

共培养微藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 与 *Chlorella* sp. U4341 提高油脂产率与沉降率

赵飞燕,余旭亚,徐军伟,李涛,赵鹏

(昆明理工大学 生命科学与技术学院,昆明 650500)

摘要:采用共培养技术,在异养条件下培养微藻 *Chlorella* sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10,提高两株微藻共培养的油脂产率;通过共培养方式促进微藻细胞的自絮凝,加速微藻细胞的沉降,以期降低微藻生物量的采收成本。结果表明:微藻 *Chlorella* sp. U4341 与 *Monoraphidium* sp. FXY-10 单独培养的油脂产率分别为 272.07、268.54 mg/(L·d),而两株微藻共培养的油脂产率提高到 315.60 mg/(L·d);两株微藻共培养后,自然沉降 5 h,微藻细胞沉降率高于 90%,远高于单独培养条件下的沉降率。因此,微藻的共培养技术有望成为解决微藻油脂产率低、采收成本高两大瓶颈问题的解决方案。

关键词:*Chlorella*; *Monoraphidium*; 共培养; 油脂产率; 采收成本; 生物柴油

中图分类号:S917.3;S968.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2018)02-0104-06

Enhancement of lipid productivity and flocculation by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10

ZHAO Feiyan, YU Xuya, XU Junwei, LI Tao, ZHAO Peng

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology,
Kunming 650500, China)

Abstract:The co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10 under heterotrophic condition to improve the lipid productivity was studied. The flocculation and sedimentation of microalgae cells were promoted and accelerated by co-cultivation so as to reduce the harvesting cost of microalgae biomass. The results showed that the co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10 significantly increased the lipid productivity (315.60 mg/(L·d)) compared with mono-cultivations (272.07 mg/(L·d) and 268.54 mg/(L·d)). After sedimentation for 5 h, the flocculation efficiency of microalgae cells in co-cultivation reached above 90%, far higher than that in mono-cultivation. Therefore, co-cultivation of microalgae might be the solution for the low lipid productivity and high harvesting cost of microalgae.

Key words:*Chlorella*; *Monoraphidium*; co-cultivation; lipid productivity; harvesting cost; biodiesel

目前大规模培养微藻生产油脂,在技术上已经

可行,但受高昂生产成本的制约,尚不能工业大规模生产^[1]。在微藻的油脂生产中,有两项因素严重制约着微藻油脂生物柴油的生产成本控制,使其在与传统石化柴油的成本竞争中处于劣势。一方面是微藻油脂产率相对较低。油脂产率的提高需要从增加脂质含量及快速积累生物量这两方面着手。研究^[2-3]表明,可以通过改变微藻培养条件(温度、光照、pH、氮浓度、磷酸盐、铁元素等)增加油脂含量或

收稿日期:2017-05-16;修回日期:2017-10-24

基金项目:国家自然科学基金(21666012,21266013);省级人培项目(KKSY201526023)

作者简介:赵飞燕(1993),女,硕士研究生,研究方向为微藻资源开发(E-mail)740654964@qq.com。

通信作者:赵鹏,讲师,博士(E-mail)zhaopeng_ca@163.com。

促进细胞生物量的积累。然而,众多研究表明,很难通过改变培养条件同时提高微藻的油脂含量以及细胞生长速度,因此微藻油脂产率较低的问题未能很好地解决^[4]。最近,微藻共培养的特殊生化反应机理得到了越来越多的关注。我们之前的研究^[5]表明,可以将微藻的共培养视作一个全新的策略应用于微藻研究领域,以期有效提升微藻油脂产率。另一方面是微藻采收成本较高。据估计,微藻采收成本占微藻油脂生物柴油生产总成本的20%~30%^[6]。

微藻细胞自絮凝采收的方法是在不额外添加化学物质的条件下,即可依靠重力沉降的作用实现藻细胞的采收,具有低能耗、高效率的优势,具有较好的应用潜力。目前,微藻自絮凝的研究主要集中在水处理方向,而在微藻油脂领域的研究较少。能够自絮凝的藻种较少,仅限于镰形纤维藻(*Ankistrodesmus falcatus*), *Ettlia texensis*, 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* AS-6-1)和小球藻(*Chlorella vulgaris* JSC-7)等^[7],因此限制了微藻细胞自絮凝的研究和应用。

在本研究中,将在本地湖泊中筛选得到的两株微藻 *Chlorella* sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10 进行异养条件下的共培养。这两种微藻均能为生物柴油的生产提供理想的油脂原料^[2,5]。通过对共培养后油脂产率及絮凝效率的研究,以期找到同时提高微藻的油脂产率及絮凝效率的,为有效降低微藻油脂生产成本探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 微藻及培养

微藻 *Chlorella* sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10, 均从云南省高原淡水湖抚仙湖(24°20'67" N, 102°32'9" E)水样中分离得到。培养基成分为:NaNO₃(1.68 g/L), KH₂PO₄(0.55 g/L), K₂HPO₄·3H₂O(0.58 g/L), MgSO₄·7H₂O(0.3 g/L), FeSO₄·7H₂O(2.5 mg/L), A5 微量元素溶液(1.2 mL/L)。添加24.81 g/L的葡萄糖为碳源后,将培养基调整至pH 6.3后进行高压蒸汽灭菌。在含有200 mL培养基的500 mL锥形瓶中,接入对数生长期的种子液后,微藻U4341与FXY-10在异养条件下进行共培养,初始细胞浓度分别为1.83×10⁶、3.50×10⁶个/mL,放置于摇床中25℃、150 r/min避光培养。两种微藻的单独培养分别作为对照。

1.2 实验方法

1.2.1 比生长速率和生物量的测定

利用血球板计数器测定细胞浓度,计算微藻的

比生长速率(μ)。培养液于13 000 g离心5 min,去离子水洗涤沉淀2次后,冷冻干燥,获得藻粉。称重计算生物量及生物量产率^[5]。

1.2.2 油脂提取

冻干藻粉中油脂采用Bligh-Dyer法进行提取^[8]。提取的油脂在70℃干燥2 h,冷却至室温后称重,计算油脂含量及油脂产率^[5]。

1.2.3 脂肪酸组成分析及相关指标测定

采用直接转酯化法对冻干藻粉中油脂进行甲酯化反应,生成脂肪酸甲酯(FAMEs)^[9]。在室温条件下,加入1 mL正己烷萃取FAMEs,利用GC-MS对FAMEs进行分析^[5]。根据脂肪酸组成计算脂肪酸不饱和度(DU)以及冷滤点(CFPP)^[10]。计算单一脂肪酸的十六烷值(CN),利用组合模型预估生物柴油的CN^[11]。

1.2.4 硝酸盐含量的测定

利用比色法测定培养体系中硝酸盐浓度。取1 mL藻培养液,13 000 g离心5 min,取100 μ L上清液与400 μ L水杨酸-H₂SO₄溶液(5%)混合。在室温下放置20 min后,缓慢加入9.5 mL 2 mol/L的NaOH。待冷却至室温后,于410 nm波长下测定吸光度,计算硝酸盐含量。

1.2.5 微藻沉降率的测定

培养结束后的藻液,稀释为相同细胞浓度,转移至250 mL玻璃烧杯中缓慢混合1 min,在室温条件下,避光自然沉降。距藻液底部2/3高度处进行取样,分光光度计(SPECORD 210 plus, Analytic Jena, Germany)于1 cm光程750 nm波长进行比色测定,计算沉降率(η)。

$$\eta = (OD_{750}(t_0) - OD_{750}(t)) / OD_{750}(t_0) \times 100\%$$

式中: $OD_{750}(t_0)$ 为开始沉降时藻液在750 nm的光密度; $OD_{750}(t)$ 为沉降至 t 时刻藻液在750 nm的光密度。

1.2.6 形态分析

在250 mL玻璃烧杯中将藻液静置1 h,距藻液底部2/3处取样取,显微镜(Eclipse 50i, Nikon)下进行观察,并用CCD拍摄进行分析。

1.2.7 胞外聚合物(EPS)提取

取培养结束后藻液,在13 000 g离心5 min,将上清液同两倍体积的无水乙醇混合均匀,4℃放置过夜。离心分离收获最终沉淀物(13 000 g, 10 min)。80%乙醇洗涤两次,100%乙醇洗涤一次^[12]。旋蒸去除残余乙醇后,用去离子水重新溶解沉淀,冻干后用于进一步分析。

1.2.8 EPS中的多糖和蛋白质的测定

采用蒽酮-硫酸显色实验测定 EPS 中的多糖^[13], 葡萄糖为阳性对照, 去离子水为阴性对照。采用考马斯亮蓝显色实验测定 EPS 中的蛋白质^[14], 牛血清白蛋白为阳性对照, 去离子水为阴性对照。

1.2.9 数据处理

全部实验均设置 3 组平行, 利用 ANOVA

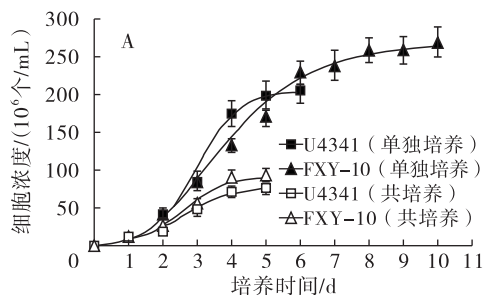


图1 *Chlorella* sp. U4341 与 *Monoraphidium* sp. FXY-10 单独培养及共培养条件下的生长曲线(A)和硝酸盐消耗(B)

从图 1A 可以看出, 所有培养体系中的微藻在生长过程中均未出现明显的停滞期, 原因在于微藻的接种量较大, 有利于减少杂菌的污染。在单独培养条件下, U4341 培养 6 d 后细胞浓度为 205.5×10^6 个/mL; FXY-10 培养 10 d 后的细胞浓度为 268.7×10^6 个/mL; 而 U4341 与 FXY-10 共培养 5 d 后的细胞浓度分别为 76.4×10^6 个/mL 和 92.2×10^6 个/mL。在共培养体系中, 由于两种微藻之间存在竞争关系, 两种微藻的生长受到抑制, 使其细胞浓度低于其单独培养状态下的细胞浓度。东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense* Lu) 与锥状斯克里普藻 (*Scrippsiella trochoidea*) (Stein) Loeblich 共培养中, 两种微藻的生长受到抑制, 使其在共培养条件下的细胞浓度下降^[15]。

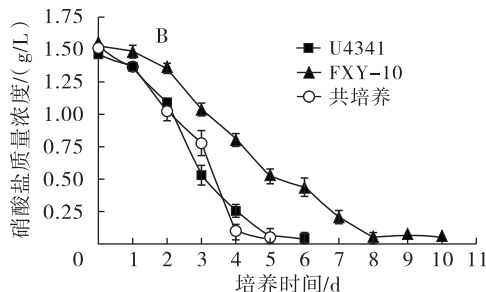
从图 1B 可以看出, 培养 5 d 时, 共培养和 U4341 单独培养体系内的硝酸盐几乎被耗尽; 培养 8 d 时, FXY-10 单独培养体系中的硝酸盐才被利

(SPSS19.0) 一步法分析实验数据。最小显著性差异进行多重比较检验组间差异, 且当 $p < 0.05$ 具有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 生长特性

微藻的生长曲线及硝酸盐消耗如图 1 所示。



用完。在共培养体系中的硝酸盐几乎耗尽时, FXY-10 单独培养体系中却仍然剩余 34% 左右的硝酸盐。由此可见, 共培养体系中氮源贫乏的情况出现得更早。这种现象可能与微藻生长环境的变化相关, 共培养条件会诱导微藻代谢途径的改变, 促使其产生在单一培养条件下不会合成的化合物。在这些物质的生物合成过程中, 硝酸盐被大量消耗。在赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 与中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 的共培养过程中, 合成了一种新型多糖蛋白复合物^[16]。莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 和水华鱼腥藻 (*Anabaena flosaquae*) 的共培养过程中, 合成了一种新型寡肽^[17]。

2.2 油脂产率

Chlorella sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10 在异养生长情况下的单独培养及共培养的油脂产率见表 1。

表 1 *Chlorella* sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10 在异养生长情况下的单独培养及共培养的油脂产率

项目	U4341	FXY-10	U4341 + FXY-10
μ/d^{-1}	0.79 ± 0.08	0.64 ± 0.07	0.60 ± 0.06 (U4341) 0.52 ± 0.04 (FXY-10)
生物量/(g/L)	6.74 ± 0.07	8.04 ± 0.83	5.15 ± 0.47
生物量产率/(mg/(L·d))	$1\ 123.33 \pm 12.28$	804.00 ± 10.21	$1\ 030.00 \pm 12.05$
油脂含量/%	24.22 ± 0.10	33.40 ± 0.15	30.64 ± 0.12
油脂产率/(mg/(L·d))	272.07 ± 2.07	268.54 ± 3.83	315.60 ± 2.49

从表 1 可以看出, U4341 单独培养的生物量产率最高 ($1\ 123.33$ mg/(L·d)), FXY-10 单独培养的生物量产率最低 (804 mg/(L·d))。FXY-10 单独培养的油脂含量最高 (33.40%), U4341 单独培养的油脂含量最低 (24.22%), 共培养条件下的油脂含量及生物量产率介于两微藻单独培养之间。为

生物柴油生产提供油脂原料的微藻, 需要具备较高的生物量产率及油脂含量。然而, 微藻的生长速度与其油脂含量并不具备相关性, 富含油脂的藻种往往生长速度缓慢^[5]。因此, 有必要将油脂含量和生物量产率同时进行考察, 采用油脂产率作为评估微藻产油性能的综合指标。

U4341 和 FXY-10 在单独培养条件下的油脂产率分别为 272.07 mg/(L·d) 和 268.54 mg/(L·d), 低于共培养条件下的油脂产率 315.60 mg/(L·d)。研究^[5]发现, 在自养方式下进行 U4341 与 FXY-10 的共培养, 共培养条件下能获得高油脂产率。在异养方式中, 微藻的培养时间相比自养方式大幅缩短, 而且油脂产率高于自养方式。在共培养条件下, 更易出现营养限制, 尤其是氮源贫乏, 微藻能够快速进入

稳定期, 使得培养时间明显缩短。此外, 培养体系中氮源缺乏可能会促进油脂的积累, 使总油脂产率得以提高。

2.3 脂肪酸组成及相关指标

微藻油脂的脂肪酸组成直接影响生物柴油的品质。本研究对共培养微藻油脂的脂肪酸组成进行了分析, 结果见表 2。

表 2 *Chlorella* sp. U4341 和 *Monoraphidium* sp. FXY-10 在异养生长情况下的单独培养及共培养的脂肪酸组成及相关指标

项目	U4341	FXY-10	U4341 + FXY-10
脂肪酸/%			
C14:0	0.47 ± 0.1	ND	ND
C16:0	25.55 ± 0.8	41.9 ± 2.6	36.84 ± 2.0
C16:1	4.28 ± 0.3	ND	0.78 ± 0.
C16:2	5.92 ± 0.5	ND	1.04 ± 0.2
C16:3	2.38 ± 0.3	ND	0.24 ± 0.1
C16:4	ND	1.9 ± 0.4	0.10 ± 0.0
C18:0	3.54 ± 0.5	3.5 ± 0.0	1.28 ± 0.2
C18:1	26.62 ± 1.8	32.1 ± 1.4	36.33 ± 2.6
C18:2	18.6 ± 1.4	6.1 ± 0.9	13.18 ± 1.1
SF	29.56 ± 1.4	45.4 ± 2.6	38.12 ± 2.2
MUFA	30.90 ± 2.1	32.1 ± 1.4	37.11 ± 2.7
PUFA	30.72 ± 2.7	8.0 ± 1.3	15.99 ± 1.8
DU	92.34 ± 7.5	85.5 ± 4.0	69.09 ± 6.3
LCSF	4.325 ± 0.3	5.94 ± 0.3	4.32 ± 0.3
CFPP/°C	-2.89 ± 0.3	2.18 ± 0.5	-2.89 ± 0.5
CN	47.19 ± 3.3	51.73 ± 3.3	52.26 ± 2.68

注: ND 表示检测限以下; LCSF 表示长链饱和因素。

从表 2 可以看出, 共培养微藻油脂的主要脂肪酸为棕榈酸 (36.84%)、油酸 (36.33%) 和亚油酸 (13.18%), 均为 16~18 个碳原子的脂肪酸, 较好地满足生物柴油的生产要求。根据英国 EN 14214 标准的规定, 油脂中 C18:3 和 C18:4 脂肪酸的含量不高于 12% 和 1%, 共培养体系中 C18:3 和 C18:4 含量均符合标准的要求。评价生物柴油品质的关键指标主要有 CN、碘值和冷滤点 (CFPP)^[10-11]。油脂的不饱和度是决定生物柴油碘值的重要参数。Ramos 等^[10]提出生物柴油原料油脂的不饱和度不应高于 137。共培养油脂的不饱和度为 69.09, 远低于单独培养 U4341 (92.34)、单独培养 FXY-10 (85.5)、菜籽油 (121.9) 和葵花籽油 (152.2), 以及微藻 *Ankistrodesmus fusiformis* (102.91)、*Kirchneriella lunaris* (112.77) 和 *Botryococcus braunii* (100.69)^[18]。

各国对 CN 的下限均有要求, 英国 (EN 14214) 标准为不低于 51, 德国 (DIN V 51606) 标准为不低

于 49, 美国 (ASTM D6751-07a) 标准为不低于 47, 我国的生物柴油标准《生物柴油调和燃料 (B5) 标准》(GB/T 25199-2010) 规定车用柴油 CN 为不低于 49。根据脂肪酸组成, 可以计算得到 U4341 和 FXY-10 共培养油脂的 CN 为 52.26, 明显高于葵花籽油 (43.99)、单独培养 U4341 (47.19) 和 FXY-10 (51.73), 但略低于棕榈油 (60.60) 和菜籽油 (54.46)。

尽管棕榈油的不饱和度更低 (64.2), CN 更高 (60.60), 但是 CFPP 较差 (10°C)。CFPP 是衡量生物柴油低温性能的重要指标。CFPP 越高, 则生物柴油的低温流动性越差^[10]。根据所处的气候环境不同, 各国对 CFPP 值有不同的规定。共培养条件下微藻生物柴油的 CFPP 为 -2.89°C, 低温流动性较好, 能够满足绝大部分国家标准中的规定。

2.4 自絮凝沉降性能

共培养有利于微藻细胞的絮凝, 加速细胞的自

然沉降速度。培养结束后,采用显微镜观察微藻细胞自然沉降 1 h 的情况,发现在单独培养条件下,U4314 和 FXY-10 呈分散、单独的细胞状态,未观察到絮凝物的形成。然而,两种微藻的共培养中,能够明显观察到微藻细胞聚集并形成絮凝。两种培养方法下微藻的沉降率见图 2。

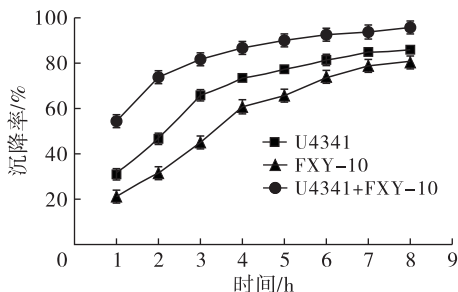


图 2 单独培养及共培养体系中微藻细胞的沉降率

从图 2 可以看出,共培养后有最高的沉降率,沉降 5 h 后,沉降率在 90% 以上。在沉降 8 h 后,单独培养 U4341 和 FXY-10 的沉降率分别为 85% 和 80%。

通常情况下,微藻多以单细胞状态悬浮于培养体系中,采收难度较大。添加无机多价金属盐、有机高分子聚合物、微生物絮凝剂、氨等絮凝剂后,微藻细胞能够迅速聚集,获得较高的沉降率。但是,添加的絮凝剂会形成新的污染源,进而形成二次污染。另外,絮凝剂的添加,产生了新的成本,不利于降低微藻采收的成本。在本研究中,尽管共培养方式采收微藻所消耗的时间较长,但无需外加絮凝剂,就能实现自然重力沉降,降低了采收成本,对大规模微藻生物量的采收有较好的应用潜力。

2.5 共培养对絮凝的影响因素分析

部分微藻会生产一类由多糖、蛋白质、糖蛋白等构成的复杂高分子胞外聚合物(EPS)。EPS 具备促进絮凝、加速沉降的作用。

在本研究中,共培养中 EPS 浓度远高于单独培养(见图 3)。对 U4341 和 FXY-10 共培养中分离的 EPS 进行蒽酮-硫酸实验及考马斯亮蓝实验,结果显示阳性。由此推断,EPS 为多糖和蛋白质组成的复合物。

在共培养环境中,有可能会大量合成 EPS。据报道,在 *Rhizobium radiobacter* F2 与 *Bacillus sphaericus* F6 的共培养过程中,能够产生高浓度的 EPS^[19]。本研究结果显示,共培养条件下硝酸盐的消耗速度明显大于单独培养(见图 1B)。在共培养环境中,会更早出现氮贫乏的情况。在氮源不足的情况下,微藻生长受到抑制,进而有效促进 EPS 的积累,促进

细胞聚集,引发藻细胞的自絮凝沉降。

Pezzolesi 等^[20]研究表明,pH 变化能够诱导微藻絮凝,对沉降率产生影响。U4341 和 FXY-10 单独培养成熟培养液的 pH 分别为 7.69 与 7.42,共培养成熟培养液的 pH 为 7.89。测定单独培养 U4341 和 FXY-10 在原始 pH 条件下的沉降率与调节至共培养 pH 的沉降率,发现两种微藻在不同 pH 条件下沉降率的变化幅度很小(见图 4)。但是,共培养微藻的沉降率却明显较高。上述结果表明,pH 变化并不是共培养 U4341 和 FXY-10 促进沉降率显著提高的主要原因,pH 对沉降率的影响不显著,有可能是由于培养液中钙、镁离子浓度较低。

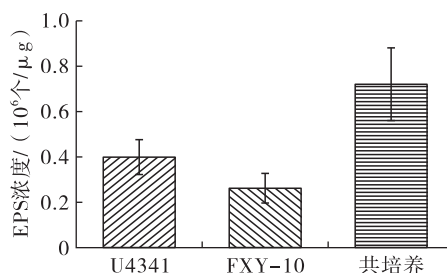


图 3 单独培养及共培养体系的 EPS 浓度

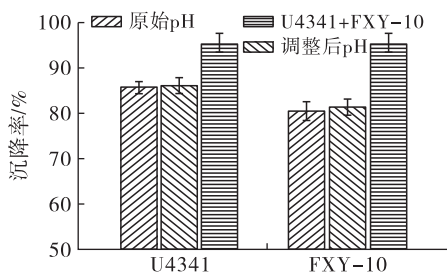


图 4 微藻液调整 pH 前后的沉降率

3 结论

微藻共培养是提高微藻油脂产率和降低采收成本的新策略。与单独微藻培养相比,共培养微藻的油脂产率明显提高。U4341 和 FXY-10 在单独培养条件下的油脂产率分别为 272.07 mg/(L·d) 和 268.54 mg/(L·d),低于共培养条件下的油脂产率 315.60 mg/(L·d)。共培养微藻油脂主要的脂肪酸为棕榈酸(36.84%)、油酸(36.33%)和亚油酸(13.18%),均为 16~18 个碳原子的脂肪酸,较好地满足生物柴油的生产要求。因此,微藻共培养油脂适合于生物柴油生产。共培养后的微藻不需添加絮凝剂,能实现自发絮凝,促进沉降,是一种较为经济、有效的微藻生物量采收方法。两株微藻共培养后,自然沉降 5 h,微藻细胞沉降率高于 90%,远高于单独培养条件下的沉降率。综上所述,微藻共培养是一种有较好应用前景的培养方式,能够降低微藻油脂

的生产成本,为生物柴油的生产提供优质的原料。

参考文献:

- [1] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnol Adv*, 2007,25: 294 – 306.
- [2] YU X, ZHAO P, HE C, et al. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 121: 256 – 262.
- [3] CHE R Q, DING K, HUANG L, et al. Enhancing biomass and oil accumulation of *Monoraphidium* sp. FXY – 10 by combined fulvic acid and two – step cultivation[J]. *J Taiwan Inst Cheme*, 2016,27:19 – 34.
- [4] SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, et al. A look back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from algae [J]. *Nat Renew Energy Lab*, 1998(7):1 – 4.
- [5] ZHAO P, YU X Y, LI J J, et al. Enhancing lipid productivity by co – cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY – 10[J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 3: 72 – 77.
- [6] WU Z C, ZHU Y, HUANG W Y, et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium [J]. *Bioresour Technol*, 2012,110: 496 – 502.
- [7] SALIM S, VERMUE M H, WIJFFELS R H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy – efficient harvesting by bio – flocculation [J]. *Bioresour Technol*, 2012,118: 49 – 55.
- [8] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37: 911 – 917.
- [9] 王盛林, 赵震宇, 刘平怀. 10种热带富油微藻生物量、总脂含量及脂肪酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2017, 42(8): 93 – 97.
- [10] RAMOS M J, FEMÁNDEZ C M, CASAS A, et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties[J]. *Bioresour Technol*, 2009,100: 261 – 268.
- [11] 张秋云, 吴忠富, 罗丹, 等. 新型海藻酸铬复合物的制备及其催化油酸甲酯化合成生物柴油[J]. *中国油脂*, 2017, 42(7):101 – 105.
- [12] IMASE M, WATANABE K, AOYAGI H, et al. Construction of an artificial symbiotic community using a *Chlorella* – symbiont association as a model[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008,63: 273 – 282.
- [13] NGUYEN T L, LEE D J, CHANG J S, et al. Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation[J]. *Colloids Surfaces B Biointerf*, 2013, 105: 246 – 250.
- [14] XIA S, ZHANG Z, WANG X. Production and characterization of abioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ – 1 [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 6520 – 6527.
- [15] WANG Y, TANG X X. Interactions between *Prorocentrum donghaiense* Lu and *Scrippsiella trochoidea* (Stein) Loeblich III under laboratory culture[J]. *Harmful Algae*, 2008, 7: 65 – 75.
- [16] YAMASAKI Y, SHIKATA T, NUKATA A, et al. Extracellular polysaccharide – protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community [J]. *Int Soc Microb Ecol*, 2009,3: 808 – 817.
- [17] KEARNS K D, HUNTER M D. Toxin – producing *Anabaena flos – aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile algae [J]. *Microb Ecol*, 2001,42: 80 – 86.
- [18] NASCIMENTO I A, MARQUES S S I, Cabanelas I T D, et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria[J]. *Bioenerg Res*, 2013,6: 1 – 13.
- [19] WANG L L, MA F, QU Y Y, et al. Characterization of a compound bioflocculant produced by mixed culture of *Rhizobium radiobacter* F2 and *Bacillus sphaericus* F6 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011,27: 2559 – 2565.
- [20] PEZZOLESI L, SAMORI C, PISTOCCHI R. Flocculation induced by homogeneous and heterogeneous acid treatments in *Desmodesmus communis* [J]. *Algal Res*, 2015, 10:145 – 151.