

微生物学通报

Microbiology China

ISSN 0253-2654, CN 11-1996/Q

《微生物学通报》网络首发论文

题目：一种富集高温栅藻 *Desmodesmus* sp. F51 的新型生物絮凝剂

作者：曾思钰，潘雪珊，沈亮，凌雪萍，卢英华

DOI：10.13344/j.microbiol.china.190462

收稿日期：2019-05-28

网络首发日期：2019-09-16

引用格式：曾思钰，潘雪珊，沈亮，凌雪萍，卢英华. 一种富集高温栅藻 *Desmodesmus* sp. F51 的新型生物絮凝剂. 微生物学通报.
<https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.190462>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190462

一种富集高温栅藻 *Desmodesmus* sp. F51 的新型生物絮凝剂

曾思钰¹ 潘雪珊² 沈亮² 凌雪萍² 卢英华*²

1 惠州卫生职业技术学院 广东 惠州 516000

2 厦门大学化学化工学院 福建 厦门 361005

摘要:【背景】海科贝特氏菌(*Cobetia marina*)可产生大量具有絮凝活性的胞外产物,可视为一种新型的生物絮凝剂。高温栅藻(*Desmodesmus* sp. F51)是一种具有较高叶黄素含量的微藻,被认为是一种新兴的叶黄素来源,但利用该生物絮凝剂高效富集高温栅藻的相关研究迄今尚未见报道。【目的】以高温栅藻为对象,研究该新型生物絮凝剂的絮凝效率,并对絮凝机理进行初步探讨。【方法】探索在不同生长阶段微藻培养液添加生物絮凝剂、添加量、絮凝时间、pH对絮凝效率的影响,分析生物絮凝剂的功能基团,并测定在不同pH条件下添加生物絮凝剂前后高温栅藻的Zeta电位变化,以及在显微镜下分析藻细胞在添加生物絮凝剂前后的形态。【结果】在高温栅藻生长至稳定期,pH 8.0添加2 mL生物絮凝剂,絮凝15 min絮凝效果最佳,达82.1%。傅里叶红外图谱显示了多糖及酰胺结构的特征吸收峰,由此推测生物絮凝剂主要是多糖的混合物,含有少量蛋白质。根据Bradford法测定絮凝剂中蛋白含量约为0.4%(质量比),通过苯酚-硫酸法测定总糖质量分数约为34.5%(质量比),与FTIR谱分析结果基本相符。生物絮凝剂在pH 4.0~11.0保持60%以上的絮凝效率,说明无论是酸性或是碱性条件下絮凝效率都较高,结合Zeta电位的分析表明,推测生物絮凝剂对高温栅藻的絮凝机理中占主导地位的可能是吸附架桥作用。【结论】该研究对微藻生物絮凝具有重要的理论和实践意义。

关键词: 海科贝特氏菌, 新型生物絮凝剂, 高温栅藻

Effective harvesting of the microalgae *Desmodesmus* sp. F51

Foundation items: Xiamen Science and Technology Plan (3502Z20173018); Natural Science Foundation Project of Fujian Province (2017J01077); National Natural Science Foundation of China (31871779)

*Corresponding author: Tel: 86-592-2186038; E-mail: ylu@xmu.edu.cn

Received: 28-05-2019; **Accepted:** 08-08-2019; **Published online:**

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20173018); 福建省自然科学基金(2017J01077); 国家自然科学基金项目(31871779)

*通信作者: 卢英华; Tel: 86-592-2186038; E-mail: ylu@xmu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-28; 接受日期: 2019-08-08; 网络首发日期:

with a novel bioflocculant

ZENG Si-Yu¹ PAN Xue-Shan² SHEN Liang² LING Xue-Ping²

LU Ying-Hua^{*2}

¹ Huizhou Health Sciences Polytechnic, Huizhou, Guangdong 516000, China

² College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

Abstract: [Background] *Cobetia marina* can produce many extracellular products with flocculation activity and therefore is regarded as a novel bioflocculant. *Desmodesmus* sp. F51 is one of the best new resources for natural xanthophyll due to its ability to accumulate large amounts of lutein. However, up to date there is no report on the use of bioflocculant from *Coberia marina* for *Desmodesmus* sp. F51 harvesting. [Objective] The flocculation efficiency and mechanism of the new biological flocculant on *Desmodesmus* sp. F51 were investigated. [Methods] Effects of bioflocculant addition in different growth periods, the addition amount of bioflocculant, flocculation time and pH on flocculation efficiency were investigated. The functional groups of bioflocculant were analyzed. Zeta potential of *Desmodesmus* sp. F51 before and after the addition of bioflocculant under different pH conditions were measured, and the morphology of *Desmodesmus* sp. F51 under the microscope before and after the addition of bioflocculant were also analyzed. [Results] The highest flocculating efficiency (82.1%, 15 min, pH 8.0) was achieved when 2 mL of bioflocculant was added at the stationary growth phase of *Desmodesmus* sp. F51. Fourier transform infrared spectrum analysis showed the characteristic structure of polysaccharides and amide. Thus, it was speculated that the bioflocculant was mainly a mixture of heteropolysaccharides, containing a small amount of proteins. According to Bradford method, the protein content in the bioflocculant was about 0.4% (W/W) and the total sugar content determined by phenol-sulfuric acid method was about 34.5% (W/W), which was basically consistent with the results of Fourier transform infrared spectrum analysis. The flocculating efficiency is above 60% when the pH value ranges from 4 to 11, which indicates that the flocculation efficiency is higher under both acidic and alkaline conditions. The analysis of Zeta potential indicates that the dominant flocculation mechanism of the bioflocculant may be adsorption bridging. [Conclusion] This study is of great significance for microalgae harvesting by bioflocculation.

Keywords: *Cobetia marina*, Bioflocculation, *Desmodesmus* sp. F51

微藻广泛分布于自然界，具有光合作用效率高、环境适应能力强、生长速率快、生长周期短、占地面积小、生物质产率高、可高效吸收废水中的氮、磷等营养元素等优点^[1-3]，已被普遍应用于生物燃料、医学原料、优质食品源及畜牧养殖业等领域^[4]。目前限制微藻生物技术发展的主要挑战之一就是微藻的富集。由于微藻个体小且能稳定悬浮于溶液中，密度低，表面通常带负电荷^[5]，如何从微藻培养基中高效收获微藻是目前学者们积极探索的难题。与常规富集方法如离心、过滤等相比，絮凝法被认为是低成本富集微藻的高效手段^[6]。絮凝法通常包括化学絮凝法、物理絮凝法、自絮凝法和生物絮凝法。其中，生物絮凝法是一种绿色环保且高效的富集方法，某些特定细菌可分泌具有絮凝活性的胞外聚合物起到絮凝微藻的作

用, 具有富集潜能。因此, 有必要开发一种高效、低成本的下游工艺, 从培养基中获取微藻细胞, 并在适当的领域使用并保持其活力和生物活性。

生物絮凝剂, 是将产絮凝剂的微生物在特定的培养基中培养, 使微生物产生并分泌具有絮凝活性的物质。生物絮凝剂作为一种天然产物, 由于其安全性和高效的絮凝效率, 被认为是一种很有前途的微藻处理和回收技术; 另外, 生物絮凝剂也因具有可生物降解且无二次污染的优点, 受到了很多研究者的广泛关注^[7]。关于絮凝机理, 现有研究提出, 絮凝剂的官能团可能通过电性中和和微藻细胞表面电荷或通过架桥吸附或网捕作用, 但哪种机制对微藻富集起主导作用还有待进一步研究^[8-9]。

高温栅藻(*Desmodesmus* sp. F51)是一种具有较高叶黄素含量和生物量产率的微藻, 被认为是一种新兴的叶黄素来源^[10]。海科贝特氏菌(*C. marina*)是一种从沿海海水中分离得到的革兰氏阴性海洋细菌, 是一种亲水细菌, 可产生大量的细胞外产物^[11]。近年来 Lei 等^[12]发现其具有生物絮凝活性, 试验结果表明 20 mg/L 海科贝特氏菌产生的生物絮凝剂与 5 mmol/L CaCl_2 共作用可有效收集小球藻, 絮凝效率达到 92.7%, 可视为一种新型的生物絮凝剂, 而且该生物絮凝剂在较宽的 pH 值和温度范围内保持稳定, 有利于在各种条件下应用。利用该生物絮凝剂富集高温栅藻尚未见相关报道, 因此本研究拟利用 *C. marina* 所产生的新型生物絮凝剂富集高温栅藻, 并解析其絮凝机理。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 絮凝菌种

海科贝特氏菌(*C. marina* MCCC 1113), 由国家海洋局第三海洋研究所中国海洋微生物菌种资源保藏管理中心提供。

固体琼脂培养基(g/L): 胰蛋白胨10.0, 酵母粉5.0, NaCl 30.0, 琼脂20.0。种子培养基(g/L): 胰蛋白胨10.0, 酵母粉5.0, NaCl 30.0。发酵培养基(g/L): 葡萄糖10.0, 胰蛋白胨5.0, 酵母粉1.0, 溶于80% (体积比)人工海水和20% (体积比)去离子水中。人工海水成分(g/L): NaCl 24.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11.0, Na_2SO_4 4.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0, KCl 0.7, KBr 0.1, H_3BO_3 0.003, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.004, NaF 0.003, NH_4NO_3 0.002。

从固体琼脂培养基上挑取菌落接种于种子培养基中, 28 °C、150 r/min培养36 h。将种子菌液按接种量10% (体积比)转接至发酵培养基, 28 °C、150 r/min培养32 h。

1.1.2 藻种

高温栅藻*Desmodesmus* sp. F51^[13]由中国台湾成功大学张嘉修教授提供; 种子培养基为 Modified Bold Basal 3N培养基^[13], 实验培养基为Modified Bristol培养基^[13], 培养方式参照Xie 等^[13]。从平板上刮取1~2藻体, 接种于250 mL玻璃瓶中, 35 °C培养, 300 r/min磁力搅拌, 2.5% CO_2 -空气混合气, 通气量0.05 L/min, 光照强度60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$, 培养至 OD_{685} 为3.5作为种子。将种子接种于1 L玻璃瓶中, 接种量9%, 400 r/min磁力搅拌, 通气量0.2 L/min, 光照强度600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$, 其余条件同上。

1.1.3 主要试剂和仪器

培养基成分及生物絮凝剂制备相关试剂等均为国产分析纯试剂, 购自国药集团化学试剂有限公司。电子分析天平、pH 计, Sartorius 公司; 恒温式磁力搅拌器, 河南省巩义市予华仪器有限责任公司; 冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司; Zeta 电位分析仪, 马尔文公司; FTIR 分光光度计, Thermo 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 生物絮凝剂的制备

生物絮凝剂的制备方法参见文献[14]。具体步骤为：发酵液于 4 ℃、9 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。加入 3 倍体积的无水乙醇(4 ℃预冷)，轻轻振荡，然后将混合物置于 4 ℃过夜，9 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀，加入 10%十六烷基吡啶(CPC)搅拌，溶于去离子水，静置数小时后，9 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀，用 75%乙醇洗涤沉淀 3 次，冷冻干燥后即得生物絮凝剂。将纯化后的生物絮凝剂加入无菌蒸馏水中，配置最终浓度为 10 g/L，用于后续试验。

1.2.2 絮凝剂理化特性检测

100 mL 藻液在磁性搅拌装置中混合均匀(60 r/min)。利用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 将藻液 pH 值分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0。将 2.0 mL 20 mg/L 生物絮凝剂分别加入不同 pH 的藻液中。用 Zeta 电位仪测定藻液、添加生物絮凝剂的藻液在不同 pH 条件下的 Zeta 电位。

采用 FTIR 分光光度计，将收集到的干燥生物絮凝剂与溴化钾(KBr)粉磨碎，压入 KBr 盘，在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内进行傅里叶变换红外(FTIR)光谱测量，以确定生物絮凝剂的特征化学基团。

利用光学显微镜观察微藻絮凝前后的形态变化。利用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[15]；Bradford 法测定蛋白质含量^[16]；水合茚三酮法检测 α -氨基酸^[17]；黄蛋白反应检测芳香族氨基酸^[17]；Benedict 试验检测还原糖^[17]。

2 结果与分析

2.1 不同生长时期添加生物絮凝剂对高温栅藻絮凝效率的影响

为了研究高温栅藻在不同生长时期对絮凝效率的影响，采用以下实验组：1) 于栅藻生长停滞期时加入生物絮凝剂；2) 于栅藻对数生长期时加入生物絮凝剂；3) 于栅藻生长稳定期时加入生物絮凝剂。设定未添加生物絮凝剂的正常生长藻类为对照组，藻类细胞絮凝后，从底部 2/3 的高度对处理组和对照组的培养物进行取样，用分光光度计测定 685 nm 处吸光度值以评价絮凝效果^[18]。每组实验均设 3 组生物学重复。

高温栅藻生长曲线及絮凝效率如图 1 所示。栅藻在接种后前 3 天为生长停滞期，藻体密度无显著增长，培养至第 4 天即进入对数生长期，第 6 天开始进入稳定期。随着高温栅藻生物量的增大，自沉降效率随之升高，栅藻的最高自沉降效率出现在稳定期(11.4%)，这是由于在生长初期生物量较低，藻细胞密度小，不易聚集沉降；随着藻细胞生长至指数期后期和稳定期，藻细胞密度增大，相对运动产生的有效碰撞次数增加，更易聚集自沉降。在耐温栅藻生长至稳定期添加生物絮凝剂，絮凝效率可达 74.6%。这可能是由于指数生长期的耐温栅藻相比稳定期会分泌更多的胞外多糖，它们能与培养基中的金属离子络合，从而影响絮凝效果^[18-19]。因此，在耐温栅藻生长至稳定期添加生物絮凝剂的效果最佳。

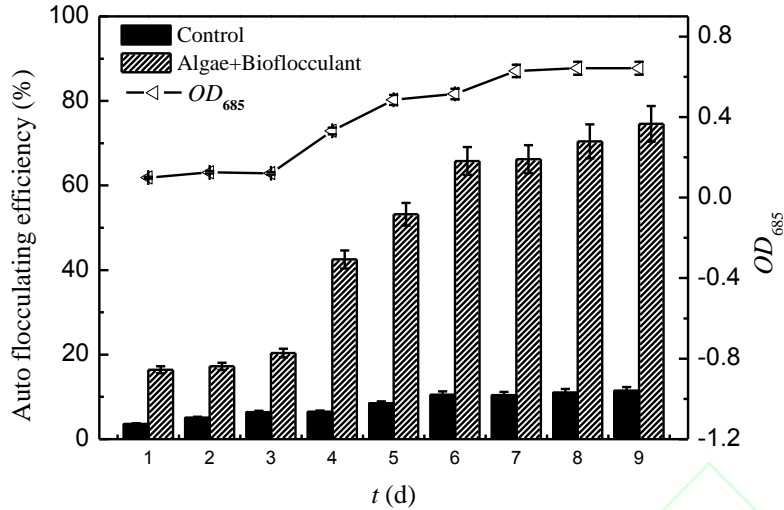


图1 不同生长时期添加生物絮凝剂对高温栅藻絮凝效率的影响

Figure 1 Effect of biofloculant addition time on flocculating efficiency of *Desmodesmus* sp. F51

2.2 絮凝剂添加量对高温栅藻絮凝效率的影响

将不同体积的絮凝剂分别加入预培养至稳定期的栅藻中，絮凝剂添加量对絮凝效率的影响如图2所示。未添加絮凝剂的栅藻自沉降效率为14.2%，随着絮凝剂添加量的增加，絮凝效率随之增大。其中，添加2 mL生物絮凝剂时絮凝效率为77.2%，添加3 mL絮凝剂时得到最大絮凝效率，为78.2%。分析认为，加入絮凝剂后，悬浮液中的微藻颗粒失稳，粒子之间范德华力作用大于静电斥力，从而聚集沉降。随着絮凝剂添加量继续增加至4 mL时，絮凝效率有所下降，这可能因为絮凝剂与栅藻之间的结合位点已接近饱和，阻碍了絮体进一步形成，导致絮凝效率下降。在任何絮凝过程中，絮凝剂的添加量都是直接影响絮凝效果的关键因素，本研究也表明在生物絮凝过程中，生物絮凝剂的添加量过高或过低都会影响最终的絮凝效率。鉴于添加2 mL和3 mL生物絮凝剂二者絮凝效率相差不大，综合考虑后选择添加2 mL生物絮凝剂进行后续试验研究。

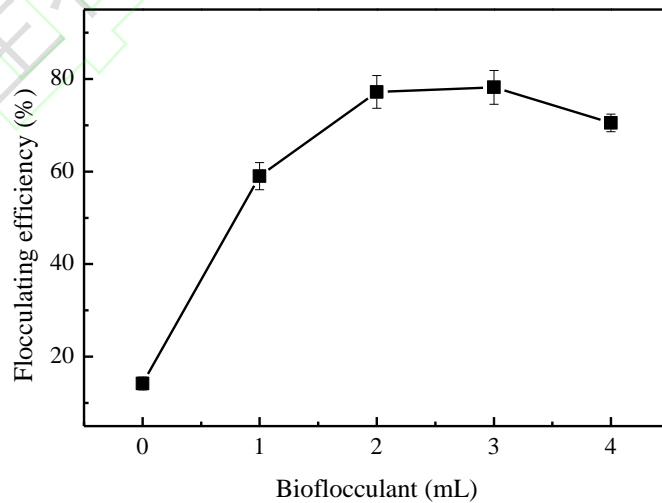


图2 絮凝剂添加量对高温栅藻絮凝效率的影响

Figure 2 Effect of biofloculant addition amount on bioflocculating efficiency of *Desmodesmus* sp. F51

2.3 絮凝时间对高温栅藻絮凝效率的影响

在藻液中加入生物絮凝剂，于振荡器上混匀 5 s，分别静置 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 和 60 min，取上清液测 OD_{685} 。以未加絮凝剂的原始藻液为空白对照，计算絮凝效率，结果如图 3 所示。随着絮凝时间的延长，絮凝效果逐渐增强，絮凝时间在 15 min 絮凝效率已趋最大，为 80.8%，以后变化趋于平缓。这可能因为加入生物絮凝剂后，絮凝剂迅速与藻细胞结合在一起，使体系中出现大量的絮状物悬浮，在重力作用下渐渐地沉降下来，随着絮凝时间的增加，吸附位点逐渐达到饱和，絮凝效率不再继续增加。而对照组的自沉降效率在静置 15 min 后才达到 8.9%，远低于生物絮凝剂处理组。由此可见，生物絮凝剂的加入可以有效缩短栅藻的絮凝时间，从工业应用角度分析，可以有效地节约收集栅藻的时间和成本。

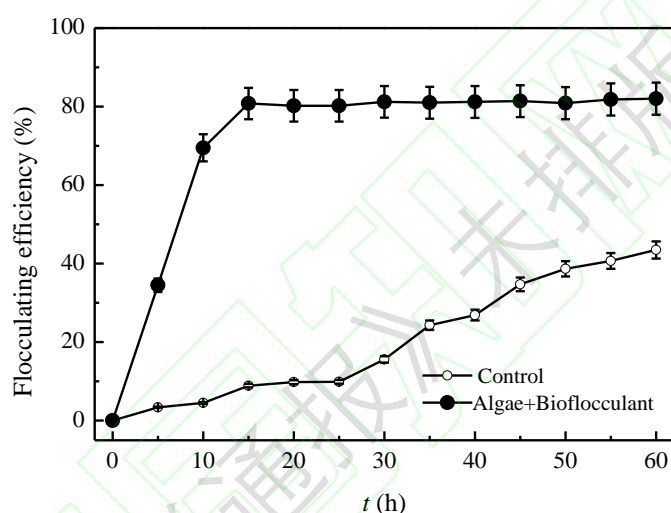


图 3 絮凝时间对高温栅藻絮凝效率的影响

Figure 3 Effect of time on flocculating efficiency of *Desmodesmus* sp. F51

2.4 傅里叶红外光谱法检测

采用红外光谱法对生物絮凝剂的官能团进行分析，结果如图 4 所示。光谱在 3417 cm^{-1} 处显示出强烈的宽拉伸峰，这由糖环中的羟基官能团($-\text{OH}$)伸缩和 $\text{N}-\text{H}$ 振动引起，说明分子中存在氢键。在 2924 cm^{-1} 处，谱线显示出较弱的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动带，这是糖类的特征峰。拉伸峰值出现在 1723 cm^{-1} 处，表明存在 $\text{C}=\text{O}$ 的拉伸振动。此外，在 1643 cm^{-1} 处出现的拉伸峰为多糖中乙酰氨基($-\text{NHCOCH}_3$)的羧基($\text{C}=\text{O}$)存在拉伸振动。在 1539 cm^{-1} 处观测到一个弱对称拉伸峰，表明生物絮凝剂中存在羧基拉伸振动。此外， $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰是糖类衍生物的特征，这些基团是絮凝过程的首选基团。拉伸峰值出现在 1061 cm^{-1} ，说明酯中存在 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 拉伸振动。根据以上结果，FTIR 图谱不仅显示了多糖的特征结构，而且显示了酰胺结构的特征吸收峰。表明该新型生物絮凝剂属胞外高聚物，分子中既含有碱性的氨基，又含有酸性的羧基，这与 Zhang 等的研究结果相一致^[20]。羧基的存在可以作为二价阳离子的结合位点^[21]。絮凝剂中的羰基、羟基和氨基等官能团可能是通过破坏微藻细胞表面电荷平衡，进而实现絮凝微藻的作用。由此可以推测絮凝剂絮凝高温栅藻的絮凝机理中占

主导地位的可能是吸附架桥作用，一定量的羧基可以使絮凝剂分子充分延展，产生架桥使藻细胞吸附到絮凝剂上，形成网状的空间絮体。

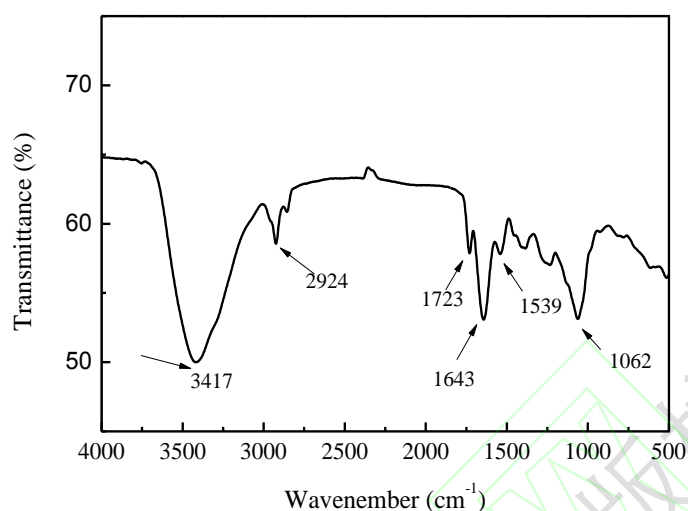


图 4 生物絮凝剂的红外光谱分析图

Figure 4 Fourier transform-infrared spectrograms of the bioflocculant

综上所述，推测生物絮凝剂主要是杂多糖的混合物，含有少量蛋白质。根据 Bradford 法测定絮凝剂中蛋白含量约为 0.4% (质量比)，通过苯酚-硫酸法测定总糖质量分数约为 34.5% (质量比)，与 FTIR 谱分析结果基本相符。而且通过水合茚三酮法、黄蛋白反应、Benedict 试验测得该生物絮凝剂中 α -氨基酸、芳香族氨基酸、还原糖均为阳性。

2.5 pH 对高温栅藻絮凝效率的影响

图 5 为不同 pH 条件下生物絮凝剂对高温栅藻絮凝效率的影响。由图 5 可知，酸性时随着 pH 的升高，絮凝效率逐渐增大，pH 为 8.0 时絮凝效率最高(82.1%)，之后 pH 进一步升高时絮凝效率却缓慢下降。对照组的自沉降率随着 pH 的升高而呈现下降趋势，总体低得多。试验结果表明，生物絮凝剂在 pH 4.0~11.0 之间都保持 60% 以上的絮凝效率。絮凝剂在碱性条件下絮凝效率有所下降，可能由于所带基团离子状态的改变导致对藻细胞的吸附作用大幅下降，弱化了絮凝体的形成。生物絮凝剂在酸性条件下形成带正电荷的离子，碱性条件下形成带负电荷的离子，且由于其分子中氨基和羧基等正负电荷的数目并不完全相等，分子所产生的正负离子数也不相等。微藻 pH 的改变会影响絮凝剂对藻类细胞的电荷中和作用。不同生物絮凝剂的适宜絮凝 pH 值可能因其自身组成及絮凝对象的不同而不同。由此推测 pH 变化会影响絮凝剂的官能团电荷特性，进而影响细胞与絮凝剂官能团之间的架桥和粘附作用力，从而导致絮凝能力的不同^[22]。pH 4.0~11.0 未添加生物絮凝剂的微藻培养液无明显絮凝或絮凝率很低。

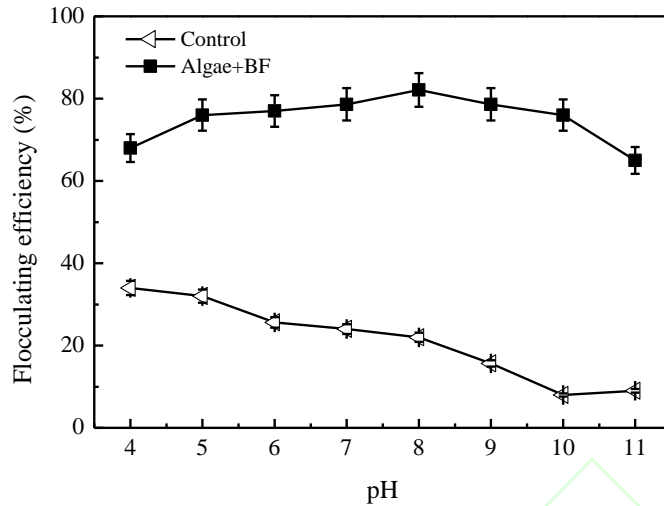


图 5 pH 对高温栅藻絮凝效率的影响

Figure 5 Effect of pH on the flocculating efficiency of *Desmodesmus* sp. F51

2.6 Zeta 电位测定

此外还测定了不同 pH 条件下添加生物絮凝剂后高温栅藻的 Zeta 电位值变化, 并以未添加生物絮凝剂的藻液作为对照。由图 6 可知, 未添加生物絮凝剂时高温栅藻的 Zeta 电位绝对值随 pH 的增大而增大, 絮凝效率降低; 经生物絮凝剂处理后, 藻液的 Zeta 电位绝对值明显降低, 絮凝效率高, 随着 pH 的增大, 藻液的 Zeta 电位一直保持在低负电位。结果表明, 电荷中和在栅藻絮凝过程中起一定作用, 但不是主导作用。

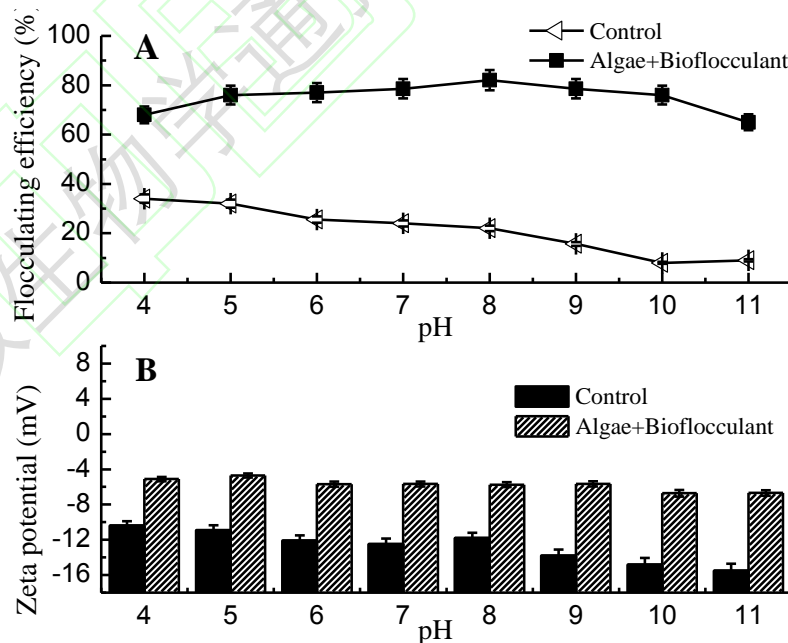


图 6 不同 pH 值下 Zeta 电位及絮凝效率

Figure 6 Flocculating efficiency and Zeta potential of *Desmodesmus* sp. F51 at different pHs

2.7 显微镜检测添加絮凝剂前后微藻形态变化

栅藻添加絮凝剂前后的显微照片见图 7。从图 7A 可以看出栅藻细胞在絮凝前均匀分布于培养基中，添加絮凝剂后(图 7B)藻细胞显著聚集。

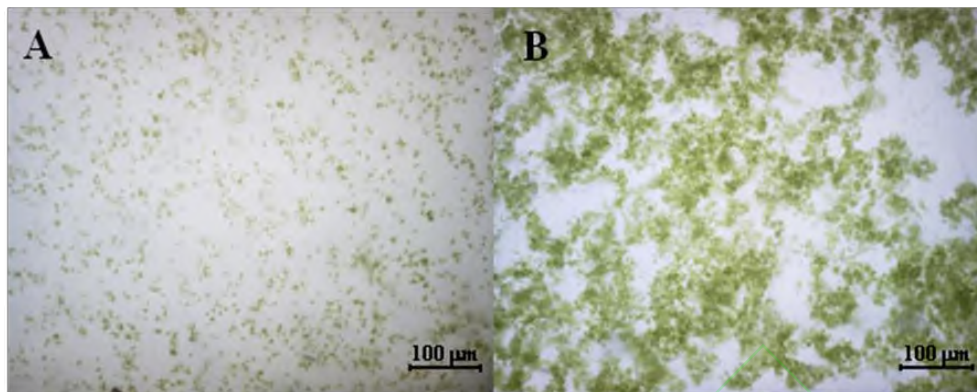


图 7 添加生物絮凝剂前(A)后(B)高温栅藻的显微照片

Figure 7 Microscopic photos of *Desmodesmus* sp. F51 before (A) and after (B) bioflocculation added

3 讨论与结论

生物絮凝法是一种环境友好且高效的微藻富集方法，海科贝特氏菌(*C. marina*)是一种新型的生物絮凝剂产生菌，Lei 等^[12]开发了一种采集微藻细胞的新方法，发现海科贝特氏菌产生的生物絮凝剂可以通过浮选有效地收集小球藻。这种生物絮凝剂在低廉收集微藻领域有着很好的应用潜力。高温栅藻(*Desmodesmus* sp. F51)是一种新兴的叶黄素来源，本研究旨在开发一种高效、低成本的从培养液中高效获取高温栅藻细胞下游工艺，对其絮凝机制进行的初步分析。研究表明在很多生物絮凝过程中，生物絮凝剂都有最适浓度，添加量过高或过低都会影响最终的絮凝效率。如红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)产生的生物絮凝剂的最适浓度为 20 mg/L^[23]。絮凝剂的最适浓度首先受絮凝剂的理化性质决定，其次和絮凝对象相关。有报道将 *Solibacillus silvestris* W01 菌株所产絮凝剂用于絮凝收集微拟球藻(*Nannochloropsis oceanica*)，絮凝剂质量浓度为 200 mg/L 时絮凝率达 76.3%^[24]。将芽孢杆菌(*Bacillus agaradhaerens*)所产生物絮凝剂用于絮凝收集极微小球藻，絮凝剂质量浓度为 8 mg/L 时絮凝率为 80.63%^[25]。在高温栅藻生长至稳定期添加 2 mL 生物絮凝剂，在 15 min 内絮凝效率为 82.1%。微藻 pH 的改变会影响絮凝剂对藻类细胞的电荷中和作用。不同生物絮凝剂的适宜絮凝 pH 值可能因其自身组成及絮凝对象的不同而不同。如 *Bacillus* sp. PY-90 产生的絮凝剂在酸性条件下絮凝活性最高^[26]，*R. erythropolis* 产生的絮凝剂在中性条件具有最高絮凝活性^[27]。克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)所产絮凝剂在 pH 为 4.0~8.0 时絮凝活性均超过 80%，最适宜 pH 值为 7.0^[27]。本研究中的生物絮凝剂在 pH 在 4.0~11.0 之间都保持 60% 以上的絮凝效率，说明该新型生物絮凝剂能适应较宽的 pH 范围，具有良好的应用前景。当然，后续仍需更多的实验深入研究分析，以便为实现生物絮凝剂的低成本、高效益和规模化生产奠定良好的理论和实验基础。

REFERENCES

- [1] Georgianna DR, Mayfield SP. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 329-335
- [2] Fan H, Han P, Wang JH, et al. Status and prospects of microalgae harvesting with biological flocculation[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(2): 26-32 (in Chinese)

-
- 樊华, 韩佩, 王菁晗, 等. 微藻生物采收技术的现状和展望[J]. 生物学杂志, 2017, 34(2): 26-32
- [3] Christenson L, Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 686-702
- [4] Lin Z, Kuang YL, Guo J, et al. A review of microalgae recovery technology[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2009, 9(6): 1242-1248 (in Chinese)
- 林喆, 匡亚莉, 郭进, 等. 微藻采收技术的进展与展望[J]. *过程工程学报*, 2009, 9(6): 1242-1248
- [5] He N, Li Y, Chen J, et al. Recent investigations and applications of bioflocculant[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(2): 104-108 (in Chinese)
- 何宁, 李寅, 陈坚, 等. 生物絮凝剂的最新研究进展及其应用[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2): 104-108
- [6] Guo SL, Zhao XQ, Bai FW. Research progress in harvesting microalgae—a review[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 721-728 (in Chinese)
- 郭锁莲, 赵心清, 白凤武. 微藻采收方法的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 721-728
- [7] Dwyer R, Bruckard WJ, Rea S, et al. Bioflotation and bioflocculation review: microorganisms relevant for mineral beneficiation[J]. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy*, 2012, 121(2): 65-71
- [8] Van Den Hende S, Vervaeren H, Desmet S, et al. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment[J]. *New Biotechnology*, 2011, 29(1): 23-31
- [9] Subramanian SB, Yan S, Tyagi RD, et al. Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering[J]. *Water Research*, 2010, 44(7): 2253-2266
- [10] Wu ZY, Shi XM, Zeng J. Research progress of lutein biosynthesis by microalga[J]. *Food Science*, 2010, 31(1): 268-273 (in Chinese)
- 吴正云, 史贤明, 曾娟. 微藻生物合成叶黄素的研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(1): 268-273
- [11] Lelchat F, C érantola S, Brandily C, et al. The marine bacteria *Cobetia marina* DSMZ 4741 synthesizes an unexpected K-antigen-like exopolysaccharide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 124: 347-356
- [12] Lei XQ, Chen Y, Shao ZZ, et al. Effective harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* via flocculation-flotation with bioflocculant[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 922-925
- [13] Xie YP, Yang XQ, Chen JF, et al. Effects of indoor and outdoor cultivation conditions on the cell growth and lutein accumulation of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2016, 16(5): 849-855 (in Chinese)
- 谢友坪, 阳需求, 陈剑锋, 等. 室内外培养对耐温微藻 *Desmodesmus* sp. F51 细胞生长和叶黄素积累的影响[J]. *过程工程学报*, 2016, 16(5): 849-855
- [14] Li Y, Xu YT, Liu L, et al. First evidence of bioflocculant from *Shinella albus* with flocculation activity on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 807-815
- [15] Cai WC, Yuan HJ. Chemical analysis methods of biological substance[M]. Beijing: Science Press, 1982 (in Chinese)
- 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982
- [16] Castillo-Castillo Y, Ruiz-Barrera O, Burrola-Barrera ME, et al. Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(4): 889-895
- [17] Kim DG, Oh HM, Park YH, et al. Optimization of flocculation conditions for *Botryococcus braunii* using response surface methodology[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(3): 875-882
- [18] Morineau-Thomas O, Jaouen P, Legentilhomme P. The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): advantage of a swirling decaying flow[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2002, 25(1): 35-42

-
- [19] Chen L, Wang CW, Wang WG, et al. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 9-15
- [20] Zhang JG, Hu B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 114: 529-535
- [21] He J, Zou J, Shao ZZ, et al. Characteristics and flocculating mechanism of a novel bioflocculant HBF-3 produced by deep-sea bacterium mutant *Halomonas* sp. V3a'[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(6): 1135-1141
- [22] Salehizadeh H, Shojaosadati SA. Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnological importance[J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19(5): 371-385
- [23] Liu CW, Liu HS. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1): 202-209
- [24] Wan C, Zhao XQ, Guo SL, et al. Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 207-212
- [25] Liu C, Wang K, Jiang JH, et al. A novel bioflocculant produced by a salt-tolerant, alkaliphilic and biofilm-forming strain *Bacillus agaradhaerens* C9 and its application in harvesting *Chlorella minutissima* UTEX2341[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 93: 166-172
- [26] Salim S, Kosterink NR, Tchekoua Wacka ND, et al. Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 174: 34-38
- [27] Garzon-Sanabria AJ, Davis RT, Nikolov ZL. Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 418-424