

## 异养小球藻发酵液上清液回用的试验研究

吴娟<sup>1,2</sup>, 姚伦广<sup>1</sup>, 毕生雷<sup>2</sup>, 鲁龙<sup>2</sup>, 张鹏飞<sup>2</sup>, 陈斯楠<sup>1,2</sup>

(1. 南阳师范学院 南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心, 河南省南水北调中线水源区生态安全重点实验室, 河南 南阳 473000; 2. 河南天冠企业集团有限公司 车用生物燃料技术国家重点实验室, 河南 南阳 473000)

**摘要:** 采用发酵液上清液进行小球藻培养试验研究。以小球藻的生物量为指标, 通过上清液回用比例试验、单因素试验和  $L_9(3^4)$  正交试验进行配方优化, 考察利用上清液培养小球藻的可行性。结果表明: 上清液回用比例为 30% (占配料用水量) 处理效果最佳, 在此基础上的配方优化结果为酵母粉 2 g/L、 $K_2HPO_4$  0.3 g/L、 $MgSO_4$  0.2 g/L、微量元素母液 0.5 mL; 在此工艺条件下, 上清液首次回用小球藻在发酵末期的生物量比未添加上清液对照组高 71% 左右, 二次、三次回用依次降低, 但仍高于对照组, 进一步验证了小球藻在优化配方下能够有效利用小球藻发酵液上清液促进自身生长, 并且通过发酵液上清液的循环使用, 可以节省 30% 的用水量、40% 的营养物质 (不含糖) 用量并且可以减少环境污染。

**关键词:** 小球藻; 发酵液上清液; 回用; 配方; 生物量

中图分类号: TQ517.2; Q934 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)05-0104-06

### Reuse of liquid supernatant in the fermentation broth of allotrophic

#### *Chlorella vulgaris*

WU Juan<sup>1,2</sup>, YAO Lunguang<sup>1</sup>, BI Shenglei<sup>2</sup>, LU Long<sup>2</sup>,  
ZHANG Pengfei<sup>2</sup>, CHEN Sinan<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Ecological Security for Water Source Region of Mid-line of South-to-North Diversion Project of Henan Province, Collaborative Innovation Center of Water Security for Water Source Region of Mid-line of South-to-North Diversion Project of Henan Province, Nanyang Normal University, Nanyang 473000, Henan, China; 2. State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology, Henan Tianguan Group Co., Ltd., Nanyang 473000, Henan, China)

**Abstract:** The experiment of *Chlorella vulgaris* growing with supernatant in the fermentation broth was carried out. Taking the biomass of *Chlorella vulgaris* as the indexes, through the supernatant recycle ratio experiment, single factor experiment and  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment to optimize formulation, the feasibility to grow the *Chlorella vulgaris* with supernatant was investigated. The results showed that the recycle ratio of supernatant accounted for 30% of the total fermentation broth with the best treatment effect. The optimal formulation was 2 g/L yeast powder, 0.3 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.2 g/L  $MgSO_4$  and 0.5 mL microelement mother liquor. Under these technological conditions, the biomass of *Chlorella vulgaris* in the end stage of fermentation in the first time recycling of supernatant was about 71% higher than control group. The second and third time recycling were higher than control group even decrease in turn. It proved that the *Chlorella vulgaris* could promote its growth with the optimal

formulation supernatant. The recycling of supernatant in the fermentation broth could save 30% of water consumption, 40% of the amount of nutrients and reduce environmental pollution.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*; supernatant in the fermentation broth; reuse; formulation; biomass

收稿日期: 2017-08-07; 修回日期: 2018-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372381)

作者简介: 吴娟 (1988), 女, 助理工程师, 在读硕士, 主要从事生物质能源开发方面的研究工作 (E-mail) hnywjuan@163.com。

通信作者: 姚伦广, 教授, 硕士生导师 (E-mail) lunguangyao@163.com。

随着能源危机、环境污染的日益严重,基于生物质的生物炼制引起了人们的高度重视。藻类具有含油量高、光合作用效率高、环境适应能力强、生长周期短、生物产量高等优点,可作为重要的可再生能源具有广阔的应用前景,同时在污水处理方面也具有巨大的潜力<sup>[1]</sup>。将小球藻培养和废水处理技术相结合,可实现小球藻的低成本化培养、废水中营养物质的资源化利用和水资源循环利用等项目的耦合<sup>[2-3]</sup>。

小球藻发酵液中主要组成为对藻油、藻蛋白等小球藻产品无用的废水,其中富含的氮、磷、硫及微量元素,可以被小球藻吸收利用进而促进自身生长<sup>[4]</sup>。但是未经处理过的发酵废水固液混杂,包含发酵过程中产生的有机代谢物和藻细胞裂解死亡后产生的细胞碎片、脂类、多糖、蛋白质等物质。发酵废水中 COD、BOD 含量较高,这些物质的存在,不仅使发酵废水较为混浊,导致再利用时溶解氧偏低<sup>[5]</sup>,而且还包含对细胞生长有抑制作用的成分。若无切实有效的处理,大量的发酵废水将会引起严重的环境污染。

目前,国内外对异养小球藻发酵液上清液回用报道较少。本研究采用适当的方法对发酵液进行预处理,降低发酵液中对藻细胞生长的不利因素,在此条件下进行上清液回用并优化发酵工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

异养小球藻(*Chlorella*):清华大学生命科学院提供;小球藻发酵液:河南天冠企业集团有限公司车用生物燃料技术国家重点实验室提供。

葡萄糖:购自于国药集团化学试剂有限公司;酵母粉:购自于安琪酵母有限公司; $K_2HPO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $H_3BO_3$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ :购自于天津市科密欧化学试剂有限公司。以上试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 基础配方培养基

基础配方培养基:葡萄糖 30.0 g/L、酵母粉 3.0 g/L、 $MgSO_4$  0.4 g/L、 $K_2HPO_4$  0.6 g/L,微量元素母液 A<sub>5</sub>(本实验室研发,  $H_3BO_3$  2.86 g/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.22 g/L、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1.81 g/L、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.079 g/L、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  0.039 g/L) 1.00 mL,去离子水定容至 1 L,调节初始 pH 至 7.0~7.2。

#### 1.1.3 仪器与设备

SHP-80D 生化培养箱;ZHY-211C 恒温振荡培养器;50 L 发酵罐;101A-3 型电热鼓风烘箱;

ME3002E 型电子天平,美国 Mettler Toledo;TG16 型台式高速离心机;XG1. D 脉动真空灭菌器。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 灭菌方法

将需灭菌物品置于灭菌器内,灭菌条件为 121 °C、121 kPa、30 min。

#### 1.2.2 小球藻发酵液的预处理

取 50 L 发酵罐下罐时的发酵液,在 7 000 r/min 的离心机中离心 10 min,离心后弃去固体藻细胞成分,收集上清液,并对其成分测定,检测结果为 COD 560 g/L、BOD 200 g/L、氮 3.3 g/L、磷 1.5 g/L、 $NH_3-N$  0.8 g/L。

#### 1.2.3 小球藻种子液预培养

无菌条件下,挑选保存在平板上且生长良好的单一藻株接入基础配方培养基中,维持温度在  $(25 \pm 1)^\circ C$ 、2 000 lx 持续光照条件进行扩大培养,获得足量的小球藻。将处于对数期生物量为 8 g/L 的藻液收集备用。

#### 1.2.4 上清液回用比例的选择

将经过稀释、灭菌处理的上清液作为配料用水直接用于培养小球藻。取小球藻种子液接种到已灭菌的含发酵上清液培养基(其他量均参照基础配方培养基添加)中,接种量 10%,装料量 50%,充分摇匀,进行摇床培养,培养条件为 30 °C、200 r/min,定期取样测定培养液生物量,考察上清液回用比例(0、10%、20%、30%、40%、50%)对小球藻生物量积累的影响。

#### 1.2.5 培养基营养成分的优化

选取最适回用比例的上清液作为部分配料用水配制培养基,将种子液接种于此培养基上,进行单因素试验。接种量为 10%,置于摇床上培养 100 h 取样测定生物量,考察培养基中的 4 个关键因素酵母粉质量浓度(0、1、2、3、4、5 g/L)、 $K_2HPO_4$  质量浓度(0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L)、 $MgSO_4$  质量浓度(0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L)、微量元素母液添加量(0、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mL)单独变化时对小球藻生物量的影响。在此基础上,以小球藻生物量为评价指标进行  $L_9(3^4)$  正交试验,使用 SPSS17.0 软件分析试验结果方差,根据试验分析结果得出最佳配方。

#### 1.2.6 50 L 发酵罐验证试验方法

50 L 发酵配料用水为发酵液上清液、自来水,发酵罐装料量为 70%,灭菌前加入 15 mL 的消泡剂。灭菌后接入 10% 的摇瓶种子液,通气量为 2.5

$\text{m}^3/\text{h}$ ,在  $28\text{ }^\circ\text{C}$  下进行培养。初始转速为  $200\text{ r}/\text{min}$ ,培养过程中通过逐步提高转速至  $250\text{ r}/\text{min}$ ,采用  $20\%$   $\text{NaOH}$  溶液将  $\text{pH}$  自动调控为  $5.6$  左右。培养过程中利用 FUS-50L(A) 对参数进行监测和控制,每隔  $12\text{ h}$  取样测量发酵液的生物量。

### 1.2.7 生物量测定

将发酵液充分摇匀,用移液管精确吸取发酵液  $10.00\text{ mL}$ ,加入  $10.00\text{ mL}$  离心管中, $3\text{ }000\text{ r}/\text{min}$  离心  $10\text{ min}$ ,弃掉上清液,沉淀加入蒸馏水定容至  $10.00\text{ mL}$  充分摇匀后继续离心,弃掉上清液,再将所得沉淀用少量蒸馏水洗至培养皿中,将加入沉淀的培养皿置于  $105\text{ }^\circ\text{C}$  的烘箱中干燥  $12\text{ h}$ ,称重,发酵液生物量按下式计算:

$$C = \frac{(m_2 - m_1)}{10} \times 1\text{ }000$$

式中: $C$  为生物量,  $\text{g}/\text{L}$ ;  $m_2$  为烘干后培养皿质量,  $\text{g}$ ;  $m_1$  为空培养皿质量,  $\text{g}$ 。

### 1.2.8 数据分析方法

使用 Origin75 绘图分析,使用 SPSS17.0 进行正交试验设计及数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 上清液回用比例对小球藻生物量的影响

异养小球藻在发酵中后期由于溶氧、营养物质等条件限制,会有部分细胞自溶,而细胞自溶产生的碎片及胶体蛋白由于个体较小,无法在离心、膜过滤等工业化固液分离条件下分离,这些细胞碎片的存在,不仅导致上清液略为混浊,还导致再利用时溶解氧偏低<sup>[6]</sup>。为了有效利用异养小球藻发酵液上清液,确定上清液在配料用水中的最佳比例,按照 1.2.4 进行上清液回用比例的考察,结果见图 1。

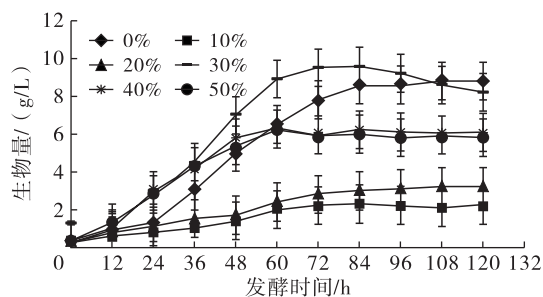


图 1 发酵液上清液回用比例对小球藻生物量的影响

由图 1 可知,随着上清液回用比例的增大,生物量先增大后降低。当上清液回用比例为  $30\%$  时,小球藻的生物量在稳定期时明显高于其他试验组,在此条件下,小球藻的生物量在  $84\text{ h}$  达到最高值  $9.6\text{ g}/\text{L}$ 。上清液回用比例低于  $30\%$  时,小球藻的生物量总体上呈现较低的趋势,这可能是上清液回用比

例较低时,上清液中微量元素不足导致的;但上清液回用比例超过  $30\%$  时,虽然发酵液中微量元素等营养物质足够细胞生长,但上清液中残留的细胞碎片影响了发酵液中的溶氧,从而影响了细胞活性,进而抑制小球藻的生长。

由图 1 还可知,当使用  $30\%$  的上清液作为配料用水时,小球藻在发酵后期生长情况较差。原因是上清液中的微量元素含量均低于基础培养基,微量元素的缺乏可能是导致发酵上清液中小球藻在后期生长情况较差的主要因素。因此,从发酵液上清液资源最大利用化和实现小球藻低成本快速生长的角度考虑,选择向发酵前期小球藻生长情况较好的培养基(上清液回用比例为  $30\%$ )中添加一定量的营养物质有可能大大促进小球藻的生长。

### 2.2 培养基营养成分优化单因素试验

#### 2.2.1 酵母粉质量浓度对小球藻生物量的影响

氮源是小球藻生长过程中所必需的营养物质,是小球藻细胞内合成蛋白质、核酸、磷脂和叶绿素等的基本元素,在小球藻生命活动中占有首要地位,能够促进小球藻的快速生长<sup>[7]</sup>。培养基中采用  $30\%$  的上清液作为配料用水、除酵母粉外其他营养物质均按照基础配方添加,按照 1.2.5 培养基营养成分优化方案考察酵母粉质量浓度对小球藻生长的影响,结果见图 2。

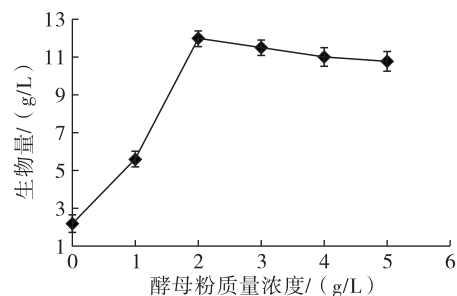


图 2 酵母粉质量浓度对小球藻生物量的影响

由图 2 可知,氮源是藻类生长的一个重要限制因子。在较低氮源质量浓度下,小球藻积累的生物量较低,原因可能是氮限制条件下,藻细胞内各组分的合成受到抑制从而影响细胞的生长<sup>[8]</sup>。而增加上清液中外源酵母粉的质量浓度,小球藻发酵进入稳定期时积累的生物量逐渐增加。当酵母粉质量浓度达到  $2\text{ g}/\text{L}$  时,积累的生物量达到最大值  $12\text{ g}/\text{L}$ ;当酵母粉质量浓度超出  $2\text{ g}/\text{L}$  时,小球藻的生物量稍有下降。这说明在此质量浓度下对小球藻的生长速度并未产生抑制作用,但小球藻的生长速度并没有随着酵母粉质量浓度的增加而增加,这可能是高氮胁迫使氮磷比发生巨变,对藻细胞的分裂起了阻

碍作用。因此,中等氮质量浓度有利于小球藻的生长<sup>[9-10]</sup>。

### 2.2.2 $K_2HPO_4$ 质量浓度对小球藻生物量的影响

磷是小球藻生长所必需的营养元素之一,是维持细胞生长所必需的。无机磷是小球藻进行光合作用最重要的磷源,磷酸盐是小球藻唯一可以吸收的磷的形态,磷在小球藻体内是以正磷酸盐的形式被利用。小球藻在生长过程中通过吸收外部的磷而不断生长繁殖的同时,也降低了外部环境中的磷含量<sup>[11-12]</sup>。培养基中采用30%的上清液作为配料用水,除 $K_2HPO_4$ 外其他营养物质均按照基础配方添加,按照1.2.5培养基营养成分优化方案考察 $K_2HPO_4$ 质量浓度对小球藻生长的影响,结果见图3。

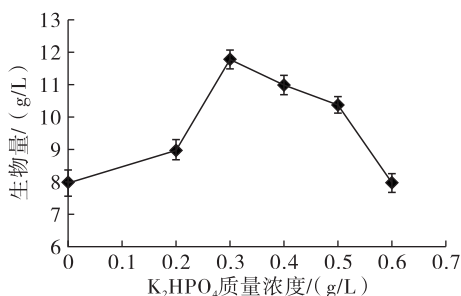


图3  $K_2HPO_4$  质量浓度对小球藻生物量的影响

由图3可知,小球藻在低 $K_2HPO_4$ 下对细胞生长的抑制作用并不明显,这是因为上清液中富含磷源且藻细胞能够将胞内储存的磷供生长需要,增加上清液中外源 $K_2HPO_4$ 的质量浓度,小球藻发酵进入稳定期时积累的生物量逐渐增加。当 $K_2HPO_4$ 质量浓度达到0.3 g/L时,积累的生物量达到最大值11.8 g/L,但是 $K_2HPO_4$ 质量浓度超出0.3 g/L时,小球藻的生物量下降,这可能是由于过高的磷浓度导致了藻细胞的单盐毒害<sup>[13]</sup>,说明磷是影响小球藻生长的显著因子。

### 2.2.3 $MgSO_4$ 质量浓度对小球藻生物量的影响

$MgSO_4$ 中的硫是植物必需的大量矿质元素之一<sup>[14]</sup>。硫元素不仅参与蛋氨酸、半胱氨酸、胱氨酸的组成,而且以二硫键的形式在蛋白质折叠过程中发挥重要作用,同时硫元素作为乙酰辅酶A的组成元素,在蛋白质、脂类和糖类代谢中起到关键作用,硫元素限制或缺乏将导致生物量大幅度降低和代谢的抑制甚至停止<sup>[15]</sup>。培养基中采用30%的上清液作为配料用水,除 $MgSO_4$ 外其他营养物质均按照基础配方添加,按照1.2.5培养基营养成分优化方案考察 $MgSO_4$ 质量浓度对小球藻生长的影响,结果见图4。

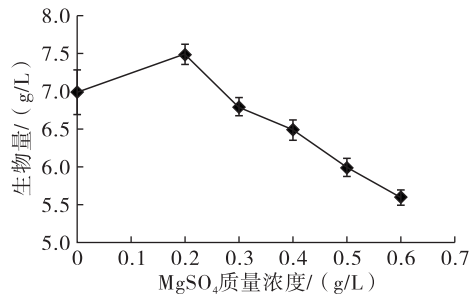


图4  $MgSO_4$  质量浓度对小球藻生物量的影响

由图4可知,低浓度时 $MgSO_4$ 对小球藻的生物量影响不大,可能原因是小球藻对硫的需求量不大,而小球藻可以从上清液中获取部分的硫元素促进自身生长。在 $MgSO_4$ 质量浓度达到0.2 g/L时,小球藻生物量达到最大值后随着 $MgSO_4$ 质量浓度的增加,小球藻的生物量反而稍有下降的趋势,这说明高浓度的 $MgSO_4$ 会明显抑制小球藻的生长,可能是由于渗透压的作用,使藻细胞发生质壁分离,导致微生物失活和死亡<sup>[16]</sup>。

### 2.2.4 微量元素母液添加量对小球藻生物量的影响

微量元素主要是作为辅助因子参与生物化学反应,促进藻类增殖,是藻细胞生长所必需的重要因子之一<sup>[17]</sup>,有些微量元素是细胞本身组成必需的元素,是酶活性基团的组成部分<sup>[18]</sup>,同时是维持小球藻细胞内环境稳态的重要物质,但是藻细胞本身不能合成。培养基中采用30%的上清液作为配料用水,除微量元素母液外其他营养物质均按照基础配方添加,按照1.2.5培养基营养成分优化方案考察微量元素母液添加量对小球藻生长的影响,结果见图5。

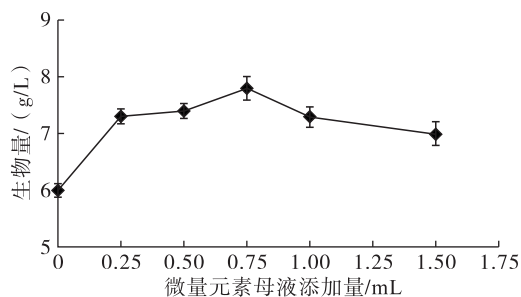


图5 微量元素母液添加量对小球藻生物量的影响

由图5可知,随着微量元素母液添加量的增加,小球藻的生物量先增加后趋于平稳,当微量元素母液添加量为0.75 mL时,小球藻生物量达到最大值7.8 g/L,说明此添加量为小球藻生长所需的最适量。

### 2.3 正交优化试验

根据单因素试验结果,以生物量为评价指标,通

过  $L_9(3^4)$  正交试验进行优化,找出最佳的配方条件。正交试验因素水平见表 1,正交试验结果与分析见表 2。

表 1 正交试验因素水平

水平	A 酵母粉质量浓度/(g/L)	B $K_2HPO_4$ 质量浓度/(g/L)	C $MgSO_4$ 质量浓度/(g/L)	D 微量元素母液添加量/mL
1	1	0.3	0.2	0.25
2	2	0.4	0.3	0.50
3	3	0.5	0.4	0.75

表 2 正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	D	生物量/(g/L)
1	1	1	1	1	12.0
2	1	2	2	2	10.8
3	1	3	3	3	10.0
4	2	1	2	3	13.4
5	2	2	3	1	12.0
6	2	3	1	2	12.9
7	3	1	3	2	6.7
8	3	2	1	3	6.5
9	3	3	2	1	6.0
$K_1$	32.8	32.1	31.4	30.0	
$K_2$	38.3	29.3	30.2	30.4	
$K_3$	19.2	28.9	28.7	29.9	
R	19.1	3.2	2.7	0.5	

由表 2 可知,影响小球藻生物量积累的主次因素是酵母粉质量浓度 >  $K_2HPO_4$  质量浓度 >  $MgSO_4$  质量浓度 > 微量元素母液添加量。各因素的最佳水平是  $A_2B_1C_1D_2$ ,即酵母粉质量浓度为 2 g/L、 $K_2HPO_4$  质量浓度为 0.3 g/L、 $MgSO_4$  质量浓度为 0.2 g/L、微量元素母液添加量为 0.5 mL。

用 SPSS17.0 软件进行方差分析,在无重复试验无空白项时取极差值最小的 D 因素(微量元素母液添加量)作为误差估计。故选取 A、B、C 3 个因素作为固定变量。单因素统计及方差分析见表 3。

表 3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	均方	F
A	18.907	2	9.453	91.484
B	7.887	2	3.943	38.161
C	0.207	2	0.103	1.000
D	0.740	2	0.370	3.581
误差	0.207	2	0.103	
总计	921.750	9		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

由表 3 可知,含 30% 上清液的培养基中酵母粉质量浓度和  $K_2HPO_4$  质量浓度对小球藻细胞生长的影响显著, $MgSO_4$  质量浓度和微量元素母液添加量影响不显著,这表明在各个因素所考察的范围内,酵母粉和  $K_2HPO_4$  的质量浓度是一个重要考察因素。

## 2.4 验证试验

按照 2.1、2.2 得出的最佳工艺条件进行 50 L 发酵验证试验,共 3 个处理(不含上清液基础培养基、含 30% 上清液基础培养基、含 30% 上清液优化培养基),其中不含上清液的基础培养基为对照组,结果见图 6。

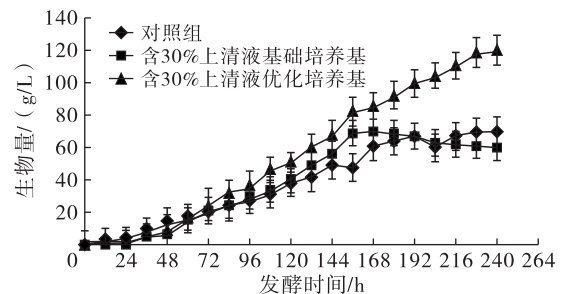


图 6 发酵液上清液回用验证试验

由图 6 可知,回用 30% 上清液的基础培养基试验,在 168 h 时,小球藻的生物量达到最大值 70 g/L,较同时期对照组 60.5 g/L 高 15.7%;而在回用 30% 上清液的优化培养基配方下,小球藻在发酵末期的生物量 120.5 g/L,较对照组 70.1 g/L 高 71.9%,进一步验证了在此工艺条件下进行上清液回用试验能够有效促进小球藻的生长。为了更有效地回用小球藻发酵液,在优化方案下进行发酵液上清液循环回用次数试验,共进行 3 个处理,分别为发酵液上清液一次回用、二次回用、三次回用,结果见图 7。

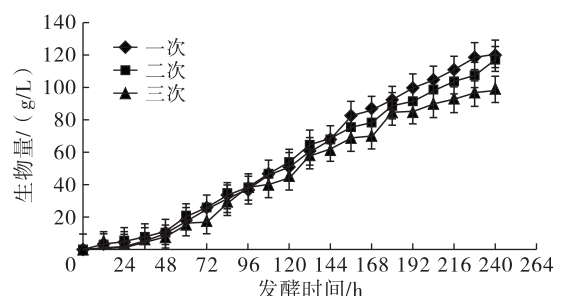


图 7 发酵液上清液循环回用次数试验

由图 7 可知,小球藻的生物量在发酵进行到 240 h 时,上清液二次回用较一次回用低约 3 个百分点,三次回用较二次回用低约 18 个百分点,可见小球藻上清液回用虽能较为有效地促进小球藻的生

长,但回用次数对小球藻的生长也有一定的限制。可能是由于培养液中的营养组分的抗衡离子( $I^-$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ 等)不会被藻细胞吸收,当分离收集细胞后,这些离子就会残留在剩余培养液中逐渐积累。发酵液的循环回用可能会造成培养基的盐度增加,从而不利于小球藻的生长,盐度的增加还会引起钙盐沉淀析出,从而导致培养液的碱度以及铁、磷等物质的丢失<sup>[19]</sup>。

### 3 结论

本研究利用小球藻发酵液上清液作为水资源配制培养基培养小球藻,考察了小球藻发酵液上清液培养小球藻的可行性。通过上清液回用比例试验、单因素试验、正交试验确定了最佳工艺条件为30%比例的上清液、酵母粉质量浓度2 g/L、 $K_2HPO_4$ 质量浓度0.3 g/L、 $MgSO_4$ 质量浓度0.2 g/L、微量元素母液添加量0.5 mL。按照上述工艺进行50 L发酵验证试验,结果表明,发酵液上清液首次回用小球藻在发酵末期的生物量比对照组高71%左右,二次、三次回用依次降低,但仍高于对照组,进一步验证了小球藻在优化配方下能够有效利用上清液促进自身生长,并且通过发酵液上清液的循环使用,可以节省30%的用水量、40%的营养物质(不含糖)用量并且可以减少环境污染,这将产生巨大的经济效益和社会效益。

本研究能够同时实现有机废水的资源化利用和小球藻的低成本快速培养,实现能源小球藻的再生和减排的双效模式,这对工业化培养小球藻具有一定的指导意义。但是仍然存在不足和需要改进的地方,如温度、pH、摇床转速等因素对小球藻生长的影响及小球藻对废水中营养物质的利用效率等方面,因此在以后的研究中还需要就以上因素对小球藻在发酵液上清液中的生长情况作进一步的研究。

### 参考文献:

[1] 欧阳克氩,刘建平,蔡力创. 小球藻在废水处理上的应用进展[J]. 江西科学,2014,32(4):515-519.

[2] 曹海,张馨允,孔维宝,等. 利用啤酒废水培养普通小球藻生产微藻生物质和油脂[J]. 中国油脂,2012,37(9):65-69.

[3] 胡洪营,李鑫,杨佳. 基于微藻细胞培养的水质深度净化与高价值生物质生产耦合技术[J]. 生态环境学报,2009,18(3):1122-1127.

[4] 边磊. 微藻对氮磷营养盐的脱除利用与废水净化[D].

杭州:浙江大学,2010.

[5] KALYUSHNYI S, SKLYAR V, RODRIGUEZ - MARTINEZ J, et al. Integrated mechanical, biological and physico-chemical treatment of liquid manure streams[J]. Water Sci Technol, 2000, 41(12): 175-182.

[6] 纪雁. 利用味精废水培养普通小球藻以及养藻废水的生物强化处理[D]. 济南:山东大学,2014.

[7] 沈颂东. 氮素对小球藻生长的影响[J]. 水利渔业,2003,23(2):55-57.

[8] 杨坤,李静,卢文轩. 不同初始氮浓度对小球藻生长及氮吸收的影响[J]. 环境科学与技术,2014,37(12):40-46.

[9] 江怀真,张维,刘天中,等. 氮、磷浓度对小球藻生长及油脂积累的影响[J]. 食品工业科技,2011,32(6):204-211.

[10] 李兴锐,王文睿,张永奎,等. 氮浓度对异养小球藻生长及蛋白质含量的影响[J]. 食品工业科技,2012,33(8):221-224.

[11] 曲春波. 小球藻对培养基中磷的利用与啤酒废水资源化处理[D]. 上海:上海交通大学,2009.

[12] 蔡佳佳,费小雯,李亚军,等. 元素缺乏和外加碳源对小球藻(*Chlorella* sp KMMCC FC-21)生长和油脂积累的影响[J]. 热带作物学报,2011,32(11):2029-2036.

[13] MARINHO - SORIANO E, NUNES S O, CARNEIRO M A A, et al. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae* [J]. Biomass Bioenergy, 2009, 33(2):327-331.

[14] RDIGER H, THOMAS L. Sulfur metabolism in plants and algae a case study for an integrative scientific approach [J]. Photosynthesis Res, 2005, 86(3): 297-298.

[15] NIKIFOROVA V J, KOPKA J, TOLSTIKOV V, et al. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants[J]. Plant Physiol, 2005, 138: 304-318.

[16] 于玉根,伦世仪. 高浓度  $Cl^-$  及  $SO_4^{2-}$  对厌氧颗粒污泥的抑制效应及抑制机理的研究[J]. 轻工环保,1994,16(2):1-3.

[17] 张铁明. 微量元素——铁、锌、锰对淡水浮游藻类繁殖的影响[D]. 北京:首都师范大学,2006.

[18] 左明,王长海. 微量元素对转植酸酶基因小球藻生长的影响[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版),2010,23(2):116-122.

[19] 马千然. 利用发酵废母液培养小球藻及超声波破壁提取油脂的工艺研究[D]. 北京:北京工商大学,2013.