



## 不同磷、硫及二氧化碳浓度对标志链带藻生长和碳水化合物积累的影晌

黄怡, 高保燕, 王飞飞, 戴晨明, 苏敏, 张成武\*

暨南大学水生生物研究中心生态学系, 广东 广州 510632

**摘要:**【目的】为了研究不同磷、硫及二氧化碳浓度对标志链带藻(*Desmodesmus insignis*)生长与碳水化合物积累的影响, 本实验以改良 BG11 培养基为基础, 设计了 8 种不同初始  $K_2HPO_4$  浓度、8 种不同初始  $MgSO_4$  浓度及 4 种二氧化碳浓度培养标志链带藻。【方法】采用干重法和苯酚-硫酸法分别测定其生物质浓度与总碳水化合物的含量。【结果】实验结果显示, 在高磷浓度(0.460 mmol/L)下生物量达到最高为 6.37 g/L, 磷浓度为 0.230 mmol/L (对照组)时总碳水化合物含量及单位体积产率达到最高, 分别为 45.40% (%干重)和 0.20 g/(L·d)。不同初始  $MgSO_4$  浓度实验结果显示, 高硫浓度有利于标志链带藻生长及碳水化合物的积累, 生物量、总碳水化合物含量及单位体积产率分别在硫浓度为 1.217 mmol/L、0.609 mmol/L 和 1.824 mmol/L 时达到最高, 分别为 7.02 g/L、51.6% (%干重)及 0.26 g/(L·d)。当二氧化碳浓度为 3% (V/V)时, 标志链带藻生物量、总碳水化合物含量及单位体积产率均达到最高, 分别为 6.81 g/L、44.03%和 0.20 g/(L·d)。【结论】因此, 磷浓度为 0.230 mmol/L、硫浓度为 1.824 mmol/L 和二氧化碳浓度为 3%时最有利于标志链带藻生长及碳水化合物的积累。

**关键词:** 标志链带藻, 磷, 硫, 二氧化碳, 生物质, 碳水化合物

相比于陆生植物, 微藻具有更快的生长速率和更高的光合效率, 且不占用耕地, 被认为是用于生产生物燃料的第三代原料<sup>[1-2]</sup>。微藻的生物质组分主要是碳水化合物、脂质和蛋白质<sup>[3]</sup>。可通过厌氧消化、厌氧发酵和生物制氢技术将微藻碳水化合物转化为甲烷、生物乙醇、生物丁醇和生物氢<sup>[1,4]</sup>。

目前, 生产富含碳水化合物微藻的方法主要有两种。第一种方法是筛选富含碳水化物的藻种, 另一种方法是改变培养条件<sup>[4]</sup>。大多数微藻可通过大量营养元素(碳、氮、磷和硫)胁迫来提高碳水化合物的含量, 但通常会同时导致生物量减少, 从而出现含量提高了但产率没有提高的情况<sup>[4-5]</sup>。磷

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA065805); 国家自然科学基金(31170337); 广东省低碳专项(2011-051); 珠海市科技重大项目(PB20041018); 珠海市科技攻关项目(PC20081008)

\*通信作者。Tel: +86-20-85222025; E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-12; 修回日期: 2018-12-19; 网络出版日期: 2019-03-13

是所有蓝藻和真核藻类生长所必需的一种营养元素,是核酸和磷脂的基本组成元素,同时在能量传递中起重要作用<sup>[6]</sup>。已有大量研究报道,低磷胁迫下,微藻细胞生长受到抑制,蛋白质与叶绿素合成停止,碳水化合物和脂质积累增加<sup>[1,4,7]</sup>。如 Markou 等研究了螺旋藻[*Arthrospira (Spirulina) platensis*]在不同磷浓度下生物量及生化组成的变化,研究结果表明低磷胁迫下生物量降低而碳水化合物含量增加,同时提出碳水化合物与细胞内磷浓度成反比关系可能是由于无机磷的减少提高了 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的活性,从而促进了碳水化合物的合成<sup>[4]</sup>。硫元素是微藻细胞内许多功能性化合物,如硫脂、维生素和辅酶因子等的基本组成元素<sup>[6]</sup>。硫缺乏时,含硫氨基酸、蛋白质及其他用于生长的细胞成分合成受到抑制,细胞分裂停止,从而促进了储能化合物如碳水化合物的合成。如 Yao 等研究发现亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)随着硫浓度的减少生物量下降而淀粉含量增加<sup>[8]</sup>。此外,亚心形四片藻蛋白质和叶绿素的含量与淀粉的含量呈负相关,表明硫限制下亚心形四片藻可能将部分蛋白质和叶绿素降解转化为淀粉<sup>[8]</sup>。同样,White 等报道了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)无硫培养 24 h 后淀粉含量增加了约 10 倍,说明在硫缺乏条件下微藻细胞主要进行淀粉积累<sup>[9]</sup>。碳是微藻生物质的主要组成元素,约占干重的 36%–65%<sup>[10]</sup>。光合自养型微藻利用光能作为能量来源固定二氧化碳合成自身有机物。溶解在水中的二氧化碳主要有  $\text{CO}_2$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$  三种形式,大部分微藻可以利用溶解于水中的  $\text{CO}_2$  和  $\text{HCO}_3^-$  作为无机碳来源,而不能利用  $\text{CO}_3^{2-}$ <sup>[11]</sup>。不同种类的微藻对二氧化碳浓度的响应不一样。如 Gifuni 等报道了小球藻

(*Chlorella sorokiniana*)在二氧化碳浓度为 0.5%、2.0% 和 5.0% 时生物量没有显著性差异,但二氧化碳浓度降为 0.04% 或增加为 10% 时小球藻生物量降低,此外还发现二氧化碳浓度对淀粉的积累没有影响<sup>[12]</sup>。然而,Tang 等研究了斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* SJTU)在二氧化碳浓度为 0.03%、5.00%、10.00%、20.00%、30.00% 及 50.00% 下的生长情况,结果显示二氧化碳浓度为 10% 时生物量最高<sup>[13]</sup>。另外,Izumo 等比较克氏小球藻(*Chlorella kessleri*)在高二氧化碳浓度(3%)与低二氧化碳浓度(0.036%)下淀粉含量的差异,结果发现克氏小球藻在高二氧化碳浓度(3%)培养下淀粉的含量低于低二氧化碳浓度(0.036%)下的含量<sup>[14]</sup>。

标志链带藻(*Desmodesmus insignis*)是本实验室分离纯化的一株绿藻,属于绿藻纲(*Chlorophyta*),栅藻科(*Scenedesmaceae*),链带藻属(*Desmodesmus*),本实验室前期研究表明标志链带藻是一株高含碳水化合物(主要是淀粉)且沉降速度快的微藻,是用于生产生物燃料的优良原料<sup>[15–16]</sup>。另外,本实验室已研究了不同氮浓度对标志链带藻生理生化的影响,结果显示高氮培养下碳水化合物的含量比低氮限制下高<sup>[15]</sup>,与大多数研究结果相反<sup>[8,12,17]</sup>,表明标志链带藻可能存在独特的代谢过程。本文进一步研究其他营养因子磷、硫及二氧化碳浓度对标志链带藻生长及碳水化合物积累的影响,为利用该藻生产生物燃料奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

标志链带藻(*Desmodesmus insignis*)为暨南大学水生生物研究所微藻生物能源与技术实验室保藏藻株。

## 1.2 培养条件

以改良的 BG11 培养基为基础, 改变其中磷酸氢二钾、硫酸镁与通入二氧化碳的浓度, 设置了 8 种磷浓度梯度(低磷组为 0.029、0.058、0.120、0.152、0.192 mmol/L, 对照组 0.230 mmol/L, 高磷组 0.460、0.920 mmol/L), 8 种硫浓度梯度(低硫组: 0.038、0.076、0.152 mmol/L; 对照组: 0.304 mmol/L; 高硫组: 0.609、1.217、1.824、2.432 mmol/L), 4 种二氧化碳浓度水平(V/V)[0.04 (空气)、1% (对照组)、3%、5%], 每组设置 3 个生物学重复。使用  $\varnothing 6.0$  cm $\times$ 60 cm 的柱状光生物反应器培养, 单侧 24 h 持续光照, 入射光强为 300  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 温度为 26  $^{\circ}\text{C}$ , 接种浓度为  $OD_{750}=0.5$ , 培养周期为 15 d。

## 1.3 生物量的测定

每天取 10 mL 藻液, 用预先烘干至恒重( $W_0$ )的 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维滤膜进行真空抽滤, 再将抽滤完的滤膜烘干至恒重( $W_1$ )。生物量(DW)的计算公式如下:  $DW(\text{g/L})=(W_1-W_0)\times 100$ 。

## 1.4 藻粉的制备

每 3 d 取 300 mL 藻液, 静置, 沉淀, 去上清, 收集藻泥放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻结冰, 然后使用冷冻干燥机冻干, 冻干的藻粉放入 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存<sup>[15]</sup>。

## 1.5 碳水化合物含量的测定

采用改进的苯酚-硫酸法测定总碳水化合物的含量<sup>[15-16,18]</sup>, 称取 10 mg 冻干藻粉于 15 mL 的玻璃离心管中, 加入 5 mL 80%乙醇溶液 40  $^{\circ}\text{C}$  提取 20 min, 离心去上清, 重复多次, 直至藻粉变白。然后加入 5 mL 0.5 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 然后 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 4 h, 离心取上清于 25 mL 容量瓶, 定容至 25 mL。取 500  $\mu\text{L}$  提取液, 补水至 2 mL, 再加入

1 mL 6%苯酚与 5 mL 98%浓硫酸, 摇匀, 室温放置 30 min 后, 于 490 nm 下测吸光值, 然后代入标准曲线计算碳水化合物的含量。标准曲线的制作: 称取 10 mg 葡萄糖定容于 100 mL 的容量瓶中, 配制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的葡萄糖标准液, 然后吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 葡萄糖标准液于具塞玻璃管中, 补水至 2 mL, 再加入 1 mL 6%苯酚与 5 mL 98%浓硫酸, 摇匀, 室温放置 30 min 后, 于 490 nm 下测吸光值。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标进行线性回归, 得到标准曲线:  $y=18.048x+0.0106$ , 相关系数  $R^2=0.9997$ 。

## 1.6 总碳水化合物单位体积产率(公式 1)

$$\text{总碳水化合物单位体积产率} = \frac{B \times C}{t} \quad (\text{公式 1})$$

式中,  $B$  为生物量(g/L),  $C$  为碳水化合物含量(% DW),  $t$  为培养时间(d)。

## 1.7 淀粉含量的测定

采用改进的蒽酮-硫酸法<sup>[15-16]</sup>, 称取 10 mg 冻干藻粉于 15 mL 的玻璃离心管中, 加入 5 mL 80%乙醇溶液 40  $^{\circ}\text{C}$  提取 20 min, 离心去上清, 重复多次, 直至藻粉变白。然后加入 2.5 mL 去离子水和 3.25 mL 52%的高氯酸溶液, 冰浴提取 20 min, 离心取上清于 25 mL 的容量瓶中, 重复 3 次, 然后用去离子水定容至刻度线。取 200  $\mu\text{L}$  提取好的样品于具塞玻璃管中, 补水至 1 mL, 加入 4 mL 蒽酮试剂(0.2 g 蒽酮溶解于 100 mL 76%硫酸), 沸水浴 10 min 后, 迅速放置于冷水中冷却终止反应, 于 620 nm 波长下测定吸光值, 带入标准曲线中计算淀粉含量。标准曲线:  $y=8.8491x+0.0074$ , 相关系数  $R^2=0.9997$ 。淀粉含量 =  $\frac{(OD-0.0074)\times 125\times 0.9}{9.9491\times M}$ , 式中  $OD$  为吸光值,  $M$  为藻粉重量(mg), 0.9 为葡

葡萄糖转淀粉的系数。

## 1.8 pH 的测定

采用 CT-6021A pH 计每天测定培养基 pH。

## 1.9 二氧化碳浓度的控制

通气采用纯二氧化碳与空气的混合气体, 通过使用 Cole-Parmer 流量计控制通入二氧化碳与空气的流量比, 实现不同的二氧化碳浓度培养条件。

## 1.10 数据处理

统计分析采用 SPSS 20.0 软件单因素方差中的 LSD 多重比较法, 使用 Excel 2010 和 Origin 8.5 分析数据及制表绘图。

# 2 结果和分析

## 2.1 不同磷浓度对标志链带藻生物量及碳水化合物积累的影响

为了研究不同磷浓度对标志链带藻生长及总碳水化合物含量的影响, 本实验设计了 8 种磷浓度水平, 低磷组为 0.029、0.058、0.120、0.152、0.192 mmol/L, 对照组 0.230 mmol/L, 高磷组 0.460、0.920 mmol/L。不同磷浓度下, 标志链带藻生物量的变化如图 1 所示。随着磷浓度的增加, 生物量不断增加。磷浓度为 0.23 mmol/L 和 0.460 mmol/L 时, 最有利于其生长, 生物量分别高达 6.18 g/L 和 6.37 g/L, 磷浓度为 0.029 mmol/L 时生物量最低为 1.17 g/L。相比于对照组(0.230 mmol/L), 降低磷浓度(除了 0.192 mmol/L)生物量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 磷浓度为 0.029、0.058、0.120、0.152 mmol/L 时的生物量分别只有对照组的 1/6、1/3、1/2、5/6, 但增加磷浓度生物量并无显著性变化, 磷浓度为 0.460 mmol/L 与 0.920 mmol/L 时的生物量与对照组 (0.230 mmol/L) 的生物量没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

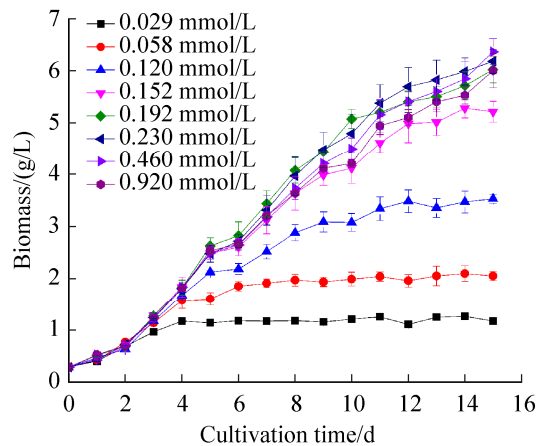


图 1. 不同磷浓度对标志链带藻生物量的影响

Figure 1. The effects of different phosphorus concentrations on the biomass of *D. insignis*.

不同磷浓度下总碳水化合物的含量变化如图 2 所示。培养前期(前 3 d), 所有磷浓度下的碳水化合物的含量均下降, 并且磷浓度越高下降的幅度越大。但随着培养时间的增加, 除了低磷组 0.029 和 0.058 mmol/L 的总碳水化合物在 24% 左右波动外, 其他磷浓度下的总碳水化合物的含量均随着培养时间的增加不断增加。磷浓度为 0.230 mmol/L (对照组), 培养至 15 d 时, 总碳水

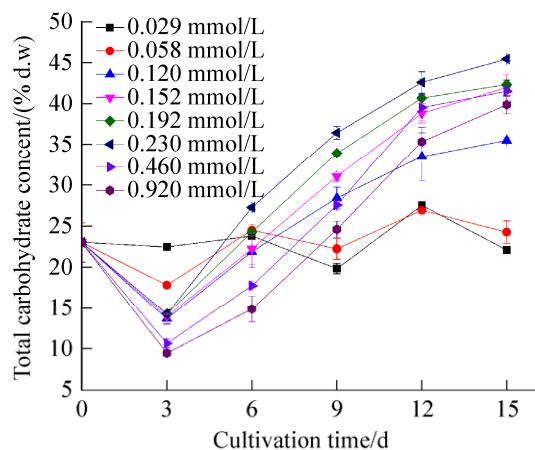


图 2. 不同磷浓度对标志链带藻碳水化合物积累的影响

Figure 2. The effects of different phosphorus concentrations on the carbohydrate content of *D. insignis*.

化合物含量达到最高为细胞干重的 45.40%。相比于对照组,降低或增加磷浓度总碳水化合物的含量均显著性减小( $P<0.05$ ),培养末期磷浓度为 0.029 mmol/L 时总碳水化合物含量最小为细胞干重的 22.1%。不同磷浓度下淀粉含量变化如图 3 所示,与碳水化合物变化一致,培养至 15 d,磷浓度为 0.230 mmol/L 时,淀粉含量最高为 36.11%,进一步降低或增加磷浓度淀粉的含量均显著性减小( $P<0.05$ )。

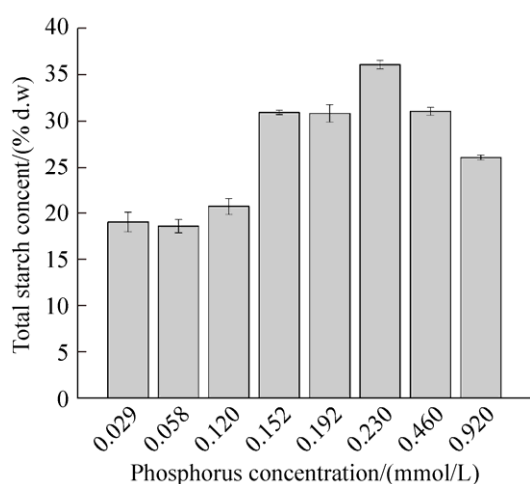


图 3. 不同磷浓度对标志链带藻淀粉含量的影响

Figure 3. The effects of different phosphorus concentrations on the starch content of *D. insignis*.

不同磷浓度下总碳水化合物单位体积产率如表 1 所示。磷浓度为 0.029 mmol/L 和 0.058 mmol/L 时,总碳水化合物单位体积产率随着培养时间增加而降低,而在其他磷浓度下总碳水化合物单位体积产率随着培养时间的增加先增加后降低,均 在第 12 天时达到最大。培养前期(第 3 天)磷浓度为 0.029 mmol/L 时总碳水化合物单位体积产率最高为 0.072 g/(L·d),但从第 6 天开始 0.230 mmol/L 磷浓度下的总碳水化合物单位体积产率高于其他浓度下的产率,最高达 0.20 g/(L·d)。因此,综合生物量与总碳水化合物含量考虑,磷浓度为 0.230 mmol/L 及培养时间为 12 d 时最有利于标志链带藻碳水化合物的积累。

## 2.2 不同硫浓度对标志链带藻生物量及碳水化合物积累的影响

标志链带藻生物量在 8 种不同硫浓度下(低硫组: 0.038、0.076、0.152 mmol/L; 对照组: 0.304 mmol/L; 高硫组: 0.609、1.217、1.824、2.432 mmol/L)的变化如图 4 所示。随着硫浓度的降低生物量降低,硫浓度为 0.038 mmol/L 时生物量最低为 2.66 g/L。培养 15 d 时,硫浓度为 1.217 mmol/L 时生物量最

表 1. 不同磷浓度下总碳水化合物单位体积产率变化[ $\times 10^{-2}$  g/(L·d)]

Table 1. Changes of the productivity of carbohydrate of *D. insignis* at different phosphorus concentrations [ $\times 10^{-2}$  g/(L·d)]

Phosphorus concentration/(mmol/L)	Cultivation time/d				
	3	6	9	12	15
0.029	7.20±0.22	4.64±0.11	2.53±0.16	2.52±0.10	1.72±0.08
0.058	6.70±0.11	7.55±1.10	4.76±1.25	4.37±0.15	3.32±0.75
0.120	5.34±0.26	7.96±3.41	9.72±2.87	9.69±5.37	8.33±0.19
0.152	5.72±0.49	9.62±0.53	13.70±1.29	16.10±3.61	14.60±2.22
0.192	5.88±0.29	11.40±0.65	16.70±0.03	18.30±3.81	17.00±0.92
0.230	5.86±0.28	12.30±0.55	18.10±3.02	20.20±4.00	18.70±0.33
0.460	4.39±1.34	7.83±0.39	12.90±0.39	17.80±2.95	17.60±0.99
0.920	3.83±0.67	6.58±0.80	11.20±0.72	15.00±2.25	16.00±2.42

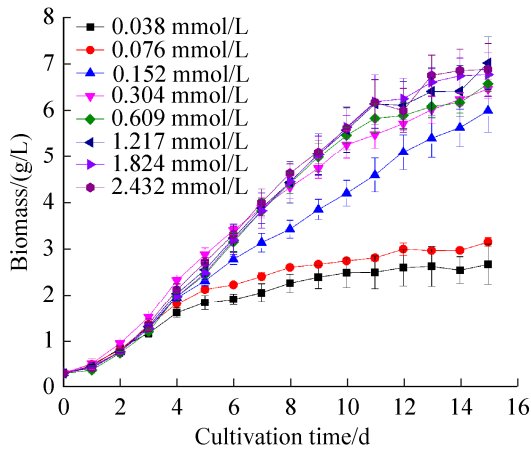


图 4. 不同硫浓度对标志链带藻生物量的影响

Figure 4. The effects of different sulfur concentrations on the biomass of *D. insignis*.  $P>0.05$ .

高为 7.02 g/L, 此外 0.304、0.609、1.217、1.824、2.432 mmol/L 硫浓度下的生物量无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

不同硫浓度下碳水化合物含量变化如图 5 所示。各个硫浓度下总碳水化合物的含量均呈现随培养时间的增加而增加的趋势。培养前期(前 6 d), 低硫组总碳水化合物含量高于其他硫浓度下的含量, 第 6 天硫浓度为 0.038 mmol/L 时总碳水化合物含量最高为 36.6%。但从第 6 天开始, 高硫组总碳水化合物含量高于其他硫浓度下的含量, 培养末期, 硫浓度为 0.609 mmol/L 时总碳水化合物含量最高为 51.6%。此外, 硫浓度为 0.609、1.217、1.824、2.432 mmol/L 下的总碳水化合物含量无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 但均比对照组(0.304 mmol/L)的含量高约 3% 左右, 而低硫(0.038 mmol/L 和 0.076 mmol/L)胁迫下总碳水化合物的含量显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。培养第 15 天时, 不同硫浓度下淀粉含量变化如图 6 所示, 与碳水化合物含量变化类似, 低硫胁迫下, 淀粉含量显著性降低 ( $P<0.05$ ), 淀粉含量最高出现在高硫组, 硫浓度为 1.217 mmol/L 时淀粉含量最高为 41.49% ( $P<0.05$ )。

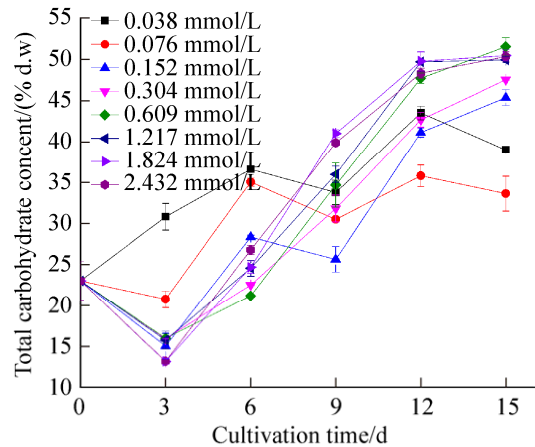


图 5. 不同硫浓度对标志链带藻总碳水化合物的影响

Figure 5. The effects of different sulfur concentrations on the carbohydrate content of *D. insignis*.

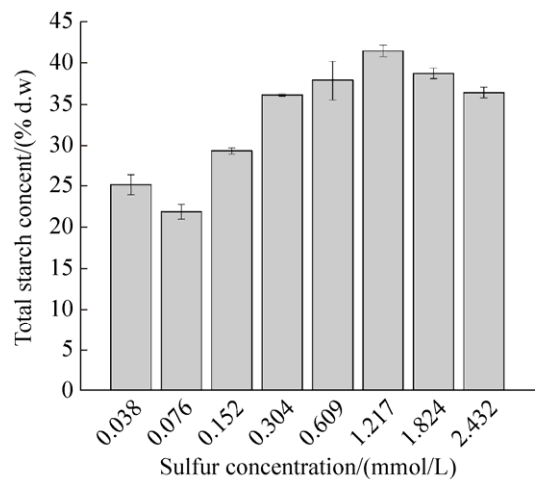


图 6. 不同硫浓度对标志链带藻淀粉的影响

Figure 6. The effects of different sulfur concentrations on the starch content of *D. insignis*.

不同硫浓度下总碳水化合物单位体积产率如表 2 所示。硫浓度为 1.824 mmol/L 培养时间为 12 d 时, 总碳水化合物单位体积产率最高为 0.259 g/(L·d)。培养前期(前 3 d)单位体积总碳水化合物产率随着硫浓度增加而降低, 但从第 6 天起高硫组的单位体积总碳水化合物产率高于低硫组, 并且随着培养时间的增加高硫组的总碳水化合物单位体积产率不断增加, 而低硫组不断减少。

表 2. 不同硫浓度下总碳水化合物单位体积产率变化 $[\times 10^{-2} \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})]$ Table 2. Changes of the productivity of carbohydrate of *D. insignis* at different sulfur concentrations  $[\times 10^{-2} \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})]$ 

Sulfur concentration/(mmol/L)	Cultivation time/d				
	3	6	9	12	15
0.038	11.80±0.45	11.50±0.49	8.94±0.41	9.39±2.75	6.92±0.77
0.076	9.08±3.43	12.90±0.42	9.01±0.062	8.92±1.45	7.05±1.31
0.152	6.25±0.33	13.10±0.42	10.90±3.81	17.40±1.80	18.13±2.94
0.304	7.95±0.017	12.70±0.051	16.70±3.94	20.30±0.98	20.50±0.17
0.609	6.35±0.94	11.10±0.73	19.20±0.92	23.40±1.47	22.60±1.16
1.217	6.79±0.34	13.10±4.79	20.20±4.91	25.30±0.51	23.40±1.32
1.824	5.54±0.82	13.10±4.51	22.90±2.14	25.90±4.30	22.80±2.13
2.432	5.90±0.80	14.70±1.75	22.60±0.66	24.20±2.37	23.10±2.19

### 2.3 不同二氧化碳浓度对标志链带藻生物量及碳水化合物积累的影响

标志链带藻生物量在 4 种不同二氧化碳浓度 (V/V) 下 [0.04% (空气)、1% (对照组)、3%、5%] 的变化如图 7 所示。1% 与 3% 二氧化碳浓度下的生物量显著高于 0.04% 和 5% ( $P < 0.05$ ) 下的生物量。培养至 15 d, 二氧化碳浓度为 3% 时生物量达到最高为 6.81 g/L, 此外, 二氧化碳浓度为 1% 与 3% 时的生物量无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。低二氧化碳浓度 (0.04%) 抑制标志链带藻生长的程度比高二氧化碳 (5%) 大, 0.04% 浓度下的生物量最大仅为 1.27 g/L 而 5% 二氧化碳浓度下的生物量最大可达 5.21 g/L。

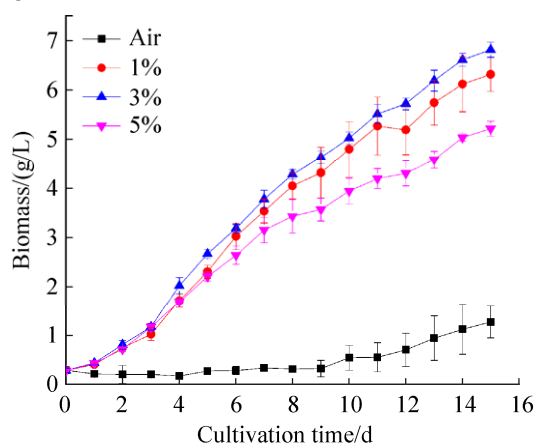


图 7. 不同二氧化碳浓度对标志链带藻生物量的影响  
Figure 7. The effects of different  $\text{CO}_2$  concentrations on the biomass of *D. insignis*.

4 种不同二氧化碳浓度下碳水化合物的含量如图 8 所示。二氧化碳浓度为 3% 时, 碳水化合物含量最高为 44.03%, 其次是二氧化碳浓度为 1% 时碳水化合物含量为 43.43%, 二者无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。进一步升高或降低二氧化碳浓度碳水化合物含量均降低, 0.04% 和 5% 二氧化碳浓度下的碳水化合物含量分别为 37.34% 和 34.64%, 比对照组低 6%–8%。不同二氧化碳浓度下淀粉的含量变化如图 9 所示, 二氧化碳浓度为 1% 与 3% 时, 淀粉含量最高分别为 35.49% 与 35.53%, 二者无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。当进一步升高或降低二氧化碳浓度时, 淀粉含量显著性降低 ( $P < 0.05$ )。

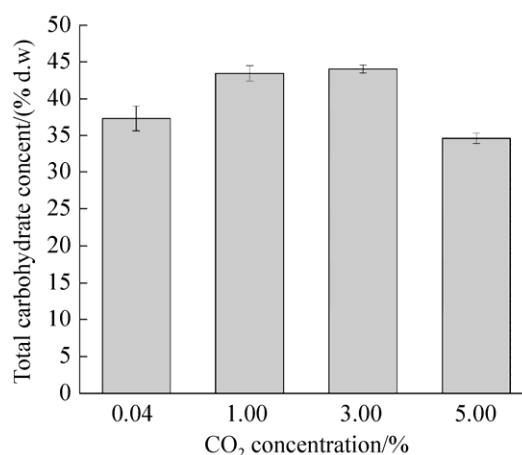


图 8. 不同二氧化碳浓度对标志链带藻碳水化合物含量的影响

Figure 8. The effects of different  $\text{CO}_2$  concentrations on the carbohydrate content of *D. insignis*.

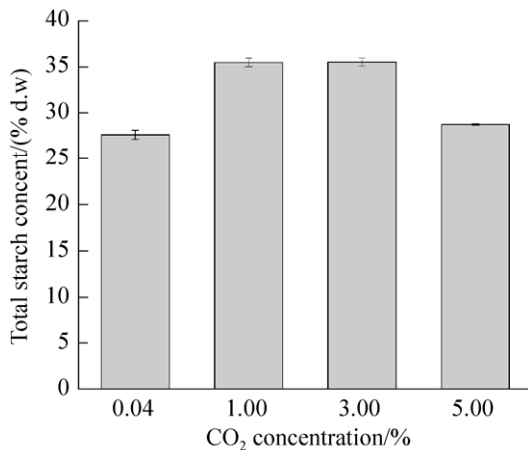


图 9. 不同二氧化碳浓度对标志链带藻淀粉含量的影响  
Figure 9. The effects of different CO<sub>2</sub> concentrations on the starch content of *D. insignis*.

4 种不同二氧化碳浓度下总碳水化合物单位体积产率如图 10 所示。随着二氧化碳浓度的增加总碳水化合物单位体积产率先增加后减少, 二氧化碳浓度为 3% 时总碳水化合物单位体积产率达到最高为 0.20 g/(L·d)。二氧化碳浓度为 0.04% 和 5% 的碳水化合物含量虽无显著性差异但 0.04% 的生物量远低于 5%, 从而导致 0.04% 的总碳水化合物单位体积产率最低为 0.032 g/(L·d)。

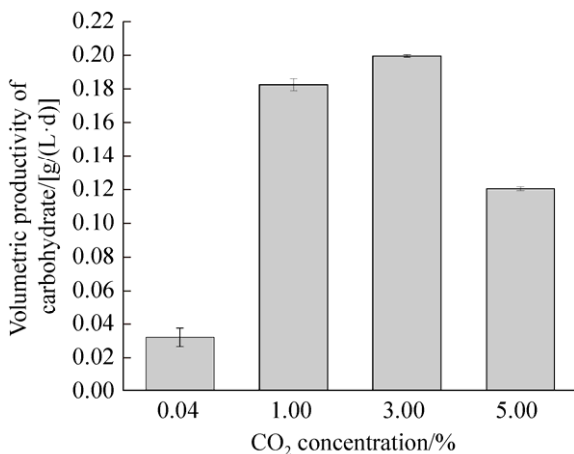


图 10. 不同二氧化碳浓度标志链带藻碳水化合物产率的变化  
Figure 10. Changes of the productivity of carbohydrate of *D. insignis* at different CO<sub>2</sub> concentrations.

### 3 讨论

本文研究了 8 组不同磷浓度对标志链带藻生物量与碳水化合物含量的影响, 结果表明高磷组磷浓度为 0.460 mmol/L 时生物量最高, 而碳水化合物含量最高出现在对照组 0.230 mmol/L。低磷限制下标志链带藻的生长受到明显的抑制, 与大多数研究结果相似<sup>[4,19-21]</sup>。如陈爱玲等研究发现类波氏真眼点藻(*Eustigmatos cf. polyphem*)随着 P 浓度的降低生物量显著下降, 表明在低 P 胁迫下, 藻细胞新陈代谢所需要的能量减少, 从而抑制了细胞分裂<sup>[21]</sup>。相比于对照组, 标志链带藻在高磷浓度培养下生物量没有显著性变化。同样 Yin-Hu 等对栅藻(*Scenedesmus* sp. LX1)研究发现, 持续添加磷使其维持在高磷浓度培养下生物量没有显著性变化, 但培养基中磷浓度保持在一定水平, 表明藻细胞可持续吸收磷但并没有全部转化为生物量, 一部分多余的磷储存在细胞内<sup>[22]</sup>。另外, 本实验结果显示培养末期磷浓度为 0.230 mmol/L (对照组) 时标志链带藻碳水化合物含量最高, 而低磷胁迫下磷浓度为 0.029 mmol/L 时碳水化合物含量最小, 这与许多研究结果相反<sup>[1,4,17,22]</sup>。如 Markou 等研究发现螺旋藻 *Arthrospira (Spirulina)* 随着磷浓度的降低碳水化合物含量逐渐增加, 低磷胁迫下碳水化合物含量最高达 66.60%, 而对照组只有 10.99%<sup>[4]</sup>。同样 Sigeo 等研究发现近具刺链带藻 (*Scenedesmus subspicatus*) 在低磷培养下碳水化合物的含量比在正常与高磷浓度下高<sup>[23]</sup>。通常在低磷胁迫下微藻细胞分裂受到抑制, 光合作用下调, 蛋白质和叶绿素合成停止, 从而促进碳水化合物或脂质积累<sup>[19,24]</sup>。但也有研究报道无磷胁迫对亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)碳水化合物的积累没有影响<sup>[25]</sup>。此外, Said 等研究发现巴



夫杜氏藻(*Dunaliella parva*)在磷饥饿胁迫下碳水化合物含量减少, 其认为可能是因为新合成的碳用于呼吸代谢或其他生物合成途径<sup>[7]</sup>。

本文研究了 8 组不同硫浓度对标志链带藻生物量与碳水化合物含量的影响, 结果显示高硫浓度 1.217 mmol/L 培养下生物量最高为 7.02 g/L, 但与对照组无显著性差异, 并且进一步增加硫浓度生物量也没有显著性变化, 但随着硫浓度减少生物量显著性减少, 说明低硫胁迫不利于标志链带藻的生长。同样有许多研究报道了低硫胁迫抑制微藻生长<sup>[8,21,26]</sup>, 如 Yao 等研究发现当硫浓度从 0.8 mmol/L 降为 0 时, 亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)生物量由 4 g/L 减少至 2 g/L<sup>[8]</sup>。硫饥饿抑制细胞分裂可能是由于藻细胞缺硫情况下, 一些用于生长的氨基酸、蛋白质或其他细胞成分合成受到抑制<sup>[24]</sup>。不同种类的微藻对硫的需求不一样, 本实验结果表明高硫浓度下标志链带藻的生物量与对照组的生物量没有显著性差异。相反, 王倩雅等研究发现产油尖状栅藻(*Scenedesmus acuminatus*)在 2 倍硫下生物量显著高于对照组, 其结果表明加富硫素促进尖状栅藻细胞的生长和繁殖<sup>[26]</sup>。此外本实验结果显示 8 组硫浓度下标志链带藻碳水化合物的含量均随着培养时间的延长而增加, 培养前期低硫组碳水化合物的含量显著高于高硫组与对照组, 而培养末期高硫组碳水化合物的含量显著高于低硫组与对照组, 这与大多数研究结果相反<sup>[5,17,26-27]</sup>。如 Jerez 等研究发现棕小球藻(*Chlorella fusca*)在初始营养盐充足情况下淀粉含量最高出现在培养前期(前 3 d), 但随着培养时间延长淀粉含量逐渐减少, 棕小球藻从积累淀粉转换为积累脂质, 而棕小球藻在硫饥饿情况下从第 3 天开始光合能力下降, 生长停止, 淀粉逐渐积累, 生长平台期时淀

粉含量达到最高<sup>[5]</sup>。Zhang 等研究发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)在低硫限制下淀粉含量提高, 但随着培养时间的延长淀粉逐渐分解, 分解产物用于细胞呼吸及生物氢气合成<sup>[27]</sup>。但有研究报道无硫胁迫下亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)碳水化合物含量没有变化<sup>[25]</sup>。由此可见, 硫对微藻碳水化合物含量的影响存在种类特异性。另外, 大多数微藻是通过低硫胁迫的方法来提高碳水化合物含量, 但同时会引起生物量降低, 从而出现碳水化合物含量提高了但产率却没有提高的情况。而本实验结果显示标志链带藻碳水化合物含量提高的同时生物量没有降低, 从而产率也相应增加。

碳是藻类物质的主要组成成分, 是组成蛋白质、碳水化合物、脂质及核酸的基本成分, 不同物种的微藻在不同二氧化碳浓度下的代谢能力存在差异<sup>[28]</sup>。微藻通常在二氧化碳浓度为 1%–2% 条件下培养<sup>[12,15]</sup>, 当二氧化碳浓度高于 1%–2% 时为高二氧化碳浓度培养条件, 空气培养时为低二氧化碳浓度培养条件<sup>[14]</sup>。本实验结果显示标志链带藻在 3% 二氧化碳浓度下生物量最高, 进一步提高二氧化碳浓度为 5% 或减少为 0.04% 时生物量均显著性降低。同样, Izumo 等研究发现小球藻(*Chlorella*)在 3% 二氧化碳浓度下的细胞密度比在空气下高<sup>[14]</sup>。有研究报道, 当 pH 值低于微藻适宜生长的 pH 范围时, 生长将受到抑制, 而通入空气时由于碳源不足会导致生物量降低<sup>[28]</sup>。如图 11 所示, 随着二氧化碳浓度增加, 培养基的 pH 值逐渐降低, 二氧化碳浓度为 5% 时 pH 值最低达 5.41, 表明可能由于二氧化碳浓度为 5% 时 pH 值低于标志链带藻适宜生长的 pH 范围而导致生物量下降。但有些微藻在较高二氧化碳浓度下生长更好, 如 Harwati 等研究发现绿球藻(*Chlorococcum* sp.)在

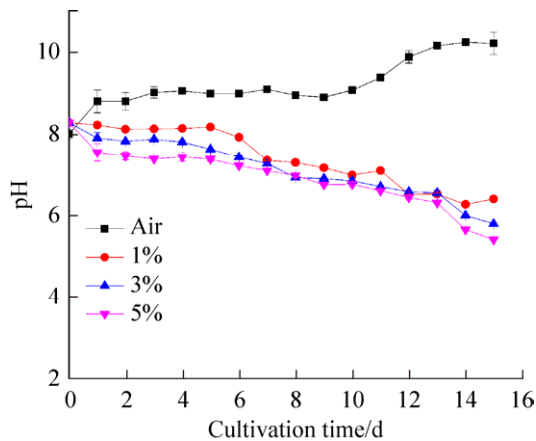


图 11. 不同二氧化碳浓度下 pH 的变化

Figure 11. Changes of pH at different CO<sub>2</sub> concentrations.

6%二氧化碳浓度下细胞密度最高, 并且 1%二氧化碳浓度的细胞密度与空气组的细胞密度一样<sup>[29]</sup>。此外, 标志链带藻在 3%二氧化碳浓度下碳水化合物含量最高, 比空气组高约 6%。相反, Izumo 等发现小球藻(*Chlorella*)在空气培养下淀粉的含量比在 3%二氧化碳浓度下高<sup>[14]</sup>。同样 de Castro Araújo 等研究发现角毛藻(*Chaetoceros cf. wighamii*)在空气培养下碳水化合物含量比在空气加二氧化碳培养下的碳水化合物含量高<sup>[30]</sup>。但有研究发现二氧化碳浓度对小球藻(*Chlorella sorokiniana*)淀粉的含量没有影响<sup>[12]</sup>。综上所述, 二氧化碳浓度对微藻碳水化合物积累的影响具有物种特异性。

本文在前期研究的基础上, 进一步研究了不同磷、硫及二氧化碳浓度对标志链带藻生长及碳水化合物积累的影响。结果表明, 在正常磷浓度 0.230 mmol/L、高硫浓度 1.824 mmol/L 及高二氧化碳浓度 3% 培养条件下最有利于标志链带藻碳水化合物的生产, 不同于大多数微藻是在营养盐胁迫下积累碳水化合物, 该藻是在营养盐充足情况下积累碳水化合物, 其中特殊的代谢机制尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Yao CH, Ai JN, Cao XP, Xue S. Characterization of cell growth and starch production in the marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* under extracellular phosphorus-depleted and sequentially phosphorus-replete conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 6099–6110.
- [2] Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, 37(1): 52–68.
- [3] Markou G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 533–535.
- [4] Markou G, Chatzipavlidis I, Georgakakis D. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: improvements through phosphorus limitation process. *BioEnergy Research*, 2012, 5(4): 915–925.
- [5] Jerez CG, Malapascua JR, Sergejevová M, Figueroa FL, Masojídek J. Effect of nutrient starvation under high irradiance on lipid and starch accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). *Marine Biotechnology*, 2016, 18(1): 24–36.
- [6] Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA. The physiology of microalgae. Cham: Springer, 2016: 1–673.
- [7] Said HA. Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2009, 4(2): 94–99.
- [8] Yao CH, Ai JN, Cao XP, Xue S, Zhang W. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 438–444.
- [9] White AL, Melis A. Biochemistry of hydrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and a Rubisco-less mutant. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31(4): 455–464.
- [10] Van Den Hende S, Vervaeren H, Boon N. Flue gas compounds and microalgae: (bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1405–1424.
- [11] Jiang JW, Cheng LH, Xu XH, Zhang L, Chen HL. Intensified technology for microalgal CO<sub>2</sub> fixation and conversion from flue gas. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014,

- 33(7): 1884–1894. (in Chinese)  
姜加伟, 程丽华, 徐新华, 张林, 陈欢林. 微藻固定转化烟气 CO<sub>2</sub> 强化技术. 化工进展, 2014, 33(7): 1884–1894.
- [12] Gifuni I, Olivieri G, Pollio A, Marzocchella A. Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: the effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation. *New Biotechnology*, 2018, 41: 46–54.
- [13] Tang DH, Han W, Li PL, Miao XL, Zhong JJ. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3071–3076.
- [14] Izumo A, Fujiwara S, Oyama Y, Satoh A, Fujita N, Nakamura Y, Tsuzuki M. Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO<sub>2</sub> concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Science*, 2007, 172(6): 1138–1147.
- [15] Wu GX, Huang LD, Gao BY, Li AF, Zhang CW. Effects of different nitrogen sources and concentrations on starch and lipid biosynthesis by *Desmodesmus insignis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(7): 1168–1177. (in Chinese)  
吴桂秀, 黄罗冬, 高保燕, 李爱芬, 张成武. 不同氮源及其浓度对标志链带藻合成淀粉和油脂的影响. 微生物学报, 2016, 56(7): 1168–1177.
- [16] 沈丹丹. 富油及富淀粉微藻培养与奶牛场废水处理相结合的效果研究. 暨南大学硕士学位论文, 2013.
- [17] Brányikova I, Maršálková B, Doucha J, Brányik T, Bišová K, Zachleder V, Vitová M. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(4): 766–776.
- [18] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356.
- [19] Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 1998, 117(1): 129–139.
- [20] Rasdi NW, Qin JG. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(6): 2221–2230.
- [21] Chen AL, Gao BY, Huang LD, Wang FF, Zhang CW. Effects of initial combined concentrations of nutrients on the growth and lipid accumulation of *Eustigmatos cf. polyphem*. *Plant Science Journal*, 2018, 36(3): 420–430. (in Chinese)  
陈爱玲, 高保燕, 黄罗冬, 王飞飞, 张成武. 营养盐初始组合浓度对类波氏真眼点藻生长和油脂积累的影响. 植物科学学报, 2018, 36(3): 420–430.
- [22] Wu YH, Yu Y, Li X, Hu HY, Su ZF. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*, 2012, 112: 193–198.
- [23] Sigeo DC, Bahrami F, Estrada B, Webster RE, Dean AP. The influence of phosphorus availability on carbon allocation and P quota in *Scenedesmus subspicatus*: a synchrotron-based FTIR analysis. *Phycologia*, 2007, 46(5): 583–592.
- [24] Markou G, Angelidaki I, Georgakakis D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(3): 631–645.
- [25] Ji CF, Yu XJ, Chen ZA, Xue S, Legrand J, Zhang W. Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(10): 5817–5821.
- [26] Wang QY, Zhang Y, Li AF, Zhang CW. Effects of sulfur concentration on the photosynthetic physiology and biochemical composition of *Scenedesmus acuminatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(4): 904–913. (in Chinese)  
王倩雅, 张莹, 李爱芬, 张成武. 硫素营养水平对产油尖状栅藻光合生理及生化组成的影响. 水生生物学报, 2017, 41(4): 904–913.
- [27] Zhang LP, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 2002, 214(4): 552–561.
- [28] Lari Z, Moradi-kheibari N, Ahmadzadeh H, Abrishamchi P, Moheimani NR, Murry MA. Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(6): 3235–3250.
- [29] Harwati TU, Willke T, Vorlop KD. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresource Technology*, 2012, 121: 54–60.
- [30] de Castro Araújo S, Garcia VMT. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, 2005, 246(1/4): 405–412.

# Effects of phosphorus, sulfur and carbon dioxide concentrations on growth and carbohydrate accumulation of *Desmodesmus insignis*

Yi Huang, Baoyan Gao, Feifei Wang, Chenming Dai, Min Su, Chengwu Zhang\*

Research Center for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] To determine the effect of concentrations of P, S and CO<sub>2</sub> on the growth and total carbohydrate accumulation of *Desmodesmus insignis*, the algae were cultivated in modified BG-11 medium containing 8 different initial phosphorus and sulfur concentrations and 4 different carbon dioxide concentrations. [Methods] Biomass and total carbohydrate content were measured by dry weight and phenol-sulfuric acid method, respectively. [Results] The highest biomass concentration reached 6.37 g/L under 0.460 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and the maximum content and productivity of carbohydrate was 45.40% of dry weight and 0.20 g/(L·d) under 0.230 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, respectively. High MgSO<sub>4</sub> concentration could promote the growth and carbohydrate accumulation of *Desmodesmus insignis*. The highest biomass concentration and the maximum content and productivity of carbohydrate were achieved at 1.217 mmol/L, 0.609 mmol/L and 1.824 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, which was 7.02 g/L, 51.60% of dry weight and 0.26 g/(L·d), respectively. In addition, the highest biomass concentration and the maximum content and productivity of carbohydrate were 6.81 g/L, 44.03% and 0.20 g/(L·d) when 3% (V/V) CO<sub>2</sub> was used. [Conclusion] Thus, the concentrations of P, S and CO<sub>2</sub> which were beneficial to the growth and carbohydrate accumulation were 0.230 mmol/L, 1.824 mmol/L and 3% (V/V), respectively.

**Keywords:** *Desmodesmus insignis*, phosphorus, sulfur, carbon dioxide, biomass, carbohydrate

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2013AA065805), by the National Natural Science Foundation of China (31170337), by the Special Program for Low-Carbon, Reform and Development Commission of Guangdong Province (2011-051), by the Scientific and Technological Key Program of Zhuhai (PB20041018) and by the Scientific and Technological Project of Zhuhai (PC20081008)

\*Corresponding author. Fax: +86-20-85222025; E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

Received: 12 October 2018; Revised: 19 December 2018; Published online: 13 March 2019