

基于生物质能源的杜氏藻海水室外周年养殖

陈 昱¹, 刘广发¹, 贾立山², 高亚辉¹, 陈长平¹

(1.厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2.厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 将涨潮海水浓缩后以次氯酸钠进行消毒, 添加少许氮、磷等无机盐, 在室外周年养殖杜氏藻及其多个突变株, 研究其在自然条件下生物量的产出和细胞内脂类的积累。结果表明, 在养殖过程中, 培养液的盐度、pH 值以及细菌含量的变化对杜氏藻的生长没有显著影响。通过培养, 不同株系杜氏藻都可以获得较高的生物量和脂类产出, 特别是耐高温突变株、高脂突变株可以适应夏天室外的高温、高盐等恶劣环境, 普通株在冬天尚能生长, 不同特性的藻株的轮换养殖可以保证养殖场周年养殖。海水养殖有望成为一种大规模培养杜氏藻的既简单又经济的发展模式。文章为进一步开发利用杜氏藻生物质能源奠定了一定的基础。

关键词: 杜氏藻; 室外养殖; 生物质能源; 脂类

中图分类号: TK6; TK123 文献标志码: A 文章编号: 1671-5292(2011)01-0057-05

Annual change of outdoor seawater cultivation of *dunaliella* for biomass energy

CHEN Yu¹, LIU Guang-fa¹, JIA Li-shan², GAO Ya-hui¹, CHEN Chang-ping¹

(1.Key Laboratory for Subtropical Wetland Ecosystem Research, Ministry of Education, and School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Dunaliella bardawil* and several mutants were cultured outdoor in concentrated seawater treated by Javel water with the addition of few nitrate and phosphate, and the biomass and lipid accumulation of *Dunaliella* were assessed. *Dunaliella* species grew well during the cultivation period, despite of the change of salinity, pH and bacteria content in seawater. High lipid and biomass productivity of *Dunaliella* species was obtained in our study. High temperature tolerance mutant and high lipid content mutant grew well under high temperature and high salinity of seawater in summer, while normal strain grew well in winter. Alternate cultivation of different *Dunaliella* strain should be carried out in all-year outdoor cultivation. It would be a simple, economic batch mode for large-scale *Dunaliella* cultivation using concentrated seawater, and it would contribute to further using of *Dunaliella* for biomass energy.

Key words: *dunaliella*; outdoor cultivation; biomass energy; lipid

0 前言

生物质能源的开发利用是缓解我国能源紧张和环境压力、建立可持续发展能源系统的有效措施^[1-3]。在众多生物质中,藻类具有生物量大、生长周期短、易培养、脂类含量较高以及可利用率高等特点,

是制备生物质能源的良好原料^[4-6]。杜氏藻(*Dunaliella* sp.)属绿藻门,团藻目,是内陆盐湖和沿海盐沼常见的鞭毛藻类,对逆境(如高盐和强光照)的耐受能力很强,在开放的环境中容易得到纯度较高的培养。较高的生物质产出和胞内脂类积累是开

收稿日期: 2010-03-01。

基金项目: 福建省科技重点项目(2009N0052);福建省重大专项前期研究项目(2005YZ1022)。

作者简介: 陈 昱(1982-),男,硕士,主要从事生物质能源研究。E-mail: chencp@xmu.edu.cn

发利用藻类制备生物质燃料的重要研究方向^[7]。本文选择杜氏藻作为研究对象,利用已有的多个藻株,开展浓缩海水周年室外养殖,以期建立一种利用海水、阳光、大气、高产脂类的杜氏藻养殖新模式,为进一步开发利用可再生杜氏藻生物质能源提供有价值的理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

试验藻株包括野生型杜氏藻及通过紫外线诱变获得的突变株系:*Dunaliella sp.* (购自青岛海洋大学,以下简称N)、巴氏杜氏藻(*Dunaliella bardawil*,由以色列M. Ginzburg博士惠赠)的耐高温突变株(以下简称HT)^[8]、巴氏杜氏藻的高脂突变株HL-1和HL-2^[9]。培养液为Ben-Amotz人工海水培养基^[10],其中NaCl的浓度为1.5 mol/L,温度为(28±1) °C,连续光照(3 000 lx)培养。

1.2 海水培养基

取厦门海域涨潮海水,将其置于阳光下曝晒,蒸发至原体积的1/2~1/3,必要时添加少量的NaCl,将浓缩海水的盐度调至90‰左右,用纱布过滤。使用前,在密封容器中用20 μL/L的次氯酸钠溶液消毒处理24 h。按照表1所示,将母液A、B分别按1%和1‰的比例添加到浓缩海水中,即为养殖杜氏藻的海水培养基。

表1 浓缩海水培养基的组成及其含量
Table 1 Constitution and concentrations of the concentrated seawater media

母液	成分	浓度/mol·L ⁻¹	备注
A液(100×)	KNO ₃	0.1	A液为氮、磷营养元素
	NaNO ₃	0.4	
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.01	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	7.0	
B液(1000×)	ZnCl ₂	0.8	B液为微量元素
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.2	

1.3 室外周年培养杜氏藻

将藻种接种于85 cm(长)×45 cm(宽)×15 cm(高)的敞口玻璃缸里,缸上加盖玻板(留有空隙)。将注入浓缩海水培养液和藻种的玻璃缸置于室外阳光充足的地方进行养殖,每日不时搅动。每月一批,周年养殖。

1.4 生物量与脂类的测定

每3 d取样测定培养液的OD₆₃₀值、盐度和pH值,并在显微镜下观察杜氏藻的生长情况。选

择1月、4月、7月和10月为一年的代表月份,养殖杜氏藻高脂突变株。在杜氏藻生长进入平衡期后收获,制成藻粉,采用索氏提取法测定脂类含量^[11]。

1.5 细菌总数的测定

按照平板计数法测定藻液中的细菌总数^[12],每季度测一次。检测时每3 d取杜氏藻露天海水养殖溶液,按10倍稀释法系列稀释成不同浓度样液。分别吸取各样液100 μL,涂抹在以海水养殖溶液配制成的固体培养基表面上(含琼脂1.3%),于30 °C恒温培养48 h,计算各种菌落的总数。

2 结果和分析

2.1 海水培养基pH值、盐度和细菌数量的周年变化

经检测,在周年浓缩海水养殖杜氏藻的过程中,尽管没有在培养基中添加缓冲溶液,且养殖过程中也都未进行pH值调控,但培养液的pH值一直变化不大,全年为7.2~8.2,可以满足杜氏藻的生长需要,其原因可能与复杂的浓缩海水本身成分就已经构成一定的缓冲体系有关。

在养殖杜氏藻过程中,浓缩海水培养液的盐度和细菌数量变化明显(图1~2)。随着时间的推移,培养液的盐度逐渐上升,从培养初期的90‰上升至300‰左右(图1)。由于不同季节的温度、

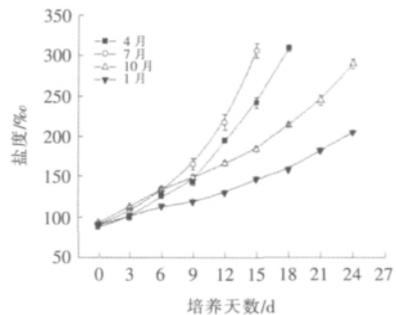


图1 海水培养基盐度的周年变化
Fig.1 Annual variation of salinity in seawater media

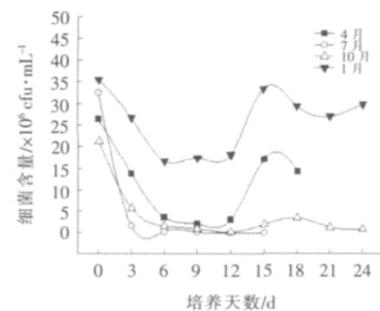


图2 海水培养基细菌含量的周年变化
Fig.2 Annual variation of bacteria quantities in seawater media

光照条件差异很大,导致海水蒸发的速度明显不一致,所以不同季节盐度变化的速率差异明显。其中,在7月份养殖15 d后,盐度可达到312‰,出现了盐晶体析出现象;4月和10月养殖过程中,20 d后盐度可达过饱和状态;而1月份养殖25 d,培养基盐度达到200‰左右,仍然属于杜氏藻可生长的范围。

海水培养基在接种杜氏藻后,细菌含量为 $(2.13\sim 3.55)\times 10^7$ cfu/mL(图2)。在7月和10月的养殖过程中,细菌含量均随着养殖时间的推移而降低,最终都减少到 8.0×10^5 cfu/mL以下;在1月和4月的养殖初期,细菌含量随着养殖时间的推移而降低,养殖10 d以后,细菌含量有所增加,最终维持在 $(1.42\sim 2.98)\times 10^7$ cfu/mL。出现这种情况的原因可能有两方面:(1)海水培养基中出现的细菌来自原藻种及海水中(经消毒未除净),它们多数不能耐受7月和10月的强光(包括紫外线)、高温及由此形成的高浓度海水等恶劣的环境,导致总菌数降到很低的水平(厦门的10月光照依然很强);(2)1月和4月阳光不强,气温不高,但随着培养基盐度逐渐升高,还是有部分细菌因不适而死亡,因此总菌数有所下降。在培养后期,因少数杜氏藻的死亡为细菌繁殖提供了一定的有机质,使得总菌数重新上升。

2.2 不同株系杜氏藻生长情况的周年变化

养殖过程中,耐高温突变株的藻细胞干重周年变化在0.65~0.93 g/L(图3)。其中,3月产出的生物量最高,4月和5月次之,藻细胞收获的干重都超过了0.90 g/L;7月的产量最低,只有0.65 g/L(盐度过高影响生长);其他月份的藻细胞干重维

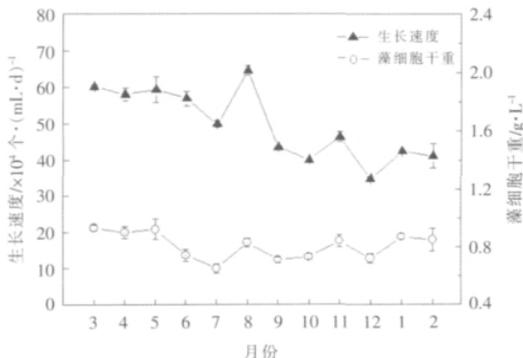


图3 耐高温突变株杜氏藻的生长速度和干重的周年变化情况

Fig.3 Annual variation of growth rate and dry weight of *Dunaliella* (High temperature tolerant strain)

持在0.80 g/L左右。另外,该藻株的生长速度周年变化明显,平均每毫升培养液每天所增加的藻细胞数在 $(3.475\sim 6.462)\times 10^5$ 个,其中,8月份藻株生长状态最好;3~7月次之,藻细胞生长速度几乎都能达到 5.5×10^5 个/(mL·d);在12月、1月以及2月,杜氏藻生长较缓慢,藻细胞生长速度只有 4.0×10^5 个/(mL·d)左右,可能与冬季气温较低有关。

养殖过程中,杜氏藻普通株系的藻细胞干重周年变化在0.41~0.96 g/L,其中,1~4月的生物量产出较高,都超过了0.90 g/L;8月和9月的产量较低,藻细胞收获的干重为0.60 g/L左右;6月和7月的藻细胞产量最低,不到0.40 g/L(图4)。另外,该藻株的生长速度周年变化同样很明显,平均每毫升培养液每天所增加的藻细胞数在 $(3.048\sim 6.154)\times 10^5$ 个,其中3月藻株的生长状态最好;11月次之,藻细胞生长速度超过了 5.0×10^5 个/(mL·d);6~9月不太适合杜氏藻的生长,藻细胞的生长速度均只有 3.5×10^5 个/(mL·d)左右。由此看来,与耐高温突变株相反,杜氏藻普通株能够适应较低的温度。利用它们的不同特性分别在夏季和冬季养殖,将会收到较好的效果。

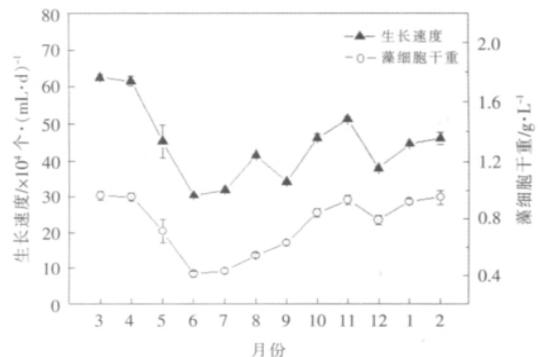


图4 普通株杜氏藻的生长速度和干重的周年变化情况

Fig.4 Annual variation of growth rate and dry weight of *Dunaliella* (Normal strain)

杜氏藻高脂突变株 HL-1 和 HL-2 的藻细胞干重变化比较接近,分别在0.70~0.92 g/L和0.74~0.98 g/L(图5,6)。HL-1和HL-2藻株在4月和10月的藻细胞生物量产量(干重)都高于1月和7月(7月最低),而且高脂杜氏藻在4月、7月以及10月的藻细胞收获干重都高于耐高温突变株。这从另一方面验证了高脂杜氏藻也具备耐高温的特性。另外,HL-1和HL-2藻细胞生长速度的变化分

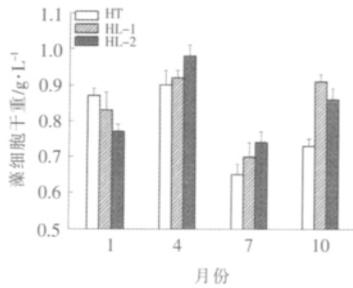


图5 高脂杜氏藻的细胞干重的周年变化情况

Fig.5 Annual variation of dry weight of high lipid-content strains of *Dunaliella*

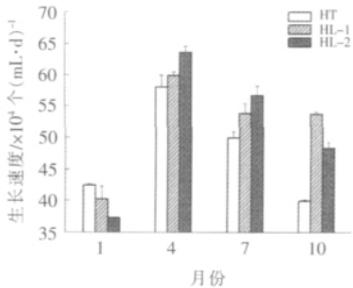


图6 高脂杜氏藻的生长速度的周年变化情况

Fig.6 Annual variation of growth rate of high lipid-content strains of *Dunaliella*

别在 $(4.031 \sim 5.989) \times 10^5$ 个/(mL·d) 和 $(3.729 \sim 6.364) \times 10^5$ 个/(mL·d), 其中都在4月份生长最快, 1月份生长最慢, 而且高脂杜氏藻在4月、7月以及10月的生长速度均高于耐高温突变株。

2.3 杜氏藻脂类含量的周年变化

耐高温突变株的藻细胞脂类含量在 10.0%~17.1%(图7)。其中,11月的脂类含量最高;6~8月的脂类含量偏低,约占藻细胞干重的10%,其他月份的脂类含量维持在15%左右。普通株的藻细胞脂类含量在 6.8%~19.4%(图8)。其中,4月的脂类含量最高;11月、12月、1月、2月和3月的脂类含量次之,约占藻细胞干重的17%;6月和7月的

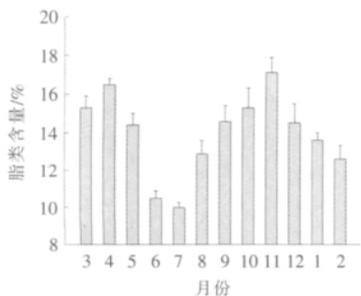


图7 杜氏藻耐高温突变株(HT)脂类含量的周年变化情况

Fig.7 Annual variation of lipid contents of *Dunaliella* (high temperature tolerant strain)

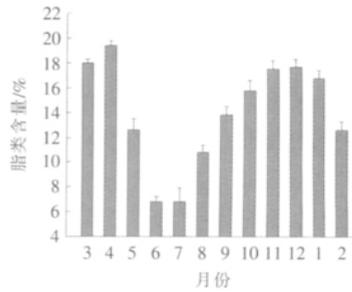


图8 杜氏藻普通藻株(N)脂类含量的周年变化情况

Fig.8 Annual variation of lipid contents of *Dunaliella* (normal strain)

脂类含量最低,均不到7%,与上文所述该藻株可适应低温的结论相吻合。

高脂杜氏藻 HL-1 和 HL-2 脂类含量的变化分别在 14.2%~19.8%和 11.6%~19.1%(图9)。它们的脂类含量都在4月达到最高,分别在1月和7月降到最低。另外,HL-1 藻株7月的脂类含量可达干重的15.3%,同样表现出耐高温的特点,而耐高温突变株的脂类含量只有10.0%。HL-2 藻株在寒冷的冬季(1月),脂类含量可达干重的18.5%,明显高于耐高温突变株。由此可以根据它们的特性分别在夏季和冬季养殖,以达到最大的经济效益。

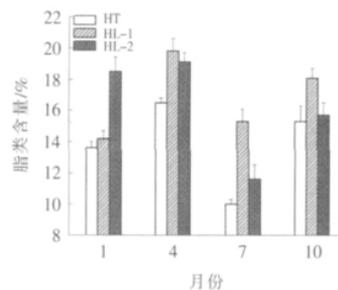


图9 耐高温藻株与高脂藻株脂类含量的季节变化情况

Fig.9 Comparison of lipid contents between high lipid-content strain (HL-1, 2) and high-temperature tolerance strain (HT) of *Dunaliella* in different seasons

4 讨论

杜氏藻的人工养殖始于20世纪60年代,主要是收获藻体用于鱼、虾、贝类等幼体的饵料。真正以提取杜氏藻细胞化合物为目的的养殖始于20世纪70年代。目前,以色列、美国、日本、澳大利亚等国家均已形成从养殖到深加工等规模不同的杜氏藻产业^[13]。已报道的一些室内外养殖研究主要针对杜氏藻的β-胡萝卜素、营养成分分析等内容^[14-15],很少涉及到生物质能源部分^[16]。

藻类细胞内脂类含量是提高生物质能源转化率的关键^[17]。试验结果表明,从开发杜氏藻生物质能源的角度出发,以浓缩海水露天养殖杜氏藻获得了不错的效果。虽然光照强度和温度等均无人控制,但厦门地处我国东南沿海,属海洋性气候,光照充足,一年中最冷和最热月的月平均气温分别为 12.4℃和 28.4℃,对杜氏藻生长不构成根本性障碍。另外,海水营养盐含量丰富,养殖杜氏藻只须添加少量的氮、磷成分以及微量元素。更重要的是浓缩海水为杜氏藻的生长提供了合适的盐度生境,同时限制了其他生物的繁殖。在周年养殖过程中,培养液的盐度、pH 值以及微生物污染情况的变化都对杜氏藻生长不产生显著影响。无论是杜氏藻的普通株系,还是其耐高温突变株、高脂突变株,都能获得较高的生物量。

试验发现,春季和秋季最适合杜氏藻的生长,它们均有较快的生长速度和较高的藻细胞干重,而且脂类相对含量也高;杜氏藻高脂突变株具有耐高温的特性,在夏季均能正常生长,而且生长速度、生物量以及藻细胞的脂类含量均高于普通株;杜氏藻在冬季的生长速度较慢,需要 25 d 左右才能达到生长平衡期。HL-1 和 HL-2 在冬季的生长速度和生物量均低于普通株,藻细胞的脂类含量也偏低。

杜氏藻对环境的适应能力强。在浓缩海水养殖过程中,培养液盐度随着海水的蒸发而逐渐上升,高盐度的培养环境,抑制了微生物的生长以及绝大多数其他藻类或者捕食者的入侵,使杜氏藻可以保持在相对纯种的状况下生长,易于人工养殖,在周年养殖的过程中,均可获得较高的藻细胞生物量和脂类含量;其次,海水富含多种元素成分和盐分,只需补充少量的 N、P、Mg、Zn、Cu 元素,即可利用海水作为杜氏藻的培养液,养殖成本大大降低。总体来讲,利用浓缩海水养殖杜氏藻简单易行、成本低廉,有望克服生物质能源成本过高的瓶颈,成为开发杜氏藻生物质能源的新养殖模式。

参考文献:

- [1] 田雅林,王革华.OECD 国家可再生能源的发展[J].可再生能源,2003(5):42-44.
- [2] 史立山.中国能源现状分析和可再生能源发展规划[J].可再生能源,2004,22(5):1-4.

- [3] 付玉杰,祖元刚.生物柴油[M].北京:科学出版社,2005.
- [4] 胡风庆,侯潇,吴庆余.利用微藻热解成烃制备可再生生物能源进展[J].辽宁大学学报(自然科学版),1999(2):182-187.
- [5] 缪晓玲,吴庆余.微藻生物质可再生能源的开发利用[J].可再生能源,2003,21(3):13-16.
- [6] 童牧,周志刚.新一代生物柴油原料——微藻[J].农业工程技术,2009(5):19-26.
- [7] 陈昱,刘广发,周韬.7种(13株)杜氏藻的总脂含量和脂肪酸组成[J].台湾海峡,2007,26(4):517-521.
- [8] 黄瑞芳,刘广发,周韬,等.耐高温杜氏藻突变株的诱变和鉴定[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(2):272-275.
- [9] 陈昱,林锦明,刘广发.高脂杜氏藻的诱变筛选与分析[J].厦门大学学报(自然科学版),2008,47(3):397-401.
- [10] GINZBURG M. Dunaliella: a green alga adapted to salt[J]. *Advances in Botanical Research*, 1987, 14: 93-183.
- [11] 林加涵,魏文铃.现代生物学实验(下册)[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [12] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法(第4版)[M].北京:中国环境科学出版社,2002.
- [13] 林广凤.盐生杜氏藻的生物学特性及其开发利用[J].齐鲁渔业,2006,23(11):7-9.
- [14] 姜建国,姚汝华.5种盐藻生化组成及β-胡萝卜素异构体分析[J].华南理工大学学报,1997,25(10):38-41.
- [15] 梁秀芝,刘成君,彭峰,等.6种盐藻的营养成分[J].食品科技,2007(1):206-209.
- [16] 孙俊楠,张建安,杨明德,等.葡萄糖对杜氏藻生长特性影响的研究[J].可再生能源,2006,24(4):38-41.
- [17] 缪晓玲,吴庆余.藻类异养转化制备生物油燃料技术[J].可再生能源,2004,22(4):41-44.

2010 年全球微藻基加快发展

2010 年是微藻基生物燃料加快发展的第一年。2010 年 10 月,派克研究(Pike Research)公司发布报告,微藻基生物燃料在今后 10 年内将会加快发展,2020 年将达到 23.1 万 m³ (6 100 万加仑),市场价值将达 13 亿美元,复合年增长率为 72%,可与生物柴油工业开发初期的增速相提并论。

(摘自中国新能源网 2011-1-12)