

研究报告

小球藻藻菌共生体系在产油方面的特性

尚海^{1,2} 薛林贵^{1,2*} 马萍^{1,2} 姜金融^{1,2} 王霞^{1,2} 何小燕^{1,2}

(1. 兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室 甘肃 兰州 730030)

摘要: 【目的】研究人工构建藻菌共生体系在产油方面的特性。【方法】从BG11培养基中分离、筛选出无菌小球藻,通过人工共培养方法构建了藻菌共生体系,探讨了共生体系中小球藻的生长及产油特性。【结果】相比无菌小球藻,藻菌共生体系对于藻的生长、油脂积累以及产生生物柴油的脂肪酸组分方面都有明显的促进作用,其中细菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)和小球藻构建的共生体系效果最好,小球藻生物量提高了9%,油脂含量提高了36.3%,C₁₈₋₁的含量提高了259.2%。【结论】进一步说明人工共培养方法构建藻菌共生体系能够提高微藻生物柴油的质量,具有很好的利用价值。

关键词: 小球藻,藻菌共生体系,油脂积累,脂肪酸组成

Characteristics of *Chlorella* microalgal-bacterial condorticin oil production

SHANG Hai^{1,2} XUE Lin-Gui^{1,2*} MA Ping^{1,2} JIANG Jin-Rong^{1,2}
WANG Xia^{1,2} HE Xiao-Yan^{1,2}

(1. School of Chemical and Biology Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)
(2. Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: [Objective] In order to research the characteristics of artificially constructing algae symbiosis system in oil production. **[Methods]** Aseptic *Chlorella* was screened and isolated from the BG11 medium, the growth and oil-producing characteristics of *Chlorella* in the symbiosis system were studied by artificial construction of co-culture system of algae and bacteria. **[Results]** The results showed that the growth of algae, accumulation of oil and the production of fatty acid components of biodiesel were significantly higher in the co-culture system of algae and bacteria compare to that of aseptic *Chlorella*. Co-culture system of bacteria (*Stenotrophomonas maltophilia*) and *Chlorella* has the best effect, and the biomass, oil content and C₁₈₋₁ of *Chlorella* increased by 9%, 36.3% and 259.2%

Foundation item: Projects of Science and Technology Support of Gansu Province (No. 1504FKCA015); Projects of Science and Technology Project of Lanzhou City (No. 2015-3-68); National Natural Science Foundation of China (No. 31260135)

*Corresponding author: Tel: 86-931-4938702; E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

Received: December 01, 2016; Accepted: March 24, 2017; Published online (www.cnki.net): April 19, 2017

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(No. 1504FKCA015); 兰州市科技计划项目(No. 2015-3-68); 国家自然科学基金项目(No. 31260135)

*通讯作者: Tel: 86-931-4938702; E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

收稿日期: 2016-12-01; 接受日期: 2017-03-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-19

respectively. **[Conclusion]** This study shows that the quality of microalgae biodiesel with good utilization value can be improved by artificial construction of co-culture system of algae and bacteria.

Keywords: *Chlorella*, Microalgal-bacterial condortic, Oil accumulation, Fatty acid composition

众所周知, 全球大多数能源消耗都来自化石燃料, 化石燃料的持续利用加剧了全球变暖、环境污染以及人类健康等问题, 因此, 开发可依赖、可持续、经济型燃料成为一个具有挑战性的目标^[1-2]。如今, 微藻已被公认是生物柴油和生物产品最有希望的原料之一^[3-4], 藻类生长速度和产油率比其他油料作物高, 并且可以通过光合作用吸收大气中的 CO₂ 合成各种物质, 如不饱和脂肪酸、蛋白质、多糖、油脂、色素和维生素等^[5], 因此, 微藻作为第三代生物燃料原料的开发利用也日益增长^[6-8]。

在大规模微藻培养系统中, 细菌和其他微生物的作用是不容忽视的^[9]。许多研究表明, 微藻与细菌、真菌等微生物之间相互影响可形成互惠关系、共生关系或寄生关系等^[10]。在这些体系中, 微藻为微生物的生长提供所需氧气和养分, 而微生物为微藻提供 CO₂ 和生长刺激因子, 并且消耗由微藻产生的胞外多聚物(Extracellular polymeric substances, EPS)等, 从而构成一个比较好的循环体系^[11]。在藻菌体系中, 有些细菌能够消耗微藻产生的氧气产生促进微藻生长的物质, 分解微藻产生的自身抑制物和提供微量元素等, 对微藻生长、油脂积累、脂肪酸种类和生长环境稳定等方面都有促进作用^[12-14]。

目前, 藻菌共生体系在废水处理中氮磷的降解、重金属的富集、难降解物质与有机物的去除以及维持体系稳定性等方面有着明显优势^[15-17], 但关于藻菌共生体系对微藻的生长、产油特性的研究近乎空白。本文以小球藻(*Chlorella* sp.)为研究对象, 利用已从小球藻培养液中筛选出的共生菌, 通过人工构建小球藻和细菌的共生体系, 研究藻菌共生体系中小球藻的生长及产油特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 微藻和小球藻共生菌: 小球藻(*Chlorella* sp.)

购买于中国科学院武汉水生生物研究所。小球藻共生菌是实验室已从小球藻培养液中筛选保存的菌种: X1: *Enterobacter* sp.; X2: *Flavobacteriaceae bacterium*; X3: *Stenotrophomona smaltophilia*; X4: *Deinococcus* sp.; X5: *Pseudomonadaceae bacterium*; X6: *Stenotrophomonas* sp.。

1.1.2 主要试剂、仪器及培养基: 浓硫酸、苯酚、考马斯亮蓝 G-250、氯仿和小牛血清蛋白, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇和正己烷, 天津市凯通化学试剂有限公司; 硫酸卡那霉素、四环素和氨苄青霉素, 天根生化科技有限公司。

Agilent 7890 气相色谱仪, 安捷伦科技公司; JXDC-20 氮吹仪, 上海拓赫机电科技有限公司; HC-X 漩涡振荡器, 金云市三和仪器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发器, 巩义市宁翔仪器有限公司; 1 L 光生物反应器, 上海光语生物科技有限公司; JY92-2D 超声破碎仪, 宁波新芝仪器研究所。

LB 固体培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0-20.0。BG11 培养基参照文献[18]配制。

1.1.3 微藻的培养: 微藻的培养在光生物反应器中进行(反应器直径 6.6 cm, 长 50 cm, 工作体积 1 L, 图 1); 无菌小球藻(Aseptic *Chlorella*)的平板分离纯化所用的培养基为 BG11 培养基, 共生菌的培养为 LB 固体培养基。藻菌共生培养温度为 25±1 °C, 光

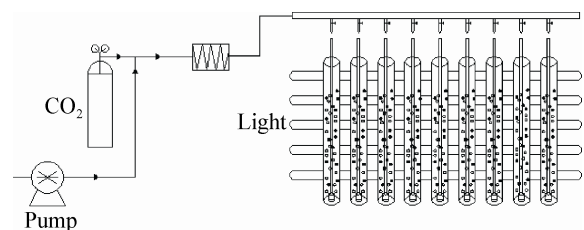


图 1 微藻光生物反应器示意图

Figure 1 The schematic diagram of microalgae photobioreactor

照强度 2 500 lx, 光照时间为 24 h, 通过气瓶和空气压缩泵以 5 L/min 和 0.2 L/min 的速度通入 CO₂ 和空气。

1.2 测定方法

1.2.1 无菌微藻的分离与纯化: 无菌小球藻经含有抗生素的 BG11 培养基平板筛选获得。将 150 μL 小球藻培养液分别涂布至分别含有 10 mg/L 硫酸卡那霉素、四环素和氨苄青霉素的 BG11 固体平板上。25 °C、2 500 lx 光照强度培养, 将长出的小球藻单菌落经平板划线接种至新鲜的含有抗生素的 BG11 平板上, 至少重复 3 次, 以获得无菌的小球藻。

1.2.2 微藻生物量的测定: 小球藻生物量通过测定小球藻细胞的数量来确定, 小球藻细胞个数通过血球计数板和显微镜测定^[19], 微藻细胞干重(Dry cell weight, DCW, g/L)和微藻细胞个数之间的关系为: 细胞干重=1×10⁻¹²×微藻细胞个数(细胞/mL)。

1.2.3 藻液胞外多聚物的测定: 微藻胞外多聚物主要包括两部分, 细胞周围的胞外多聚物和上清液中的胞外多聚物^[20]。首先用 EP 管取 10 mL 小球藻培养液 12 000×g、4 °C 离心 10 min, 取上清液; 再将沉淀加入 5 mL 超纯水悬浮, 在 80 °C 温浴 30 min, 再离心 10 min, 得到的上清与第一次上清液混合, 将所有的混合液经过 0.45 μm 的膜过滤后, 进行进一步的检测。

微藻胞外多聚物主要包括多糖和蛋白质^[21], 所以主要测定胞外多聚物中多糖和蛋白质的含量。多糖含量用苯酚-硫酸法^[22], 以葡萄糖为标样。蛋白质的含量通过 Bradford 的方法^[23], 以牛血清蛋白为标样。

1.2.4 微藻油脂含量的测定: 称取 30 mg 冷冻干燥后的小球藻粉放入 10 mL 的 EP 管中加入 0.75 mL 氯仿和 0.25 mL 超纯水中, 超声波破碎 3 min 后, 用旋涡振荡器振荡 5 min; 再加入 5 mL 萃取混合液氯仿:甲醇(体积比为 2:1), 继续用旋涡振荡器振荡 15 min; 12 000×g、4 °C 离心 10 min 将有机相移至新的 EP 管中。此过程至少重复 3 次。最后将所有有机相合并, 称量 50 mL 蒸馏瓶空瓶的重量

M_1 , 把 3 次萃取的有机相放入旋转蒸发仪内, 在真空度为 3×10⁶ Pa、温度为 60 °C 和蒸馏瓶转速 100 r/min 条件下蒸馏, 待真空度不再变时, 称量蒸馏后蒸馏瓶的重量 M_2 , 并计算所得藻油重量 $M(g/mL)=M_2-M_1$ 。

1.2.5 微藻中脂肪酸组成的分析: 微藻中脂肪酸组成分析的第一步跟油脂含量测定的方法类似, 只不过在提取过油脂的 EP 管中加入 2 mL 1%硫酸-甲醇溶液, 超声波破碎 3 min 后, 用旋涡振荡器振荡 5 min, 80 °C 温浴 60 min; 待冷却后加入 2 mL 正己烷和 5 mL 超纯水, 12 000×g、4 °C 离心 10 min 后取上清至新的 EP 管中。再用 2 mL 正己烷重复提取 2 次后合并上清, 用氮气吹干; 继续加入 1 mL 正己烷重新溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 进行气相色谱分析脂肪酸组成^[24]。气相色谱条件: Agilent 7890 气相色谱仪, 色谱柱为 30 m×0.25 mm 毛细管柱, 起始温度 80 °C, 首先以 12 °C/min 上升至 140 °C 保留 15 min, 再以 4 °C/min 升至 240 °C 保持 15 min, 载气流量 80 mL/min; 检测器温度 280 °C, 进样口温度 250 °C; 进样量 2 μL, 分流 50%。

2 结果与分析

2.1 无菌小球藻的筛选及人工构建藻菌共生体系

从 3 种含抗生素的 BG11 培养基上筛选经过反复分离纯化最终得到无菌的小球藻, 经电镜扫描验证。然后将无菌小球藻与 6 种共生菌构建小球藻共生体系, 分别命名为 A1: 无菌小球藻-*Enterobacter* sp.; A2: 无菌小球藻-*Deinococcus* sp.; A3: 无菌小球藻-*Flavobacteriaceae bacterium*; A4: 无菌小球藻-*Pseudomonadaceae bacterium*; A5: 无菌小球藻-*Stenotrophomona smaltophilia*; A6: 无菌小球藻-*Stenotrophomonas* sp.。将共生体系进行培养后电镜扫描(图 2), 从电镜扫描图片分析小球藻-共生菌体系表明, 无菌小球藻表面没有任何微生物附着, 而藻菌共培养体系中共生菌附着于小球藻表面, 这种附着方式有利于小球藻和微生物相互之间进行物质与气体交换。

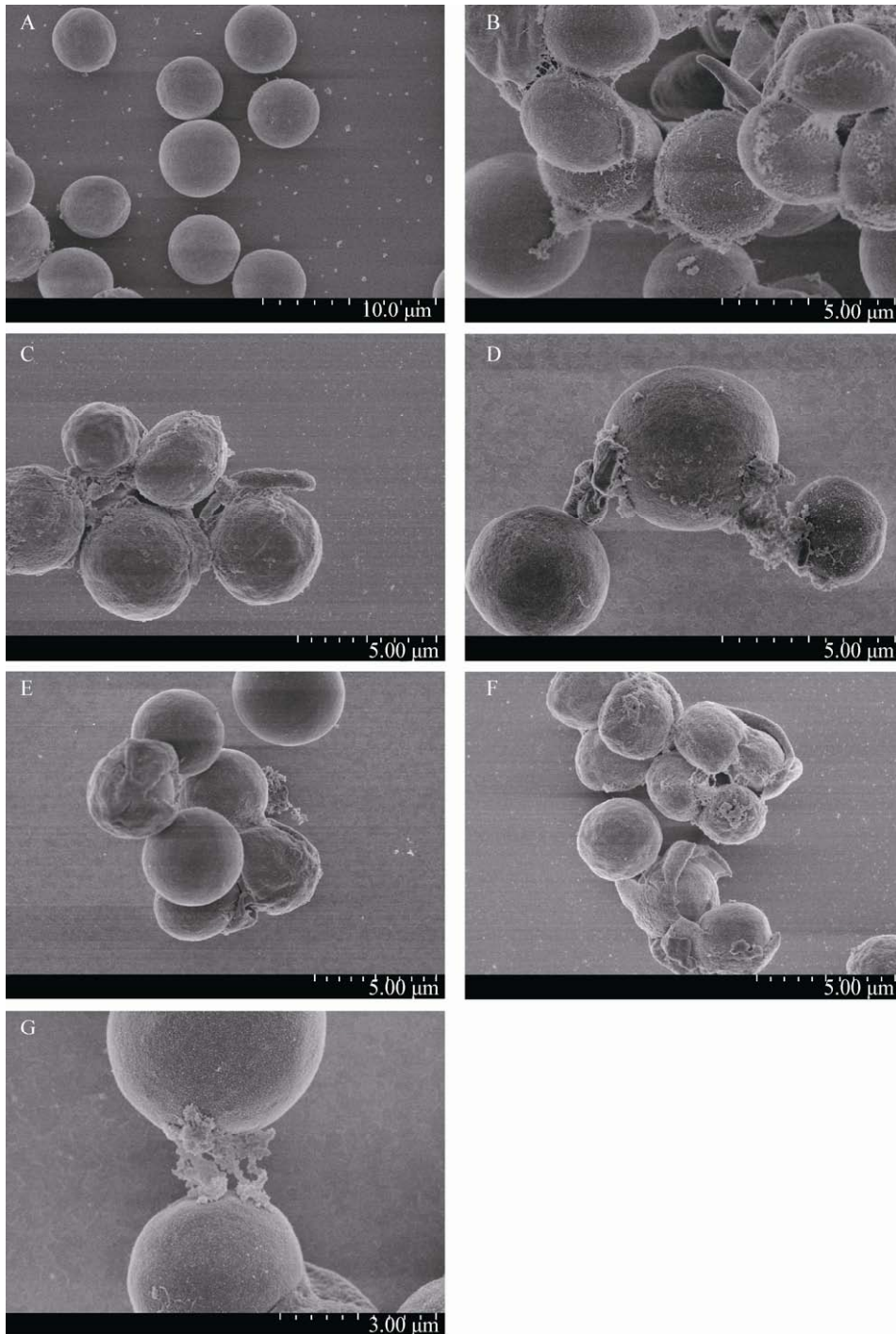


图 2 电镜观察无菌小球藻和藻菌共生体系

Figure 2 Electron microscopic observation of aseptic *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

注: A: 无菌小球藻; B: 无菌小球藻-*Enterobacter* sp.; C: 无菌小球藻-*Deinococcus* sp.; D: 无菌小球藻-*Flavobacteriaceae* bacterium;
E: 无菌小球藻-*Pseudomonadaceae* bacterium; F: 无菌小球藻-*Stenotrophomonas maltophilia*; G: 无菌小球藻-*Stenotrophomonas* sp.
Note: A: Aseptic *Chlorella*; B: Aseptic *Chlorella-Enterobacter* sp.; C: Aseptic *Chlorella-Deinococcus* sp.; D: Aseptic *Chlorella-Flavobacteriaceae* bacterium; E: Aseptic *Chlorella-Pseudomonadaceae* bacterium; F: Aseptic *Chlorella-Stenotrophomonas maltophilia*; G: Aseptic *Chlorella-Stenotrophomonas* sp.

2.2 藻菌共生体系对小球藻生长的影响

小球藻生物量变化如图 3 所示, 小球藻藻菌共培养体系相对于空白无菌小球藻, 小球藻的生物量有了明显的增加, 但是不同共生体系中小球藻生物量的积累是不同的。从图 3 中可以看出, 第 12 天时, 人工构建的藻菌共生体系 A1 的生物量累积最高(11.22 ± 0.15 g/L), 显著高于空白对照($P < 0.05$); 而共生体系 A3 和 A5 生物累积量次之, 分别为 10.88 ± 0.23 g/L 和 10.60 ± 0.32 g/L, 且两体系间无显著性差异($P > 0.05$); 共生体系 A4 的生物量累积最低(10.04 ± 0.38 g/L), 显著低于空白对照($P < 0.05$)。共生菌 *Enterobacter sp.*、*Flavobacteriaceae bacterium* 和 *Stenotrophomona smaltophilia* 与无菌小球藻组成的共生体系 A5、A3 和 A1 分别使小球藻生物量提高了 8.0%、8.8% 和 9.0%, 而 A2、A4 和 A6 共生体系中小球藻的生物量低于空白, 所以选择促进小球藻生物量增加的这 3 种共生菌, 对小球藻的生长和产油特性做进一步研究。

2.3 藻菌共生体系上清液中 EPS 的浓度变化

无菌小球藻培养及藻菌共培养体系中上清液蛋白和多糖的变化如图 4、5 所示, 无菌小球藻培养体系中上清液多糖在第 10–12 天时变化基本趋于稳定, 在第 12 天的多糖含量为 19.50 mg/L, 藻菌共培养体系中上清液中多糖的变化为 15.10–16.35 mg/L;

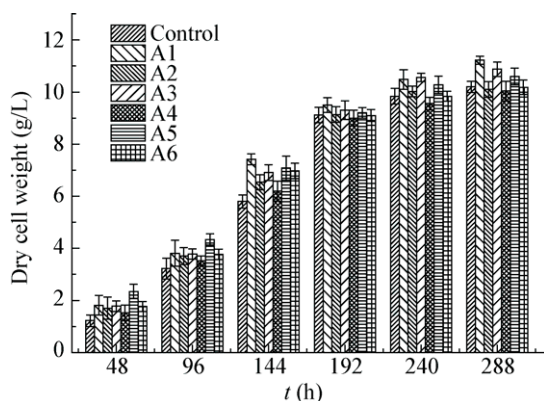


图 3 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系中小球藻生物量的变化

Figure 3 Changes of the biomass of *Chlorella* in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

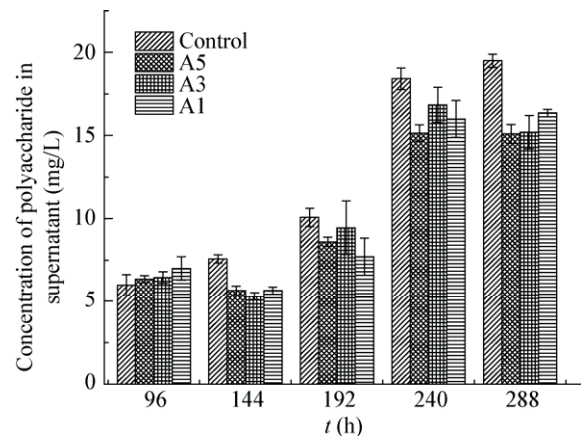


图 4 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系上清液中多糖浓度的变化

Figure 4 Changes of the supernatant polysaccharide concentration in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

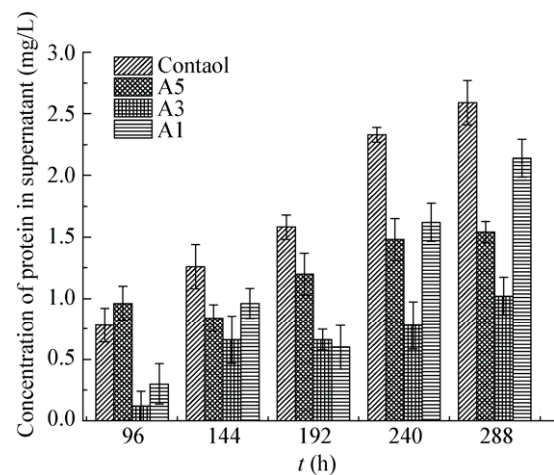


图 5 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系上清液中蛋白浓度的变化

Figure 5 Changes of the supernatant protein concentration in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

而上清液中蛋白含量也表现出了相同趋势, 蛋白含量明显低于对照, 第 4 天后, 对照中蛋白含量从 0.78 mg/L 稳定到第 12 天的 2.59 mg/L。在上清液中多糖含量明显比蛋白含量高, 由此可知上清液中主要成分是多糖, 而藻菌共生体系中上清液中的蛋白和多糖的含量均低于对照体系, 说明共生体系消耗了这部分物质, 小球藻可以给共生菌提供养

分, 但是不同细菌的消耗能力不同, 这 and 不同菌的功能差异有关。

2.4 藻菌共生体系中细胞周围 EPS 的浓度变化

无菌小球藻培养及藻菌共培养体系中细胞周围蛋白和多糖的变化如图 6、7 所示, 从图 6 和 7 可以看出细胞多糖含量明显多于蛋白含量。无菌小球藻体系中多糖含量在 10 d 时处于稳定, 且从第 4 天

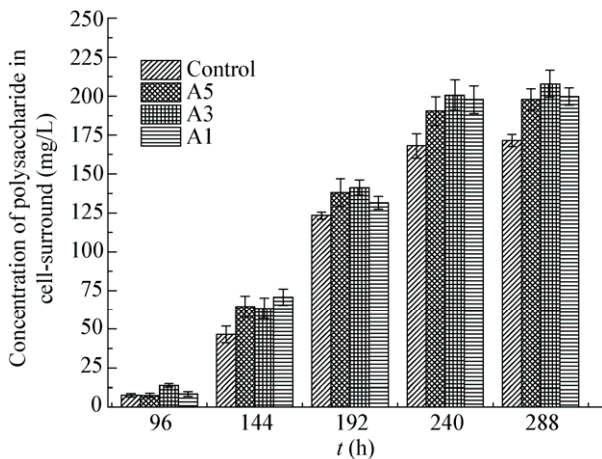


图 6 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系细胞周围多糖浓度的变化

Figure 6 Change of cell-surrounding polysaccharide concentration in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

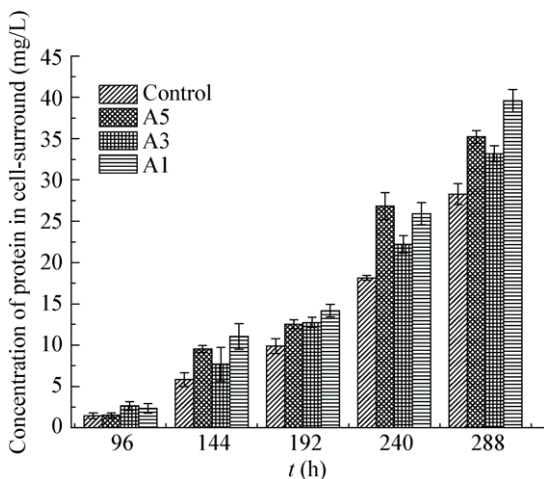


图 7 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系细胞周围蛋白浓度的变化

Figure 7 Change of cell-surrounding protein concentration in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

的 7.68 mg/L 增加到了第 10 天的 171.53 mg/L, 而藻菌共生体系中细胞周围多糖含量最高达到了 207.95 mg/L; 细胞周围蛋白含量也有相同趋势, 在第 10 天藻菌共生体系中蛋白含量在 22.20–26.82 mg/L, 明显高于空白的 18.15 mg/L。

2.5 藻菌共生体系中小球藻含油量的变化

由图 8 可以明显看出, 无菌小球藻油脂的含量由第 6 天时的 9.00 mg/L 增加到了第 12 天的 30.33 mg/L, 在 12 d 时藻菌共生体系 A1 中小球藻的含油量最大(41.33±0.58 mg/L), 显著高于空白对照($P < 0.05$), 而构建的 A3 和 A5 两共生体系间无显著性差异($P > 0.05$), 并且培养到第 12 天时 A5、A3 和 A1 三种共生体系相对于空白油脂含量分别提高了 23.1%、28.6% 和 36.3%, 说明细菌的加入对小球藻油脂积累有显著的促进效果。

2.6 藻菌共生体系中小球藻油脂脂肪酸组成的变化

为了研究无菌小球藻培养及藻菌共培养体系小球藻脂肪酸组分的变化(图 9 和 10), 先对油脂进行甲酯化处理, 然后利用气相色谱仪分析其脂肪酸组成。从图 9 和 10 中可以看出, 共生体系中小球藻脂肪酸的组分含量相对于空白有了明显的变化, 在第 6 天和第 12 天时脂肪酸含量变化趋势不一, 但是从整体来看, C₁₆ 和 C₁₈ 饱和和烯酸相对于空白都有所增加,

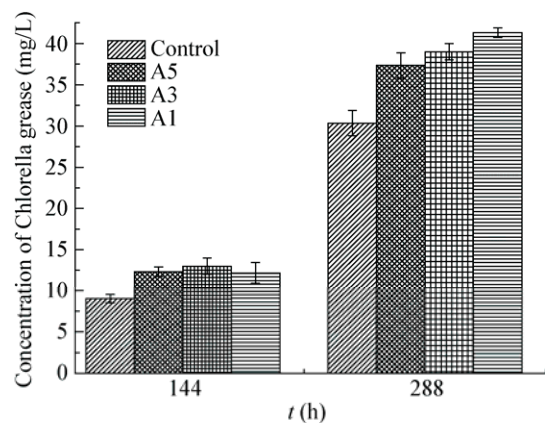


图 8 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系小球藻含油量的变化

Figure 8 Changes of oil content of *Chlorella* in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria

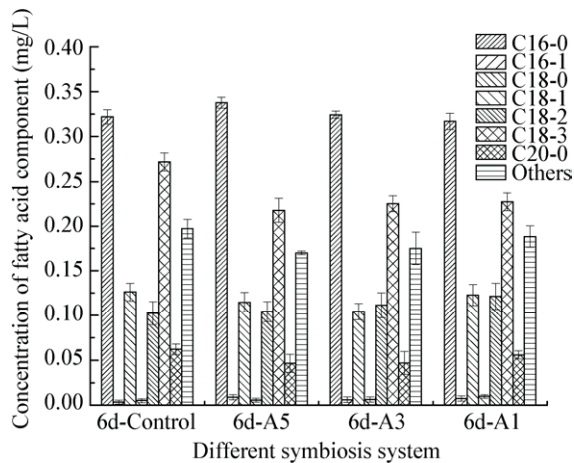


图 9 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系第 6 天时小球藻中脂肪酸的变化

Figure 9 Changes of fatty acids of *Chlorella* in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria on the 6th day

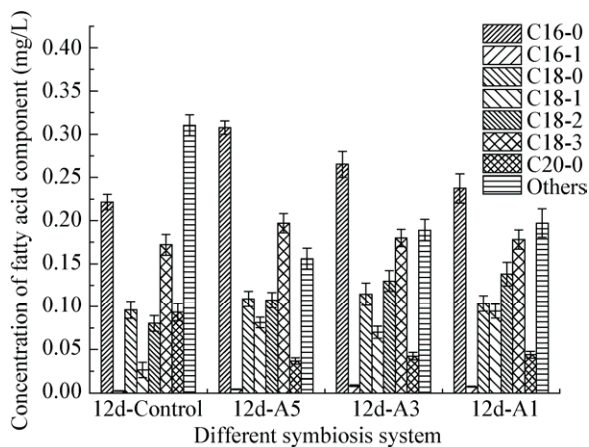


图 10 无菌小球藻培养及藻菌共培养体系第 12 天时小球藻脂肪酸的变化

Figure 10 Changes of fatty acids of *Chlorella* in aseptic culture *Chlorella* and the co-culture system of algae with bacteria on the 12th day

其他多不饱和烯酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)相对于空白有降低趋势,表明细菌的加入增加了饱和脂肪酸的含量。其中作为生物柴油的主要脂肪酸组分 C_{18-1} 含量相比于对照组都有很明显的升高,在 *Enterobacter* sp.、*Flavobacteriaceae* bacterium 和 *Stenotrophomona smaltophilia* 共生菌与小球藻组成的 A5、A3 和 A1 共生体系中, C_{18-1} 含量分别提

高了 208.6%、166.3% 和 259.2%。说明共生体系对小球藻生产生物柴油有显著的促进作用。

3 讨论

自然界中存在的藻类大约有 20 多万种,不同微藻的生物量、油脂含量和脂肪酸组成等特性存在着明显的差异,而许多藻株都是具有开发和利用价值的产油微藻。本研究利用人工共培养构建藻菌共生体系这一新思路,将筛选出的无菌小球藻与不同功能的微生物组合到一起,通过测定生物量、胞外多聚物、油脂含量和脂肪酸组成来研究小球藻的产油特性。结果表明, A5、A3 和 A1 共生体系中小球藻生物量较空白有显著提高,可能是由于细菌能够消耗微藻产生的氧气、分解藻产生的自身抑制物、产生促进微藻生长的物质等。de-Bashan 等^[25]将小球藻(*Chlorella vulgaris*)和一种固氮菌(*Azospirillum brasilense*)共培养,结果表明 *Azospirillum brasilense* 能产生促微藻生长的植物生长促进菌(MGPB);但是在第 12 天时并不是所有的共生体系中小球藻的生物量积累比无菌小球藻的高,在共生体系中有些细菌和小球藻随着培养体系的稳定,可能彼此之间产生了互利竞争关系,细菌为了竞争养分产生了抑制小球藻生长的物质,从而杀死部分小球藻,也有可能因为小球藻和微生物之间有很强的专一性,某一种细菌对特定的微藻有作用,而对其他微藻的生长没有促进作用,致使生物量积累低于空白,所以本研究中选择促进小球藻生物量积累的 *Enterobacter* sp.、*Flavobacteriaceae* bacterium 和 *Stenotrophomona smaltophilia* 这 3 种菌研究产油特性。

胞外多聚物(EPS)被认为是藻菌体系中产物的核心部分,主要由多糖和蛋白质组成。研究结果表明,上清液中多糖含量明显比蛋白含量高,说明多糖是上清液的主要成分,并且上清液中无论是多糖还是蛋白质含量都低于空白,这可能是上清液中的蛋白和多糖被共生菌所利用,供自身生长的同时又消耗了部分 EPS,减缓了其对小球

藻生长的抑制作用; 而细胞周围多聚物含量变化与上清液中多聚物含量变化趋势相反, 细胞周围多糖和蛋白质都高于空白, 可能是共生体系中, 细菌通过释放特定物质影响微藻生长和 EPS 分泌, 促进微藻产生了更多的胞外多聚物, 或是微藻-细菌相互作用强烈驱动了内部非生物和外部生物间的物质交联, 外部营养物受影响引起了共生体系中的生物群落转移使 EPS 浓度增加^[26-27], 并且细胞周围多糖含量高于蛋白质含量有助于提高多糖和蛋白的结合, 从而强化整个藻菌体系的稳定性和油脂产量的提高。但是在共生体系中, 微藻通过光合作用将 CO₂ 转化为甘油酸-3-磷酸(G-3-P), 而其是合成脂质和多糖等的前体, 因为在一系列的催化氧化过程中, 脂质和多糖的合成过程发生在甘油酸-3-磷酸转化为丙酮酸后, 如果微藻分泌的细胞外多聚物(多糖)过多, 即说明过多的 CO₂ 转化为非酯类物质而非油脂, 将直接影响 CO₂ 到油脂的转化率。

微藻生物量的积累是间接反映藻油含量高低的一个重要指标。通过测定生物量结果显示, 小球藻共生体系 A5、A3 和 A1 分别使小球藻生物量相比空白提高了 8.0%、8.8% 和 9.0%, 而油脂含量相比空白提高了 23.1%、28.6% 和 36.3%, 所以小球藻生物量的积累和油脂含量呈正相关, 这与 Cho 等^[28]的研究结果一致。油脂中脂肪酸的组成和含量是微藻可作为生物柴油原料的两个关键因素, 图 9 和 10 的结果显示, 不同藻菌共生体系中脂肪酸的组成和含量存在明显的差异。十八烯酸是评估生物柴油质量的一种重要指示剂, 在小球藻共生体系中 C₁₈₋₁ 的含量提升最显著, 这可能是细菌与微藻共生理和调控导致的, 对这一方面还有待进一步的研究。

4 结论

小球藻共生菌体系相比于纯小球藻培养, 小球藻生物量及产油量有了显著的提高。其中 X3 细菌 (*Stenotrophomona smaltophilia*) 对小球藻生长和产油促进效果最佳, 使小球藻生物量提高了 9.0%, 油

脂含量提高了 36.3%, C₁₈₋₁ 的含量提高了 259.2%。进一步说明共生体系能够提高微藻生物柴油的质量, 有很好的利用和开发价值。

参 考 文 献

- [1] Chu S, Majumdar A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future[J]. Nature, 2012, 488(7411): 294-303
- [2] Hill J, Nelson E, Tilman D, et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels[J]. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 2006, 103(30): 11206-11210
- [3] Abomohra AEF, El-Sheekh M, Hanelt D. Pilot cultivation of the chlorophyte microalga *Scenedesmus obliquus* as a promising feedstock for biofuel[J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 64: 237-244
- [4] Liu JX, Zhu Y, Tao YJ, et al. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6: 98
- [5] Georgianna DR, Mayfield SP. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels[J]. Nature, 2012, 488(7411): 329-335
- [6] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(2): 557-577
- [7] Demirbas A, Demirbas MF. Importance of algae oil as a source of biodiesel[J]. Energy Conversion and Management, 2011, 52(1): 163-170
- [8] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(1): 217-232
- [9] Unnithan VV, Unc A, Smith GB. Mini-review: a priori considerations for bacteria-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters[J]. Algal Research, 2014, 4: 35-40
- [10] Geng HF, Belas R. Molecular mechanisms underlying roseobacter-phytoplankton symbioses[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 332-338
- [11] Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 896-907
- [12] de-Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, et al. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(6): 514-521
- [13] Abed RMM. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(1): 58-64
- [14] Imase M, Watanabe K, Aoyagi H, et al. Construction of an artificial symbiotic community using a *Chlorella*-symbiont association as a model[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(3): 273-282

- [15] Yang LB, Tan XB, Li DY, et al. Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 181: 54-61
- [16] Tamilselvan N, Saurav K, Kannabiran K. Biosorption of Cr (VI), Cr (III), Pb (II) and Cd (II) from aqueous solutions by *Sargassum wightii* and *Caulerpa racemosa* algal biomass[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2012, 11(1): 52-58
- [17] Muñoz R, Guieysse B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review[J]. *Water Research*, 2006, 40(15): 2799-2815
- [18] Zhang ZP, Ji HR, Gong GP, et al. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 93-99
- [19] Watanabe K, Takihana N, Aoyagi H, et al. Symbiotic association in *Chlorella* culture[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 187-196
- [20] Bruckner CG, Bahulikar R, Rahalkar M, et al. Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(24): 7740-7749
- [21] Watanabe K, Imase M, Sasaki K, et al. Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 42(5): 538-543
- [22] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254
- [24] Wang RM, Tian Y, Xue SZ, et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of *Scenedesmus obliquus* and *Candida tropicalis* in an autotrophic system[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2016, 91(5): 1387-1396
- [25] de-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*[J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(4): 938-947
- [26] Gerbersdorf SU, Manz W, Paterson DM. The engineering potential of natural benthic bacterial assemblages in terms of the erosion resistance of sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(2): 282-294
- [27] Gerbersdorf SU, Bittner R, Lubarsky H, et al. Microbial assemblages as ecosystem engineers of sediment stability[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2009, 9(6): 640-652
- [28] Cho DH, Ramanan R, Heo J, et al. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal-bacterial community[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 578-585