^[178]。实验结果表明当总碳与总氮的摩尔比为 72:1 时, 藻细胞活性更好, 生长繁殖更快, 生物质密度更高。此外, 叶绿素 α 作为微藻细胞内最主要的光合色素, 直接参与光合作用中光能的吸收、传递与转化功能, 其含量高低对细胞的光合自养具有重要的影响作用, 可以直观地了解微藻细胞的光合潜能^[197]。由图可知, 不同总碳与总氮摩尔比条件下微藻生物膜的叶绿素 α 含量变化趋势大致相同, 随着时间的增加, 叶绿素 α 含量不断降低, 当摩尔比为 72:1 时, 叶绿素 α 含量的下降速率最快, 但其最终的色素含量与其他实验组相同, 说明不同的总碳与总氮摩尔比对微藻细胞内叶绿素 α 的合成几乎没有明显的抑制作用, 不会影响微藻细胞进行正常的光合作用。



(a)



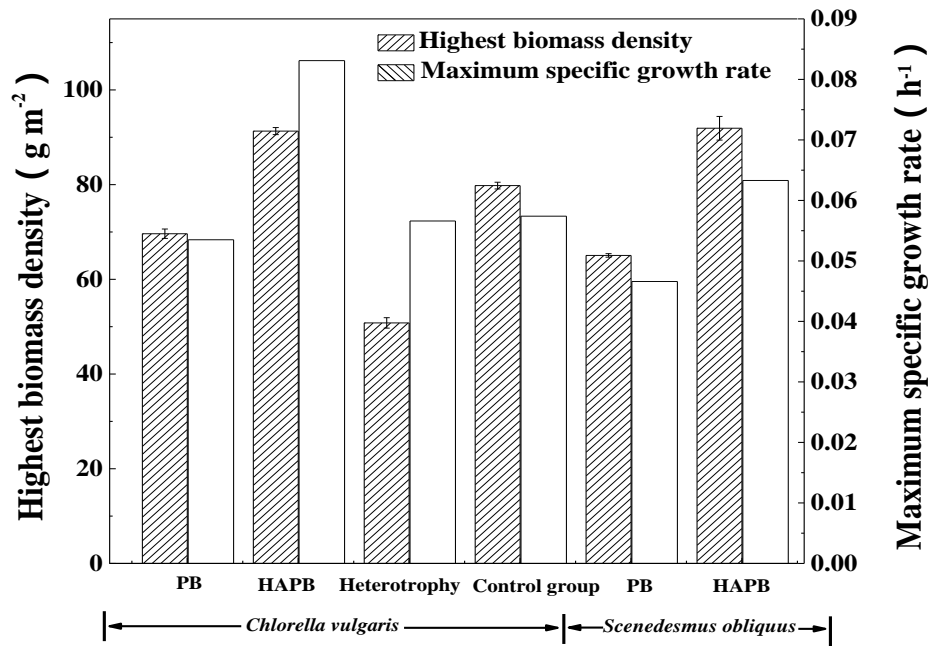
(b)

图 3.6 不同 TC 与 TN 比例下微藻生物膜生物量与叶绿素 α 含量的比较Fig. 3.6 Comparison of (a) biomass density and (b) percentage of chlorophyll α in the HAPB under different molar ratios of TC to TN.

3.3.4 营养物质优化后微藻生物膜的生长特性研究

考虑到优化后的营养物质的有效性与适应性,本文选取普通小球藻 *Chlorella vulgaris* FACHB-31 和斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* FACHB-417 两种藻种进行了生长实验研究,并将其与光合作用进行对比,如图 3.7 所示,对于光合自养生长,虽然两种微藻的叶绿素 α 含量较高,但细胞的生长速率较慢,生物质密度较低,普通小球藻与斜生栅藻的生物质密度分别只有 69.63 g m^{-2} 与 65.05 g m^{-2} ,但是,加入葡萄糖碳源后,尤其当无机碳与有机碳摩尔比为 20:1,总碳与总氮

摩尔比为 72:1 时, 两种藻种细胞活性较好, 生长繁殖较快, 获得的生物质密度分别可高达 91.31 g m^{-2} 与 91.91 g m^{-2} , 这可能是因为异养生长辅助的条件下, 藻细胞直径较大, 生物膜结构疏松, 且细胞内叶绿素 α 含量偏少, 因此在同步光合自养-异养微藻生物膜内具有更强的光穿透能力 (3.31 节的结论), 同时, 多孔介质生物膜内的孔隙率较高, 营养物质的传输能力较强, 藻细胞的生化反应效率越高, 进一步增加了生物量的积累^[198]。为了深入明确优化后的营养物质的实验效果, 本文采用了 BG11 与 33 mM 葡萄糖的物质组合对普通小球藻进行培养作为实验对照组, 此时无机碳与有机碳的摩尔比为 29:1, 总碳与总氮的摩尔比为 96:1, 实验结果表明采用优化后的营养物质对普通小球藻进行生长实验, 其比生长速率高达 0.08 h^{-1} , 比实验对照组提高了 78%, 此外, 微藻异养生长的生物质密度明显低于光合自养组与同步光合自养-异养组, 这有可能是因为异养生长方式并不适用于生物膜体系中, 与悬浮式微藻培养体系相比, 生物膜内空间较小, 溶解氧供应不足, 细胞活性较差, 导致生物膜密度较低。



(a)

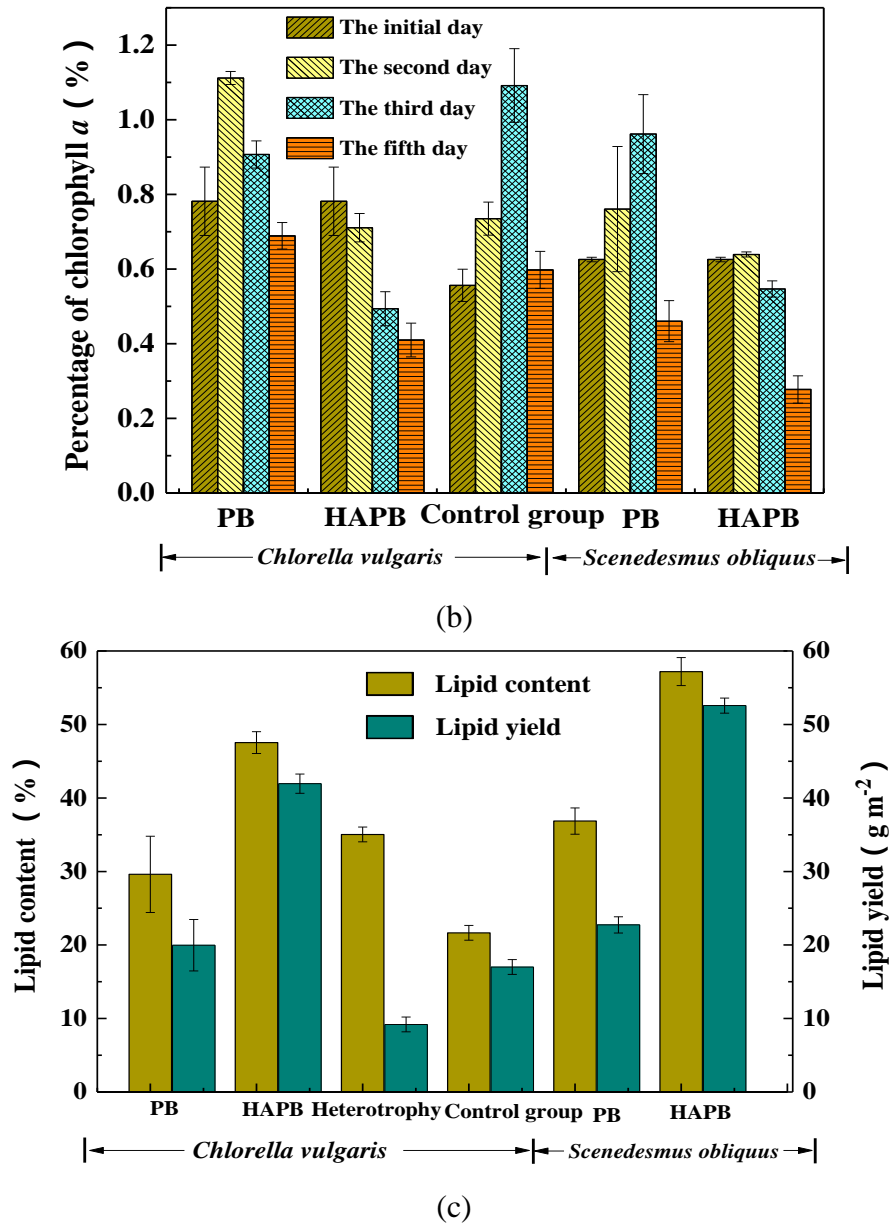


图 3.7 (a)不同实验条件下微藻生物膜的最高生物量密度、最大比生长率、(b)叶绿素 α 含量、
(c)脂质含量与微藻生物膜产量的比较

Fig.3.7 Comparison of (a) the highest biomass density, maximum specific growth rate, (b) chlorophyll a content of the microalgae biofilm, and (c) lipid content and production of microalgae biofilm under different experimental conditions.

不同实验工况对普通小球藻和斜生栅藻的产油情况如图 3.7c 所示，采用优化后的营养物质对两种藻种进行同步光合自养-异养培养后，小球藻和斜生栅藻的油脂含量分别高达 47.53% 和 57.19%，比实验对照组分别提高了 120% 和 147%，该值远远高于已有的实验研究，例如，Rincon^[199]等提出了一种以甘油和尿素为碳氮源的新型微藻生物膜反应器，研究发现当甘油浓度为 2 g L⁻¹ 和 5 g L⁻¹ 时，油脂含

量分别只有 $13\pm0.02\%$ 和 $23.91\pm0.03\%$ ；Zhang^[200]等设计了一种生物膜辅助生长的新型跑道池，用于废水处理与生物质生产，实验结果表明微藻细胞的油脂含量在 18.59-19.37% 之间；Miranda^[201]等研究了天然生物膜、光合作用生物膜和藻类/蓝藻生物膜等作为新一代生物能源原料的潜力，结果表明这些生物膜的油脂含量仅仅在 6-18% 之间。

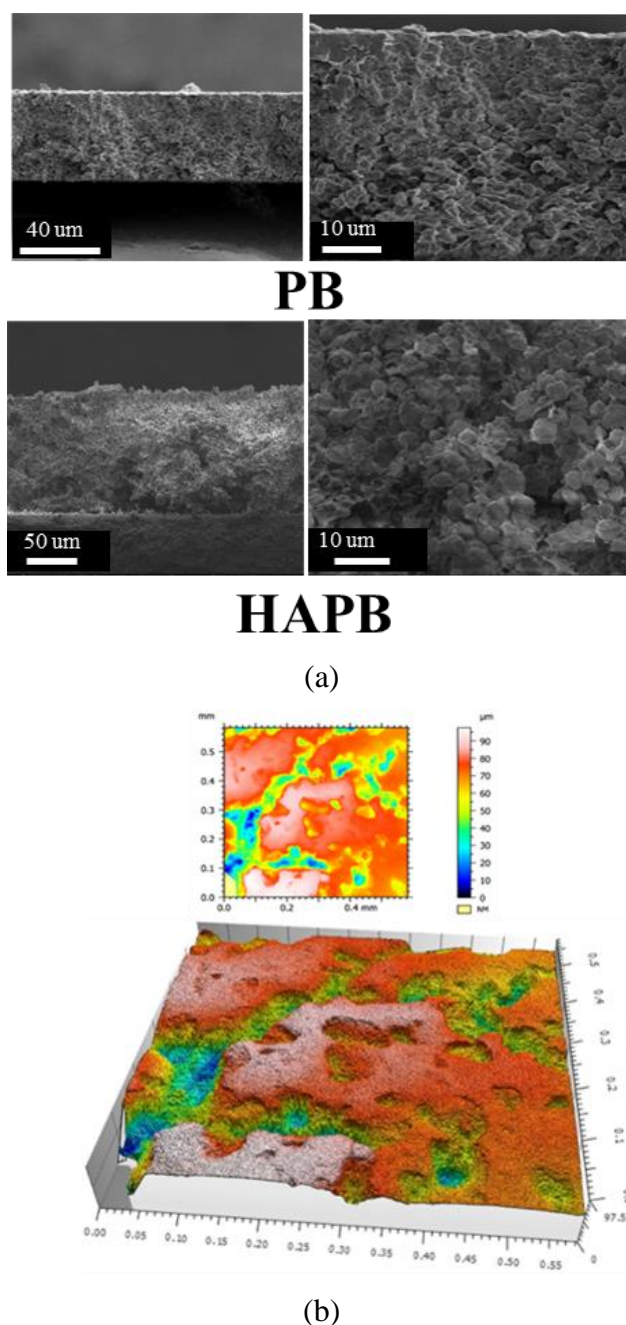


图 3.8 普通小球藻 HAPB 的显微形态和三维重构

Fig.3.8 Micromorphology and 3D reconstruction morphology of the HAPB

最后, 本文采用 NanoFocus 移动式 3D 共聚焦显微镜对普通小球藻生物膜进行了断层扫描和三维重构, 获得了微藻生物膜的完整形貌图, 如图 3.8 所示, 生物膜作为一个多重多元的多孔介质体系, 存在着复杂的多孔通道和表面形貌, 该技术不仅可以完整地复原生物膜 3D 立体影像, 还能有效地开展膜内微观结构的定性分析。综上所述, 优化后的营养物质组合对微藻生物膜的生长与产油具有明显的促进作用, 对清洁可再生微藻生物柴油的生产具有重要的指导意义。

3.4 本章小结

本章基于同步光合自养-异养微藻生物膜的多因子生长动力学模型对生长所需营养物质进行了优化调控, 首先研究了不同碳氮源、无机碳与有机碳摩尔比以及总碳与总氮摩尔比对微藻生物膜生长的影响, 根据微藻生物物质密度和油脂含量的高低确定了营养物质的最优组合, 然后, 为了明确同步光合自养-异养生物膜与单纯光合自养生物膜的光穿透特性的差异, 本文设计了一系列梯度光强的多组实验对两者进行了充分比较。得到的主要结论如下:

- ① 与光合自养微藻生物膜相比, 同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透能力更强, 提高了 64%。
- ② 采用优化后的营养物质对微藻生物膜进行培养, 细胞的比生长速率比优化前提高了 78%, 油脂含量与产量为 47.53% 和 41.95 g m^{-2} , 分别提高了 120% 和 147%。
- ③ 同步光合自养-异养微藻生物膜内结构更疏松、孔隙率更高, 有利于气体与营养物质的传输与转化。

4 基于微电极技术的微藻生物膜的生长环境检测及调控研究

4.1 引言

微藻生物膜内有着复杂的微观结构和生化反应过程，一般很难准确可靠地获取生物膜膜内的特征参数。对于生物膜内部的参数测量，通常有三种方法，第一种是直接采用悬浮液微生物进行研究，将处于游离生长条件下的实验参数作为生物膜的相关参数，虽然学者们普遍意识到该方法不能完全替代生物膜内部参数，但由于其方法简单，操作容易，目前仍被广泛使用；由于直接采用游离微生物进行研究来获取生物膜相关参数会由于悬浮细胞与吸附式细胞之间的活性差异等而导致生物膜参数的不准确性，因此学者们提出了第二种方法即在测量生物膜内部参数过程中，首先对微生物进行生物膜培养，然后将取出的生物膜破碎，用水冲洗，使得微生物在游离状态下进行研究，与第一种方法相比，该方法更具优越性，可避免由于不同生存环境而带来的生理差异，能够更加准确的获得生物膜内的相关参数。但是，由于生物膜内部结构复杂，存在流体通道与多孔空隙，采用生物膜破碎的方法会破坏生物膜固有的结构特性，对生物膜参数获取的准确性还有待研究；第三种方法是在没有破坏生物膜结构的条件下，基于生物膜自身特有的微观结构进行研究，相当于原位测量，具有高度的准确与可靠性，1986年，Rittmann提出了一种原位测量生物膜内部的动力学参数的研究方法，根据 Atkinson 提出了标准溶液可得多组无量纲变量，进而生成标准曲线，通过生物膜反应器培养获得相应的数据，将这些数据取对数与标准曲线进行拟合就可以确定半饱和常数和最大比增长速率，即该方法只需将反应器中的底物浓度与物质通量与标准曲线对比即可，操作简单，方便使用。与前两种方法相比，该方法在基于生物膜微观结构的基础上综合考虑了生物膜内部传质阻力对生化反应速率的影响，得到了越来越多学者的青睐。

针对生物膜参数测量的第三种方法，微电极技术由于具有灵敏度高、操作简单、选择性等诸多优势在电化学和生物电化学等领域得到了迅速的发展，此外，在污水处理领域、环境分析与检测等领域也到了广泛的应用。微电极-微型传感器，其探头的尖端直径可达到微米级别（精确至 $1\ \mu\text{m}$ ），可以测量微观浓度场的分布特性以及微观特征参数的分析等，而特征参数的分布由于微生物的种类、活性、种群分布及生存环境紧密相关，从而为生物膜内部微观结构的研究提供了新的视角。Rincon^[199]等设计了一种采用压力梯度驱动传质的新型生物膜反应器对普通小球藻在以甘油和尿素分别为有机碳与有机氮的混养条件下进行培养，除了测量生物物质密度、油脂含量和脂肪酸成分含量之外，还借助微电极测量技术分析了微藻生物

膜内溶解氧与 pH 的分布情况,实验结果表明当甘油浓度为 2 g L^{-1} 和 5 g L^{-1} 时,小球藻的生产力分别为 $9.27 \pm 0.47 \text{ g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 和 $12.64 \pm 0.94 \text{ g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$,油脂含量分别为 $13 \pm 0.02\%$ 和 $23.91 \pm 0.03\%$,此外,生物膜剖面测量表明,生物膜上表面溶解氧浓度高达 3.5 mg L^{-1} ,生物膜底部的溶解氧低至 1.4 mg L^{-1} ,而 pH 在微藻生物膜剖面内没有明显的变化,有光照时 pH 在 7.5 左右,无光照时 pH 在 6.8 左右。Li^[99]等利用微型传感器测量了多孔基质生物膜光生物反应器中人造生物膜剖面内光照、溶解氧和 pH 等分布特性,实验结果表明根据入射光照强度的不同,最大溶解氧浓度位于生物膜剖面内的 50-150 μm 之间,当光照为 $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, CO_2 浓度为 5% 时,最大溶解氧浓度可高达 3.2 mM,随着光照强度和 CO_2 的增加,生物膜表面上的光合效率逐渐提高,生物膜剖面内溶解无机碳的浓度梯度表明 CO_2 可用性对光合作用具有重要的影响作用,此外,研究发现暗呼吸作用是微藻细胞生长速率随着时间慢慢降低的主要原因,该研究结果有利于我们充分地了解光合自养生物膜内的环境变量与代谢过程的复杂动力学行为,对多孔基质生物膜光生物反应器的高效设计具有重要的理论指导作用。Bishop^[202]等采用溶解氧微电极对生物膜包埋物 K-carrageenan 凝胶颗粒进行了氧扩散研究,发现 O_2 在生物膜的有效扩散系数与在主体溶液中的扩散系数差别显著,其中, O_2 在生物膜表面的有效扩散系数高达主体溶液的 90%,而且随着生物膜厚度的增加而逐渐降低,甚至低至主体溶液的 20%。Akihiko^[203]等利用膜曝气生物膜反应器处理高浓度含氮废水时发现溶解氧在生物膜的扩散深度为 300-700 μm ,而生物膜整体厚度为 1600 μm ,实验结果表明生物膜内存在着无氧区,在反应器中可以同时进行硝化与反硝化作用。

在同步光合自养-异养微藻生物膜培养系统中,暴露于光照条件下的生物膜表面的微藻细胞主要通过光合作用进行生长,在消耗气相 CO_2 的同时会产生大量的 O_2 ,其可能通过膜表面直接逸出或通过扩散作用进入生物膜内部被再次生化转化,这是因为在生物膜底部处于黑暗区,藻细胞主要利用葡萄糖有机物进行异养生长,该过程需要消耗大量的 O_2 ,同时,呼吸作用还会产生代谢气体 CO_2 , CO_2 气体可能直接溶解于培养液也有可能扩散至生物膜表面被藻细胞的光合作用利用,总之,同步光合自养-异养微藻生物膜内存在着复杂的物质代谢与生化反应,尤其 CO_2 与 O_2 的异向传递与相互转化,使得生物膜剖面处溶解氧和 pH 分布与单纯光合自养生物膜截然不同,因此,为了进一步地了解微藻生物膜内部的物质迁移行为与生化转化效果,本章采用了丹麦 Unisense 定制的微米级别的微电极测试系统对生物膜剖面处的溶解氧与 pH 进行了测量,对生物膜内的微观传质与反应机理有了进一步地认识,之后,对微藻生物膜的生长环境进行了优化调控,旨在通过强化生物膜内物质传输来提高微藻生物物质密度。

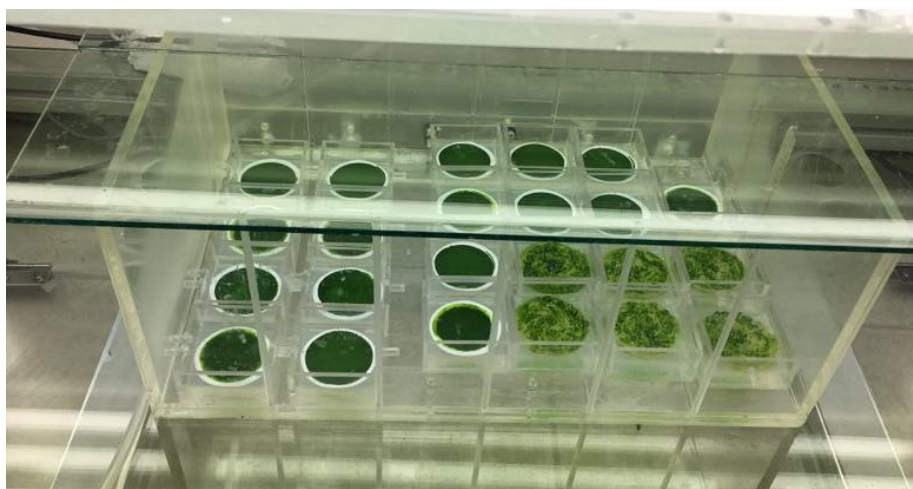
4.2 材料与方法

4.2.1 藻种与培养基

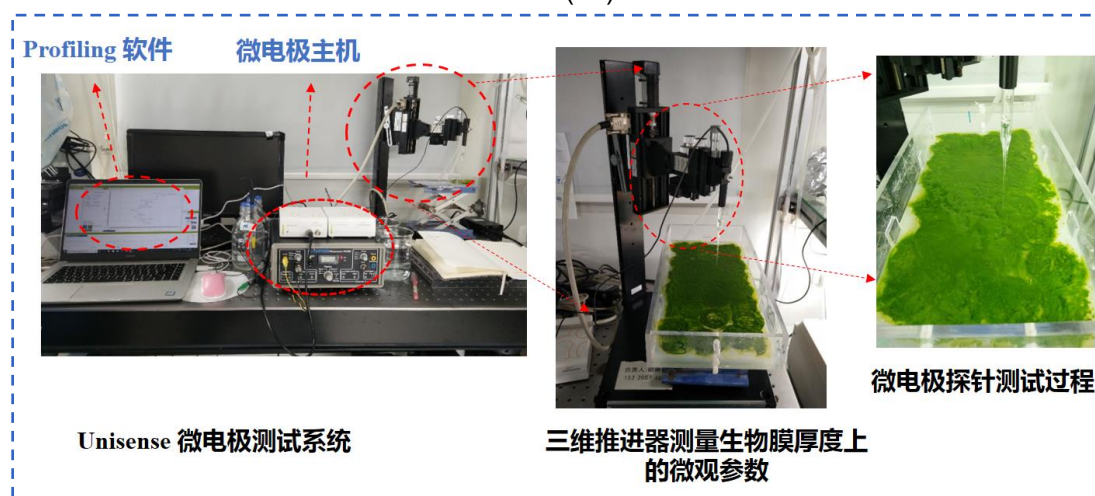
藻种和培养基与 2.21 节所述一致。

4.2.2 实验系统

本章采用的微藻生物膜反应器如图 4.1 所示，24 个有机玻璃方盒置于一个有机玻璃箱体内，每个小方盒内吸附一片生物膜，吸附载体为琼脂固体培养基，在固体培养时琼脂是最好的固体剂，琼脂本身并不提供任何营养，它是一种高分子的碳水化合物，从红藻等海藻中提取，仅溶解于热水，成为溶胶，冷后（40℃ 以下）即凝固为固体状成凝胶。总共有 24 片微藻生物膜，箱体上表面被透明玻璃覆盖，荧光灯光源从有机玻璃箱体的上表面进行光照，培养过程中持续向大腔室内通入 CO_2 和 O_2 的混合气体。



(a)



(b)

图 4.1 微藻生物膜 (a) 培养系统与 (b) 微观特征参数的测试系统

Fig. 4.1 Microalgae biofilm (a) culture system and (b) test system of microscopic characteristic parameters

4.2.3 方案设计

本文首先研究了在不同琼脂浓度下单片膜反应器与多片膜反应器在不同浓度琼脂培养基培养条件下微藻生物膜的生长情况,如图 4.2 所示,单片膜反应器指微藻膜片单独放在小型有机玻璃盒中,多片膜反应器是指很多片微藻生物膜共同放进一个有机玻璃方盒中,膜片与膜片之间没有单独隔离,同时置于相同的琼脂固体培养基上表面。此外,采用丹麦 Unisense 微电极测试技术测量了微藻生物膜内溶解氧(DO)与 pH 的分布情况以及两者随着时间的变化规律,并与单纯光合自养生物膜进行对比,通过生物膜内微观特征参数的变化特征来说明异养生长对光合自养的辅助作用,最后,通过对气相环境中的 CO_2 与 O_2 浓度比进行优化来实现对微藻生物膜的生长调控。

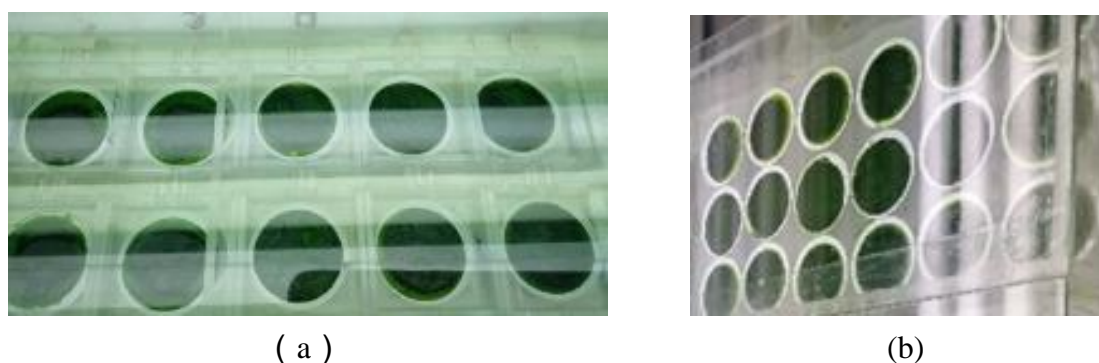


图 4.2 微藻 (a) 单片膜培养系统与 (b) 多片膜培养系统

Fig. 4.2 Microalgae (a) single film culture system and (b) multiple film culture system

4.2.4 分析方法

① 溶解氧微电极测试方法

1) 本章采用的是丹麦 Unisense 微米级别的溶氧微电极测试系统,尖端直径 $25\ \mu\text{m}$ 。开启 PA2000 和三维推进马达控制系统的电源开关,逆时针调节“Gain”到底,然后将 Display 旋钮调至 POL.1 档,调节极化电压为 -0.8V ,再将旋钮转到 Signal.1 档,若不是零点就用螺丝刀调节 Offset 键到 0,之后将电极连接至 PA2000 主机,注意,氧电极至少极化 2 h 以上。极化时分两种情况:(1) 在两次操作的间隙,将电极清洗后置于空气中,待显示器中的读数稳定;(2) 电极长时间不使用时,在下次操作开始前,将电极置于空气中约 2 h 直至读数稳定,在极化过程中,显示器读数呈下降趋势。

2) 氧电极零校正溶液配制方法:

a. 制备抗坏血酸钠和氢氧化钠溶液,终浓度均为 $0.1\ \text{M}$ (约 2 g 抗坏血酸钠加入到 100 ml 的 $0.1\ \text{M}$ 的氢氧化钠溶液中),搅拌片刻后让水静止。这种零校正液

在密闭容器中可贮存 1-2 周，将微电极（带保护套管）置于溶液中，等待信号稳定，用自来水冲洗微电极（仍带保护套管）。

b. 用无氧惰性气体（如 N_2 ）强力冒泡充气，强力冒泡持续一段时间，确保所有氧气都已经溢出，同时也要保证在冒泡期间要避免水体和氧气的任何接触，否则氧气将会持续不断地进入到水体中去，这意味着在实际应用时水体上部必须密闭，除了开一个小孔，比微电极的杆要稍稍粗一点，其他部分都必须是密闭的，可以有效地防止环境中的空气进入容器。

c. 可以采用很多别的方法获取零度数。一种酵母溶液能在 30 min 内耗尽所有的氧气，或者含有活性污泥的小体积容器也可以变成无氧状态。

3) 零校正与饱和校正方法

零校正：将溶解氧电极探针放入充满零校正溶液的容器（如离心管）中，等信号稳定后马上按下“Add Point”键，注意零校正时浓度值一定要设为 0。

饱和校正：取一定量与待测溶液温度和盐度相同的溶液，用空气泵泵入空气 20 min，通气过程中控制校正溶液温度与待测样品保持一致，按饱和校正框旁边的“ O_2 ”键，输入温度和盐度，Profiling 软件自动生成相应的饱和浓度值，将电极放入饱和溶液中待信号稳定按“Add Point”键，最后，按下“Applied calibration”键生成标准曲线。

由于溶氧微电极对氧气浓度呈线性反应，故两点校正就已经足够，在适当的时间间隔检查并重复校正，以确保所有的测量都能被校正到正确的浓度。若微电极是新的，校正则更为频繁；而旧的、使用较多的微电极则只需要每隔 24 h 校正 1 次，推荐最好保持微电极在测量期间进行校正。

4) 样品测量：校正完成后清洗电极，将电极放在空气中极化，把校正残留在电极中的大量氧气先消耗掉，待信号稳定后即可测量样品，首先将带有保护管的电极水平置于一垂直面，固定住电极后端，将保护管沿着垂直面缓慢抽出，固定在三维推进器上，进入测量界面，先设定测量间隔，测量时间为 5 s，测量步径应大于或等于探头的尖端直径 25 μm ，注意不能长时间测量，通常整个测试过程的数据最好不要超过 7000 个。测量结束后按 Finish 键，软件自动生成 Excel 表格。

尽管 Unisense 微电极是用玻璃制作的，但其尖端具有一定的柔韧性，可以轻微弯曲，具有一定的坚固性，可以应用于沉积物甚至是坚硬的组织。但是，在微电极顶端与固体基质接触过程中，微电极如果发生横向移动，会使玻璃尖端破碎。由于微型微电极顶部尺寸很小、很多环境中溶氧梯度急剧升降，因此微电极顶部即使位移几微米也会改变当时的溶氧环境。因此，测量应当只在稳定支架上进行，此支架应当固定在结实的桌子上，没有移动和震动装置。

② pH 微电极测试方法

1) 本章采用的是丹麦 Unisense 微米级别的 pH 微电极测试系统, pH 微电极尖端直径为 25 μm , 与溶氧微电极不同, 由于电位反映了溶液的酸度, pH 微电极必须与参比电极一起使用, 而且要接到高阻抗的毫伏表上, 当电极头浸入水溶液并通过高阻抗的毫伏表连接到参比电极上时, pH 电极头与参比电极之间会产生电位, 此电位就是溶液的酸度, pH 微电极的尖端应当一致保存在水溶液中, 暴露在空气中不能超过 10 min, 参比电极是一个简单的开放式的带有凝胶稳定电解质的 Ag-AgCl 电极, 参比电极的作用是相对于电位传感器建立一个基准电位。

2) 校正: 分别制取 pH=4, pH=6.86, pH=9.18 的缓冲液各 30 mL, 将 pH 微电极与参比电极放入同一个 (3 种) pH 缓冲液中, 保证缓冲液的 pH 范围能涵盖所有要测的样品, 记录每种 pH 缓冲液的信号强度, pH 微电极应当在这些点之间呈线性反应 (斜率为 50-70 mV/pH), 在之后的测量过程中, 毫伏读数可利用校正值线性转化为 pH 值。

3) 样品测量: 校正结束后就可以开始测量样品, 在 Prifiling 软件中设置读数间隔, 等待时间, 下降步径等相关参数, 将 pH 微电极和参比电极同时放入同一个待测样品中开始进行测量。

③ 微藻生物物质密度

微藻生物膜生物量的测量步骤与 2.24 节所述一致。

④ 微藻细胞色素含量

色素含量的测定与 3.24 节所述一致。

⑤ 细胞油脂含量

油脂含量的测定与 3.24 节所述一致。

⑥ 生物膜含水率

将空白滤膜置于琼脂固体培养基上吸附一段时间至饱和状态, 称其湿重为 m_1 , 取出反应器中吸附过微藻的滤膜, 将其称重称其湿重为 m_2 , 加入一级去离子水洗净滤膜上的微藻, 烘干后称微藻干重 m_3 , 则单位干重微藻的含水率 W 的计算如公式 (4.1) 所示:

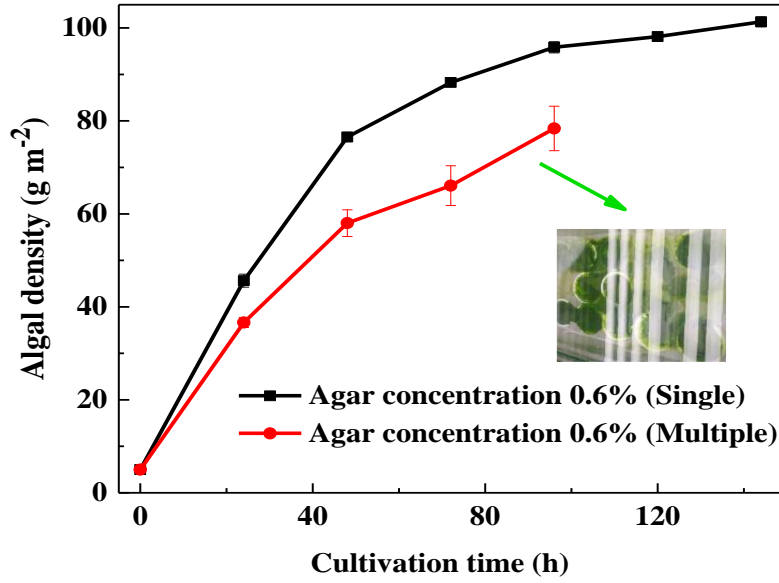
$$W = \frac{m_2 - m_1 - m_3}{m_3} \quad (4.1)$$

4.3 实验结果与分析

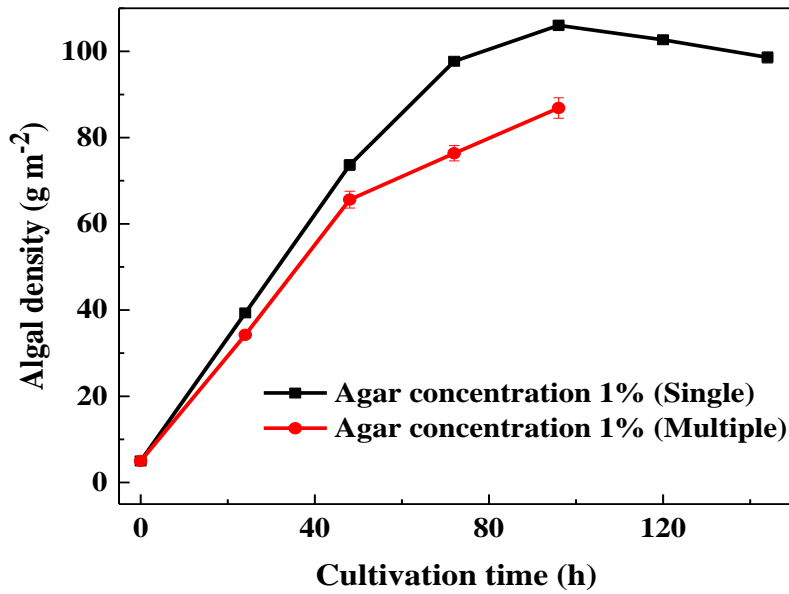
4.3.1 同步光合自养-异养微藻生物膜内溶解氧与 pH 的分布特征

本文在研究同步光合自养-异养微藻生物膜内微观特征参数之前, 对微藻分别采用了单片与多片生物膜培养方式, 通过观察微藻的生长状况和系统的稳定性选择最适宜微藻生物膜生长的培养系统, 用于后续生物膜内微观参数测量的实验研

究，两种培养方式对微藻生物膜生长的影响如图 4.3 所示。



(a)



(b)

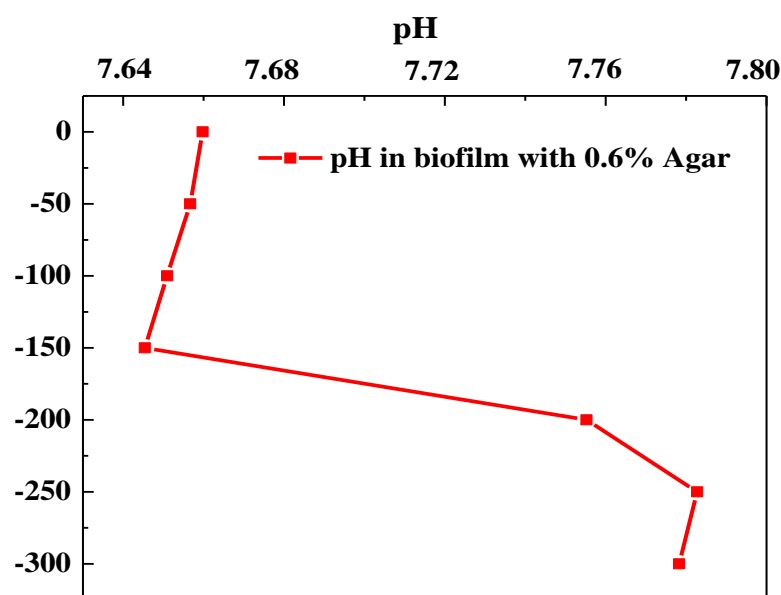
图 4.3 微藻 (a) 单片膜培养系统与 (b) 多片膜培养系统的生长情况

Fig. 4.3 Biomass density of (a) single film culture system and (b) multiple film culture system

当琼脂浓度为 0.6% 时，采用单片生物膜反应器生长的微藻生长速率更快，生物质积累更多，从初始的 5 g m^{-2} 快速长到 101.32 g m^{-2} (144 h)，而多片生物膜共同培养的生物膜系统生长情况较差，在生长初期，细胞生长缓慢，生物质密度逐渐增加，在 96 h 时生物质密度为 78.38 g m^{-2} ，然而，在生长后期，实验发现生物

膜反应器中积累着大量的水，一部分是由藻细胞自身代谢产生，一部分是由反应器内水分蒸发产生，过多的水导致生物膜被淹没，微藻细胞四处散开，无法准确可靠地对其生物质密度进行测量，同理，当琼脂浓度为 1% 时，采用单片生物膜反应器培养的微藻从初始 5 g m^{-2} 快速增加至 106.03 g m^{-2} (96 h)，而多片生物膜反应器的生物质密度达到 86.87 g m^{-2} (96 h) 之后就积累了大量的水，生物膜表面被破坏，微藻冲散形成悬浮液，使得后续的测量步骤无法进行。因此，考虑到微藻生物质积累与培养系统稳定性的综合影响，本文选用单一生物膜膜片培养系统即共处于同一个气相环境腔室内的每一片微藻生物膜被单独存放，彼此隔开的反应器用于后续实验研究。

为了进一步了解同步光合自养-异养微藻生物膜内的微观传质和反应机理，本文借助丹麦 Unisense 微米级别的微电极测试系统对生物膜内的微观特征参数进行了测量，主要观察了溶解氧 DO 和 pH 在生物膜剖面上的分布情况，如图 4.4 所示。



(a)

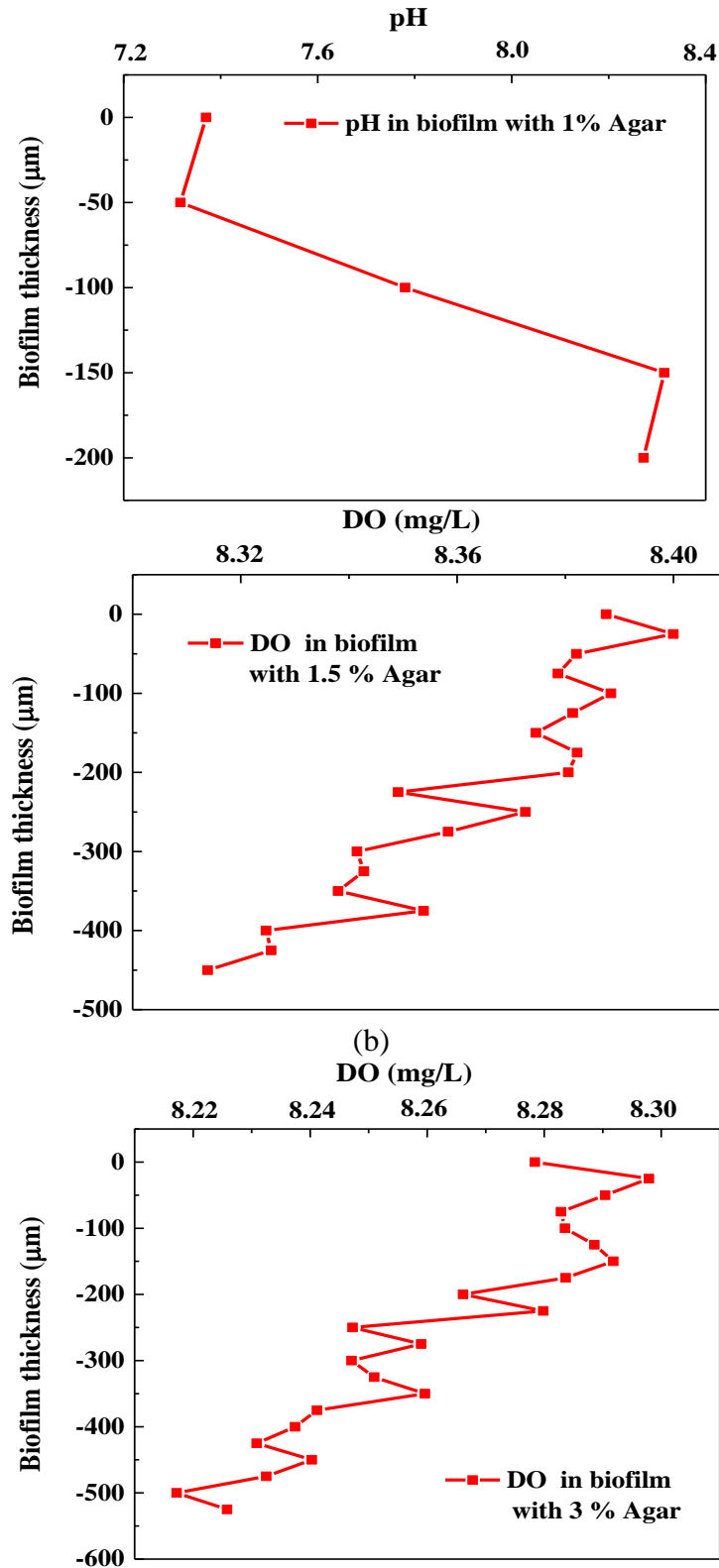


图 4.4 微藻生物膜内 DO 和 pH 分布情况 (a) 0.6%琼脂生物膜内的 pH (b) 1%琼脂生物膜内的 pH (c) 1.5%琼脂生物膜内的 DO (d) 3%琼脂生物膜内的 DO

Fig. 4.4 DO and pH depth profiles of *Chlorella vulgaris* biofilm (a) pH in biofilm with 0.6% agar (b) pH in biofilm with 1% agar (c) DO in biofilm with 1.5% agar (d) DO in biofilm with 3% agar

由图 4.4 可知, 生物膜内 pH 偏中性, 其波动范围为 7.62-7.66, 该结果是合乎常理的, 因为已有文献证明当微藻光合自养时, pH 值明显上升, 当微藻异养生长时, pH 值显著下降, 当微藻同时利用无机碳 CO_2 与有机碳进行兼养生长时, pH 值则偏中性。

光合自养: $\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{C}_{(\text{biomass})} + 1/2 \text{O}_2 + 3 \text{OH}^-$

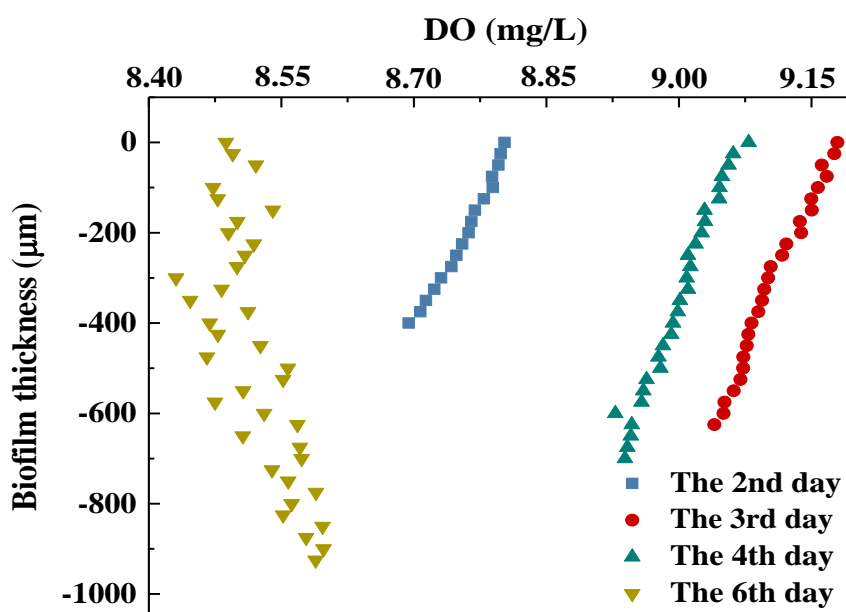
异养生长: $(1 + a) \text{C}_2\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow (\text{biomass}) + a \text{CO}_2 + ($

兼养生长: $b \text{HCO}_3^- + c \text{C}_2\text{H} - ab + (c - a) (\text{biomass}) + 3 \text{OH}^-$

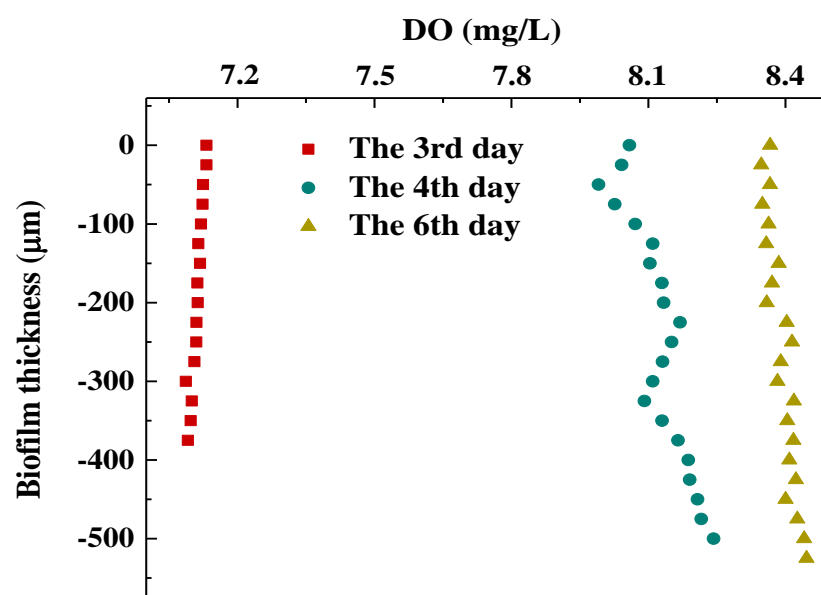
尽管微藻生物膜内的 CO_2 浓度不能够直接测量, 但是通过对液体培养液进行高效液相色谱分析发现液相中并不存在任何发酵型代谢产物, 因此微藻生物膜内的 pH 值变化主要取决于 CO_2 的可用性。在微藻生长过程中, 当气相 CO_2 向生物膜内溶解时会电离出大量的 HCO_3^- 和 H^+ , 由于生物量不断积累, 细胞对 CO_2 的消耗增加, 导致 H^+ 大大减少, pH 值呈现出逐渐上升的趋势, 然而, 在同步光合自养-异养微藻生物膜内同时进行着光合作用与异养生长, 光合作用产生的 O_2 通过扩散进入生物膜底部供细胞呼吸作用, 而异养代谢产生的 CO_2 又会到达生物膜上表面供细胞光合自养, 换言之, 与光合自养生物膜相比, 同步光合自养-异养生物膜具有复杂的气相环境与代谢路径, 可以根据自身发展的需要调整 CO_2 用量进行调整, 使得生物膜内部始终保持中性环境。本文中当采用 1% 琼脂固体培养基对生物膜进行培养时, pH 值的波动范围更大, 在 7.31 与 8.31 之间变化, 这是因为琼脂浓度越高, 固体培养基表面越干涸, 细胞含水量越低, 生物膜越薄, 光照的有效穿透性更好, 光合作用更强, 最终导致生物膜体系的 pH 值不断上升, 高达 8.31, 相反, 当琼脂浓度为 0.6%, 固体培养基表面越湿润, 细胞吸收较好, 含水量较高, 生物膜厚度较厚, 光照区的藻细胞主要进行光合作用, 黑暗区的藻细胞偏向异养生长, 最终导致生物膜内的 pH 值偏中性, 没有明显的变化。类似地, Rincon^[199]等利用甘油和尿素对普通小球藻生物膜进行兼养培养时发现, 在光照条件下生物膜内的 pH 值在 7.5 左右波动, 呈中性。综上所述, 当微藻生物膜内同时进行光合自养和异养生长时, 培养体系保持中性环境。

由于丹麦 Unisense 微电极测试系统可以在不破坏生物膜结构的前提下对微观特征参数进行考察, 具有良好的实时响应能力, 因此本文采用尖端直径为 25 μm 的溶解氧微电极对生物膜内的溶解氧浓度进行了测量。同步光合自养-异养微藻生物膜内的溶解氧浓度分布如图 4.4 所示, 虽然生物膜内 DO 浓度随着厚度的增加不断降低, 但是整体波动不明显。当琼脂浓度为 1.5% 时, DO 浓度波动范围为 8.399 - 8.314 mg L^{-1} , 当琼脂浓度为 3% 时, DO 浓度在 8.298 与 8.217 mg L^{-1} 之间, 可以从两个方面对此现象进行解释, 一方面, 普通小球藻细胞呈圆球形, 由细胞堆积产生的生物膜内结构疏松, 具有较多的孔洞、通道与空隙等, 使得溶解氧的传质

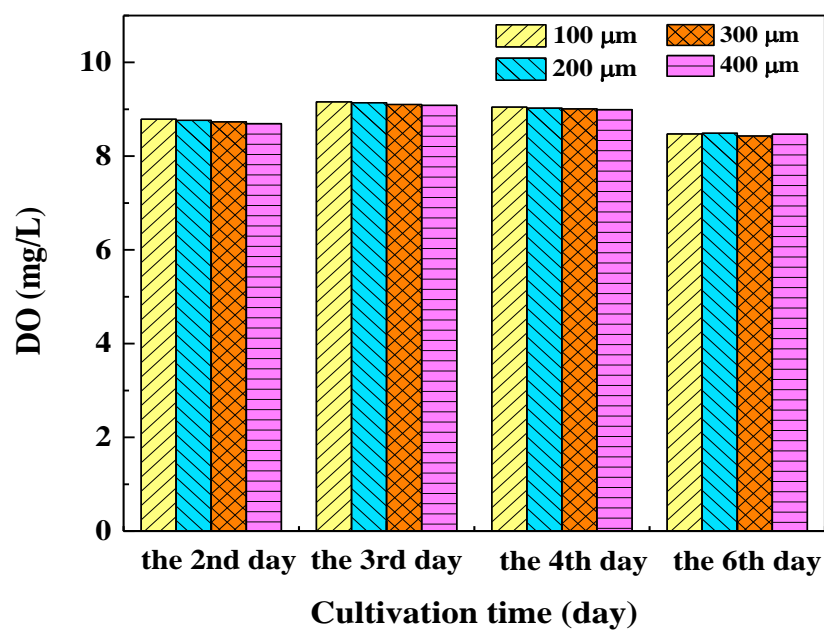
系数较高，浓度分布较一致，且同步光合自养-异养生长条件普通小球藻细胞直径更大，更加圆润饱满，使得生物膜内的溶解氧浓度分布更均匀。另一方面，本次实验的气相环境中的 O_2 浓度为 20% (v/v)，供给较多，浓度梯度较大，扩散作用较强， O_2 从生物膜表面向底部传输较迅速，最终浓度分布比较均匀。此外，本实验中生物膜内的 DO 浓度的平均值为 8.3 mg L^{-1} ，是一种非典型的微藻生物膜氧浓度分布特征，Bernstein^[69]等利用新型的旋转生物膜反应器对微藻生物膜进行了光合作用和呼吸作用研究，实验发现当利用大气且光照强度为 $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 时，在微藻生物膜厚度 250-500 μm 处，最大 DO 浓度高达 20 mg L^{-1} ，Li^[99]等在光强为 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ， CO_2 浓度为 5% 时，生物膜厚度方向 100-300 μm 处，最大 DO 浓度高达 40 mg L^{-1} ，对于本文而言，生物膜内 DO 浓度远远低于前两者，说明了在同步光合自养-异养微藻生物膜内由于同时存在进行光合自养与异养生长作用， CO_2 和 O_2 之间可能存在内部循环机制，导致生物膜内 DO 浓度明显低于光合自养生物膜。Grama^[204]等通过对 *Dactylococcus dissociatus* MT1 进行悬浮式光异养培养也发现了此类现象。



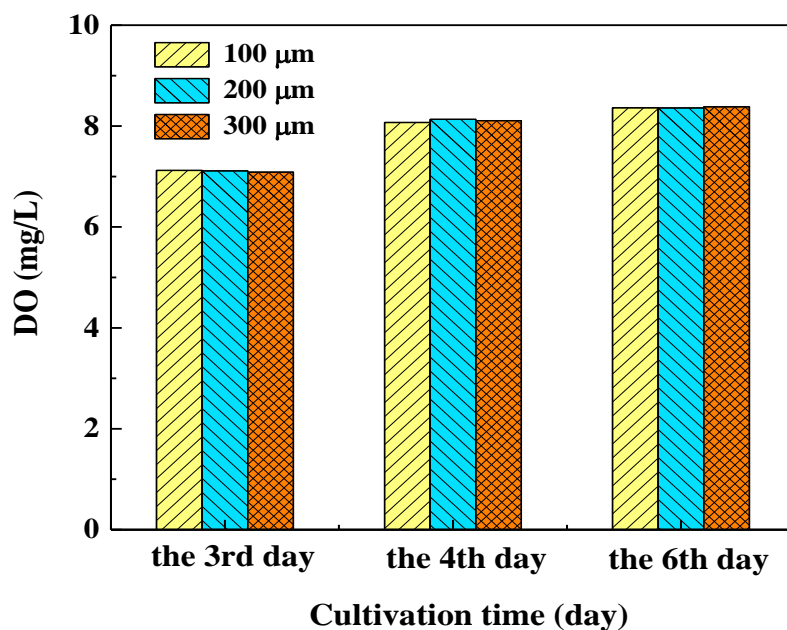
(a)



(b)



(c)



(d)

图 4.5 微藻生物膜内 DO 的变化情况 (a) 同步光合自养-异养微藻生物膜内 DO 变化 (b) 光合自养微藻生物膜内 DO 变化 (c) 同步光合自养-异养微藻生物膜某一厚度处的 DO 变化 (d) 光合自养微藻生物膜某一厚度处的 DO 变化

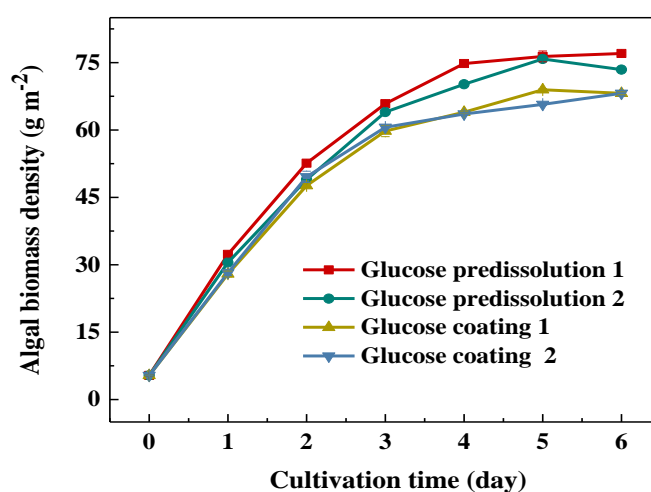
Fig. 4.5 Changes of DO in the microalgae biofilm (a) changes of DO in the biofilm of photoautotrophic-heterotrophic biofilm (b) changes of DO in the biofilm of photoautotrophic biofilm (c) changes of DO at a certain thickness of the biofilm of photoautotrophic-heterotrophic biofilm (d) changes of DO at a certain thickness of the biofilm of photoautotrophic biofilm

为了进一步了解同步光合自养-异养微藻生物膜内微观特征参数的变化规律，本文研究了微藻生物膜内溶解氧随时间的变化以及生物膜某一厚度处溶解氧的浓度变化，如图 4.5 所示，并与纯光合自养微藻生物膜进行了对比，实验结果表明在同步光合自养-异养微藻生物膜内的溶解氧浓度随着生物膜厚度的增加缓慢降低，原因可能是微藻生物膜底层光照受到限制，藻细胞主要进行糖降解作用维持自身生长，因此耗氧量更多，溶解氧浓度更低，而纯光合自养微藻生物膜内的溶解氧浓度比较均匀。在生长稳定期，同步光合自养-异养微藻生物膜的厚度为 925 μm ，比纯光合自养微藻生物膜厚度（525 μm ）提高了 76%，这是因为在同步光合自养-异养微藻生物膜内，接受光照的生物膜表面主要以光合作用进行生长，而在生物膜底层的黑暗区域，藻细胞以糖降解作用为主，来维持自身的呼吸代谢，且光合作用产生的 O_2 异养生长释放的 CO_2 会在生物膜多孔结构内进行异向传递和再次生化转化，形成一个内部循环，也就是说光合自养与异养生长同时存在且相互促进，因此，在同步光合自养-异养微藻生物膜内细胞活性更好，生物膜厚度更高。此外，

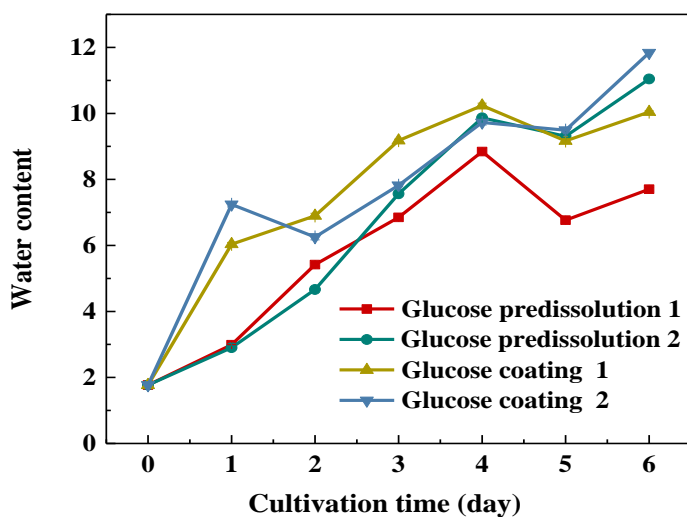
通过研究生物膜某一厚度处溶解氧浓度随时间的变化情况可以发现纯光合自养生物膜某厚度处溶解氧浓度随时间的增加而增大，而光合自养-异养生物膜某厚度处溶解氧浓度随时间的增加先增大后降低，这是因为在光合自养生物膜内，藻细胞进行光合作用产生的 O_2 在生物膜内不断积累，无法利用，因此溶解氧浓度越来越高，而在光合自养-异养生物膜内，在生长初期，生物膜较薄，藻细胞主要进行光合作用，产生的 O_2 在生物膜体系内逐渐增加，但是在生长后期，生物膜厚度较厚，膜底层存在黑暗区，藻细胞倾向于异养生长作用，在有氧条件下不断对糖类有机物进行降解，导致溶解氧浓度降低。

4.3.2 葡萄糖利用方式对微藻生物膜生长及膜内 pH 分布的影响

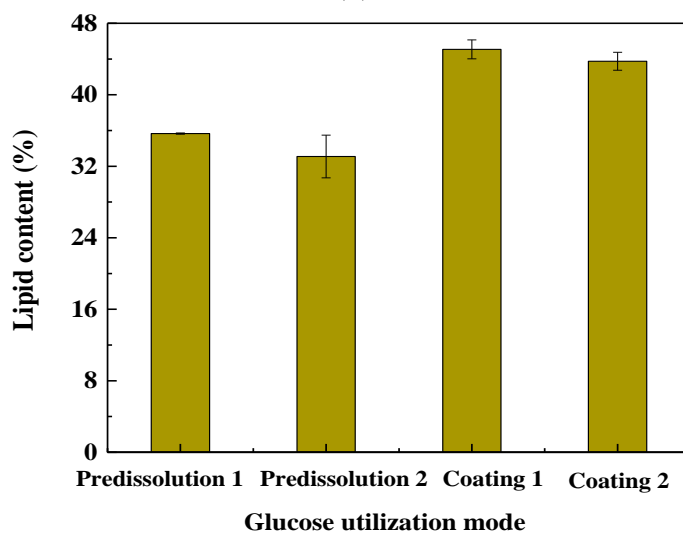
为了优化与调控同步光合自养-异养微藻生物膜的生长环境，本文分别采用了葡萄糖预溶解与葡萄糖涂抹两种方法对微藻生物膜进行生长实验，其中，针对于葡萄糖预溶解的方法，本文设置了 5 g L^{-1} 和 10 g L^{-1} 两个浓度，相应地，葡萄糖涂抹法设置了两个等量的实验工况，实验结果如图 4.6 所示，当预溶解的葡萄糖浓度为 5 g L^{-1} ，微藻生物膜密度的最大值为 77.02 g m^{-2} ，而采用涂抹等量葡萄糖法培养的生物膜密度仅仅只有 68.95 g m^{-2} ，降低了 10%，类似地，当预溶解的葡萄糖浓度为 10 g L^{-1} ，微藻生物膜密度的最大值为 75.81 g m^{-2} ，而采用涂抹等量葡萄糖法培养的生物膜密度仅仅只有 68.16 g m^{-2} ，降低了 10%。也就是说，采用涂抹法进行葡萄糖浓缩式微藻培养并不能提高物质密度，反而降低了 10%，发生这种现象的原因可能是与葡萄糖预溶解相比，葡萄糖集中涂抹法虽然可以提高微藻在生长初期对葡萄糖的利用率，但氧化反应生成的丙酮酸会在三羧酸循环作用下进一步分解为草酰乙酸和琥珀酸等各种酸性物质，使得生物膜内 pH 明显降低，不适合藻细胞进行正常生长，严重影响了藻细胞的生理活性，导致物质密度较低。



(a)



(b)



(c)

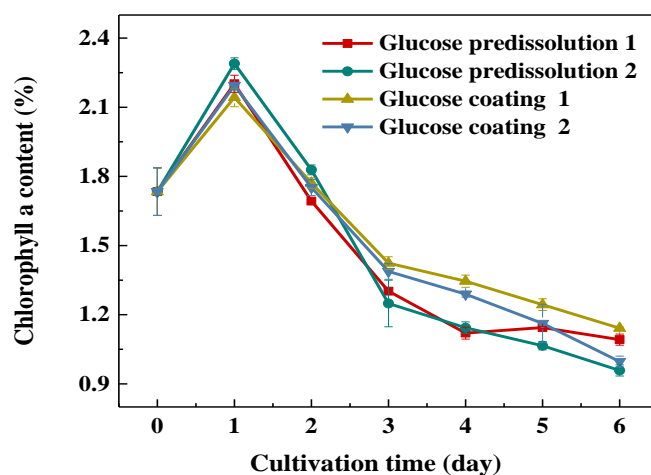
图 4.6 两种葡萄糖利用方式下微藻生长情况 (a) 生长曲线

(b) 生物膜含水率 (c) 油脂含量

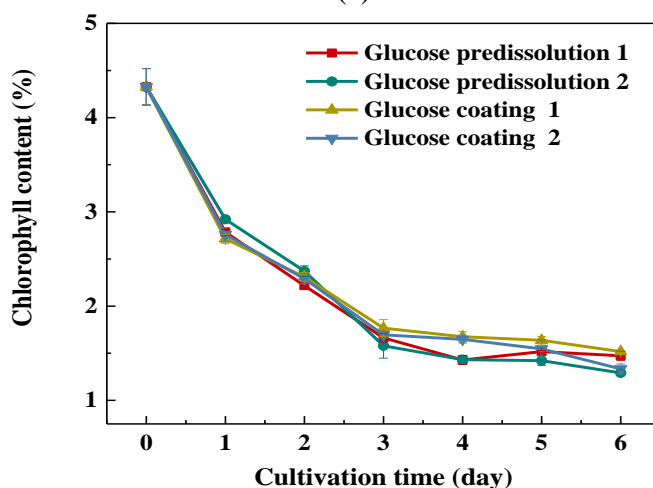
Figure 4.6 Microalgae growth under the two glucose utilization methods (a) growth curve (b) water content of biofilm (c) lipid content

由于微藻的光合作用以 H_2O 为底物，而异养生长又会代谢产生 H_2O ，因此，研究微藻生物膜生长过程中含水率的变化规律可进一步地了解生物膜内的生化反应机制，由图可知，生物膜含水率均随着培养时间的增加逐渐提高，尤其在生长第一天，采用葡萄糖涂抹法培养的微藻生物膜含水率明显高于葡萄糖预溶解实验组，当预溶解的葡萄糖浓度为 5 g L^{-1} 时，生物膜含水率为 2.989，而采用等量涂抹法培养的生物膜含水率为 6.035，提高了 102%，类似地，当预溶解的葡萄糖浓度为 10 g L^{-1} 时，生物膜含水率为 2.903，而采用等量涂抹法培养的生物膜含水率为

7.241, 提高了 149%, 说明采用葡萄糖涂抹法对微藻生物膜进行培养时, 在细胞生长初期, 主要进行异养生长作用, 这是因为异养培养除了分泌酸性物质之外, 还能产生大量的水, 因此, 生物膜内含水率较高, 整体物质浓度更均匀。此外, 葡萄糖利用方式对微藻生物膜产油影响如图 4.6c 所示, 在同等和 2 倍葡萄糖用量条件下, 葡萄糖预溶解获得的油脂含量分别为 35.66% 和 33.10%, 而葡萄糖涂抹法获得的油脂含量分别为 45.08% 和 43.75%, 分别提高了 26% 和 32%, 也就是说葡萄糖涂抹法更有利于油脂积累, 这是因为与葡萄糖预溶解于琼脂培养基相比, 将高浓度浓缩的葡萄糖溶液涂抹于固体琼脂培养基表面可大大减小了葡萄糖大分子的传质阻力, 细胞利用更快, 异养生长更强, 因此油脂积累更快, 含量更多。



(a)



(b)

图 4.7 两种葡萄糖利用方式下微藻光合色素的变化情况 (a) 叶绿素 α 的变化规律 (b) 叶绿素总含量的变化规律

Figure 4.7 Changes in photosynthetic pigments of microalgae under two glucose utilization modes (a) changes in chlorophyll α (b) changes in total chlorophyll content

叶绿素作为一种吸收、传递及转化光能的色素分子，与细胞的光合作用有着密切的联系，其含量高低与细胞光能转化效率在一定范围内呈正比关系。当叶绿素含量较高时，细胞光合作用较强，生长速率较快，当叶绿素含量较低时，光合作用较弱，生长速率缓慢。叶绿素主要包括叶绿素 α 与叶绿素 b ，其中，叶绿素 α 对细胞的光能利用具有重要的影响作用。为了研究葡萄糖利用方式对微藻生物膜内光合自养生长的影响，本文研究了叶绿素 α 和叶绿素总含量随时间的变化情况，如图 4.7 所示，叶绿素 α 含量均随着培养时间的增加先增加后降低，叶绿素总含量均呈现出一直升高的趋势，每组实验工况下光合色素的变化规律相同，说明不同的葡萄糖利用方式对微藻色素的影响不大，这可能是因为本实验中生物膜厚度较薄（薄至 $250\ \mu\text{m}$ ），光照比例大，光合色素可以充分吸收利用光子，因此各组实验工况之间的叶绿素含量差别不大。

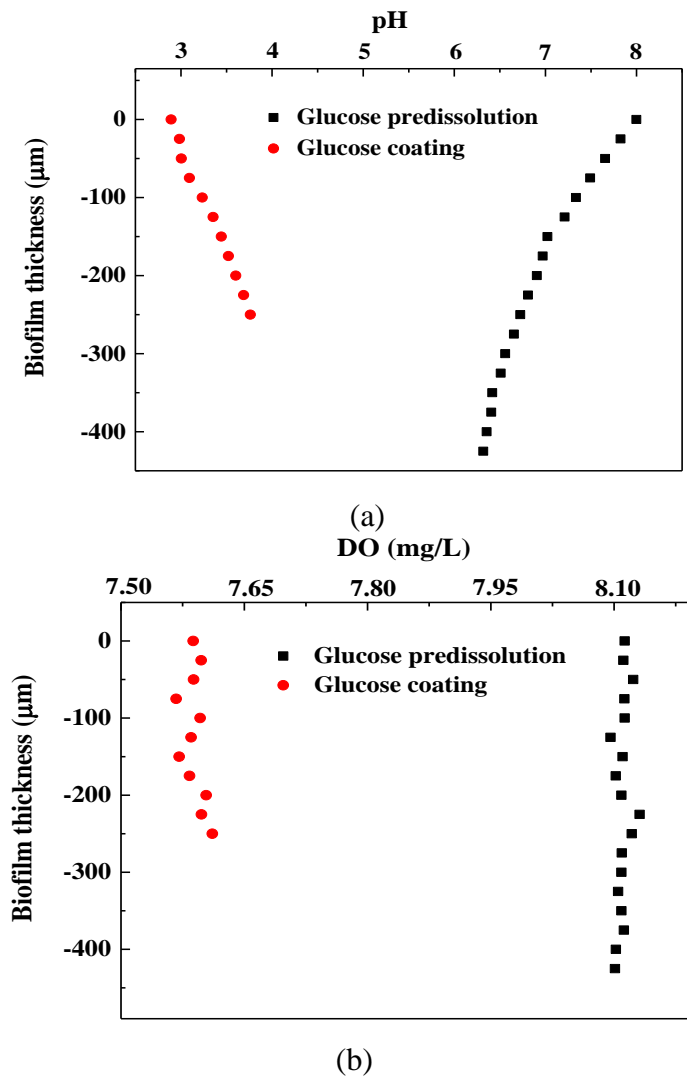


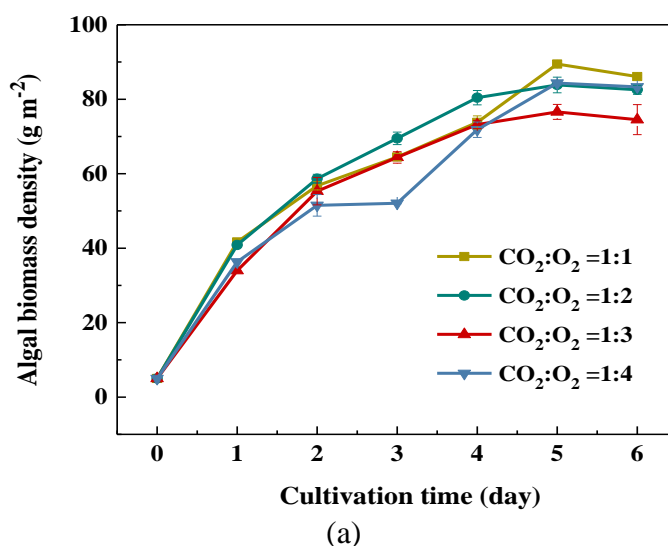
图 4.8 两种葡萄糖利用方式下微藻生物膜内的 (a) pH 和 (b) DO 变化情况

Fig. 4.8 Changes of (a) pH and (b) DO in microalgae biofilm under two glucose utilization modes

为了进一步地了解生物膜内的物质传输与反应机理, 本文对葡萄糖预溶解与涂抹两种方式生长的生物膜分别进行了溶解氧与 pH 的测定, 如图 4.8 所示, 以葡萄糖预溶解方式进行生长的微藻生物膜内的 pH 值从生物膜表面的 7.9 降到 6.4, 而以葡萄糖涂抹法生长的生物膜的 pH 值从 2.9 逐渐升至 3.7, 发生这种现象的原因可能是预先溶解于琼脂固体培养基内的大分子葡萄糖向微藻生物膜内的传输阻力较大, 消耗利用不彻底, 生物膜底层藻细胞的异养生长作用较弱, 故 pH 没有明显降低, 而采用葡萄糖喷涂法进行微藻培养时, 琼脂表面薄薄一层葡萄糖液膜由于易于传输, 传质更强, 更有利于微藻细胞的吸收转化, 此时藻细胞主要进行异养生长, 对葡萄糖进行氧化降解, 其中, 葡萄糖经过糖酵解转化为丙酮酸, 然后, 在有氧条件下进行三羧酸循环转化成柠檬酸、草酰乙酸和琥珀酸等酸性物质, 经过浓度梯度驱动与自由扩散等作用, 这些酸性物质充分溶解于生物膜, 使得生物膜内的 pH 值明显降低, 生物膜整体酸性化, 而适宜细胞生长的 pH 范围是 6.5-7.5, 因此, 此时微藻生物膜整体生长情况较差, 且在实验过程中发现细菌污染的现象很严重, 生物膜厚度只有 250 μm 。另外, 由图可知, 葡萄糖预溶解方式进行生长的微藻生物膜内的 DO 浓度范围为 8.10-8.03 mg L^{-1} , 而以葡萄糖喷涂法生长的生物膜的 DO 浓度范围为 7.56-7.61 mg L^{-1} , 原因可能是采用葡萄糖喷涂法生长的生物膜异养生长作用更强, 在同等生长条件下, 消耗的氧气量更多, 因此, 生物膜内的溶解氧浓度更低。此外, 在这两种培养方式下微藻生物膜内的溶解氧浓度梯度不明显, 这是因为生物膜厚度较薄, 孔隙率较高, 传质效果好, 因此生物膜内的溶解氧呈现出浓度均一性。

4.3.3 气相环境 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜生长及膜内 pH 分布的影响

为了明确微藻生物膜光合自养与异养生长的各自优势, 进一步提高微藻生物膜物质产量, 本文研究了不同 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜生长的影响。



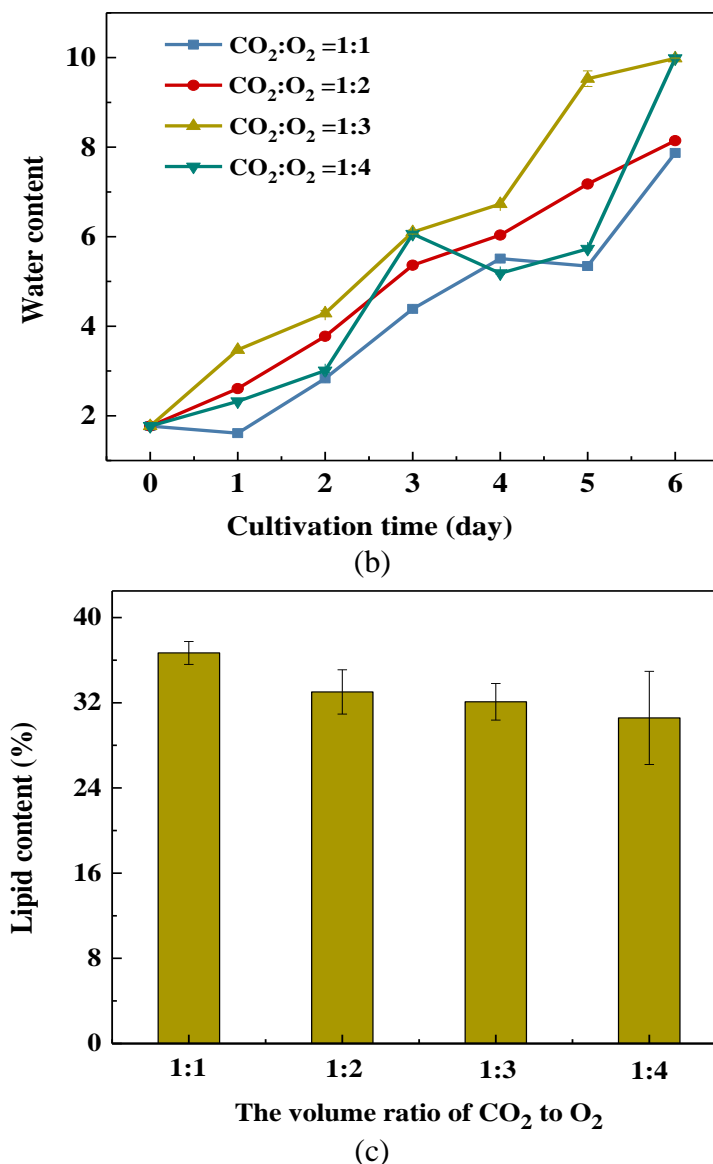


图 4.9 不同 CO₂ 与 O₂ 比例对微藻生物膜 (a) 生物质密度 (b) 含水率 (c) 油脂含量的影响
 Fig. 4.9 Effects of different ratios of CO₂ to O₂ on (a) biomass density (b) moisture content and (c) lipid content

由图可知, 不同 CO₂ 与 O₂ 比例对微藻生物膜密度没有明显的影响, 当 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:1 时, 最大生物量为 89.4358 g m⁻², 当 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:2 时, 最大生物量为 83.840 g m⁻², 当 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:3 时, 最大生物量为 76.608 g m⁻², 当 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:4 时, 最大生物量为 84.33758 g m⁻², 实验结果表明 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:1 时已经能够分别满足细胞光合自养与异养生长的需求, 继续提高 O₂ 的供应量对微藻生物膜的生长没有促进作用, 发生这种现象的可能原因是本文实验采用的是琼脂固体培养基, 生物膜底层完全与固体接触, 当 CO₂ 与 O₂ 比例为 1:1 时, 环境中供应的气相与生物膜内部代谢产生的气体足够支撑微藻细胞的生长,

若继续提高 O_2 的用量, 则对细胞没有明显的促进作用, 与微藻生物膜生长动力学实验的研究类似, 当 CO_2 为 2% 时, 生物膜的生长已经达到饱和状态, 若继续提高 CO_2 的供应量, 对微藻生物膜并没有显著的影响, 此外, 发生这种现象的原因还有可能是本文所采用的微藻生物膜反应器结构设计不合理, 传质阻力较大, 不利用气相物质的传输与转化, 因此, 单纯提高 CO_2 或 O_2 的浓度并不能明显提高微藻生物膜的生物量, 若想进一步地提高反应器内的气相传质能力, 后续实验需要借助中空纤维膜或气液分离膜等有利于气体吸收的高效反应器装置。

不同 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜含水率的影响如图 4.9 所示, 生物膜含水率随着培养时间的增加而增加, 呈现出逐渐递增的趋势, 且不同气相物质比例对生物膜含水率的影响没有明显的区别。实验开始时, 每组微藻生物膜的初始含水量均一致, 当 CO_2 与 O_2 比例为 1:1 时, 微藻生物膜在生长稳定期的含水率为 7.87, 当 CO_2 与 O_2 比例为 1:2 时, 微藻生物膜含水率为 8.14, 当 CO_2 与 O_2 比例为 1:3 时, 微藻生物膜含水率为 9.98, 当 CO_2 与 O_2 比例为 1:4 时, 微藻生物膜含水率为 9.98。生物膜含水率逐渐递增可从两个方面进行解释, 一方面, 微藻细胞初始接种时, 琼脂培养基营养充分, 浓度梯度较大, 且培养基表面湿润, 细胞可以快速吸收利用营养盐, 生理活性较好, 因此, 生物膜含水率逐渐增加。另一方面, 随着培养时间的增加, 琼脂培养基中的水分被大量吸收与转化, 一定程度上阻碍了藻细胞的光合作用, 此时微藻细胞能够进行实时反馈与自我调整, 根据自身的生长需求代谢分泌出相应的产物, 因此, 在生物膜生长稳定期至后期, 生物膜含水率快速增加。此外, 不同 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜含水率的影响没有明显区别, 这是因为对于本试验的微藻生物膜光生物反应器而言, 低浓度的 O_2 足够支持细胞的异养生长作用, 此时生物膜内的光合自养与异养生长已经达到相对平衡的状态, 因此, 继续提高 O_2 浓度对生物膜含水率没有显著的影响。

通常提高气相环境中 O_2 浓度会增强细胞异养生长作用, 进而增加细胞内的油脂含量, 为了进一步明确 O_2 浓度与油脂之间的作用关系, 本文研究了微藻生物膜内油脂含量随时间的变化情况, 如图 4.9c 所示, 由图可知当细胞内油脂含量随 O_2 浓度的增加而降低, 当 CO_2 与 O_2 体积比从 1:1 变化到 1:4 时, 细胞内的油脂含量从 36.68% 降至 30.8%, 原因可能是对于同步光合自养-异养微藻生物膜而言, CO_2 与 O_2 体积比为 1:1 时已经能够满足细胞进行正常的异养生长作用, 继续提高 O_2 浓度, 不仅对微藻生物膜生长没有明显地促进作用, 反而抑制了其进一步地生长, 即微藻生物物质密度和油脂含量随着 O_2 浓度的增加而降低。综上所述, 当 CO_2 与 O_2 体积比为 1:1 时就已满足微藻细胞的正常生长需求。

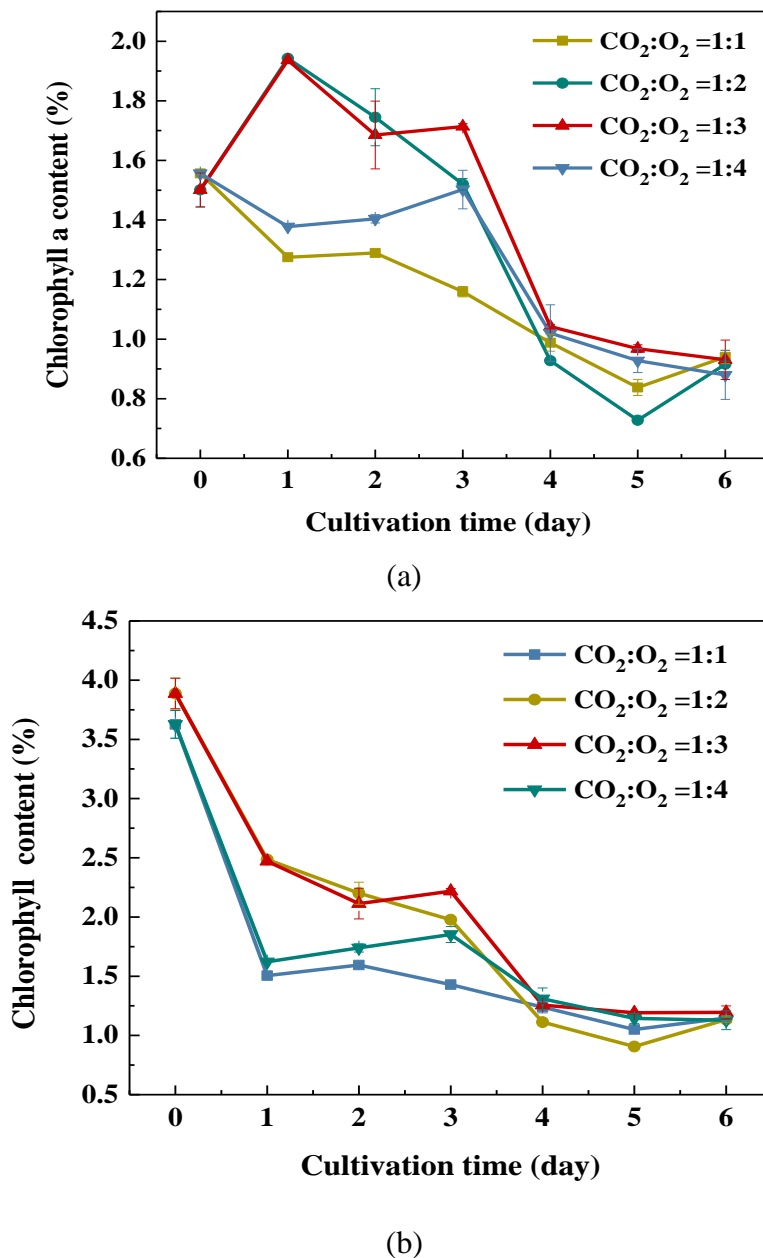


图 4.10 不同 CO_2 与 O_2 比例对细胞叶绿素 α (a) 与总叶绿素 (b) 含量的影响

Fig. 4.10 Effects of different ratios of CO_2 to O_2 on (a) chlorophyll α and (b) chlorophyll content of microalgae

为了进一步地了解微藻生物膜生长过程中光合潜力的变化情况，本文研究了细胞中叶绿素 α 与总叶绿素含量的变化，如图 4.9 所示，叶绿素 α 与总叶绿素含量均随着培养时间的增加而明显降低。当 CO_2 与 O_2 比例为 1:2 和 1:3 时，细胞内的叶绿素 α 含量从初始的 1.5 均快速提高至 1.9，之后逐渐减少，在生长稳定期分别降至 0.92 和 0.93，而当 CO_2 与 O_2 比例为 1:1 和 1:4 时，叶绿素 α 含量一直呈现出逐渐降低的趋势，发生这种现象的可能原因是当 CO_2 与 O_2 比例为 1:2 和 1:3 时，

气相物质比例比较适宜光能利用，细胞倾向于以光合作用进行生长，因此在生长初期，细胞内的叶绿素 α 含量明显提高。而在生长后期，随着细胞的堆积，生物膜厚度增加，细胞的异养生长作用增强，对色素的需求大量减少，因此，叶绿素 α 的合成越来越少。而当 CO_2 与 O_2 比例为 1:1 和 1:4 时，微藻生物膜在生长前期和生长后期均偏向于异养生长，细胞内叶绿素 α 含量逐渐降低，但是此时的叶绿素 α 含量与其他实验组大致相同。对于叶绿素总含量而言，无论采用哪种气相比比例，叶绿素含量均逐渐降低，生长第二天， CO_2 与 O_2 比例为 1:1 和 1:4 时叶绿素总含量下降速率更快，在生长稳定期和后期，所有实验工况的叶绿素含量均逐渐下降并趋于稳定，本文可从两个方面对此现象进行解释，首先，随着培养时间的增加，生物膜厚度较厚， CO_2 的传质阻力较大，光合作用受到了阻碍，使得叶绿素的合成逐渐减少，其次，气相环境中的 O_2 与细胞代谢产生的 O_2 在生长过程中逐渐积累，过多的 O_2 会破坏叶绿素结构使其含量降低。

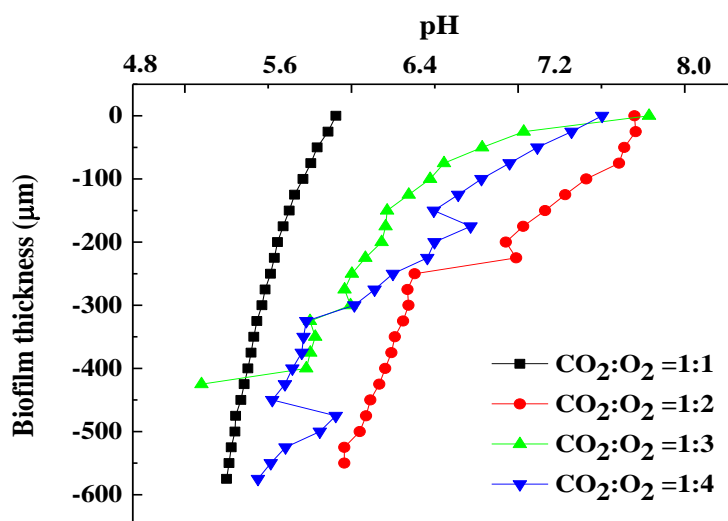


图 4.11 不同 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜内 pH 分布的影响

Fig. 4.11 Effects of different ratios of CO_2 to O_2 on pH distribution in microalgae biofilm

通常提高微藻生长气相环境中的 O_2 浓度会改变生物膜内细胞的代谢途径，使其满足自身的生长需求，不同 CO_2 与 O_2 体积比对同步光合自养-异养微藻生物膜内 pH 分布的影响如图 4.11 所示，无论气相物质体积比多高，微藻生物膜内的 pH 均呈现出逐渐降低的趋势，当 CO_2 与 O_2 比例为 1:1 时，微藻生物膜厚度为 575 μm ，pH 变化范围为 6.3-5.8；当 CO_2 与 O_2 比例为 1:2 时，微藻生物膜厚度为 525 μm ，pH 变化范围为 7.6-6.3；当 CO_2 与 O_2 比例为 1:3 时，微藻生物膜厚度为 425 μm ，pH 变化范围为 7.8-5.6；当 CO_2 与 O_2 比例为 1:4 时，微藻生物膜厚度为 600 μm ，pH 变化范围为 7.6-5.2。pH 值随着生物膜厚度增加而明显降低是因为生物膜内部

同时进行着光合作用与呼吸作用，在生物膜表面上，接收光强的微藻细胞主要进行光合作用，而在生物膜底层，处于黑暗区的藻细胞主要通过氧化有机物释放能量维持自身的生长，该过程会产生大量的 CO_2 气体，扩散溶解至生物膜内部，导致生物膜内底层环境偏酸性，越接近生物膜底部，异养代谢越强，pH 越低。当 CO_2 与 O_2 比例从 1:2 变化至 1:4 时，生物膜底层的 pH 值从 6.3 降至 5.2，换言之，随着 O_2 用量的增加，生物膜底层环境的酸性化更严重，这是因为当 O_2 的供应量增加时，生物膜底层中细胞的呼吸速率越高，有机物氧化速度更快，产生 CO_2 更多，导致生物膜内的 pH 值显著降低。此外，由图可知微藻生物膜厚度与 CO_2 与 O_2 用量比例没有明显的线性关系，并不是 O_2 的浓度越高，生物膜厚度就越厚，这是因为生物膜厚度是由细胞活性、光合潜能、氧化反应与外界环境等影响因素共同决定的。

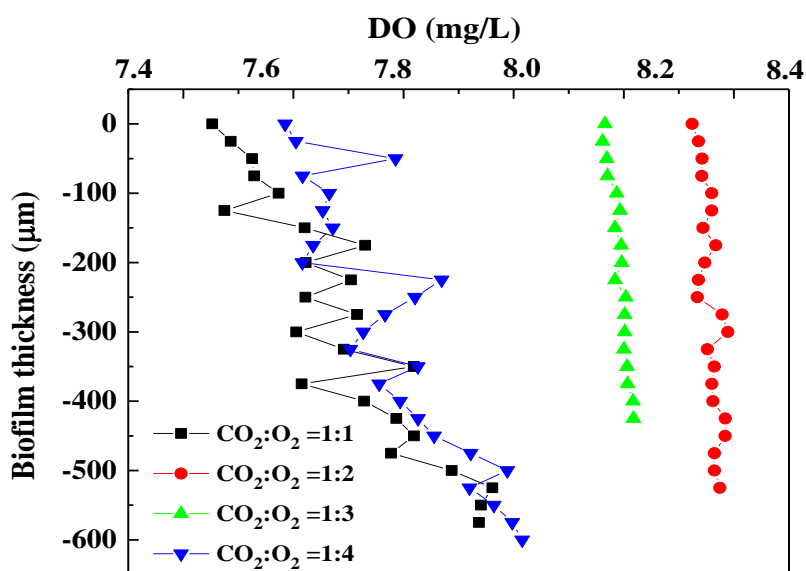


图 4.12 不同 CO_2 与 O_2 比例对微藻生物膜内 DO 分布的影响

Fig. 4.12 Effects of different ratios of CO_2 to O_2 on DO distribution in microalgae biofilm

不同 CO_2 与 O_2 浓度比对微藻生物膜内溶解氧浓度的影响如图 4.12 所示，随着生物膜厚度的增加，溶解氧浓度缓慢增加，当 CO_2 与 O_2 比例为 1:1 时，DO 浓度范围为 $7.45\text{--}7.9\text{ mg L}^{-1}$ ，当 CO_2 与 O_2 比例为 1:2 时，DO 浓度范围为 $8.32\text{--}8.38\text{ mg L}^{-1}$ ，当 CO_2 与 O_2 比例为 1:3 时，DO 浓度范围为 $8.16\text{--}8.21\text{ mg L}^{-1}$ ，当 CO_2 与 O_2 比例为 1:4 时，DO 浓度范围在 $7.58\text{--}8.0\text{ mg L}^{-1}$ 之间。通常在光合自养生长条件下，微藻生物膜内 DO 浓度在 $20\text{--}40\text{ mg L}^{-1}$ 之间^[69, 199]，但是本文的 DO 浓度值更低，这是因为在同步光合自养-异养微藻生物膜内同时存在光合作用与有氧呼吸作用，气相环境中供应的 O_2 与光合作用产生的 O_2 会被细胞的异养生长大量消耗，导致溶解氧

更少，同时，藻种种类与生存环境等也是影响生物膜内微观特征参数分布的主要因素。此外，本实验中，生物膜内的溶解氧浓度变化范围较小，生物膜表面与生物膜底层的 DO 值没有明显的区别，这是因为与已有研究相比，本实验获得的微藻生物膜厚度较薄，且生物膜内部结构疏松，空隙率高，O₂ 传输效果较好，传质能力更强，导致生物膜内的溶解氧浓度差别不大。

4.4 本章小结

本章通过微电极测试技术测量了同步光合自养-异养微藻生物膜内微观特征参数（溶解氧 DO 和 pH）的分布特性，进一步明确了多孔介质生物膜体系内的物质传输与生化转化行为，并通过改善葡萄糖的利用方式与气相物质浓度比对微藻生物膜生长进行优化调控，主要结论如下：

① 生物膜内 pH 呈中性，当琼脂浓度为 0.6% 时，pH 值的波动范围为 7.64-7.77，当琼脂浓度为 1% 时，pH 值在 7.31 与 8.31 之间变化，生物膜内 DO 浓度随着厚度的增加不断降低，但是整体波动不明显。当琼脂浓度为 1.5% 时，DO 浓度波动范围为 8.399-8.314 mg L⁻¹，当琼脂浓度为 3% 时，DO 浓度在 8.298 与 8.217 mg L⁻¹ 之间。

② 采用不同的葡萄糖利用方式对微藻生长并没有明显的促进作用，其中，以葡萄糖预溶解方式进行生长的微藻生物膜内的 pH 值从生物膜表面的 7.9 降到 6.4，而以葡萄糖涂抹法生长的生物膜的 pH 值从 2.9 升至 3.7，生物膜内微环境过酸，导致生物物质密度较低。

③ 不同 CO₂ 与 O₂ 比例对微藻生物膜密度没有明显的影响，当 CO₂ 与 O₂ 体积比为 1:1 时，就已满足同步光合自养-异养微藻生物膜的正常生长需求，其最大生物物质密度与油脂含量分别为 89.43 g m⁻² 和 36.68%。

5 结 论

本文以微藻能源化利用技术中的微藻生物膜式培养为背景，对同步光合自养-异养微藻生物膜的生长特性及优化调控进行了逐步深入的研究。首先，在明确微藻生物膜生长的主要影响因素的基础上，结合复杂动力学方程构建了微藻生物膜生长的综合多因子动力学模型，该模型的建立对微藻生物膜培养系统的评估与应用提供了重要的理论指导作用。其次，基于微藻生物膜生长动力学的研究结果对培养液中的营养物质进行了优化调控，显著提高了微藻生物膜的生物质密度与油脂含量，最后，通过微电极测试技术测得了微藻生物膜内的微观特征参数的分布特征，进一步明确了生物膜内的物质传递与反应机理，并通过改善葡萄糖的利用方式与气相物质浓度比对微藻生物膜进行了生长调控。通过上述工作，得到的主要结论如下：

① 利用梯度浓度营养物质对微藻生物膜进行培养时，微藻生物膜的最大生物质密度随着底物浓度的增加而增加，直至达到饱和生长点，超过饱和点之后，微藻生物膜密度不再明显增加。并构建了微藻生物膜的多因子生长动力学模型，验证实验表明该模型能够精准地评估和预测微藻生物膜生长系统的生产能力，吻合度高达 0.99。此外，通过研究微藻生物膜对营养底物的消耗情况建立了相应的吸收动力学模型，微藻对底物的反应速率常数和半饱和常数分别为：对于葡萄糖的吸收 $k = 0.0518 \text{ (g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$, $K_m = 20 \text{ g L}^{-1}$ ；对于硝酸根的吸收 $k = 2.225(\text{g L}^{-1}) / (\text{g m}^{-2})/\text{h}$, $K_m = 1.177 \text{ g L}^{-1}$ 。

② 与光合自养微藻生物膜相比，同步光合自养-异养微藻生物膜的光穿透能力更强，提高了 64%，采用优化后的营养物质对微藻生物膜进行培养，细胞的比生长速率比优化前提高了 78%，油脂含量与产量为 47.53% 和 41.95 g m^{-2} ，分别提高了 120% 和 147%，此外同步光合自养-异养微藻生物膜内结构更疏松、孔隙率更高，有利于气体与营养物质的传输与转化。

③ 同步光合自养-异养微藻生物膜内 pH 为 7.6 左右，呈中性，溶解氧浓度约为 8.3 mg L^{-1} ，且生物膜内溶解氧浓度随培养时间的增加先增大后降低。同等葡萄糖用量下，涂抹法培养的生物膜中异养生长作用更强，可使油脂含量提高 32%，当 CO_2 与 O_2 体积比为 1:1 时，就已满足同步光合自养-异养微藻生物膜的正常生长需求，其最大生物质密度与油脂含量分别为 89.43 g m^{-2} 和 36.68%。

6 后续研究工作及展望

本文从强化微藻生物膜内的物质传递和提高生物物质密度的角度出发,研究了同步光合自养-异养微藻生物膜的生长动力学特性,结合 Monod 方程构建了生物膜的多因子生长动力学模型,同时建立了微藻生物膜对底物消耗的吸收动力学模型,之后,基于生物膜生长的动力学研究对微藻生物膜生长进行了优化调控。由于微藻生物膜是一个多尺度多过程能质传输与生化反应相互耦合的复杂体系,且实验条件和测试技术还尚不成熟,生物膜培养技术仍处于起步阶段,为了真正实现微藻生物物质的规模化培养与能源化利用,可考虑从以下几个方面开展进一步的研究工作:

① 目前,微藻生物膜接种方式仍然是一个困难瓶颈,很难突破,后续研究可从缩短接种时间、提高牢固性及强化生长等角提出一种新型高效的生物膜接种方法。

② 虽然通过微电极测试技术可以获取生物膜内重要微观特征参数的浓度分布,但其不能实现在线测量,无法获得生物膜内重要物质的动态发展过程与行为,后续研究可以探索一种在线监测生物膜内相关物质动态变化的测量技术。

③ 由于现有的实验技术很难实现对微藻生物膜成膜与生长整个过程的动态变化进行分析,因此可借助于元胞自动机模型考虑光强的非均匀分布、生化代谢反应、细胞生长及衰亡等因素建立更加完善的生物膜生长动力学模型。

④ 关于新型微藻生物膜反应器的研究仍然匮乏,应有针对性地从优化光分布、物质传输、气相利用等方面加强对生物膜反应器的开发,解决微藻生物物质大规模生产的问题。

参考文献

- [1] Hualin Xie , Wei Wang. Spatiotemporal differences and convergence of urban industrial land use efficiency for China's major economic zones[J]. Journal of Geographical Sciences, 2015, 25(10): 1183-1198.
- [2] Jianguo Liu , Peter H. Raven. China's Environmental Challenges and Implications for the World[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2010, 40(9-10): 823-851.
- [3] Dominik Wiedenhofer , Dabo Guan , Zhu Liu. et.al. Unequal household carbon footprints in China[J]. Nature Climate Change, 2016, 7(1): 75-80.
- [4] Wei Wang , Hualin Xie , Tong Jiang. et.al. Measuring the Total-Factor Carbon Emission Performance of Industrial Land Use in China Based on the Global Directional Distance Function and Non-Radial Luenberger Productivity Index[J]. Sustainability, 2016, 8(4): 336.
- [5] Sheng Zhou , Qing Tong , Sha Yu. et.al. Role of non-fossil energy in meeting China's energy and climate target for 2020[J]. Energy Policy, 2012, 51: 14-19.
- [6] Ning Zhang , Xiao Wei. Dynamic total factor carbon emissions performance changes in the Chinese transportation industry[J]. Applied Energy, 2015, 146: 409-420.
- [7] Wen Liu , Henrik Lund , Brian Vad Mathiesen. et.al. Potential of renewable energy systems in China[J]. Applied Energy, 2011, 88(2): 518-525.
- [8] Wei Liu , Hong Li. Improving energy consumption structure: A comprehensive assessment of fossil energy subsidies reform in China[J]. Energy Policy, 2011, 39(7): 4134-4143.
- [9] Girdhar Joshi , Jitendra K. Pandey , Sravendra Rana. et.al. Challenges and opportunities for the application of biofuel[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 79: 850-866.
- [10] Hualin Xie , Yanni Yu , Wei Wang. et.al. The substitutability of non-fossil energy, potential carbon emission reduction and energy shadow prices in China[J]. Energy Policy, 2017, 107: 63-71.
- [11] Yusuf Makarfi Isa , Elvis Tinashe Ganda. Bio-oil as a potential source of petroleum range fuels[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 81: 69-75.
- [12] Pooya Azadi , Robert Malina , Steven R. H. Barrett. et.al. The evolution of the biofuel science[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 76: 1479-1484.
- [13] Wai-Hong Leong , Jun-Wei Lim , Man-Kee Lam. et.al. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production[J]. Renewable and Sustainable Energy

- Reviews, 2018, 91: 950-961.
- [14] Oladapo Martins Adeniyi , Ulugbek Azimov , Alexey Burluka. Algae biofuel: Current status and future applications[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 90: 316-335.
 - [15] Raphael Slade , Ausilio Bauen. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects[J]. Biomass and Bioenergy, 2013, 53: 29-38.
 - [16] Richard Sayre. Microalgae: The Potential for Carbon Capture[J]. BioScience, 2010, 60(9): 722-727.
 - [17] Daniel Chaumont. Biotechnology of algal biomass production – a review of systems for outdoor mass-culture[J]. Journal of Applied Phycology 1993, 5: 593–604.
 - [18] Katsumi Yamaguchi. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review[J]. Journal of Applied Phycology 1997, 8: 487-502.
 - [19] Mayur M. Phukan , Rahul S. Chutia , B. K. Konwar. et.al. Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock[J]. Applied Energy, 2011, 88(10): 3307-3312.
 - [20] Reda A. I. Abou-Shanab , Jae-Hoon Hwang , Yunchul Cho. et.al. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production[J]. Applied Energy, 2011, 88(10): 3300-3306.
 - [21] C. Jansson , T. Northen. Calcifying cyanobacteria--the potential of biomineralization for carbon capture and storage[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 365-71.
 - [22] M. H. Spalding. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: Chlamydomonas inorganic carbon transporters[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1463-73.
 - [23] W. Y. Cheah , P. L. Show , J. S. Chang. et.al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae[J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 190-201.
 - [24] X. G. Zhu , S. P. Long , D. R. Ort. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2): 153-159.
 - [25] Murray R. Badger and G. Dean Price. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1994, 45: 369-392.
 - [26] Facundo-Joaquin Marquez-Rocha. Katarzyna Chojnacka Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2004, 3(1): 21-34.
 - [27] C. Y. Chen , K. L. Yeh , R. Aisyah. et.al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 71-81.

-
- [28] Teresa M. Mata , António A. Martins , Nidia S. Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(1): 217-232.
- [29] Raoqiong Che , Ke Ding , Li Huang. et,al. Enhancing biomass and oil accumulation of *Monoraphidium* sp . FXY-10 by combined fulvic acid and two-step cultivation[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 67: 161-165.
- [30] GuanHua Huang , Feng Chen , Dong Wei. et,al. Biodiesel production by microalgal biotechnology[J]. Applied Energy, 2010, 87(1): 38-46.
- [31] Arief Widjaja , Chao-Chang Chien , Yi-Hsu Ju. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009, 40(1): 13-20.
- [32] S. Y. Chiu , C. Y. Kao , C. H. Chen. et,al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3389-96.
- [33] B. Torpee Cheirsilp, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 510-516.
- [34] S. Venkata Mohan ,M. V. Rohit ,P. Chiranjeevi. et,al. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: progress and perspectives[J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 169-178.
- [35] O. Perez-Garcia , F. M. Escalante , L. E. de-Bashan. et,al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products[J]. Water research, 2011, 45(1): 11-36.
- [36] G. Q. Chen , F. Chen. Growing phototrophic cells without light[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(9): 607-16.
- [37] A.H. Neilson, Lewin, R.A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. [J]. Phycologia, 1974, 13(3): 227-264.
- [38] Z. Wu , X. Shi. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(1): 13-8.
- [39] H. Xu , X. Miao , Q. Wu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(4): 499-507.
- [40] Y. Liang , N. Sarkany , Y. Cui. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(7): 1043-9.

- [41] W. Xiong , X. Li , J. Xiang. et.al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(1): 29-36.
- [42] Wei-Bao Kong , Shao-Feng Hua , Hai Cao. et.al. Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2012, 43(3): 360-367.
- [43] Yiming Zhang Feng Chen, Siyuan Guo. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture.[J]. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(5): 603-608.
- [44] Jiao Zhan , Junfeng Rong , Qiang Wang. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42(12): 8505-8517.
- [45] Shota Tomiyama James C. Ogbonna , Hideo Tanaka. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic–photoautrophic cultivation of *Euglena gracilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1): 213-221.
- [46] Michael A. Borowitzka. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70: 313-321.
- [47] Algal biotechnology products and processes - matching science and economics[J]. *Journal of Applied Phycology* 1992, 4(3): 267-279.
- [48] N. C. Boelee ,M. Janssen ,H. Temmink. et.al. The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 26(3): 1439-1452.
- [49] A. E. Toninelli ,J. Wang ,M. Liu. et.al. *Scenedesmus dimorphus* biofilm: Photoefficiency and biomass production under intermittent lighting[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32305.
- [50] M. Gross ,X. Zhao ,V. Mascarenhas. et.al. Effects of the surface physico-chemical properties and the surface textures on the initial colonization and the attached growth in algal biofilm[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 38.
- [51] Lin-Lan Zhuang , Dawei Yu , Jian Zhang. et.al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 94: 1110-1119.
- [52] M. Gross , Z. Wen. Yearlong evaluation of performance and durability of a pilot-scale Revolving Algal Biofilm (RAB) cultivation system[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 171: 50-8.
- [53] L. Zhang , L. Chen , J. Wang. et.al. Attached cultivation for improving the biomass

- productivity of *Spirulina platensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 181: 136-42.
- [54] P. J. Schnurr , G. S. Espie , D. G. Allen. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136: 337-44.
- [55] B. Podola , T. Li , M. Melkonian. Porous Substrate Bioreactors: A Paradigm Shift in Microalgal Biotechnology?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016,
- [56] Y. Huang , W. Xiong , Q. Liao. et.al. Comparison of *Chlorella vulgaris* biomass productivity cultivated in biofilm and suspension from the aspect of light transmission and microalgae affinity to carbon dioxide[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222: 367-373.
- [57] P. Cheng ,B. Ji ,L. Gao. et.al. The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 138: 95-100.
- [58] O. Jorquera , A. Kiperstok , E. A. Sales. et.al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1406-13.
- [59] Bei Ji , Wei Zhang , Ningning Zhang. et.al. Biofilm cultivation of the oleaginous microalgae *Pseudochlorococcum* sp[J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2014, 37(7): 1369-1375.
- [60] Esther Posadas , Pedro Antonio García-Encina , Antonio Domínguez. et.al. Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 67: 156-164.
- [61] Maureen Kesaano , Ronald C. Sims. Algal biofilm based technology for wastewater treatment[J]. *Algal Research*, 2014, 5: 231-240.
- [62] K. Sukacova , M. Trtilek , T. Rataj. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2015, 71: 55-63.
- [63] Y. Shen ,H. Zhang ,X. Xu. et.al. Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 38(3): 481-488.
- [64] A. Ozkan , K. Kinney , L. Katz. et.al. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor[J]. *Bioresource Technology* , 2012, 114: 542-8.
- [65] J. Shi , B. Podola , M. Melkonian. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 154: 260-6.
- [66] N. C. Boelee ,M. Janssen ,H. Temmink. et.al. Nutrient removal and biomass production in an outdoor pilot-scale phototrophic biofilm reactor for effluent polishing[J]. *Applied*

- Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(1): 405-22.
- [67] P. L. Gupta , S. M. Lee , H. J. Choi. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 31(9): 1409-17.
- [68] Y. Shen , W. Zhu , C. Chen. et.al. Biofilm formation in attached microalgal reactors[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39(8): 1281-8.
- [69] H. C. Bernstein , M. Kesaano , K. Moll. et.al. Direct measurement and characterization of active photosynthesis zones inside wastewater remediating and biofuel producing microalgal biofilms[J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 206-15.
- [70] S. Orandi , D. M. Lewis , N. R. Moheimani. Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(9): 1321-31.
- [71] Logan B. Christenson , Ronald C. Sims. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(7): 1674-1684.
- [72] L. L. Zhuang , H. Y. Hu , Y. H. Wu. et.al. A novel suspended-solid phase photobioreactor to improve biomass production and separation of microalgae[J]. Bioresource Technology, 2014, 153: 399-402.
- [73] Christina N. Economou , Nikolaos Marinakis , Maria Moustaka-Gouni. et.al. Lipid production by the filamentous cyanobacterium *Limnothrix* sp. growing in synthetic wastewater in suspended- and attached-growth photobioreactor systems[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 1941-1948.
- [74] N. Müller. Implementing biofilm carriers into activated sludge process — 15 years of experience[J]. Water Science and Technology, 1998, 37(9): 167-174.
- [75] Gayatri S. Gera , Swati N. Yewalkar , Sanjay Nene. et.al. Kinetic Studies on an Algal Biofilm Reactor for Raw Sewage Water Treatment[J]. Chemical Engineering & Technology, 2016, 39(9): 1629-1635.
- [76] F. Gao , Z. H. Yang , C. Li. et.al. A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent[J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 8-12.
- [77] L. L. Zhuang , Y. Azimi , D. Yu. et.al. Enhanced attached growth of microalgae *Scenedesmus* LX1 through ambient bacterial pre-coating of cotton fiber carriers[J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 643-9.
- [78] Yan Cui Wenqiao Wayne Yuan, Z. J. Pei. Algal Cell-Surface Interaction: An Overview and Preliminary Test [J]. ASME 2009 International Manufacturing Science and

- EngineeringConference, 2009: 33-41.
- [79] Isabel Martín-Girela , María Dolores Curt , Jesús Fernández. Flashing light effects on CO₂ absorption by microalgae grown on a biofilm photobioreactor[J]. Algal Research, 2017, 25: 421-430.
- [80] Florian Berner , Kirsten Heimann , Madoc Sheehan. Microalgal biofilms for biomass production[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 27(5): 1793-1804.
- [81] Y. Shen , C. Chen , W. Chen. et.al. Attached culture of *Nannochloropsis oculata* for lipid production[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(9): 1743-8.
- [82] I. de Godos , C. Gonzalez , E. Becares. et.al. Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(1): 187-94.
- [83] M. Gross , W. Henry , C. Michael. et.al. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest[J]. Bioresource Technology, 2013, 150: 195-201.
- [84] M. Janssen W. Blanken, M. Cuaresma, Z. Libor,T. Bhaiji, R. H. Wijffels. Biofilm Growth of *Chlorella Sorokiniana* in a Rotating Biological Contactor Based Photobioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 111, No. 12, December, 2014, 2014, 111(12): 2436–2445.
- [85] Junfeng Wang Tianzhong Liu, Qiang Hu, Pengfei Cheng,et al. Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 216-222.
- [86] Antonia Mantzourou , Filippas Ververidis. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques[J]. Science of The Total Environment, 2019, 651: 3187-3201.
- [87] T. E. Irving , D. G. Allen. Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(2): 283-94.
- [88] Ledwoch Katarzyna , Gu Sai , Oinam Avijeet Singh. Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: literature review and research needs[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015, 42: 1418-1427.
- [89] G. A. Lutz ,L. Zhang ,Z. Zhang. et.al. Feasibility of attached cultivation for polysaccharides production by *Porphyridium cruentum*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016,
- [90] Y. Shen ,X. Xu ,Y. Zhao. et.al. Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(3): 441-50.

- [91] V. P. Venugopalan R. Sekar, K. K. Satpathy, K. V. K. Nair & V. N. R. Rao. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates[J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 109-116.
- [92] B. H. Kim , D. H. Kim , J. W. Choi. et.al. Polypropylene Bundle Attached Multilayered *Stigeoclonium* Biofilms Cultivated in Untreated Sewage Generate High Biomass and Lipid Productivity[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(9): 1547-54.
- [93] Alice Costa Kiperstok , Petra Sebestyén , Björn Podola. et.al. Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities[J]. *Algal Research*, 2017, 21: 213-222.
- [94] M. B. Johnson , Z. Wen. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 525-34.
- [95] S. N. Genin , J. Stewart Aitchison , D. Grant Allen. Design of algal film photobioreactors: material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155: 136-43.
- [96] B. Zippel and T.R. Neu. Growth and structure of phototrophic biofilms under controlled light conditions[J]. *Water Science and Technology* 2005, 52(7): 203-209.
- [97] J. Wang , J. Liu , T. Liu. The difference in effective light penetration may explain the superiority in photosynthetic efficiency of attached cultivation over the conventional open pond for microalgae[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 49.
- [98] P. J. Schnurr , G. S. Espie , D. G. Allen. The effect of light direction and suspended cell concentrations on algal biofilm growth rates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(20): 8553-62.
- [99] Bastian Piltz Tong Li, Bjorn Podola, Anthony Dron, Dirk de Beer, Michael Melkonian. Microscale Profiling of Photosynthesis-Related Variables in a Highly Productive Biofilm Photobioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(5): 1046-1055.
- [100] P. Cheng , J. Wang , T. Liu. Effects of nitrogen source and nitrogen supply model on the growth and hydrocarbon accumulation of immobilized biofilm cultivation of *B. braunii*[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 527-33.
- [101] Georg Martin , Tiina Paalme , Kaire Torn. Growth and Production Rates of Loose-Lying and Attached Forms of the Red Algae *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus* in Kassari Bay, the West Estonian Archipelago Sea[J]. *Hydrobiologia*, 2006, 554(1): 107-115.
- [102] J.-M. Guarini O. Herlory, P. Richard, G. F. Blanchard. Microstructure of microphytobenthic biofilm and its spatio-temporal dynamics in an intertidal mudflat (Aiguillon Bay, France)[J]. *Marine ecology progress series*, 2004, 282: 33-44.
- [103] Peter J. Schnurr , George S. Espie , Grant D. Allen. The effect of photon flux density on algal

- biofilm growth and internal fatty acid concentrations[J]. *Algal Research*, 2016, 16: 349-356.
- [104] Scott N. Genin , J. Stewart Aitchison , D. Grant Allen. Novel waveguide reactor design for enhancing algal biofilm growth[J]. *Algal Research*, 2015, 12: 529-538.
- [105] M. Hultberg ,H. Asp ,S. Marttila. et,al. Biofilm formation by *Chlorella vulgaris* is affected by light quality[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(5): 699-702.
- [106] Xianhai Zeng , Michael K. Danquah , Xiao Dong Chen. et,al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(6): 3252-3260.
- [107] Stefan Schaap Ward Blanken, Sophie Theobald, Arjen Rinzema, Rene H. Wijffels,Marcel Janssen. Optimizing carbon dioxide utilization for microalgae biofilm cultivation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 769-776.
- [108] Larissa K. P. Schultze , Marie-Victoria Simon , Tong Li. et,al. High light and carbon dioxide optimize surface productivity in a Twin-Layer biofilm photobioreactor[J]. *Algal Research*, 2015, 8: 37-44.
- [109] P. J. Schnurr ,O. Molenda ,E. Edwards. et,al. Improved biomass productivity in algal biofilms through synergistic interactions between photon flux density and carbon dioxide concentration[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219: 72-9.
- [110]R. M. Benstein , Z. Cebi , B. Podola. et,al. Immobilized growth of the peridinin-producing marine dinoflagellate *Symbiodinium* in a simple biofilm photobioreactor[J]. *Marine Biotechnology* (NY), 2014, 16(6): 621-8.
- [111] J. Fernańdez E. Molina, F.G. Acie'n, Y. Chisti Tubular photobioreactor design for algal cultures[J]. *Journal of Biotechnology* 2001, 92: 113-131.
- [112] Aditya M. Kunjapur* and R. Bruce Eldridge. Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2010, 49: 3516–3526.
- [113] Yin Shi Wu Qingyu , Sheng Guoying ,Fu Jiamo, New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae [J]. *Science in China. Series B, Chemistry, Life Sciences & Earth Sciences* 1994, 37(3): 326-335.
- [114] D. Honda T. Yokochi, T. Higashihara, T. Nakahara. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(1): 72-76.
- [115] Chen Feng Liu Shiming , Liang Shizhong Researches on the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*--Optimization of carbon sources, nitrogen sources, inoculum size and initial pH [J]. *Journal of South China University of Technology(Natural Science)* 1999, 27(4):

- 111-115.
- [116] EW Becker. Microalgae: biotechnology and microbiology[J]. New York: Cambridge University Press, 1994: 181-182.
- [117] Jack A. Borchardt and Hardam S. Azad. Biological Extraction of Nutrients[J]. Water Pollution Control Federation, 1968, 40(10): 1739-1754.
- [118] M. W. Fields , A. Hise , E. J. Lohman. et.al. Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(11): 4805-16.
- [119] Lin-Lan Zhuang , Yaldah Azimi , Dawei Yu. et.al. Effects of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 in suspended-solid phase photobioreactors (ssPBR)[J]. Biomass and Bioenergy, 2018, 109: 47-53.
- [120] T. E. Murphy , H. Berberoglu. Flux balancing of light and nutrients in a biofilm photobioreactor for maximizing photosynthetic productivity[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(2): 348-59.
- [121] Jing Shi , Björn Podola , Michael Melkonian. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study[J]. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(5): 417-423.
- [122] Thomas Naumann ,Zehra Çebi ,Björn Podola. et.al. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor[J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 25(5): 1413-1420.
- [123] W. Zhang , J. Wang , J. Wang. et.al. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production[J]. Bioresource Technology, 2014, 158: 329-35.
- [124] Tong Li , Björn Podola , Michael Melkonian. Investigating dynamic processes in a porous substrate biofilm photobioreactor — A modeling approach[J]. Algal Research, 2016, 13: 30-40.
- [125] G. Picioreanu Wolf, C. van Loosdrecht, M. C. Kinetic modeling of phototrophic biofilms: the PHOBIA model[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(5): 1064-1079.
- [126] C. F. Murphy , D. T. Allen. Energy-water nexus for mass cultivation of algae[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(13): 5861-8.
- [127] Eunyoung Lee , Mehregan Jalalizadeh , Qiong Zhang. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review[J]. Algal Research, 2015, 12: 497-512.
- [128] Jacques Monod. The growth of bacterial cultures[J]. Annual Reviews, 1949, 3(1): 371–394.
- [129] Li Xin , Hu Hong-ying , Gan Ke. et.al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater

- microalga *Scenedesmus* sp[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5494-5500.
- [130] William J. Oswald Joel C. Goldman, David Jenkins The kinetics of inorganic carbon limited algal growth,[J]. *Water Pollution Control Federation*, 1974, 46(3): 554-574.
- [131] H. T. Hsueh , W. J. Li , H. H. Chen. et.al. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 2009, 95(1): 33-9.
- [132] Jongmin Park , Hai-Feng Jin , Byung-Ran Lim. et.al. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8649-8657.
- [133] Haldane J B S. *Enzymes* Longmans, Green & Co[J]. New York: Cambridge University Press, 1930,
- [134] John F. Andrews. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1968, 10(6): 707-723.
- [135] N. Kurano , S. Miyachi. Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(4): 403-8.
- [136] Anondho Wijanarko , Dianursanti , Antonius Yudi Sendjaya. et.al. Enhanced *Chlorella vulgaris* Buitenzorg growth by photon flux density alteration in serial photobioreactors[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13(4): 476-482.
- [137] Elena Litchman and Simon A. Levin Christopher A. Klausmeier. Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation[J]. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(4): 1463-1470.
- [138] U. Sommer. A comparison of the Droop and the Monod models of nutrient limited growth applied to natural populations of phytoplankton[J]. *Functional Ecology*, 1991: 535-544.
- [139] Droop Stephen J. M. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monachryais lutheri* [J]. *Journal of the marine biological association of the united kingdom*, 1968, 48(3): 689-733.
- [140] Judith Meye John Caperon. Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton—II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton[J]. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 1972, 19(9): 619-632.
- [141] James P. Grover. Dynamics of competition among microalgae in variable environments: experimental tests of alternative models[J]. *Oikos*, 1991, 62(2): 231-243
- [142] Thomas Egli Karin Kovárová-Kovar. Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics[J]. *microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 646-666.

- [143] K.L Terry. K. Terry, Nitrogen and phosphorus requirements of *Pavlova lutheri* in continuous culture[J]. *Botanica marina*, 1980, 23: 757-764.
- [144] J. S. Guest , M. C. van Loosdrecht , S. J. Skerlos. et,al. Lumped pathway metabolic model of organic carbon accumulation and mobilization by the alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(7): 3258-67.
- [145] Gaël Bougaran , Olivier Bernard , Antoine Sciandra. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2010, 265(3): 443-454.
- [146] Shuichi Aiba. Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganisms[J]. *Microbial Reactions* , 1982, 23: 85-156.
- [147] C. J. Hulatt , D. N. Thomas. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(12): 6687-95.
- [148] Y. Ye , Y. Huang , A. Xia. et,al. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 80-87.
- [149] B. Guieysse , Q. Bechet , A. Shilton. Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 317-23.
- [150] Q. Bechet , A. Shilton , B. Guieysse. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1648-63.
- [151] F.G. Acie'n Ferná'ndez E. Molina Grima, F. Garcí 'a Camacho, Yusuf Chisti *. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup[J]. *Journal of Biotechnology* 1999, 70: 231-247.
- [152] Arnaud Muller-Feuga , Roland Le Guédes , Jérémy Pruvost. Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103(2): 153-163.
- [153] Lorena Martínez , Antonio Morán , Ana Isabel García. Effect of light on *Synechocystis* sp. and modelling of its growth rate as a response to average irradiance[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 24(1): 125-134.
- [154] M. Pahlow , A. Oschlies. Chain model of phytoplankton P, N and light colimitation[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, 376: 69-83.
- [155] S. J. Giovannoni ,U. Stingl. Molecular diversity and ecology of microbial plankton[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 343-8.

-
- [156] I.R. Davison. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature[J]. Journal of Phycology, 1991, 27(1): 2-8.
 - [157] B. Ketheesan , N. Nirmalakhandan. Modeling microalgal growth in an airlift-driven raceway reactor[J]. Bioresource Technology, 2013, 136: 689-96.
 - [158] Olivier Bernard. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production[J]. IFAC Proceedings Volumes, 2010, 43(5): 667-678.
 - [159] A. Kumar , S. Ergas , X. Yuan. et,al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(7): 371-80.
 - [160] Ankita Juneja ,Ruben Ceballos ,Ganti Murthy. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review[J]. Energies, 2013, 6(9): 4607-4638.
 - [161] Y. Sun , Q. Liao , Y. Huang. et,al. Application of growth-phase based light-feeding strategies to simultaneously enhance *Chlorella vulgaris* growth and lipid accumulation[J]. Bioresource Technology, 2018, 256: 421-430.
 - [162] Shaikh Abdur Razzak , Saad Aldin M. Ali , Mohammad Mozahar Hossain. et,al. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 76: 379-390.
 - [163] José M. Fernández-Sevilla , Celeste Brindley , Natalia Jiménez-Ruíz. et,al. A simple equation to quantify the effect of frequency of light/dark cycles on the photosynthetic response of microalgae under intermittent light[J]. Algal Research, 2018, 35: 479-487.
 - [164] Hong Yang Wei-Bao Kong , Yun-Tao Cao , Hao Song , Shao-Feng Hua , Chun-Gu Xia. Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture[J]. Food Technology and Biotechnology, 2013, 51(1): 62-69.
 - [165] X. Li , W. Li , J. Zhai. et,al. Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis*[J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 555-561.
 - [166] Sashenka Fierro , Maria del Pilar Sa´nchez-Saavedra , Carmen Copalcu´a. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 1274-1279.
 - [167] W.T. DE GROOT. Modelling the multiple nutrient limitation of algal growth[J]. Ecological Modelling, 1983, 18(2): 99-119.
 - [168] L. Travieso , F. Benítez , E. Sánchez. et,al. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using

- psettled and diluted piggery waste[J].
- Ecological Engineering*
- , 2006, 28(2): 158-165.
- [169] Ch. Boyadjiev P. Popova. About Microalgae Growth Kinetics Modeling[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2008, 22(4): 491-497.
- [170] Campbell W. Robinson Gordon A. Hill Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975: 1599-1615.
- [171] Mornet F Collos Y, Sciandra A, et al. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11(2): 179-184.
- [172] Gail Lorenz Miller. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [173] E.P. Lincoln D.T. Hill. Development and validation of a comprehensive model of largescale production of microalgae[J]. *Agricultural Wastes*, 1981, 3(1): 43-64.
- [174] Hui-Jun Liu Xian-Ming Shi, Xue-Wu Zhang , Feng Chen. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 341-347.
- [175] D. Haass , W. Tanner. Regulation of Hexose Transport in *Chlorella vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1974, 53: 14-20.
- [176] Wei-Bao Kong , Hong Yang , Yun-Tao Cao. et.al. Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2013, 51(1): 62-69.
- [177] Erica B. Young , John Beardall. Rapid ammonium- and nitrate-induced perturbations to Chl a fluorescence in nitrogen-stressed *Dunaliella*[J]. *Journal of Phycology* 2003, 39: 332-342.
- [178] Guo-Zheng Dai , Bao-Sheng Qiu , Karl Forchhammer. Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the *psbA* multigene family[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014, 37: 840-851.
- [179] Makram T. Suidan Sarah K. Liehr, J. Wayland Eheart. A Modeling Study of Carbon and Light Limitation in Algal Biofilms[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35: 233-243.
- [180] Peter J. Schnurr ,D. Grant Allen. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 52: 418-429.
- [181] D. L. Sutherland , C. Howard-Williams , M. H. Turnbull. et.al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal[J]. *Water Research*, 2015, 70: 9-26.
- [182] Bruno D. Fernandes , André Mota , António Ferreira. et.al. Characterization of split cylinder airlift photobioreactors for efficient microalgae cultivation[J]. *Chemical Engineering Science*,

- 2014, 117: 445-454.
- [183] W. Tongprawhan ,S. Srinuanpan ,B. Cheirsilp. Biocapture of CO₂ from biogas by oleaginous microalgae for improving methane content and simultaneously producing lipid[J]. Bioresource Technology, 2014, 170: 90-99.
- [184] Jimenez C Katz A, Pick U. Isolation and Characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga *Dunaliella bardawil*[J]. Plant Physiology, 1995, 108(4): 1657-1664.
- [185] Junfeng Wang , Wen Liu , Tianzhong Liu. Biofilm based attached cultivation technology for microalgal biorefineries—A review[J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 1245-1253.
- [186] D. Morales-Sanchez , O. A. Martinez-Rodriguez , J. Kyndt. et.al. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 31(1): 1-9.
- [187] Yue Lu , Junbiao Dai , Qingyu Wu. Photosynthesis-fermentation hybrid system to produce lipid feedstock for algal biofuel[J]. Environmental Technology, 2013, 34(13-14): 1869-1876.
- [188] S. Hena , N. Fatihah , S. Tabassum. et.al. Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement[J]. Water Research, 2015, 80: 346-356.
- [189] Jun Cheng , Ke Li , Zongbo Yang. et.al. Gradient domestication of *Haematococcus pluvialis* mutant with 15% CO₂ to promote biomass growth and astaxanthin yield[J]. Bioresource Technology, 2016, 216: 340-344.
- [190] Wellburn Alan R 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: 307–313.
- [191] Neil R. Baker. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59(1): 89-113.
- [192] K. G. Ryan ,P. Ralph ,A. McMinn. Acclimation of Antarctic bottom-ice algal communities to lowered salinities during melting[J]. Polar Biology, 2004, 27(11): 679-686.
- [193] Brenda Little ,Patricia Wagner ,Richard Ray. et.al. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1991, 8: 213-222.
- [194] Arsenio Villarejo , María Isabel Orús , Flor Martínez. Coordination of photosynthetic and respiratory metabolism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 in the light.[J]. Physiologia Plantarum, 1995, 94: 680-686.
- [195] Yecong Li , Yi-Feng Chen , Paul Chen. et.al. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel

- production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(8): 5138-5144.
- [196] Galvan A. Fernandez E. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(9): 2279-2287.
- [197] B. R. Green , D. G. Durnford. The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis[J]. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 1996, 47: 685-714.
- [198] Vasily Zaburdaev James N. Wilking, Michael De Volder, Richard Losick, Michael P. Brenner, and David A. Weitz. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms[J]. *PNAS*, 2013, 110(3): 848–852.
- [199] Sandra Milena Rincon , Hernan Mauricio Romero , Wrya Moh Aframehr. et,al. Biomass production in *Chlorella vulgaris* biofilm cultivated under mixotrophic growth conditions[J]. *Algal Research*, 2017, 26: 153-160.
- [200] Q. Zhang , X. Li , D. Guo. et,al. Operation of a vertical algal biofilm enhanced raceway pond for nutrient removal and microalgae-based byproducts production under different wastewater loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 323-332.
- [201] A. F. Miranda , N. Ramkumar , C. Andriotis. et,al. Applications of microalgal biofilms for wastewater treatment and bioenergy production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 120.
- [202] H. Horn S. Wäsche, D.C. Hempel. Mass transfer phenomena in biofilm systems[J]. *Water Science and Technology*, 2000, 41(4-5): 357-360.
- [203] Kazuaki H Akihiko T, Jun N, Satoshi T. . Nitrogen Removal Characteristics and Biofilm Analysis of a Membrane-Aerated Biofilm Reactor Applicable to High-Strength Nitrogenous Wastewater Treatment[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(2): 170-178.
- [204] Spiros N. Agathos Borhane S. Grama, and Clayton Jeffries. Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4: 1611–1618.

附 录

A. 攻读硕士学位期间发表及撰写的论文

- [1] **Yangli Ye**, Yun Huang*, Ao Xia, Qian Fu, Qiang Liao, Weida Zeng, Yaping Zheng, Xun Zhu. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 80-87. (SCI 一区, IF=5.807, Top 期刊)
- [2] **Yangli Ye**, Yun Huang*, Weida Zeng, Qiang Liao, Ao Xia, Xun Zhu, Multifactorial kinetic characteristics and modeling of heterotrophic-assisted photoautotrophic microalgae biofilm growth. *The 14th Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium*. 2018.9.14-9.17 (Oral)
- [3] **Yangli Ye**, Yun Huang*, Ao Xia, Qian Fu, Qiang Liao, Xun Zhu. Growth kinetics model of synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm. (To be submitted)
- [4] **Yangli Ye**, Yun Huang*, Ao Xia, Qian Fu, Qiang Liao, Xun Zhu. Detection and regulation of the growth environment of synchronous photoautotrophic-heterotrophic microalgae biofilm based on microelectrode technology. (To be submitted)

B. 攻读硕士学位期间获得的奖励

- [1] 2018 年硕士研究生国家奖学金
- [2] 2016 年重庆大学研究生 A 等学业奖学金
- [3] 2017 年重庆大学研究生 A 等学业奖学金
- [4] 2018 年重庆大学研究生 A 等学业奖学金
- [5] 2018 年重庆大学优秀毕业研究生
- [6] 2017 APEC-ACABT YES Challenge” 国际竞赛团体四等奖
- [7] 在“The 13th Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium” 国际会议进行英文口头报告, 且获得 “the 3rd place paper of the 13th Asian Biohydrogen & Bioefinery Symposium”

C. 攻读硕士学位期间参与的科研项目

- [1] 《含光合自养/异养微藻生物膜的双重结构多孔介质内气液传输和生化转化特性》, 国家自然科学基金青年项目 (No. 51606020)
- [2] 《非饱和微藻异养辅助自养双重多孔生物膜内多相传递及油脂生产能力强化》, 重庆市博士后科研项目 (No: Xm2015070)
- [3] 《太阳能水热水解及生化转化耦合制取微藻生物燃料基础研究》, 国家自然科学基金委国际 (地区) 合作与交流项目 (No.51561145013)

致 谢

光阴似箭，日月如梭，时间像一匹飞驰的骏马，从我们身边飞逝而去，眨眼间，我的硕士生涯像一颗闪耀着金色光芒的流星一样，结束了，回首往事，感慨万千。还记得第一次乘火车来重庆的好奇与期待，记得来重大复试的紧张与不安，记得研一组会文献汇报时的惶恐与胆怯，记得通宵达旦做试验的辛苦与疲惫，记得阅读文献寻找思路的忧虑与迷茫，记得英文论文中稿时的欣慰与喜悦。经过研究生三年的学习与磨练，我的思想逐渐成熟，行动趋于干练，心中仿佛有一把生活的标尺，时时刻刻衡量着自己的一言一行，值此毕业论文完成之际，感谢每一位陪伴我、支持我、鼓励我的人。

首先感谢我的导师黄云副教授，您是我人生的灯塔，永远在我迷茫的时候为我指明方向。本学位论文的选题与研究等工作等是在黄老师您的热忱关怀和悉心指导下完成的，您在指导工作时那循循善诱的教学方法，那严谨求实的科学素养，以及那一丝不苟的工作作风深深地感染和激励着我，在课题研究工作上，您总能给予我莫大的帮助与支持，时刻鼓励着我不断前行。每当我实验失败感到挫败与气馁时，您总能给我信心，使我重振旗鼓，并且给我指明方向，突破重重困难，正是因为您的谆谆教导，才成就了今日的我，在此谨向黄老师致以最诚挚的谢意和最崇高的敬意。衷心祝愿黄老师工作顺利，万事如意。

感谢廖强教授和朱恂教授，你们对待科研的那种高屋建瓴、严谨治学、精益求精以及永远不放弃任何一个细节的求真务实的精神深深地感染着我，使我不再惧怕科研道路上的任何困难，只管撸起袖子好好干，衷心祝愿廖老师朱老师身体健康，工作顺利，阖家幸福。

感谢夏鼻老师、付乾老师和朱贤青老师对我的关心和指导，感谢你们在组会课题讨论中提出的宝贵建议，帮助我在科研道路上攻坚克难，谢谢你们！祝愿你们身体健康，家庭幸福。此外，也要感谢陈蓉老师，李俊老师，丁玉栋老师，王宏老师，叶丁丁老师，张亮老师和张彪老师等研究所团队的其他老师对我的帮助与支持，祝你们万事顺心，生活美满。

感谢已毕业的常海星师兄，孙亚辉师兄，郑亚萍师姐，黄勇师兄等对我的照顾与关怀，感谢肖超、魏朝阳、陈豪、富经纬、韦鹏飞、邓志超、郭晓博、曾伟达、叶文帆、罗如虹、张晗、冯栋、梅杰等绿能组全体成员对我的帮助，祝你们科研顺利，前程似锦！感谢 IETP 这个温暖的大家庭，祝愿 IETP 在未来的日子里蒸蒸日上，蓬勃发展！

感谢父母的养育之恩，是你们那无私奉献和无微不至的关怀让我有了艰苦奋

斗的动力和面对挫折的勇敢，在此，祝愿我的父母永远年轻，健康长寿，幸福快乐！

感谢国家自然科学基金委国际（地区）合作与交流项目（No.51561145013），国家自然科学基金青年项目（No. 51606020），重庆市博士后科研项目（No: Xm2015070）等项目对本研究的资助！

叶杨丽

二〇一九年五月 于重庆大学