

小球藻培养条件的优化

季 祥, 张智慧, 张雪艳, 蔡 禄* (内蒙古科技大学生物工程与技术研究所, 内蒙古包头 014010)

摘要 [目的]优化小球藻培养条件,以提高小球藻生物量。[方法]在无菌培养条件下,对影响小球藻生长的主要营养因素 Na_2CO_3 、 NaNO_3 、 KH_2PO_4 和 MgSO_4 等进行了单因素和正交试验优化。[结果]微量元素和 pH 值对小球藻的生长有非常明显的影响,优化培养基配方为: Na_2CO_3 0.02 g/L, NaNO_3 2.0 g/L, KH_2PO_4 0.02 g/L, MgSO_4 0.1 g/L, 环境条件为 pH 值 6.0。[结论]该研究为扩大培养小球藻提供依据。

关键词 小球藻;有机氮;优化
中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517- 6611(2009)34- 16763- 02

Culture of *Chlorella* spp and Optimization of Growth Condition
JIXiang et al. (Institute of Bioengineering and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010)
Abstract [Objective] The growth condition of *Chlorella* spp was optimized to increase its biomass. [Method] Under the aseptic culture condition, major nutritional factors for *Chlorella* spp growth, such as Na_2CO_3 , NaNO_3 , KH_2PO_4 and MgSO_4 were optimized. [Result] Trace elements and pH value had a prominent influence on the growth of *Chlorella*. Optimized culture medium program was as follows: Na_2CO_3 0.02 g/L, NaNO_3 2.0 g/L, KH_2PO_4 0.02 g/L, MgSO_4 0.1 g/L and ambient conditions of pH value 6.0. [Conclusion] The research could provide basis for the extension of the cultivation of *Chlorella* spp.
Key words *Chlorella* spp; Organic nitrogen; Optimization

小球藻为绿藻门小球藻属 (*Chlorella* spp) 普生性单细胞绿藻,以光合自养生长繁殖,分布极广,以淡水水域种类最多,生物量大。小球藻类似于多个“细胞工厂”,通过光合作用将 CO_2 转化为生物燃料、食物、饲料和高价值的生物活性物质^[1]。包括小球藻和其他微藻类对生物治理(净化环境)发挥很大作用^[2],且可以作为混合氮源来使用^[3]。以小球藻为原料,可以生产几种可再生生物燃料,如通过小球藻生物质的厌氧消化生产沼气^[4];小球藻油脂提炼生物柴油^[5];光生物学上的生物产氢等^[6]。另外,小球藻具有多种保健和药理作用,是目前保健食品开发应用较理想和研究较多的微藻之一^[7]。为了更好地利用小球藻,首先要获得大量的小球藻藻体。笔者通过优化小球藻培养条件来提高小球藻生物量,为其扩大培养提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试小球藻藻种由内蒙古科技大学生物工程与技术研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 球藻培养。在 BG11 培养基基础上进行优化。培养温度为 28℃,光强为 4.5×10^3 lx,转速为 140 r/min 下培养^[8]。

1.2.2 正交试验。球藻生长中 C、N、P 是主要营养元素^[9]。小球藻营光自养生长,可直接利用空气中的 CO_2 ,因此 CO_3^{2-} 可直接作为小球藻生长的碳源。硝酸盐是培养小球藻的一种氮源。微量元素(如 Mg)是影响藻类生长代谢过程的重要因子。利用正交试验优化培养基中 Na_2CO_3 、 MgSO_4 、 NaNO_3 和 KH_2PO_4 的浓度,采用 $L_9(3^4)$ 正交表(表 1)进行 4 因素 3 水平正交试验。

1.2.3 生物量的测定^[10]。采用浊度比色法,用 722 分光光度计测定培养液在波长 680 nm 处的吸光度 (OD_{680})。

表 1 因素水平				
Table 1 Levels of factors				
水平	A	B	C	D
Levels	(NaNO_3)	(KH_2PO_4)	(MgSO_4)	(Na_2CO_3)
1	1.0	0.02	0.050	0.015
2	1.5	0.04	0.075	0.020
3	2.0	0.06	0.100	0.025

2 结果与分析

2.1 pH 值对小球藻生长的影响 pH 值是影响小球藻生长的重要因素之一。pH 值影响光合作用中 CO_2 的可用性,在呼吸作用中影响微藻对有机碳源的利用效率,并影响培养基中微藻细胞对离子的吸收、利用以及代谢产物的再利用、毒性^[11]。由图 1 可知,当 pH 值在 6.0 时小球藻生长情况较好;当 pH 值为 5.0 和 7.0 时,小球藻的生长明显较差。因此, pH 值 6.0 为小球藻生长的适宜环境条件。

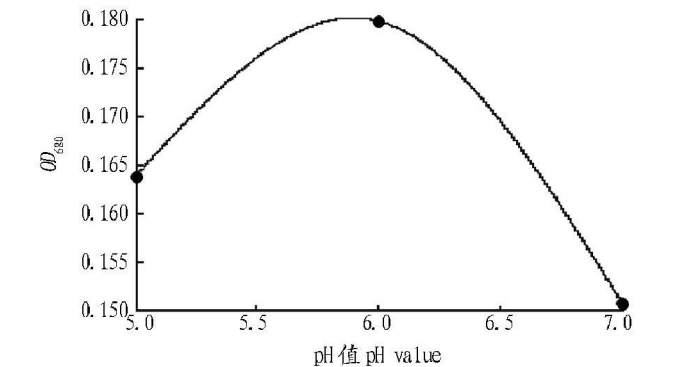


图 1 初始 pH 值对小球藻生长的影响
Fig 1 Effects of initial pH value on the growth of *Chlorella* spp

2.2 NaNO_3 对小球藻生长的影响 氮元素是单细胞微藻生长发育必需的元素之一。微藻通常可以利用铵盐、硝酸盐及尿素等氮源。为了对氮源水平作进一步的探索,该试验对氮

基金项目 教育部春晖计划(Z2007-1-01020);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJy08233);内蒙古包头市科技攻关项目(2008y1002-2)。
作者简介 季祥(1978-),男,内蒙古包头人,硕士,讲师,从事生物质能、生物制浆方面的研究。* 通讯作者。
收稿日期 2009-07-27

源水平作了单因素试验。由图 2 可知,随着 NaNO_3 浓度的升高,小球藻的生物量逐渐增加;当 NaNO_3 浓度达到 0.08 g/L 时,小球藻的生物量达到最大值;当继续提高 NaNO_3 浓度时,小球藻的生物量减小。由此可知, NaNO_3 最适浓度为 0.08 g/L 。

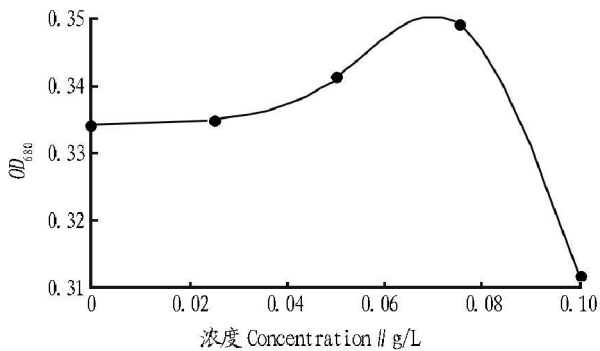


图 2 NaNO_3 对小球藻生长的影响

Fig 2 Effects of sodium nitrate on the growth of Chlorella sp

2.3 KH_2PO_4 对小球藻生长的影响 由图 3 可知,随着 KH_2PO_4 浓度的升高,小球藻的生物量逐渐增加;当 KH_2PO_4 浓度达到 1.5 mg/L 时,小球藻的生物量达到最大值;当继续增加 KH_2PO_4 时,小球藻的生物量减小。这可能是由于过高的磷浓度抑制了小球藻的生长。由此可知, KH_2PO_4 的最适浓度为 1.5 mg/L 。

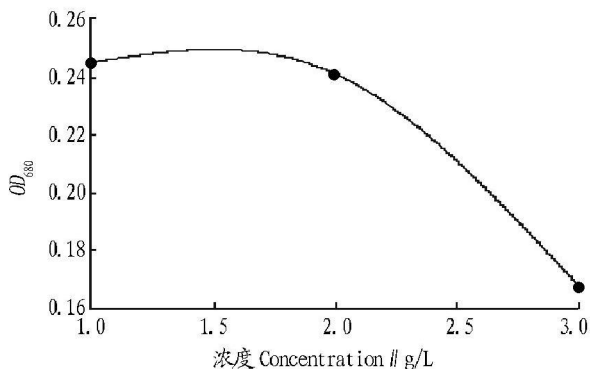


图 3 KH_2PO_4 对小球藻生长的影响

Fig 3 Effects of phosphorus sources on the growth of Chlorella sp

2.4 接种量对小球藻生长的影响 取 5 个 250 mL 三角瓶,装液 100 mL ,接种量分别为 5%、10%、20%、30%、40%,摇床培养,每 12 h 取样 1 次,测定 OD 值。由图 4 可知,接种量为 5% 时生物量增加缓慢,而后迅速增加,接种量低时细胞浓度增加缓慢;而接种量为 30% 时,细胞浓度增加较快,但需种量大,增加了制种过程工作量;接种量为 20% 时,培养相同时间后最终 OD 与接种量为 30% 时的相当;接种量为 40% 时,藻液则因初始接种密度过大,生长后期营养供给不足而导致平均生长速率依次减小。因此,接种量为 25% 对于小球藻的生长是最为有利的。

2.5 有机氮对小球藻生长的影响 以尿素为有机氮源,考查尿素对小球藻生长的影响。尿素浓度为 0.02、0.4、0.6、0.8 g/L 在光照培养箱中培养。研究表明,尿素是一种很好的有机氮源,并且在小球藻的培养过程中,培养基 pH 值一直非常稳定。由图 5 可知,当尿素浓度为 0.4 g/L 时小球藻生

长最好,而浓度为 0.8 g/L 时小球藻长势明显不好,说明氮源量太大反而会抑制小球藻的生长。有研究表明,在藻类的生长过程中消耗等量的氮,以尿素作为氮源则比硝酸盐产生较多的生物量,并引起培养基较小的 pH 值变化。

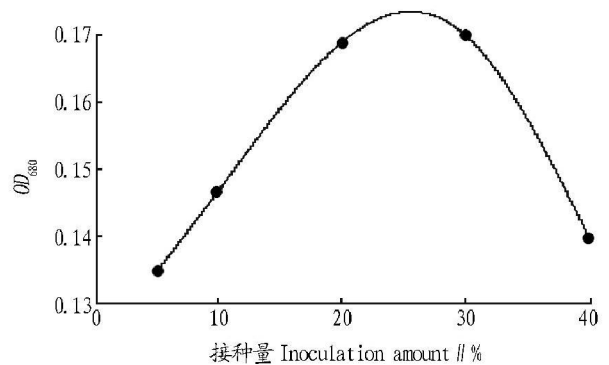


图 4 接种量对小球藻生长的影响

Fig 4 Effects of inoculation amount on the growth of Chlorella

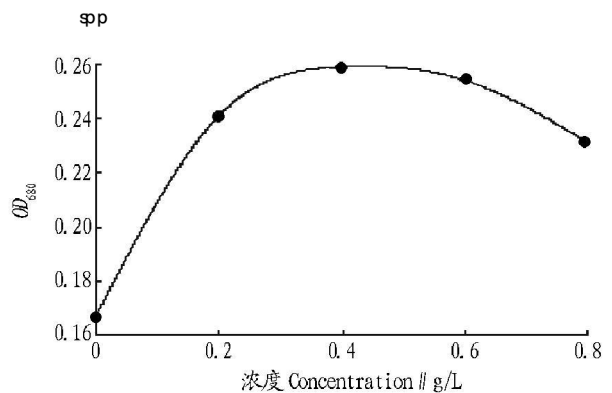


图 5 尿素对小球藻生长的影响

Fig 5 Effects of urea on the growth of Chlorella sp

2.6 营养盐浓度和微量元素 (mg) 对小球藻生长的影响 按表 1 设计的 4 因素 3 水平正交试验,在光照培养箱中培养。由表 2 可知,第 7 组试验小球藻长势最好,当 Na_2CO_3 浓度低于 0.02 g/L 时,小球藻生物量随 Na_2CO_3 浓度的升高而增加,但超过 0.02 g/L 时,小球藻的生物量又随之下降。由此可知,较好的水平组合为 $A_3B_1C_3D_2$ 。比较 4 个因素的极差 R,发现影响小球藻生长因素的主次顺序为 $B > C > A > D$,说明磷源浓度对小球藻生长的影响最大,其次是氮源浓度。

表 2 正交试验及结果

Table 2 Orthogonal experiments and results					
序号 Serial No	A (NaNO_3)	B (KH_2PO_4)	C (MgSO_4)	D (Na_2CO_3)	OD ₆₈₀
1	1	1	1	1	0.109
2	1	2	2	2	0.097
3	1	3	3	3	0.079
4	2	1	2	3	0.109
5	2	2	3	1	0.081
6	2	3	1	2	0.064
7	3	1	3	2	0.115
8	3	2	1	3	0.056
9	3	3	2	1	0.079
R	0.012	0.037	0.019	0.011	

3 结论

pH 值是影响小球藻生长的重要因素,通过影响小球藻光合作用强度而影响小球藻的生长。小球藻可以利用尿素

(下转第 16834 页)

2 3 3 最长叶片长度增长、叶片数增加差异。李氏禾的最长叶片长增长和叶片数增加在试验设定的 3 个温度条件下差异显著。其中, 25 e 时最长叶片生长速度、叶片增加数明显较快 (0 18 mm /d 0 23 片 /d), 自然温度下居中 (0 10 mm /d 0 11 片 /d), 15 e 时最慢 (0 07 mm /d 0 08 片 /d)。

3 结论与讨论

3 1 高富集李氏禾种群的筛选 筛选试验中的 3 个李氏禾种群对 Cr^{3+} 具有较强的耐受能力, 各组李氏禾生长状况良好。不同种类的重金属对李氏禾的毒性不同, 培养期间 Cr^{3+} 污染条件下生长的李氏禾生物量与对照相比无显著减少。各样品的地上部分重金属含量与地下部分之比平均值为 1.24 > 1, 证明李氏禾对重金属 Cr^{3+} 有较强的转运能力。3 个李氏禾种群对 Cr^{3+} 的富集能力均超过 1 000 mg/kg 符合超富集植物的 3 个特征^[10-12], 其中, 荔浦种群李氏禾富集特征尤其明显, 所以选定为后期试验对象。

3 2 光照强度对李氏禾生长的影响 光照强度对植物细胞的生长和分化、体积的增长和重量的增加有重要影响, 在一定范围内光合作用速率与光照强度呈正比, 但达到一定强度, 若继续增加光强, 光合作用速率不但不会增加, 反而会下降^[1]。该试验时间为盛夏, 光照强度较高, 在透光率为 50% 和 100% 的光照强度 (5 000~10 000 lx) 下, 李氏禾出现 /光饱和和 0 甚至 /光抑制 0 现象, 叶片生长缓慢或停滞。

3 3 温度对李氏禾生长的影响 任何一种生物, 其生命活动中每一生理生化过程都有酶系统的参与。然而, 每一种酶的活性都有它的最高温度、最低温度和最适温度。在 15 e 条件下, 李氏禾生长速度极为缓慢; 在 25 e 条件下, 李氏禾叶片显绿色, 分蘖数多, 分蘖后的新植株生长速度很快, 为生

长的最适温度。这一研究结果与学者们对藻类的研究结果基本一致^[13-14]。

参考文献

- [1] 李博. 生态学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 21-31.
- [2] 王琪, 马树庆, 郭建平, 等. 温度对玉米生长和产量的影响 [J]. 生态学报, 2009, 28 (2): 255-260.
- [3] 王帆, 严红, 曲霞. 水分、光照与硼互作对大豆生长发育及产量的影响 [J]. 大连大学学报, 2006, 27 (2): 16-20.
- [4] 毛炜光. 水分和光照对厚皮甜瓜苗期植株生理生态特性的影响 [J]. 应用生态学报, 2007, 18 (11): 2475-2479.
- [5] 刘春光. 光照与磷的交互作用对两种淡水藻类生长的影响 [J]. 中国环境科学, 2005, 25 (1): 32-36.
- [6] 于萍, 张前前, 王修林, 等. 温度和光照对两株赤潮硅藻生长的影响 [J]. 海洋环境科学, 2006, 25 (1): 38-40.
- [7] 姜宏波, 董双林, 包杰, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响 [J]. 生态学报, 2009, 20 (1): 185-189.
- [8] 张学洪, 罗亚平, 黄海涛, 等. 一种新发现的湿生铬超积累植物))) 李氏禾 (*Leersia hexandra* Swartz) [J]. 生态学报, 2006, 26 (3): 950-953.
- [9] 陈俊, 王敦球, 张学洪, 等. 李氏禾修复重金属 (Cr Cu N) 污染水体的潜力研究 [J]. 农业环境科学学报, 2008, 27 (4): 1514-1518.
- [10] BENN CELL IR, STEZPN EW SKA Z, BANACH A, et al. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal wastewater [J]. Chemosphere, 2004, 55: 141-146.
- [11] BROOKS R R, LEE J, REEVES R D, et al. Detection of nickeliferous rocks by analysis of the barium species of indicator plants [J]. Journal of Geochemical Exploration, 1977, 7: 49-57.
- [12] TORRESDEY J L G, VIDEA JR P, MONTESM, et al. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements [J]. Bioresource Technology, 2004, 92: 229-235.
- [13] 张学成, 孟振, 时艳侠, 等. 光照、温度和营养盐对三株盐生杜氏藻生长和色素积累的影响 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36 (5): 756-762.
- [14] 周洪琪, RENAUD SM, PARRY D L, 等. 温度对新月菱形藻、铲状菱形藻和巴夫藻的生长、总脂肪含量以及脂肪酸组成的影响 [J]. 水产学报, 2002, 22 (3): 8-12.

(上接第 16764 页)

作为氮源。研究表明, 小球藻的优化培养基配方为: Na_2CO_3 0 02 g/L, NaNO_3 2 0 g/L, KH_2PO_4 0 02 g/L, MgSO_4 0 1 g/L, 尿素量为 0 8 g/L, 接种量为 25% 左右, 环境条件为 pH 值 6 0。

参考文献

- [1] WALTER T L, PURTON S, BECKER D K, et al. Microalgae as bioreactors [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 629-641.
- [2] MUNOZ R, GU EY SSE B. A list of bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review [J]. Water Res, 2006, 40: 2799-2815.
- [3] VAISHAMPAYAN A, SNHAR P, HADER D P, et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture [J]. Bot Rev, 2001, 67: 453-516.
- [4] SPOLAORE P, JOANN B-CASSAN C, DURAN E, et al. Commercial applica-

tions of microalgae [J]. JBiosciBeng, 2006, 101: 87-96.

- [5] GAVRILESCU M, CHISTOIY. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry [J]. Biotechnology, 2005, 23: 471-499.
- [6] KAPDANIK, KARGIF. Bi hydrogen production from waste materials [J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 38: 569-582.
- [7] 胡月薇, 史贤明. 新食品资源小球藻的生理活性与保健功能 [J]. 中国食品学报, 2002, 2 (2): 69-72.
- [8] 于贞, 王长海. 小球藻培养条件的研究 [J]. 烟台大学学报, 2005, 18 (3): 206-211.
- [9] 王波. 不同营养盐对小球藻培养的影响 [J]. 现代渔业信息, 2006, 21 (5): 11-16.
- [10] BECKER E W. Measurement of algal growth in microalgae biotechnology & microbiology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994: 56-62.
- [11] 余若黔, 刘学铭, 梁世忠, 等. 小球藻的异养生长特性研究 [J]. 海洋通报, 2000, 19 (3): 57-62.