

参赛队员姓名：王锦芸

中学：中国人民大学附属中学

省份：北京

国家/地区：中国

指导教师姓名：庄林岚

论文题目：以发光细菌为光源的微藻附着生长潜能提升探究

论文题目：以发光细菌为光源的微藻附着生长潜能提升探究

摘要：

微藻采用阳光、二氧化碳、水、氮磷等营养盐通过光合作用合成油脂、蛋白等物质，可用于生物柴油、生物制氢、动物饲料、水产饵料等产品的生产，亦可用于污水深度脱氮除磷处理，在人类可持续发展的生产生活中起着越来越重要的作用，然而如何找到一个高效、经济的微藻培养方法却是一个一直困扰人们的难题。传统的微藻悬浮培养模式存在培养可达到的微藻生物质含量低、收获困难、成本高等问题。微藻附着培养模式可克服传统悬浮培养中存在的上述问题。近期，该培养模式逐步引起了研究者的关注。

我们采用附着培养模式对某种微藻进行培养，发现微藻产量呈线性增长，不存在指数型快速增长时期，可见，微藻的附着生长受到抑制。因为在此培养模式中微藻的高密度聚集很可能使光不能达到微藻生物膜的深处，进而导致其生长不良，总体产量也受到限制。基于上述分析，我们推测微藻附着生长的抑制因子为光照强度。针对上述问题，本研究提出了发光细菌与微藻共同培养的理念，即以发光细菌为光源，在微藻群的底部分散培养，为生长受到抑制的微藻提供光能。基于上述理论，先后筛选了潜在共培养的发光细菌，优化了共培养所需培养基，探究了发光细菌持续发光的调控方法，系统研究了不同条件下发光细菌对共同培养系统中微藻生长的影响。最终，我们通过实验发现微藻在发光细菌介入的情况下生长会收获更高的干重

和密度, 生长得到促进。 发光细菌的介入为有效促进微藻培养提供了新思路, 我们也期待在一步一步的完善后广泛应用至工厂和企业中。

关键词: 微藻; 附着培养; 光抑制; 发光细菌; 菌藻关系

Title: A novel light source provided by luminous bacteria to improve the growth of microalgal biofilm

Abstract:

Microalgae can be used to produce biodiesel, biological hydrogen, fish food because of its ability to convert light, CO₂, water and nutrients to synthesize protein and lipid,. In addition, microalgae could be applied to remove the nitrogen and phosphorus in wastewater, which plays an increasingly important role in the sustainable development of human society. However, scientists have been struggling to find a cultivation method that can efficiently improve microalgae yield. Traditional suspension culture system yields low microalgae density, results in difficult harvesting process and costs a lot. Currently, a novel microalgae attachment method is favored by industries and companies because it produces dense microalgae biomass which can be harvested easily with low cost. We studied the microalgae attachment system and found that the growth of microalgae increased linearly. We postulated that the inhibition factor is light intensity as the high density of microalgae formed via attachment method is likely to hinder light from reaching to the group of microalgae near the carrier, resulting in an inefficient growth as well as limited overall yield. To overcome the problem, we designed a cultivation system which co-cultures luminescent bacteria and microalgae, using luminescent bacteria as light source to provide light for inhibited microalgae at the bottom. In addition, we applied photobacteria species that have the potential of being co-cultured, selected the optimal medium, developed ways for bacteria to emitting light continuously, and studied the changes in the microalgae growth under a variety of co-culture systems with different conditions. Ultimately, we found that the growth of microalgae with the intervention of photobacteria would yield higher dry weight and density, which meant the growth was promoted. The introduction of luminescent bacteria into microalgae cultivation provides a new perspective to promote the cultivation of microalgae effectively and we are looking forward to the wide use of it after further scrutiny and improvements.

Key words: microalgae; algae biofilm cultivation; luminous bacteria; algae-bacteria interaction

参赛声明:

本人郑重声明: 所提交的学位论文, 是本人在导师的指导下, 独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外, 本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体, 均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

参赛团队签名:

王锦芸

庄林岚

日期: 2018/

目录

1. 简介:	7
2. 材料与方法:	8
2.1 材料:	8
2.1.1 斜生栅藻:	8
2.1.2 发光细菌:	8
2.1.3 培养基的配置:	8
2.1.4 载体选择与制备:	10
2.2 微藻附着培养装置:	11
2.2.1 反应器设计:	11
2.2.2 装置:	11
2.3 方法:	12
2.3.1 微藻密度检测:	12
2.3.2 微藻生长曲线绘制:	13
2.3.3 培养基优选:	13
2.3.4 发光细菌生长与发光特性测定:	13
2.3.5 碳源补加实验设置:	13
2.3.6 藻菌共生实验设置:	13
3 结果与讨论:	14
3.1 微藻附着生长特性:	14
3.1.1 定性观测:	14
3.1.2 生长曲线:	14
3.1.3 存在的问题-光抑制:	15
3.2 微藻附着培养中生长抑制的解除研究:	15
3.2.1 细菌微藻共生原理:	15
3.3 共同培养培养基的确定:	16
3.4 发光细菌的发光特性:	16
3.4.1 发光细菌定性观察:	16
3.4.2 发光细菌生长与发光特性:	18
3.4.3 持续发光的方法:	19
3.5 确定培养基后的共同培养:	19
3.5.1 藻菌混合的吸光光谱:	19
3.5.2 藻菌共生:	20
3.5.3 藻菌开放体系, 提供外光源的结果:	22
3.6 后续系统优化的建议:	24

1. 简介:

作为地球上生物进化演变的一大“祖先”，藻类的重要作用是万万不可忽视的。而在其千变万化的大小之中，微藻（一类只能在显微镜下观察到的藻类：以蓝藻门、绿藻门、金藻门和红藻门为主），可谓是冉冉升起的新星。

“麻雀虽小，五脏俱全。”微藻作为蛋白质、脂类、多糖、维生素、微量元素等高价值营养成分和化工原料的优质来源，被大量培养用于生物柴油^[1]、化学药品、饲料和营养保健品的生产制造。例如，微藻中的类胡萝卜素可用于预防癌症，抵抗辐射，延缓衰老和增强免疫力^[2]。目前小球藻与栅藻已经投入食品工业中（尤其包括饲料）^[3]，在粮食紧缺的今天实在具有广大的前景。同时，微藻也因耗能耗力低而被广泛运用于环境质量监测、改善当中：如污水处理、有毒有害气体和重金属离子的吸收、甲醛探测等^[4]。微藻在人类生产生活中的运用逐渐推广，促进生态、经济、社会可持续发展，并使人类健康得到保障，为解决粮食、能源、环境危机提供不容小觑的力量。

然而，让人们头疼的，是如何高效培养微藻。纵使微藻繁殖能力很强，真正做到低消耗工业化生产微藻却至今未有线索。在广泛运用的传统悬浮培养系统中，微藻浓度非常的低，加之细胞微小，其收获过程困难——须经历沉降、絮凝、离心等步骤，存在操作复杂、能耗高、经济性差等问题^[5]。

近期，一种新兴的微藻培养系统——附着培养，也就是将微藻附着于某种固体表面，使微藻以生物膜的形式生长。附着培养作为悬浮培养的潜力替代方法广受关注：当微藻生长在生物膜上会自然地聚集，密度增长，使营养与光源被更有效的利用^[6]，产量和质量都有大幅提升^[7,8]。此方法下的微藻可直接被机械方法收集而避免传统悬浮系统中的繁杂收获步骤^[9]，不需要从低浓度微藻培养液中逐渐浓缩和分离微藻，进而降低其生物质的生产成本^[10,11,12]。在本课题中，我们设计实验了一种微藻附着系统，对微藻在此方法下的生长规律与趋势做出细致的研究。在分析得到的数据时，我们发现附着培养微藻呈线性生长，而非向悬浮培养的 S 形生长。我们认为，随着微藻生物膜达到 200 μm 以上，底层微藻光照不足，无法进行光合作用将不再持续增长。由此我们做出猜想：光是限制微藻膜生长的主要因素。

所以为了改善上述问题，我们想到引入发光细菌以提供光照（如图 1.1 所示）。发光细菌在环境中常通过其发光特性来检验水质的毒性，也常被用来制作生物传感器检测污染物浓度变化^[13]。发光细菌体积小于微藻，所以可分散在微藻生物膜中并具有作为微藻光合作用的光源使用的潜力。研究表明，细菌与微藻的共生构成了较为复杂的一个系统：细菌的呼吸作用放出二氧化碳，为微藻的光合作用提供原料，而微藻的光合作用也为细菌的呼吸作用提供氧气。两者形成了很好的互利共生系统，发光细菌生长好，发光也会增强。且有文献表明，发光细菌发光的峰值与叶绿素吸收峰值非常相近^[14]。为此，

我们提出了一个创新性理念：如果将发光细菌均匀分散在藻膜中，加之其发光，可为微藻提供均匀的光源，突破藻膜生长的光限制。如果这个想法可以实现，将大幅提升藻类生物质培养的效率。

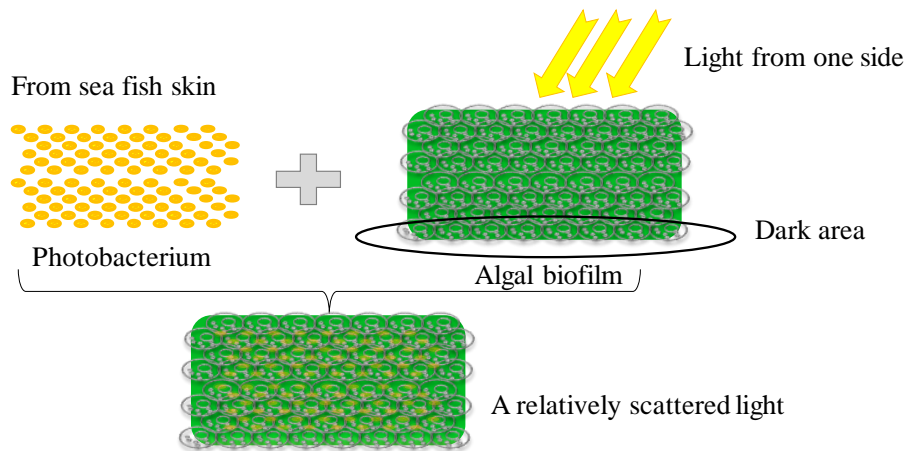


图 1.1 -光合细菌和微藻共生简要示意图

由于菌藻的生长环境和需求不同，细菌生长需要有机碳，而微藻不需要；细菌发光需要高浓度的氯化钠（NaCl）^[15]，而微藻生长不需要氯化钠^[16]，而且适应的渗透压也不尽相同。怎么选藻，怎么调节碳源等问题依然存在，所以我们需要深入研究这个想法的可行性。

2. 材料与方法：

2.1 材料

2.1.1 斜生栅藻

斜生栅藻(*Scenedesmus. Obliquus*)是一种较为常见的淡水微藻，广泛分布于静水水体中，具有易存活、耐菌性强、繁殖能力强、环境耐受性强、氮磷利用率高等特点，可生长在高浓度的盐环境中^[16,17]，生存适宜温度为 25 °C。我们采用加拿大藻种库里的藻种，并用 BG11 培养基培养。

2.1.2 发光细菌

鮟发光杆菌(*Photobacterium leiognathi*)，具有生长速率高、发光性能稳定、对营养要求低、对环境污染敏感等特点，生存适宜温度为 25 °C，需要高浓度的 Na⁺，发光波长区域在 420 nm 到 560 nm 之间，峰值产生于 490 nm 处^[18]。我们采用的是 ACTT 全球生物资源中心 菌种，用液体 LB 培养基培养。

2.1.3 培养基的配置

a) 液体培养基 **BG11**:

表 1 BG11 培养基配方

BG11 培养基配方	
组分	浓度 (mgL)
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40
Na ₂ CO ₃	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36
EDTA	1
柠檬酸	6
柠檬酸铁铵	6
A3 溶液:	
HIBO	2.86
MnCl ₂ · H ₂ O	1.86
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
CO(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.05

b) 液体 LB 培养基:

表 2 LB 培养基配方

LB 培养基配方	
组分	浓度(g/L)
胰蛋白胍(Tryptone)	10
酵母提取物 (Yeast extract)	5
氯化钠(NaCl)	10

c) 固体培养基配置

配置好液态培养基加 2%的琼脂，放到锥形瓶高温蒸汽灭菌 20 min，冷却至 50 °C左右倒入灭菌培养皿中，静置冷却后形成固态培养基，用于细菌或者微藻的保存，备用培养基保存在-4 °C冰箱中。

d) 固体 LB 培养基:

表 3 固体 LB 培养基配方

组分	比例.
牛肉膏	3.0 g.
蛋白胨	10.0 g
NaCl.	5.0 g
琼脂	15-25 g.
水	1000 ml
pH:7.4-7.6	

按上述配方配置培养基，用 10%盐酸或 10%的氢氧化钠调整 pH 值到 7.2~7.6，锥形瓶加棉花塞后用高压蒸汽灭菌：121 °C维持 30 min。

2.1.4 载体选择与制备

我们采用亲水性强的棉质超细纤维材料，作为微藻与发光细菌培养的载体，超细纤维采用具有有效吸取培养液的作用。实验中多条纤维捆扎成一束使用，一段浸没在培养基中，大部分暴露在气相。暴露在气相的载体表面接种微藻，由于气相中载体表面水分不断蒸发，使得浸没在液相培养基中的载体利用毛细作用不断吸水，带动培养基营养供给微藻生长。

添加发光细菌共同培养系统的构建方法：预先把载体放在 LB 液相培养基加发光细菌的锥形瓶中，使得部分发光细菌附着生长在载体表面，之后再取出，在载体上接种微藻，实现共同生长（如图 2.1 所示）。

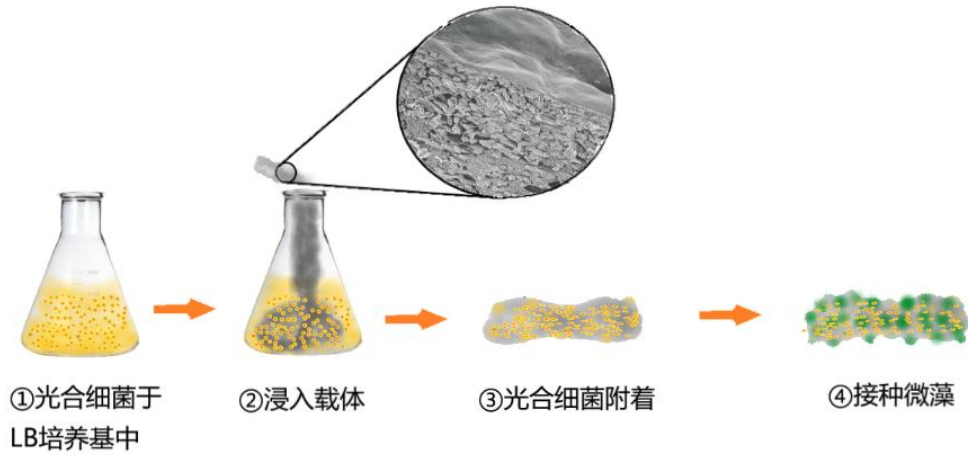


图 2.1 -微藻与光合细菌附着过程示意图

2.2 微藻附着培养装置

2.2.1 反应器设计

设计并构建一套微藻附着培养体系（图 2.2），藻液流经反应器，沉降在玻璃片载体表面上，其余由出水系统排出，微藻附着培养系统形成，不断提供微藻的培养基以供微藻生长。除此之外，反应器上设有光源，培养基供给系统上设有由时控开关控制的泵。

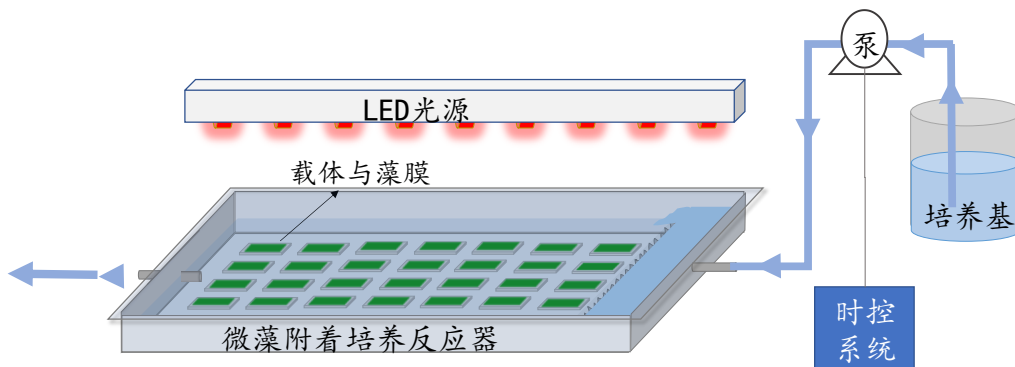


图 2.2 -微藻附着培养实验装置示意图

2.2.2 装置

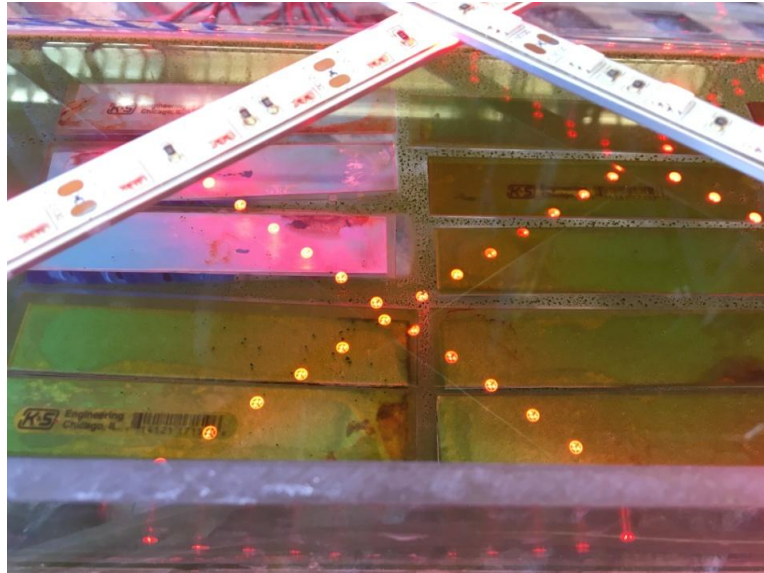


图 2.3 -微藻单独培养实验装置

如图 2.3 所示，微藻在玻璃片上沉降，微藻附着培养系统形成。

2.3 方法

2.3.1 微藻密度检测

1) 取样方法

每次取样检测时，从培养系统中抽取玻璃片放在烧杯内，用高纯水冲洗，同时利用玻璃棒进行搅拌，以加速附着微藻的再悬浮过程。将重悬液置于 100 mL 量筒内，按照上述方式多次冲洗玻璃片使得附着微藻最大程度的重悬于液相。将量筒内重悬液定容至 50 mL 用于后续指标的测试。

2) 藻密度检测

藻密度利用血球计数板法进行测定：将大约 0.1 mL 藻液样品滴入盖有盖玻片的血球计数板上，置于普通光学显微镜下观察，记录血球计数板内计数室的微藻细胞数量，每个样品计数 3 次。通过换算得到样品藻密度。共同培养时，藻密度定义为附着在纤维表面的微藻总量与纤维长度的比值。

普通情况下我们使用血球计数板计数。但为了探究不同生物膜层处细胞生长差异，我们将藻膜进行原位脱水并用琼脂液将藻膜固定，然后再用刀片把微藻膜切片，放在显微镜下观测。

2.3.2 微藻生长曲线绘制

将 200 mL 培养基加到 500 mL 锥形瓶中，四孔封口膜封口，高温高压灭菌 30 min 后，冷却，加入 5 mL 藻液，放至人工气候箱中培养。每隔 1-2 天，使用血球计数板计数微藻浓度，并绘制生长曲线。

2.3.3 培养基优选

BG11 是栅藻最适培养基，LB 是发光细菌最适培养基。将两者以不同比例（100%BG11；75%BG11+25%LB；50%BG11+50%LB；25%BG11+75%LB；100%LB）混合，分两组试验添加或不添加 NaCl，配置培养基。高温高压灭菌 30 min 后，以【原液：培养基=1:40】的比例接种细菌和微藻，分别测定菌、藻密度，细菌发光强度。微藻用血球计数板计数；发光细菌取 0.5 mL 菌液放到 96 孔板，用酶标仪读取 OD₆₀₀ 和荧光发光值。

2.3.4 发光细菌生长与发光特性测定

设置酶标仪自动每隔 30 min 读数一次 OD₆₀₀ 和发光强度，把发光细菌每 25 uL 和培养基 0.5 mL 接种到 96 孔板上，放在酶标仪中过夜，并绘制细菌生长与发光曲线图。

2.3.5 碳源补加实验设置

设置酶标仪自动每隔 30 min 读数一次 OD₆₀₀ 和发光强度，把发光细菌每 25 微升和培养基 0.5 mL 接种到 96 孔板上，放在酶标仪中过夜，第二天补充 0.5 mL 新鲜培养基，继续在酶标仪中测定每隔 30 min 的发光数据。

2.3.6 藻菌共生实验设置

(1) 液相共同培养

按最优培养基混合比例培养培养基放入锥形瓶中, 加入藻液与菌液, 悬浮培养, 不设置人工光源, 每两天取样按照方法 2.4.1 检测藻密度。

(2) 附着条件下共同培养

如图四所示组装实验器材, 将表面有细菌预先附着培养 2-3 天的载体纤维置于固体平板表面, 一端放入培养基中, 一端暴露在空气中, 载体表面接种微藻。持续补充培养基至 14 天, 把纤维上的微藻用洗瓶冲下来, 形成悬浮微藻, 用血球计数板测定藻密度, 过滤烘干测定干重。

3 结果与讨论

3.1 微藻附着生长特性

3.1.1 定性观测

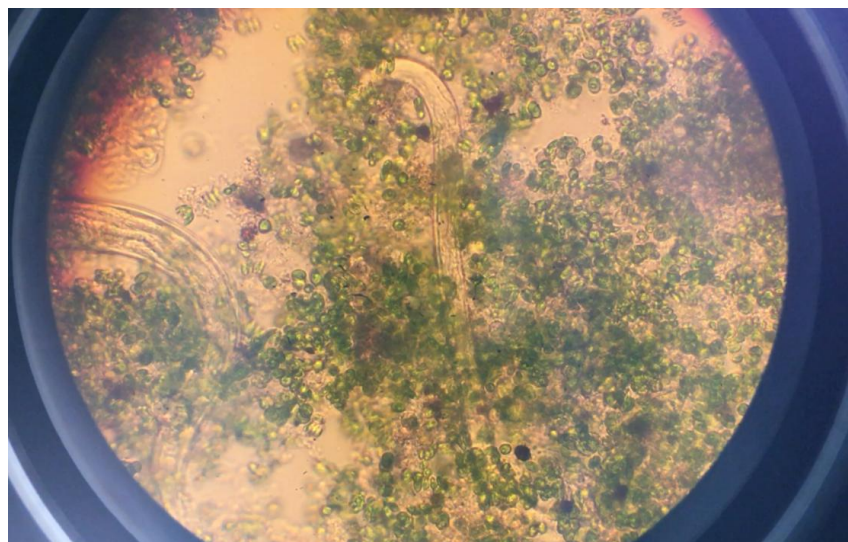


图 3.1 -斜生栅藻单独培养的镜检

根据图 3.1 我们可以看出微藻的分布较不均匀, 生长密度局部相对高, 甚至堆叠在一起。栅藻在液相培养中标准的四连体结构解体, 细胞长宽比发生改变, 且细胞表面附着一层近透明的胞外聚合物, 其生长状态与悬浮培养条件下存在较大差异。

3.1.2 生长曲线

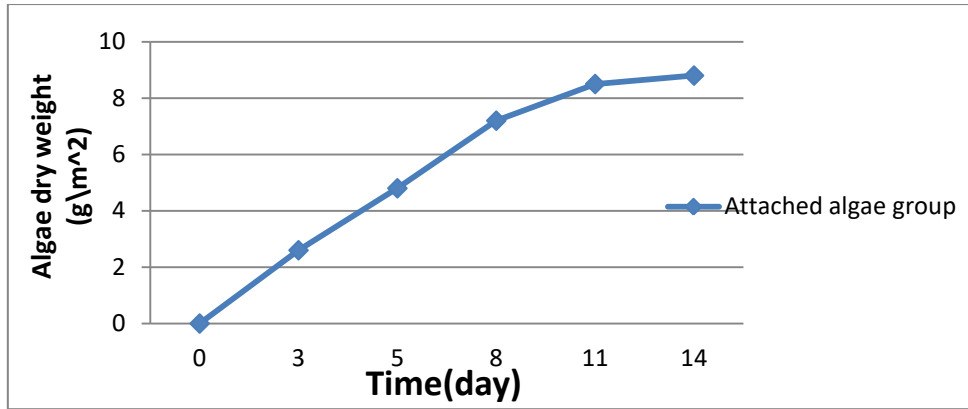


图 3.2 -微藻干重随时间的变化趋势

根据曲线图 3.2 我们可以发现微藻呈线性生长, 在一段时间之后生长速率有很明显的减少, 甚至最后趋于不生长水平, 这表明在附着培养的方法下, 微藻的生长在一定时间后会被抑制。

3.1.3 存在的问题-光抑制

微藻的生长呈典型的线形增长, 且梯度逐渐平稳。在影响微藻生长的因素中, 因微藻膜加厚而导致的光照不足显然限制了微藻生长, 该推测亦有文章佐证^[9]。此外, 结合图 3 所示, 微藻细胞表面包被一层物质后, 进一步抑制了光能与营养盐的传递, 导致微藻附着生长的限制。微藻是光合植物且需要充足光照繁殖。当藻膜加厚, 新生细胞叠在老细胞上, 最终将其完全覆盖住; 底层细胞也可能因为过厚微藻而导致的营养传输速率减慢而被抑制生长。如果底层细胞不能有效维持生长, 整个微藻膜生长也会受到拖延。

3.2 微藻附着培养中生长抑制的解除研究

3.2.1 细菌微藻共生原理

发光细菌和微藻的互利共生关系的核心为两者的新陈代谢相辅相成, 主要表现为发光细菌对氧气、微藻对二氧化碳和代谢产物的释放和吸收利用^[19](图 3.3)。发光细菌自身发光为微藻光合作用提供条件, 同时发光细菌吸收微藻通过光合作用产生的氧气呼吸, 其产生的二氧化碳也能再次供微藻进行光合作用。在富营养状态下, 微藻吸收氮和磷等元素并通过光合作用将其转化成可利用物质, 同时将有有机碳释放到环境中以促进细菌生长^[20]。此外, 凋亡后的微藻细胞会被细菌氧化分解, 成为细菌获取有机碳的一个来源。这也同时意味着微藻因细胞堆积、生长厚密而限制营养盐和光能传递的现象可被缓解, 而且被分解的藻细胞的产物也可成为营养盐被其余微藻吸收利用, 促进其余微藻生长。此外, 细菌可以产生促进微藻生长的生长因子^[21]。在增殖过程中, 细菌和微藻会分泌一些细胞外代谢物, 如氨基酸, 脂类, 维生素, 碳水化合物, 酶等, 进而促进共生。

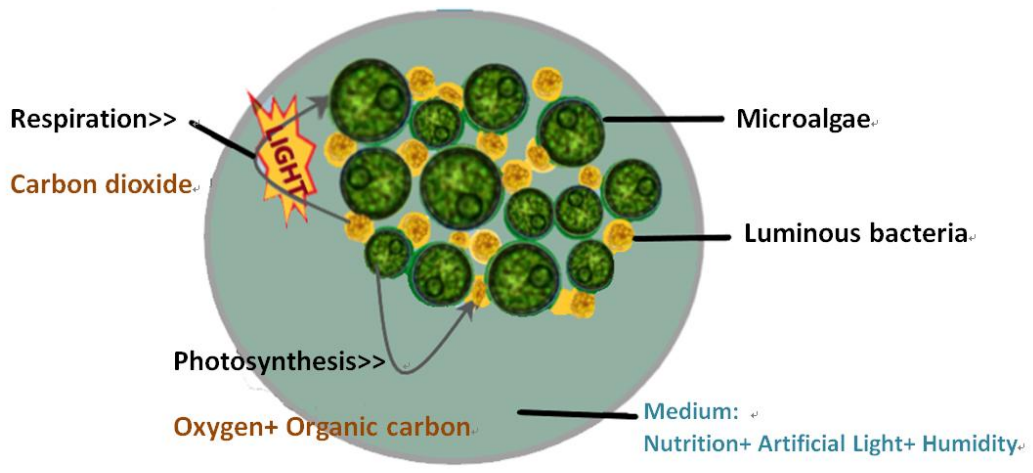


图 3.3 -微藻与发光细菌共同生长的原理示意图

3.3 共同培养培养基的确定

表 4- 使用不同培养基单独培养，微藻生长与细菌生长及发光情况

	With 1.5% NaCl					Without 1.5% NaCl				
	100% BG11	75%BG11 25%LB	50%BG11 50%LB	25%BG11 75%LB	100%LB	100% BG11	75%BG11 25%LB	50%BG11 50%LB	25%BG11 75%LB	100%LB
Algal density (cells/ml)	1.7×10^6	3.9×10^6	4.4×10^6	4.7×10^6	2.2×10^6	1.5×10^6	7.9×10^6	6.1×10^6	6.3×10^6	2.9×10^6
LUM (RLU) (490 nm)	-36	-9	7	7	11	338	2223	138	70	-79
Bacterial density OD ₆₀₀	0.10	0.36	0.39	0.37	0.49	0.07	0.30	0.38	0.32	0.47

根据表 4，我们发现用不加 1.5%Nacl，LB 占比 25%的培养基培养，细菌和藻生长最好，细菌发光强度最高；LB0% 单位菌发最强。100%BG11 中，整体发光强度第二，单位细胞发光强度也是第二。细菌虽然没增长，但是培养基促进了发光。综上所述，我们认为 75%BG11+25%LB 为适宜的共同培养培养基。

3.4 发光细菌的发光特性

3.4.1 发光细菌定性观察

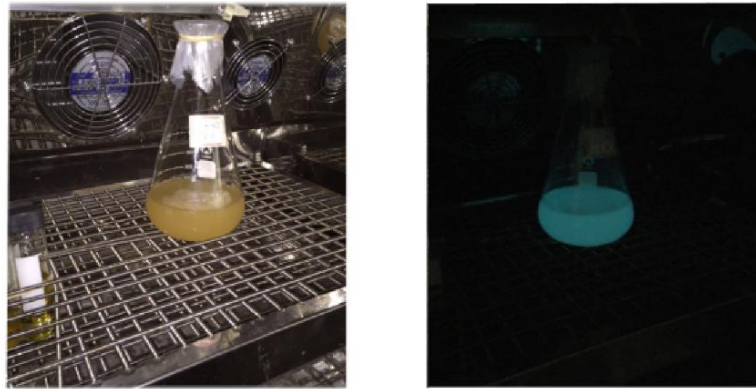
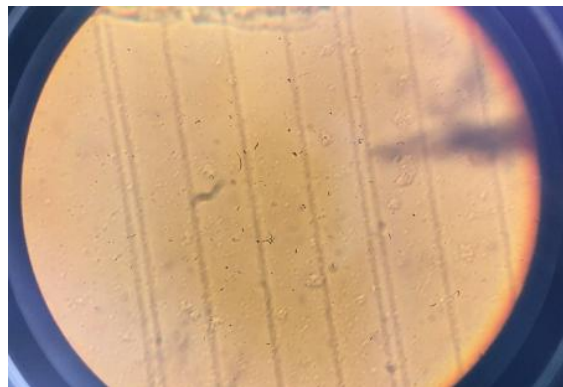


图 3.4- 在 A) 开灯; B) 关灯下发光细菌的图像

发光细菌的发光较为微弱, 在黑暗环境中可明显辨别。

A.



B.

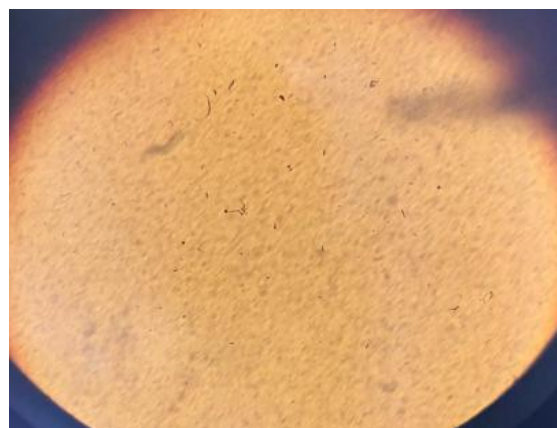


图 3.5- 鲮发光杆菌 A) 不发光; B) 发光镜检

根据发光细菌在光学显微镜下的镜检(图 3.5), 我们发现发光细菌不发光时运动性较差, 密度相对低; 发光时运动性较好, 分布均匀。我们猜测发光细菌的运动性强弱可能在其与微藻共生中微藻的生长起到影响。

3.4.2 发光细菌生长与发光特性

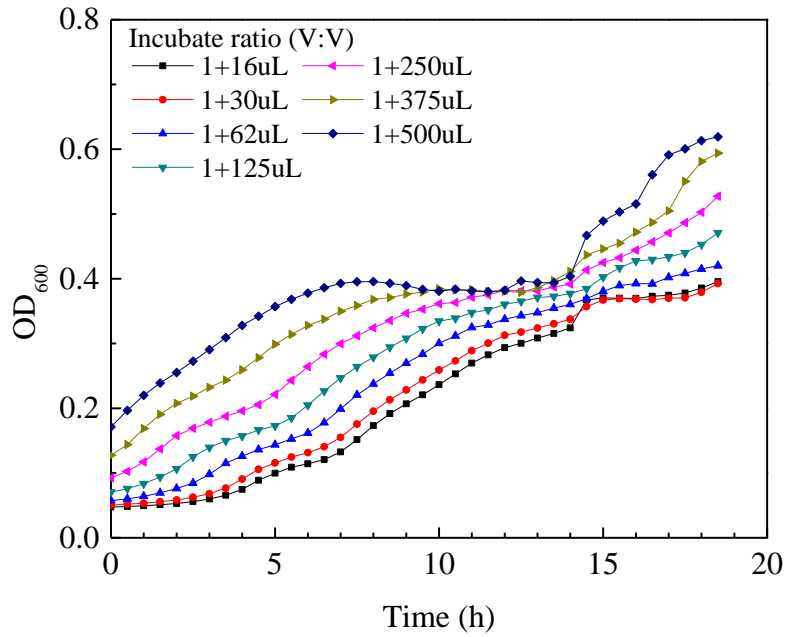


图 3.6 -发光细菌生长曲线

*单独培养不等量的发光细菌于等量培养基中, 其生长的情况(“1:16ul” 为 1000ul 培养基加 16ul 培养到稳定期的细菌培养液, 培养基为 25%LB+100%BG11)

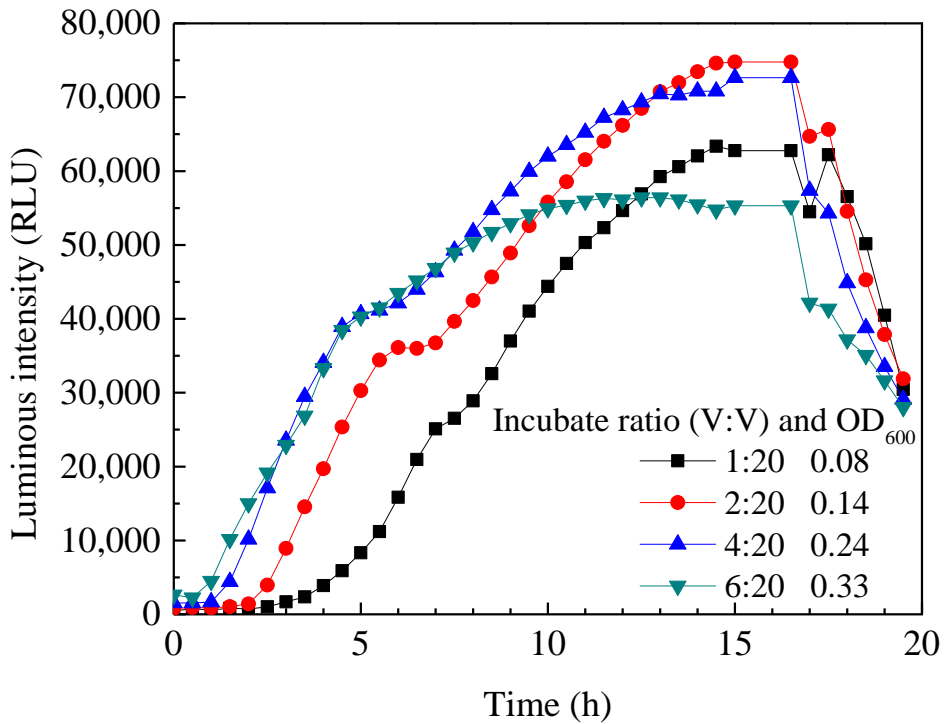


图 3.7 -发光细菌发光曲线

*单独培养不等量的发光细菌于等量培养基中，其发光强度的情况（“1:20”为1体积培养到稳定期的细菌培养液加20体积培养基，培养基为25%LB+100%BGI1）

我们发现不同初始接种量下，初始接种量最大的，最后菌密度也最大（图3.6），这在预期之内，然而密度最高的实验组发光强度却不是最大的（图3.7），可见生长与发光既协同也竞争。空间和营养充足的情况下，菌能生长良好，发光良好，生长太快，空间好营养缺失现象出现更快，发光反而弱一些。所以营养供给与初始接种量影响整体发光强度。

3.4.3 持续发光的方法

我们推测碳源的消耗大幅影响发光强度下降，所以设计在实验中间补加碳源观察发光情况。通过图3.8我们发现在重新补加碳源（LB琼脂）后发光恢复至原水平。所以在之后与藻膜共同培养时，需要持续提供碳源才能保证发光细菌持续提供光源。

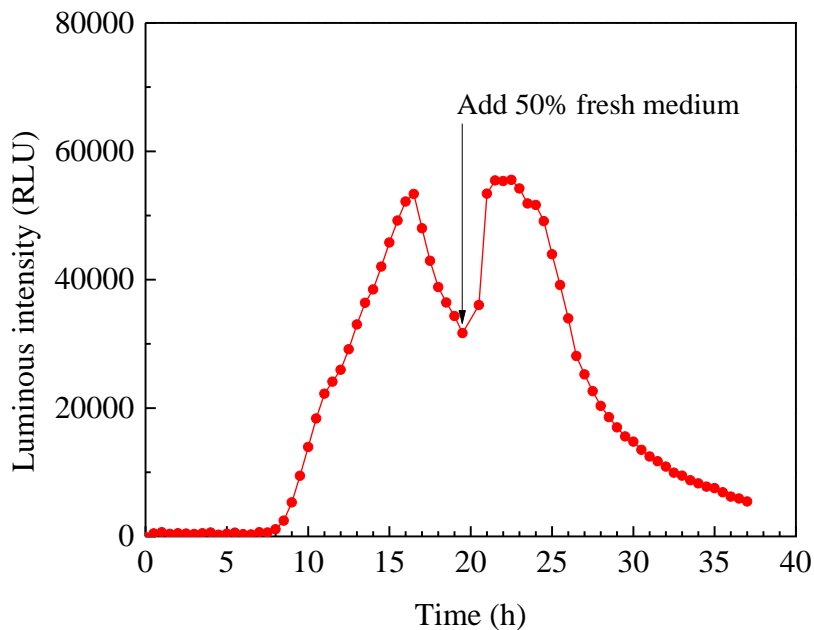


图 3.8 -补加碳源后细菌发光强度情况

3.5 确定培养基后的共同培养

3.5.1 藻菌混合的吸光光谱

为了探究细菌发光是否能够作为微藻光合作用的光源, 我们设计实验检测了细菌发光是否被微藻吸收, 及其吸收程度。通过图 3.9 我们发现, 加入微藻后, 发光细菌发光强度明显下降。于是我们做了进一步调查, 发现去除率最高点在 450 nm 处 (图 3.10), 也就是叶绿素吸收了光, 而非类似于颗粒物散射导致的吸光度下降, 说明微藻能够利用发光细菌所产生的光吸收利用。

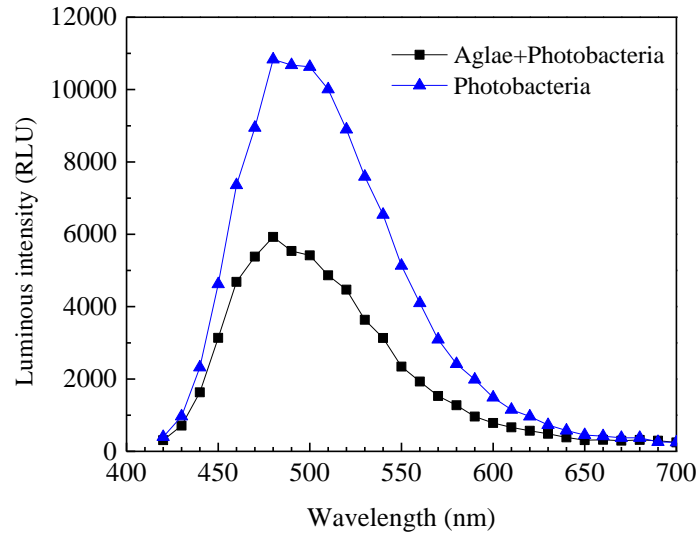


图 3.9 -单独培养和共同培养情况下细菌的发光强度

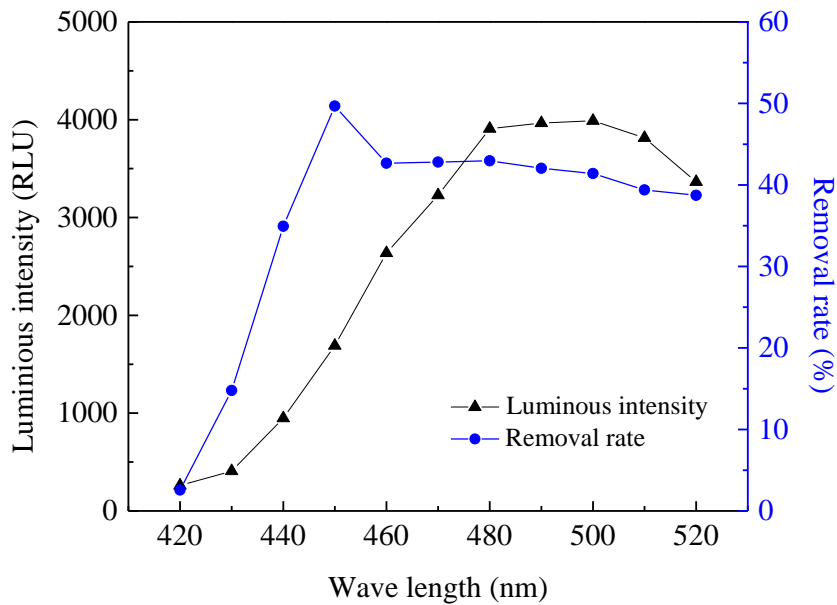


图 3.10 -加入微藻对发光细菌发光强度的影响

3.5.2 藻菌共生

在确定了藻菌共生体系的可行性后, 我们具体对于此培养方法所需的条件进行探寻。我们设计实验探究在不提供光源, 完全依赖发光细菌提供光源的情况下微藻的生长情况。我们将藻菌共养于 25%LB, 75%BG11 培养基和无光的条件下 (phobac group), 发现藻基本不长, 且与未添加发光细菌的对照组 (blank group) 相比, 添加发光细菌并未表现出对微藻的生长的促进作用。虽然发光细菌可为微藻的生长提供光源, 但是, 发光细菌与微藻之间还存在竞争空间和营养盐的作用, 在黑暗和存在有机碳的条件下, 细菌生长占优势, 反而抑制了微藻的生长。

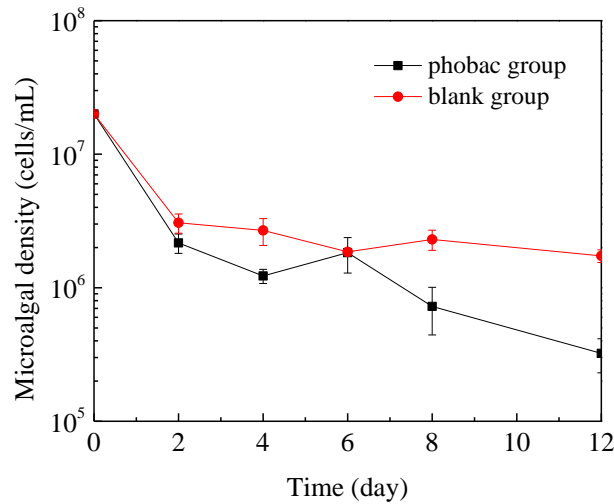


图 3.11 -藻菌共养于 25%LB 100 BG11 无光培养

另外, 我们探究了自然光条件下封闭体系中菌藻的比例对微藻生长的影响, 并发现我们所做的实验中藻菌比例为 1:1 时, 微藻生长最好 (图 3.12), 这说明如果发光细菌过多藻生长不能得到有效促进, 其原因可能为藻菌竞争关系更加激烈, 导致微藻所获取营养不足; 而如果细菌过少则不能有效发挥发光用处, 但是相对竞争资源从而削弱微藻生长情况较轻。

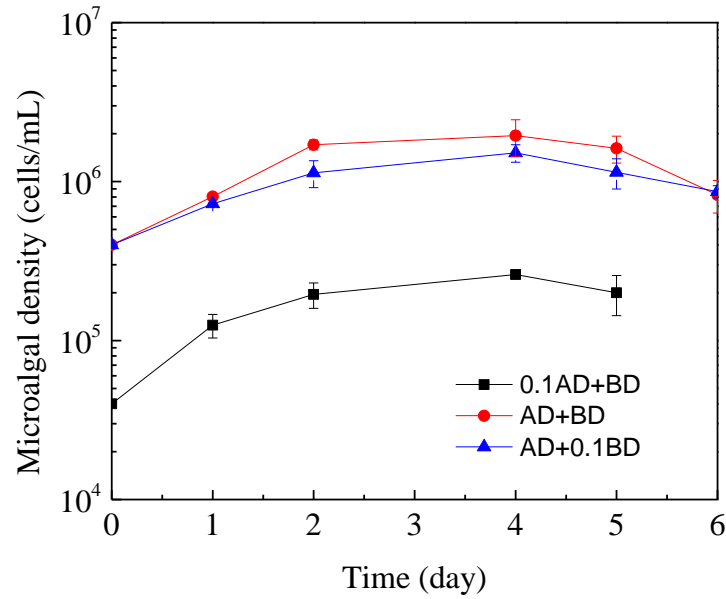


图 3.12 -藻菌不同投加比例对微藻生长的影响

*藻菌共同培养于 25%LB+75%BG11 液相培养基, 不同藻菌比例下的情况。(AD 指微藻密度, BD 指发光细菌的密度。“0.1AD+BD”为培养到稳定期的藻密度的 0.1 倍+培养到稳定期的菌密度比例添加进培养基)

3.5.3 藻菌开放体系, 提供外光源的结果

最终我们在开放体系中, 提供人工光源、持续提供优选培养基, 考察超细纤维上微藻的生长情况, 探究添加发光细菌的促进效果。根据图 3.13 可以观察到有发光细菌实验组的颜色较绿(左 4 条), 表观可见微藻长势更好。

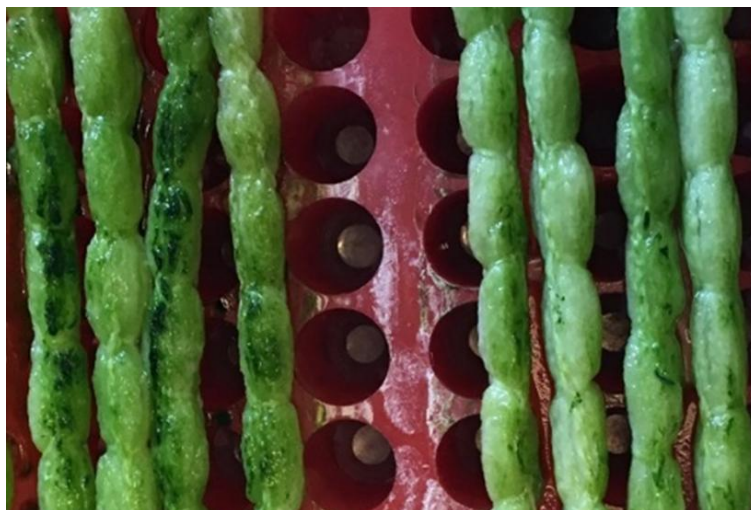


图 3.13 -微藻在超细纤维上的生长图示

*左侧实验组为发光细菌与微藻共同培养实验组, 右侧为微藻单独培养实验组)

定量分析菌藻共生体系下微藻生长情况（图 3.14），我们发现微藻发光细菌共生使微藻的生长稍微得到促进，重量和数量上都有增加。

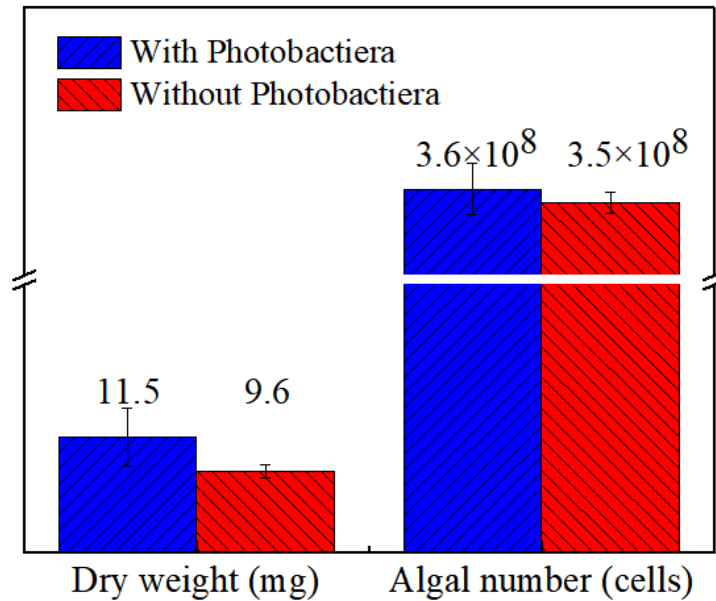


图 3.14 -藻菌共生，连续供营养盐附着培养，微藻生长情况

目前，发光细菌对微藻附着生长的促进效果虽然存在，但未呈现出显著的大幅提升，我们推断可能的原因有：

1) 藻菌的竞争关系导致细菌生长过盛，导致微藻生长受到抑制。

细菌和微藻需要在生长过程中吸收环境中的营养物质，因此环境中的营养物质若不达两者共生的基本需求，就会加剧细菌和微藻竞争关系。研究表明，当共生环境中的磷酸盐含量较低时，细菌相较于微藻有更高的磷酸盐利用率^[22]，这说明微藻在营养盐的利用效率方面很可能被细菌压迫，导致生长劣势。

由于此系统并非全封闭系统，环境微生物（主要指其它细菌）会进入微藻培养系统，部分会附着生长于载体表面，此现象亦有文献佐证^[23]。生物膜中高密度的细菌可能夺走营养，加剧其与微藻之间的竞争关系，抑制微藻的生长。

此外，一些溶藻细菌（algae-lysing bacteria）会抑制藻细胞生长，甚至裂解整个藻细胞，表现出杀藻效应^[24]。细菌直接与藻细胞接触，释放可溶解纤维素的酶使其细胞壁分解，进而溶解并杀死整个藻细胞。细菌可在生长期间释放特异性或非特异性化感物质，包括肽类、蛋白质、生物碱、抗生素、色素等，可通过阻断呼吸链、抑制细胞壁合成等抑制藻细胞的生长甚至将其杀死^[25]。抑藻细菌是否会在我们的微藻开放培养系统中存在仍需进一步证实。

2) 细菌发光不稳定。

随微藻的生长, 培养系统的 pH 将升高至 8.5-9.0 左右。然而, 反应器内发光细菌的最适 pH 可能并不在该范围内。方宏达等人发现最适于发光弧菌 D2 生长的 pH 值为 7.0, 发光强度最好是在 pH 为 5~6 范围内^[15], pH 导致此环境不适于细菌的生长, 发光也不稳定, 导致微藻生长促进效果不理想。

此外, 微藻可以产生特殊抗生物活性物质——藻毒素(例如小球藻素), 抑制细菌生长。微藻产生的一些胞外分泌物(抗生物物质), 可能对细菌和病原菌产生抑制或毒害作用^[22]。在营养匮乏状况下, 异样微藻还可能发挥自身本能捕食细菌, 对细菌生长造成大幅度抑制效果。

3) 细菌提供的光量占比小。

从实验可知, 发光细菌发光的强度不高, 仅在黑暗环境中才可被肉眼观测到。因此, 发光细菌提供的光能在藻膜中所起到的作用大小有可能比较微弱, 是投加发光细菌后, 微藻生长促进作用不明显的可能原因。

综上所述, (发光) 菌藻共生系统对微藻生长有促进效果, 但还需要深入研究加以完善。

3.6 后续系统优化的建议

通过本次研究, 我们识别了微藻附着生长的光限制因素, 创造性的提出以发光细菌为光源的微藻培养提升方式。通过对发光细菌的筛选、生长与发光特性的研究, 提出了发光细菌发光的持续方法。选择优势培养基, 实现微藻与发光细菌的共同培养, 发现发光细菌可促进微藻的附着生长。

在上述研究基础上, 我们建议后续系统性地针对不同种属的发光细菌进行培养, 考察其最优生长条件及发光特性, 筛选并构建更为适宜的藻菌共生体系。新的系统可以进一步通过减少有机碳源, 辅以外部光照等手段来提供利于微藻生长的环境, 同时改善共生条件(pH、营养等)使细菌能较好发光并避免过度生长和竞争营养盐等现象。

参考文献:

1. Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances* 25 (3), 2007, 294–306.
2. P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert, "Commercial applications of microalgae", *Journal of bioscience and Bioengineering* 101 (2), 2006, 87–96
3. Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., & Bandarra, N. M., et al, "Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review.", *Livestock Science*, 2017, 205.
4. Christenson, L., & Sims, R, "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts", *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6), 686-702.
5. Gross, Martin Anthony, "Development and optimization of biofilm based algal cultivation", *Graduate Theses and Dissertations*, 2015, 14850.
6. The difference in effective light penetration may explain the superiority in photosynthetic efficiency of attached cultivation over the conventional open pond for microalgae. *The Poetical works of Thomas Campbell and Samuel Taylor Coleridge: Gall & Inglis*.
7. N.C. Boelee, M. Janssen, H. Temmink, L. Taparaviciute, R. Khiewwijit, A. Janoska, C.J.N. Buisman and R.H. Wijffels, "The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing", *Journal of Applied Phycology* 26 (3), 2014, 1439–1452.
8. F. Gao, Z. H. Yang, C. Li, G.-M. Zeng, D. H. Ma and L. Zhou, "A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent", *Biosource Technology* 179, 2015, 8–12.
9. P. J. Schnurr, G.S. Espie and D.G. Allen, "The effect of light direction and suspended cell concentrations on algal biofilm growth rates", *Applied Microbiology Biotechnology* 98 (20), 2014, 8553–8562.
10. S.-H. Lee, H.-M. Oh, B.-H. Jo, S.-A. Lee, S.-Y. Shin, H.-S. Kim, S.-H. Lee and C.-Y. Ahn, "Higher Biomass Productivity of Microalgae in an Attached Growth System, Using Wastewater Attached Growth System", *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (11), 2014, 1566–1573.

11. G.A. Lutz, L. Zhang, Z. Zhang and T. Liu, “Feasibility of Attached Cultivation for Polysaccharides Production by *Porphyridium Cruentum*”, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40(1), 2017, 73–83.
12. L.-L. Zhuang, Y. Azimi, D. Yu, W.-L. Wang, Y.-H. Wu, G.-H. Dao and H.-Y. Hu, “Enhanced attached growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 through ambient bacterial pre-coating of cotton fiber carriers”, *Biosource Technology* 218, 2016, 643–649.
13. N. Efremenko, O. V. Senko, L. E. Aleskerova, “Biosensors Based on the Luminous Bacteria *Photobacterium phosphoreum* Immobilized in Polyvinyl Alcohol Cryogel for the Monitoring of Ecotoxicants”, *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2014, 50(5):490-6.
14. A. J. KLUYVER, Delft and J. M. W. MILAT, “EMISSION SPECTRA OF LUMINOUS BACTERIA”, *Biochim Biophys Acta*. 1950, 5(2):175-8.
15. FANG Hongda, DONG Yanhong, YUAN Yin, LI Xiuqin, YI Bin, “Growth and Luminescent Conditions of a Marine Luminous Bacterium”, *Marine Science Bulletin*, 2007, 10 (1), 45-53
16. Xiang Ji a,b , Jie Cheng a , Donghui Gong , “The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002”, *Science of the Total Environment* , 2018, 633:593-599
17. Pingzhong Feng, “Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production”, *Bioresource Technology* , 2014, 173:406-414
18. 杨颐康,唐法尧,叶履平等, “环境因子对发光细菌的生长和发光的影响”, 《海洋与湖沼》 , 1981, 12(3):249-253
19. Rishiram Ramanan, “Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications”, *Biotechnology Advances* , 2016, 34(1):14-29
20. Juan Luis Fuentes, “Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds”, *Marine Drugs* , 2016 , 14 (5) :100
21. Zhi Guo & Yen Wah Tong , “The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions”, *Journal of Applied Phycology* , 2014 , 26 (3) :1483-1492
22. SP Wang, et al, “The relationship between bacteria and microalgae in water

environment and its practical application”, South China Fisheries Science , 2008 , 4 (1) :76-80

23. Linlan Zhong“*The Establishment and Performance Characteristics of Suspended-Solid Phase Photobioreactor for Attached Microalgae Cultivation*”, 2017
24. 苏建强, 郑天凌等, “海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒量的影响”, 《海洋与湖沼》, 2003 , 34 (1) :44-49
25. 牛燕, “海洋弧菌 S-9801 次级代谢产物抑藻作用及作用机制研究”, 《青岛科技大学》, 2009

致谢:

九月, 金秋时节, 我的论文在庄林岚老师的指导下圆满完成。在此, 我要对庄林岚老师表示衷心地感谢! 庄老师不仅是我的良师, 更是益友。老师在工作繁忙的情况下, 依然非常重视我的项目, 给予我精心的指导和帮助。看着这份凝结着我和老师心血的论文, 眼前又闪过它从稚嫩到趋于完善的过程, 一点一滴都记忆犹新。多少个青灯夜畔, 一点点的整理思路、画图、打稿; 多少次围绕一个疑难问题, 不停地寻找办法、查阅资料。从理论知识的学习到实验操作, 无不有庄老师的无私关怀与悉心指导。

庄老师不仅从专业知识上指导我, 更教给我为人处事的道理和严谨勤奋的科研态度。庄老师的教诲坚定了我今后深入学习生物的决心, 鼓励并指引着我向着未来的目标继续努力。

另外, 我还要感谢我的父母。在我繁忙的研究学习过程中, 他们对于我的鼓励支持使得我能够不懈追寻我对生物的爱, 并可以全心全意投入到学习中, 顺利完成此次研究。

这次研究的过程是我人生道路中宝贵的财富, 将对我受益终生