



响应面法优化2种混合绿藻的培养基

王其鹏, 张树林, 张达娟*, 李森森, 王鑫鑫

(天津市水产生态及养殖重点实验室/天津农学院水产学院, 天津 300384)

摘要:【目的】优化普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)2种混合绿藻的培养基,为提高混合绿藻的生长速度及推广应用淡水有益藻类混合培养技术提供参考依据。【方法】采用单因素试验筛选BG11培养基中适宜普通小球藻和斜生栅藻2种混合绿藻增殖的营养盐浓度范围,通过Plackett-Burman试验筛选显著影响混合绿藻生长的营养因素,采用响应面法优化主要营养盐的最佳浓度,并进行混合绿藻培养验证试验。【结果】通过单因素试验筛选出相对适宜混合绿藻生长的7种营养盐浓度范围,通过Plackett-Burman试验筛选出显著影响混合绿藻生长的3个营养因素(分别为 Na_2CO_3 、 K_2HPO_4 和 NaNO_3)。响应面法分析结果表明,营养因素中 NaNO_3 与 K_2HPO_4 交互作用强,对混合绿藻细胞密度具有显著影响($P<0.05$,下同),得到优化后的培养基配方为 NaNO_3 1600.00 mg/L、 K_2HPO_4 50.85 mg/L和 Na_2CO_3 32.39 mg/L。使用优化后的培养基培养混合绿藻,可显著提高其细胞光合系统PSII最大光能转换效率,混合藻细胞密度最高达 36.75×10^6 个/mL,较对照组显著提高24.28%,在整个培养周期内,普通小球藻和斜生栅藻的细胞密度比基本为1.00:1.00。【结论】通过响应面法优化的普通小球藻和斜生栅藻混合绿藻培养基,能够实现混合绿藻的高密度培养,可供大规模推广应用淡水有益藻类混合培养技术时参考;培养2种混合绿藻培养基中的 Na_2CO_3 、 K_2HPO_4 和 NaNO_3 最佳浓度分别为32.39、50.85和1600.00 mg/L。

关键词:普通小球藻; 斜生栅藻; 混合绿藻; 响应面法; 培养基

中图分类号:S917

文献标志码:A

文章编号:2095-1191(2023)04-1263-10

Optimization of culture medium for two mixed green algae by response surface methodology

WANG Qi-peng, ZHANG Shu-lin, ZHANG Da-juan*, LI Miao-miao, WANG Xin-xin

(Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture/College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract:【Objective】This study optimized the culture medium for *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*, which provided reference for improving the growth rate of mixed greenalgae and promoting the application of mixed culture technology of freshwater beneficial algae. 【Method】The concentration ranges of nutrient salt that suitable for the proliferation of *C. vulgaris* and *S. obliquus* in BG11 medium were screened by single factor test. And the nutrient factors that significantly affected the growth of the mixed green algae were determined by Plackett-Burman test. By using response surface methodology, the optimal concentrations of the main nutrient salts in BG11 medium were optimized. Then, confirmatory experiment of the mixed green algae culture was performed. 【Result】Relatively suitable concentrations of 7 nutrient salts for the mixed green algae growth were determined by single factor test. Using the Plackett-Burman test, 3 nutrient factors, Na_2CO_3 , K_2HPO_4 and NaNO_3 , which significantly impacted the growth of mixed green algae most were determined via Plackett-Burman test. The results of response surface methodology analysis showed that the strong interaction between NaNO_3 and K_2HPO_4 had a significant effect on the cell density of mixed green algae ($P<0.05$, the same below). In the optimized medium, NaNO_3 , K_2HPO_4 and Na_2CO_3 were 1600.00, 50.85 and 32.39 mg/L, respectively. Maximum light conversion efficiency in the photosynthesis PSII system of the mixed green algae in the optimized medium was significantly improved. The cell density of mixed green algae in the optimized medium group peaked at 36.75×10^6 cells/mL, which was significantly increased by 24.28% than the control group. Furthermore, the cell density rate of *C. vulgaris* and

收稿日期:2023-02-16

基金项目:天津市科技计划项目(22ZYCGSN00260);天津市教委科研计划项目(2020ZD06, 2021KJ110);天津市淡水养殖产业技术体系创新团队—养殖水环境调控岗位项目(ITFRS2021000-009)

通讯作者:张达娟(1981-), <https://orcid.org/0000-0001-5854-2900>, 博士, 主要从事养殖水质调控及水域生态学研究, E-mail: dajuanzhang@163.com

第一作者:王其鹏(1999-), <https://orcid.org/0000-0002-5433-5506>, 研究方向为养殖水环境调控与修复, E-mail:2500876678@qq.com

S. obliquus was basically 1.00:1.00 throughout the culture cycle. [Conclusion] The mixed green algae culture medium of *C. vulgaris* and *S. obliquus* optimized by response surface methodology can realize the high density culture of mixed green algae, which can be used as a reference for the large scale application of mixed culture technology of freshwater beneficial algae; the optimal concentrations of Na_2CO_3 , K_2HPO_4 and NaNO_3 in the culture medium of two mixed green algae are 32.39, 50.85 and 1600.00 mg/L respectively.

Key words: *Chlorella vulgaris*; *Scenedesmus obliquus*; mixed green algae; response surface methodology; culture medium

Foundation items: Tianjin Science and Technology Planning Project (22ZYCGSN00260); Tianjin Education Commission Research Project (2020ZD06, 2021KJ110); Tianjin Freshwater Aquaculture Industry Technology System Innovation Team—Aquaculture Water Environment Regulation Post Project (ITFRS2021000-009)

0 引言

【研究意义】微藻是水生态系统中重要的初级生产者,通过吸收水中的氮、磷、重金属和有机物等污染物从而净化水质(陈晓江等,2022)。已有研究发现,利用有益藻类可提高共生藻的优势和藻类多样性,从而改变水体浮游植物群落结构(Qiu et al., 2019; 宋婵媛等,2022)。绿藻属于有益藻类,既可作为水产动物的饵料,也可在水中抑制有害藻类生长,维持生态系统稳定(Bittencourt-Oliveira et al., 2015)。绿藻门的小球藻(*Chlorella*)和栅藻(*Scenedesmus*)已广泛应用于水产养殖、食品加工、环保行业、医药保健和生物能源等领域(Mujtaba and Lee, 2017; 王小冬等,2022),因此,其规模化培养需求也不断扩大。但目前藻类培养存在细胞密度小、培养效率较低及培养基不适应大规模培养等问题。因此,探究一种能高效、大规模培养小球藻和栅藻的培养基,并规模化混合培养2种绿藻,对提高混合藻类生长速度及在水产养殖领域推广应用淡水有益藻类混合培养技术具有重要意义。【前人研究进展】已有研究发现,适合淡水小球藻生长的最佳碳源为葡萄糖(葛珍珍等,2012),其最适浓度为50.00 g/L(李金穗等,2012),但在海洋小球藻的培养基中添加葡萄糖却降低油脂产率,而以 NaNO_3 为氮源时生物量产率和油脂产率均最大(高影影,2013)。在 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 和 NH_4Cl 最适浓度分别为1500.00和300.00 mg/L的培养基中,斜生栅藻(*S. obliquus*)的生长率与培养基初始氮浓度和氮磷比(N/P)密切相关,当氮浓度为247.00 mg/L、N/P=25:1时生长最好(宋志伟等,2015; 罗晓霞等,2018; 谢静等,2021)。Priyanka等(2020)以 NaNO_3 为氮源, NaH_2PO_4 为磷源优化特氏杜氏藻(*Dunaliella tertiolecta*)培养基,可有效提高特氏杜氏藻中的玉米黄质含量。螺旋藻(*Spirulina*) 在纯碱生产废料17.00 g、 NaNO_3 2.00 g、KCl 1.00 g、 KH_2PO_4 1.60 g条件下培养,其藻蓝蛋白含量最高(谢丽丹和王素英,2017)。已有研究结果显示,氮

缺乏会抑制铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的分裂增殖和正常代谢过程,但这种抑制作用随着氮缺乏时间的延长而减弱(张达娟等,2019)。谢静等(2021)研究认为,N/P=5:1适宜铜绿微囊藻生长,当氮浓度相同时,N/P对其最大生物量具有显著影响。可见,不同藻类的生长与营养盐种类和浓度密切相关,但培养基成分种类繁多,各研究结果中影响藻类生长的关键营养盐存在一定差异,因此,优化藻类的培养基组成尤为重要。常用的藻类培养基优化方法有单因素试验、正交设计、均匀设计、二次回归正交旋转组合、遗传算法和响应面优化设计法等,其中,单因素法仅考虑一种因素的影响,缺乏因素间的交互作用,正交试验法虽能同时考虑多种因素,但不能得出因素和响应值间明确的函数表达式(回归方程),进而无法求得整个区域中因素的最佳组合和最优值(杨琪等,2012; 韩谦等,2018)。响应面分析法是根据多元二次回归方程对各影响因素和响应值间的函数关系进行拟合,从而对选取条件和所得结果进行全面分析寻求最优工艺参数的方法,已在多个领域广泛应用(杨晶晶和端允,2018)。【本研究切入点】目前,应用响应面法优化混合藻类培养基的研究鲜见报道。【拟解决的关键问题】选择由普通小球藻(*C. vulgaris*)和斜生栅藻组成的混合藻类,通过响应面分析法确定其同时存活的营养盐最佳浓度,了解培养基中影响绿藻生长的关键因素,为提高混合藻类生长速度和生物量及推广应用淡水有益藻类混合培养技术提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2022年6—8月在天津市水产生态及养殖重点实验室进行。普通小球藻和斜生栅藻藻种购自上海光语生物科技有限公司,使用BG11培养基于光照培养箱(日本三洋有限公司MLR352-PC)中培养,随后人工混合,形成混合藻,经多次筛选与长期培养,稳定二者密度比为1:1,培养温度为 25 ± 1 °C,

光照强度为90.00 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为12 h:12 h,每天摇瓶3次,防止沉淀。

1.2 试验方法

1.2.1 营养盐单因素试验 以BG11培养基为基础培养基,进行7种营养盐单因素(分别将 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 、 MgSO_4 、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 、 NaNO_3 和 CaCl_2 设为因素A、B、C、D、E、F和G)试验,每种营养盐均设1个对照(CK,培养基中不添加营养盐)和5个浓度处理组(表1),每组设3个平行。取对数生长期的混合绿藻离心(5000 r/min, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$),去上清液,取藻泥添加至相应的培养基中,藻细胞初始密度均为 1×10^6 个/mL(密度比为1:1),培养6 d时使用血球计数板计数每组的藻细胞,获得7种营养盐的最适浓度范围。

1.2.2 响应面优化培养基试验 Plackett-Burman (P-B)试验:根据单因素试验结果,利用Minitab 19.0设计进行12次P-B试验,每个因素设2个水平,其中高水平为低水平的2倍,每组设3个平行,测定培养6 d时的藻细胞密度,以此为响应值,筛选对混合绿藻生长最显著的营养盐因子。

Box-Behnken(B-B)试验:以P-B试验为基础,选取影响显著的营养盐因子,每个因子取3个水平,以(+1, 0, -1)编码,进行B-B试验(王立原, 2018),测取培养6 d时的藻细胞密度为响应值,采用响应面软件Design-Expert 8.0的响应面分析法优化试验,每组设3个平行,共设17个试验点(中心点重复5次,用于估计试验误差),以获得显著因素的0最佳浓度水平。通过Design-Expert 8.0对数据进一步拟合分析,得到关键营养盐的最适浓度。

1.2.3 验证试验 分别以优化后的培养基(优化组)和原BG11培养基(对照组)培养混合绿藻,开展混合绿藻生长验证试验,每组设3个平行,共培养14 d,每隔1 d使用血球计数板与叶绿素荧光仪(Phyto-PAM)测定混合绿藻的藻细胞密度与最大光能转换效率(F_v/F_m)。

1.3 统计分析

表1 营养盐单因素试验浓度水平(mg/L)

Table 1 Single factor test nutrient salt concentration levels (mg/L)

营养盐 Nutrient salt	CK	浓度 Concentration				
		1	2	3	4	5
MgSO_4	0	25.00	50.00	75.00	100.00	125.00
NaNO_3	0	500.00	1000.00	1500.00	2000.00	2500.00
K_2HPO_4	0	30.00	40.00	50.00	60.00	70.00
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
$\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$	0	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
Na_2CO_3	0	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
CaCl_2	0	20.00	30.00	40.00	50.00	60.00

试验数据采用SPSS 26.0进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以Duncan's新复极差法进行组间多重比较,以独立样本t检验对验证试验中藻细胞密度进行统计分析,以Origin 2021绘制柱状和折线图;采用Design-Expert 8.0绘制等高线和响应曲面图,并对响应值藻细胞密度进行回归拟合和方差分析。

2 结果与分析

2.1 营养盐单因素试验结果

从图1-A可看出, NaNO_3 浓度为1500.00 mg/L时斜生栅藻的细胞密度均显著($P < 0.05$,下同)或极显著($P < 0.01$,下同)高于其他浓度处理,1500.00 mg/L NaNO_3 处理普通小球藻的细胞密度均高于其他浓度处理,其中仅与1000.00 mg/L处理无显著差异($P > 0.05$,下同),普通小球藻和斜生栅藻的细胞密度比趋于1.00:1.00,而CK中斜生栅藻的生长受到显著抑制,说明适合混合藻生长的最佳 NaNO_3 浓度为1500.00 mg/L;从图1-B和图1-C可看出, K_2HPO_4 和 Na_2CO_3 浓度分别为50.00和20.00 mg/L时,2种混合绿藻的总细胞密度最高,此后随着 K_2HPO_4 浓度的升高,普通小球藻的细胞密度比降低,斜生栅藻的细胞密度比升高,而随着 Na_2CO_3 浓度的升高,2种混合藻细胞的密度比从普通小球藻较高转变为二者趋于1.00:1.00,说明适当的磷源和碳源可较好地促进斜生栅藻生长;从图1-D可看出, MgSO_4 浓度为75.00 mg/L时,2种混合绿藻的总细胞密度最高,此后随着 MgSO_4 浓度升高普通小球藻的细胞密度比升高,斜生栅藻细胞密度比降低,说明适宜的 MgSO_4 浓度可较好地促进普通小球藻生长;从图1-E和图1-F可看出, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 和 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ 浓度为6.00 mg/L时,2种混合绿藻的总细胞密度最高,其他各浓度处理组普通小球藻与斜生栅藻的细胞密度比基本接近1.00:1.00,说明 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 和 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ 对混合绿藻比例变化影响较小;从图1-G可看出,当 CaCl_2 浓度为40.00 mg/L,2种混合绿藻的总细胞密度最高,斜生栅藻的细胞密度与其他浓度处理无显著差异,普通小球藻的细胞密度仅与CK存在显著差异,说明 CaCl_2 对混合绿藻细胞生长的影响较小。

2.2 响应面法优化混合绿藻培养基试验结果

2.2.1 P-B试验结果分析 P-B试验结果见表2,各因素的方差分析结果及影响排名见表3。由表3可知,影响混合绿藻细胞密度的因素排序为 Na_2CO_3 (因素C) $>$ K_2HPO_4 (因素B) $>$ NaNO_3 (因素F) $>$ MgSO_4 (因素D) $>$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (因素E) $>$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ (因素A) $>$ CaCl_2 (因素G),所有因素均呈正效应。从图2可看出,

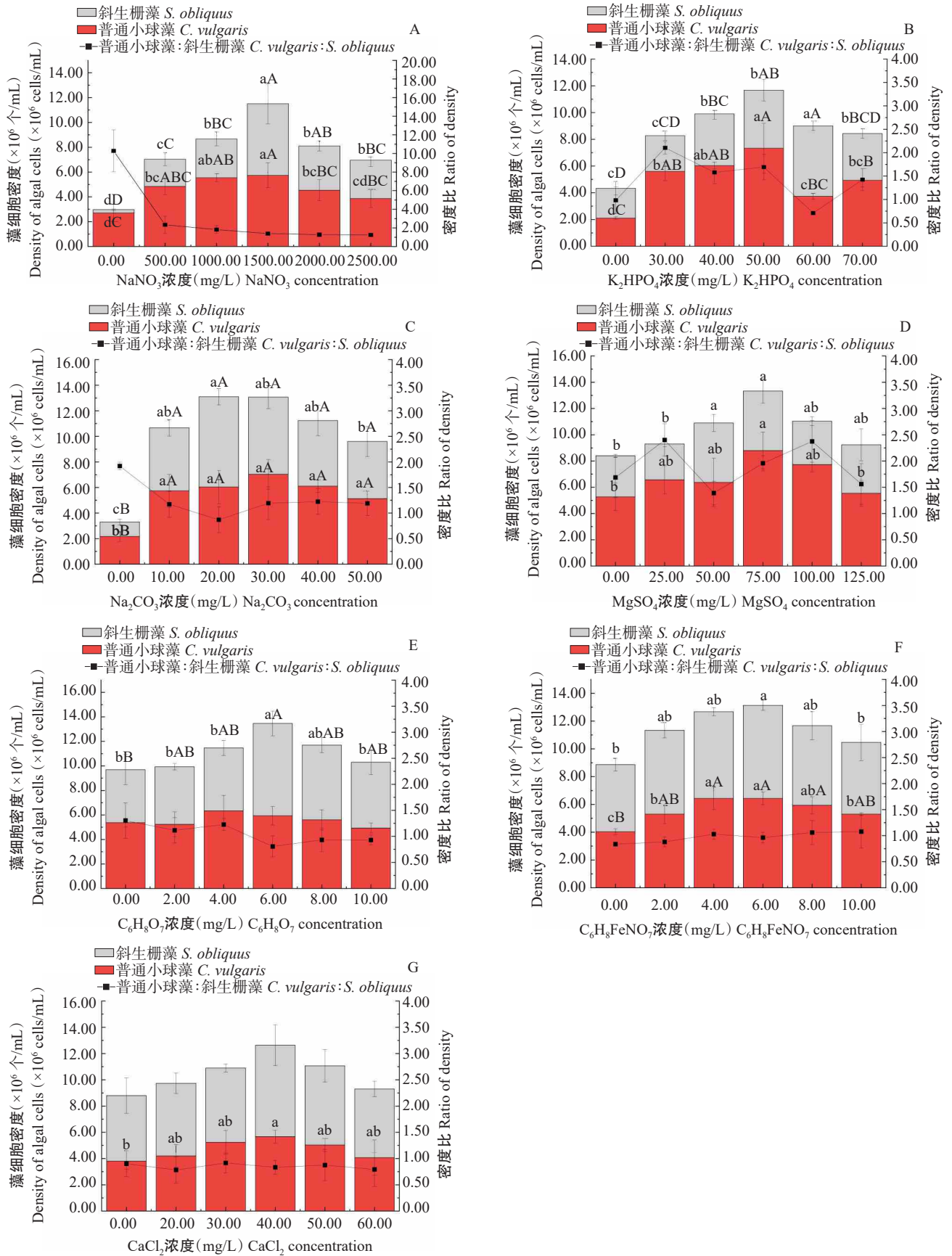


图 1 不同营养盐浓度对混合绿藻生长的影响

Fig.1 Effects of different nutrient salt concentrations on the growth of mixed green algae
在同一小图中,不同藻类图柱上不同大、小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)

In the same subplot, different uppercase letters in the same column represented extremely significant difference ($P<0.01$), and lowercase letters represented significant difference ($P<0.05$)

Na₂CO₃(因素C)、K₂HPO₄(因素B)和NaNO₃(因素F)为影响显著的因素。

2.2.2 B-B试验结果分析 对影响显著或极显著的因素(NaNO₃、K₂HPO₄和Na₂CO₃)进行3因素3水平B-B试验,各因素和水平设计见表4,中心组合因素编码表及对应的响应值见表5。以混合绿藻的细胞密度为响应值Y,将表4的数据进行拟合,获得显著因素与Y间的回归方程 $Y=143.20-1.37A+5.94B+7.19C+9.75AB+3.50AC+0.63BC-8.16A^2-10.29B^2-17.04C^2$,其中A、B和C分别代表NaNO₃、K₂HPO₄和

Na₂CO₃。

对二次拟合模型进行方差分析,结果(表6)发现,整体模型的F为7.72,P=0.0067,说明该模型极显著;B、C、AB、A²、B²和C²值均小于0.05,对细胞密度的影响显著,而交互项AC和BC值均大于0.05,对细胞密度无显著影响,说明Na₂CO₃和K₂HPO₄浓度对混合绿藻细胞密度的线性效应显著,且3种营养盐对混合绿藻细胞密度的曲面效应均显著,但三者间的交互作用不明显;模型的失拟值为3.05,P>F=0.1547>0.05,失拟值不显著。可见,模型可用。

拟合曲线方差分析结果显示,决定系数R²=0.9084,校正系数R²_{Adj}=0.7907,该模型中Adeq测量精度为7.546,参考许莹芳(2020)的研究结果,当Adeq测量精度大于4.000时可用,说明该模型可用于预测设计并预测营养盐浓度对混合绿藻生长的影响;Residual项未出现P>F情况,说明二次回归方程与实际拟合性好。

图3是Na₂CO₃为30.00 mg/L时NaNO₃与K₂HPO₄交互作用对混合绿藻细胞密度影响的等高线和响应面,其中,等高线呈椭圆形且密集,说明这两个因素的交互作用较强,且随着NaNO₃和K₂HPO₄浓度的增加,混合绿藻细胞密度呈先上升后下降变化趋势,其

表 2 P-B试验结果

Table 2 Plackett-Burman result

编号 Number	因素 Factor							细胞密度(×10 ⁵ 个/mL) Cell density (×10 ⁵ cells/mL)
	D	F	B	E	A	C	G	
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	107.00
2	-1	-1	1	-1	1	1	-1	118.00
3	1	-1	-1	1	1	1	1	94.60
4	-1	1	-1	1	-1	-1	1	102.00
5	-1	1	-1	-1	1	1	1	101.60
6	-1	1	1	1	1	-1	-1	126.30
7	1	1	1	1	-1	1	-1	136.75
8	-1	-1	1	1	-1	1	1	119.30
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	123.75
10	1	1	1	-1	1	-1	1	134.50
11	1	-1	-1	1	1	-1	-1	104.00
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	82.75

表 3 P-B试验结果的分析结果

Table 3 Plackett-Burman test result and analysis

因素 Factor	水平(mg/L) Level		t	P	排序 Rank
	低水平	高水平			
	Low level(-1)	High level(+1)			
C	15.00	30.00	10.23	0.001	1
B	30.00	60.00	4.03	0.016	2
F	1000.00	2000.00	3.11	0.036	3
D	60.00	120.00	0.94	0.400	4
E	4.00	8.00	0.46	0.671	5
A	4.00	8.00	0.24	0.820	6
G	30.00	60.00	0.06	0.956	7

表 4 B-B试验因素水平表(mg/L)

Table 4 Levels of Box-Behnken experimental factors(mg/L)

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	+1
F: NaNO ₃	1000.00	1500.00	2000.00
B: K ₂ HPO ₄	30.00	45.00	60.00
C: Na ₂ CO ₃	20.00	30.00	40.00

表 5 B-B中心组合因素水平编码表及试验结果

Table 5 Box-Behnken center combination factor level coding table and results

编号 Number	因素 Factor			细胞密度(×10 ⁵ 个/mL) Cell density(×10 ⁵ cell/mL)
	F	B	C	
1	0	-1	1	110.50
2	1	0	-1	101.00
3	0	0	0	147.00
4	1	-1	0	108.00
5	0	0	0	135.00
6	-1	0	1	128.00
7	0	0	0	142.00
8	-1	0	-1	110.00
9	0	1	1	125.00
10	0	1	-1	120.00
11	1	1	0	138.00
12	0	0	0	147.00
13	0	-1	-1	108.00
14	-1	1	0	122.00
15	-1	-1	0	131.00
16	1	0	1	133.00
17	0	0	0	145.00

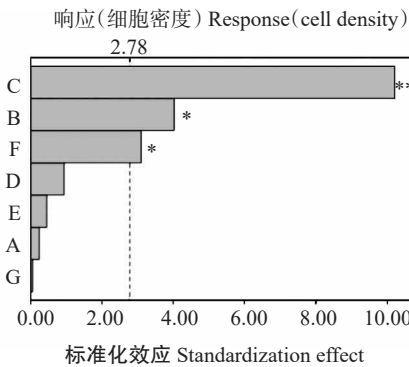


图 2 标准化效应的Pareto图

Fig.2 Pareto diagram of the standardization effect

图柱上*表示影响显著(P<0.05),**表示影响极显著(P<0.01)

* on the bar represented significant effect (P<0.05), ** represented extremely significant effect(P<0.01)

表 6 回归模型的方差分析结果

Table 6 Analysis of variance of regression model

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean squares	F	P	显著性 Significance
模型 Model	3288.51	9	365.39	7.72	0.0067	**
F-NaNO ₃	15.12	1	15.12	0.32	0.5896	
B-K ₂ HPO ₄	282.03	1	282.03	5.96	0.0447	*
C-Na ₂ CO ₃	413.28	1	413.28	8.73	0.0213	*
AB	380.25	1	380.25	8.03	0.0253	*
AC	49.00	1	49.00	1.03	0.3429	
BC	1.56	1	1.56	0.033	0.8610	
A ²	280.53	1	280.53	5.92	0.0452	*
B ²	445.61	1	445.61	9.41	0.0181	*
C ²	1222.22	1	1222.22	25.81	0.0014	**
残差 Residual	331.49	7	47.36			
失拟项 Lack of fit	230.69	3	76.90	3.05	0.1547	
纯误差 Pure error	100.80	4	25.20			
总和 Cor total	3620.00	16				

*和**分别表示影响显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)

* represented significant influence($P<0.05$) and ** represented extremely significant influence($P<0.01$)

中,混合绿藻细胞密度受K₂HPO₄浓度变化影响的变幅大于NaNO₃浓度变化的影响,进一步说明在NaNO₃与K₂HPO₄的交互作用中K₂HPO₄的影响大于NaNO₃,适宜浓度的NaNO₃和K₂HPO₄可提高混合绿藻细胞密度。从图4和图5可看出,NaNO₃和K₂HPO₄浓度分别为1500.00和45.00 mg/L时,NaNO₃-Na₂CO₃和K₂HPO₄-Na₂CO₃的等高线图均呈椭圆形,说明NaNO₃与Na₂CO₃、K₂HPO₄与Na₂CO₃存在交互作用,结合表6的方差分析结果可知,NaNO₃-K₂HPO₄、K₂HPO₄-Na₂CO₃两两因素间影响不显著,说明其交互作用较弱;随着NaNO₃、K₂HPO₄和Na₂CO₃浓度的增加,混合绿藻细胞密度在靠近水平0时达最大。通过响应面软件Design-Expert 8.0对数据进一步拟合分析,得到优化后的培养基配方为NaNO₃ 1600.00 mg/L、K₂HPO₄ 50.85 mg/L和Na₂CO₃ 32.39 mg/L,其余营养盐为BG11培养基原配方。

2.3 混合绿藻生长验证试验结果

将混合绿藻分别接种于优化组和对照组进行培养,其生长曲线见图6。从图6可看出,在培养12 d时,优化组培养的混合绿藻细胞密度达最大值,为 36.75×10^6 个/mL,较对照组培养的混合绿藻细胞密度显著提高24.28%,且优化组培养普通小球藻与斜生栅藻的密度比基本为1.00:1.00,而对照组中普通小球藻与斜生栅藻的密度比为(0.70~1.00):1.00,波动较大。从图7可看出,随着培养时间的延长,优化组培养混合绿藻细胞的 F_v/F_m 逐渐上升,变化范围为0.61~0.68,而对照组混合绿藻在培养8 d后其 F_v/F_m 开始缓慢下降,培养14 d时降至0.55,均极显著低于优化组培养的混合绿藻,说明优化培养基中混合绿藻

细胞的光化学活性优于对照组。

3 讨论

采用响应面法对影响试验的因素进行优化,具有可克服正交试验不能给出直观图像缺陷、弥补传统方法中非线性关系深度不足且能考虑误差产生的影响、对局部最具特征的点和整体的面进行精准预测及回归拟合整体范围内各因素间相互关系等特点(如扎·哈布都拉等,2020;陈丽等,2021),还具有试验次数少、周期短和成本低等优点,已广泛应用于化工、医药和农业等领域(许天阳等,2019)。营养盐作为影响微藻生长的主要因素,其浓度和配比对藻类的代谢活动和生长速率具有显著影响(曲孟等,2014),其中,氮可促进藻细胞大量繁殖、生长、成熟和分裂,磷是细胞膜的重要组成成分,在细胞中发挥传递能量作用,且可通过调节酸碱度对培养基起缓冲作用。杨琪等(2012)采用响应面法可将混合培养普通小球藻培养基的氮源浓度优化为1.64 g/L。本研究中,NaNO₃、K₂HPO₄和Na₂CO₃浓度变化对普通小球藻和斜生栅藻2种混合绿藻生长具有显著影响,与上述研究结果相似。罗晓霞等(2018)研究表明,栅藻生长率随着初始氮浓度的增加而提高,在氮浓度为247.00 mg/L时达最高。本研究中,普通小球藻和斜生栅藻2种混合绿藻对氮浓度的需求较高,优化后培养基中的NaNO₃浓度达1600.00 mg/L,推测混合培养的绿藻对氮源的利用率可能优于单种藻类培养,而在混合培养过程中斜生栅藻的占比随着氮浓度的升高而增大,说明氮源对斜生栅藻生长的影响比普通小球藻更剧烈。

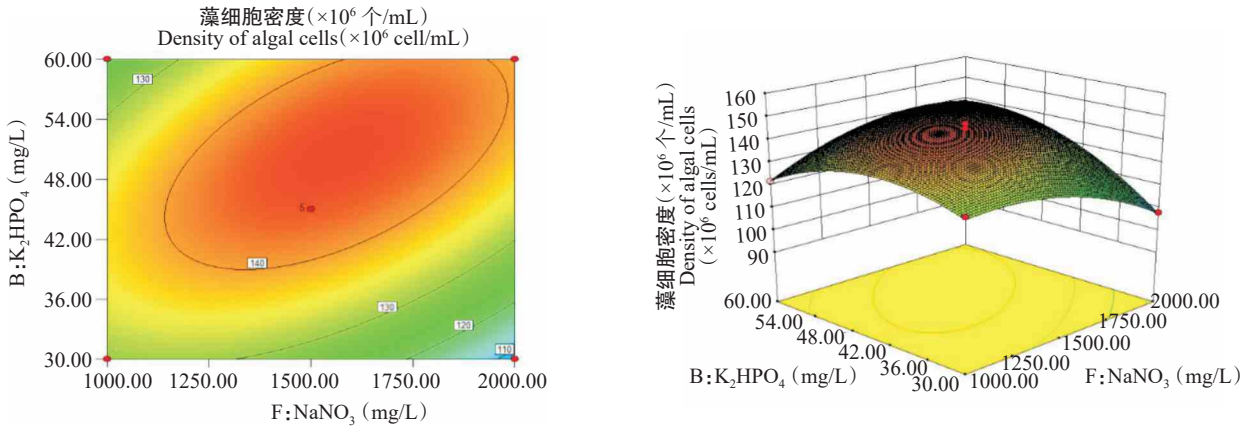


图 3 NaNO₃和K₂HPO₄交互作用对混合绿藻细胞密度影响的等高线和响应面图

Fig.3 Contour and response surface plot of the effect of NaNO₃ and K₂HPO₄ interaction on the cell density of mixed green algae

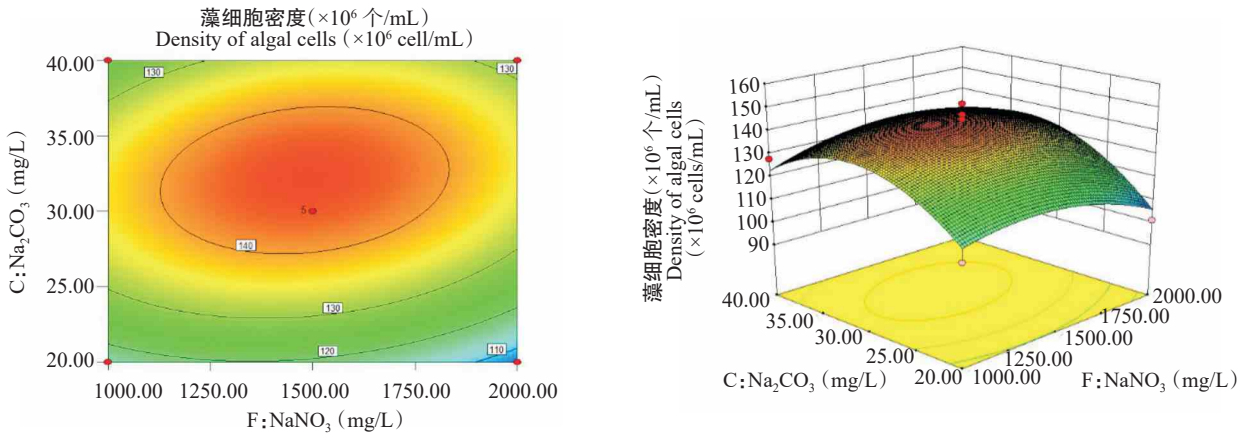


图 4 NaNO₃和Na₂CO₃交互作用对混合绿藻细胞密度影响的等高线和响应面图

Fig.4 Contour and response surface plot of the effect of NaNO₃ and Na₂CO₃ interaction on the cell density of mixed green algae

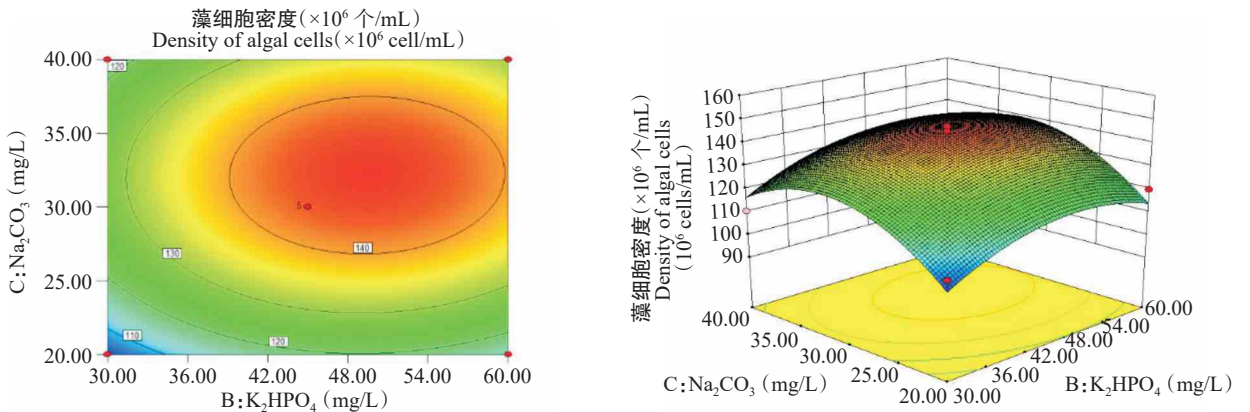


图 5 K₂HPO₄和Na₂CO₃交互作用对混合绿藻细胞密度影响的等高线和响应面图

Fig.5 Contour and response surface plot of the effect of K₂HPO₄ and Na₂CO₃ interaction on the cell density of mixed green algae

本研究中,普通小球藻和斜生栅藻2种混合绿藻培养基中的K₂HPO₄最佳浓度为50.85 mg/L,与葛珍珍等(2012)利用P-B分析法和RSM法对小球藻培养基进行优化确定的培养基中K₂HPO₄最佳浓度(58.00 mg/L)相近,但远高于陈晓江等(2021)单独培养斜生栅藻时磷的最适浓度(0.15 mg/L),原因可能是混合绿藻间存在种间竞争,其分泌物间接或直

接影响藻类生长,导致其对营养盐的需求不同;随着碳源浓度的升高,2种混合藻的密度比从普通小球藻较高转变为二者趋于1.00:1.00,说明碳源可较好地促进斜生栅藻生长。谢静等(2021)研究也证实,氮和磷元素对藻类的生长和竞争具有显著影响。响应面反映的是多个优化因素中任意1个取0水平时,其他优化因素间相互作用对研究对象的影响(李琦等,

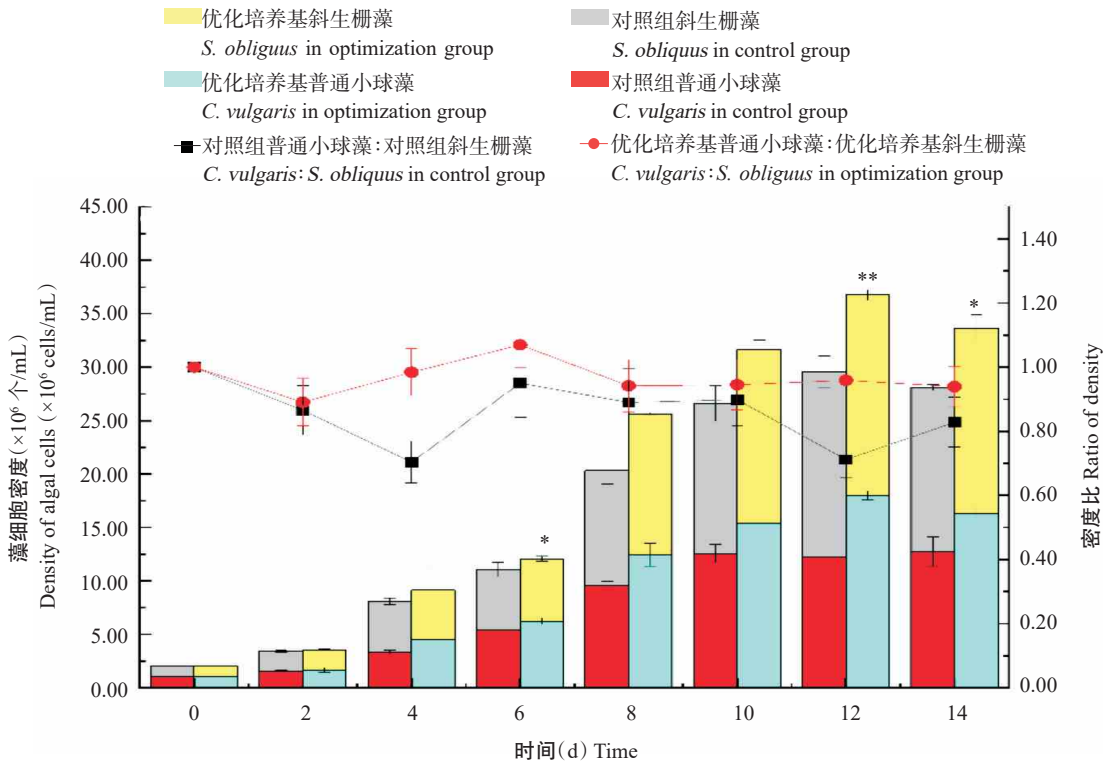


图 6 优化组与对照组培养混合绿藻的生长曲线

Fig.6 Growth curves of mixed green algae cultured in the optimization and control groups

*表示与对照组差异显著($P<0.05$),**表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。图7同

* represented significant difference($P<0.05$) and ** represented extremely significant difference($P<0.01$) compared with control groups. The same was applied in Fig.7

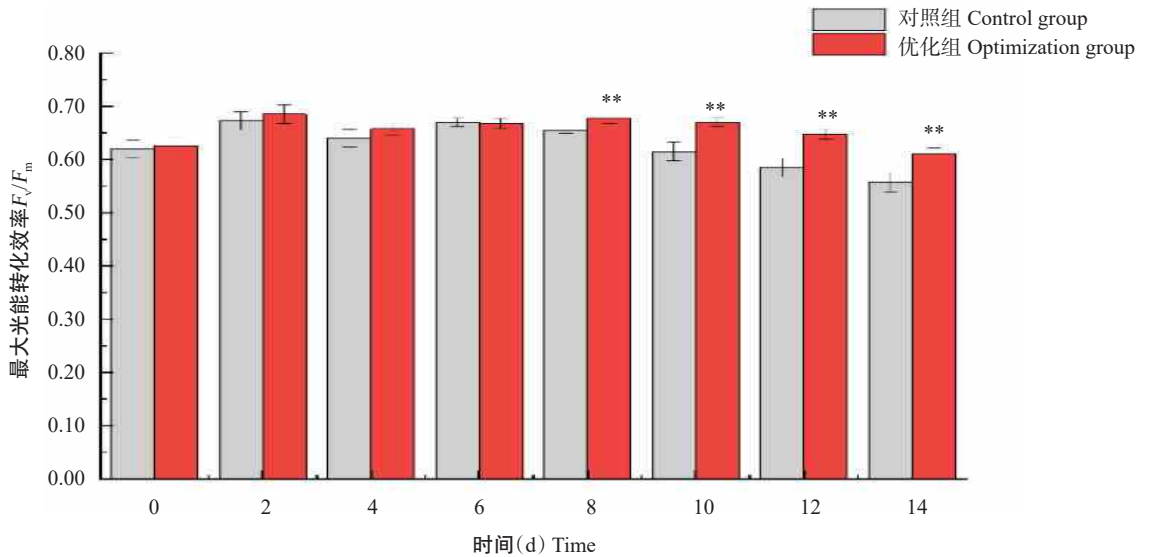


图 7 优化组与对照组培养混合绿藻的 F_v/F_m

Fig.7 F_v/F_m of mixed green algae cultured in the optimization and control groups

2022),因此,本研究采用响应面法分析优化得到显著影响因素的最佳浓度具有可靠性,可应用于实际操作,从而达到利用淡水低成本高密度培养有益藻的目的。

叶绿素荧光参数 F_v/F_m 通常用来检测植物在不同营养盐条件下的光合作用状态,反映光反应中心PS II的最大量子产量,其值下降表明植物受到了环

境胁迫(姚冬梅等,2021)。在普通小球藻和斜生栅藻2种混合绿藻生长验证试验中,本研究使用优化培养基培养12 d后,2种混合绿藻的细胞密度较对照组提高了24.28%, F_v/F_m 一直在较高范围内浮动,混合绿藻的光化学活性显著提高。可见,优化后的培养基可显著促进混合绿藻的光合作用速率。

4 结论

利用在BG11培养基基础上通过响应面法优化的普通小球藻和斜生栅藻混合的培养基, 能实现混合绿藻的高密度培养, 可供大规模推广淡水有益藻类混合培养技术时参考; 培养2种混合绿藻培养基中的 Na_2CO_3 、 K_2HPO_4 和 NaNO_3 最佳浓度分别为32.39、50.85和1600.00 mg/L。

参考文献:

- 陈丽, 饶杰, 赵永强, 杨贤庆, 魏涯, 李春生, 王悦齐. 2021. 坛紫菜膳食纤维的响应面优化超声复合酶法提取及其对鱼糜凝胶强度的影响[J]. 大连海洋大学学报, 36(5): 796-805. [Chen L, Rao J, Zhao Y Q, Yang X Q, Wei Y, Li C S, Wang Y Q. 2021. Optimization for ultrasonic assisted enzymatic extraction of soluble dietary fiber in laver *Porphyra haitanensis* and its effect on gel strength of surimi by response surface methodology[J]. Journal of Dalian Ocean University, 36(5): 796-805.] doi:10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-279.
- 陈晓江, 董英羽, 刘晓峰. 2021. 营养盐磷浓度对斜生栅藻生长的影响[J]. 湖北农业科学, 60(16): 28-32. [Chen X J, Dong F Y, Liu X F. 2021. Effects of phosphate concentration on the growth of *Scenedesmus obliquus*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 60(16): 28-32.] doi: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2021.16.006.
- 陈晓江, 聂国春, 郑润林, 赵康旭, 郑庆荣. 2022. 斜生栅藻对污水中氮、磷的去除效果研究[J]. 绿色科技, 24(10): 50-53. [Chen X J, Nie G C, Zheng R L, Zhao K X, Zheng Q R. 2022. Study on the removal effect of nitrogen and phosphorus from wastewater by *Scenedesmus obliquus* [J]. Journal of Green Science and Technology, 24(10): 50-53.] doi:10.16663/j.cnki.lskj.2022.10.055.
- 高影影. 2013. 富油海洋微藻的筛选及营养条件对其生长和油脂积累的影响[D]. 南京: 南京农业大学. [Gao Y Y. 2013. Screening of oil-rich marine microalgae and the effect of nutritional conditions on the growth and lipid accumulation of it[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University.]
- 葛珍珍, 王杰, 周灿灿, 余晓斌. 2012. 响应面法优化小球藻培养基[J]. 食品工业科技, 33(16): 195-198. [Ge Z Z, Wang J, Zhou C C, Yu X B. 2012. Optimization of medium for *Chlorella vulgaris* by response surface analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 33(16): 195-198.] doi: 10.13386/j.issn.1002-0306.2012.16.021.
- 韩谦, 刘锦上, 黄翔鸽, 董铭标, 李蒙杰. 2018. 响应面法优化波吉卵囊藻多糖提取条件[J]. 广东海洋大学学报, 38(2): 23-29. [Han Q, Liu J S, Huang X H, Dong M B, Li M J. 2018. Optimization of extraction conditions of polysaccharides from *Oocystis borgei* by response surface methodology[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 38(2): 23-29.] doi: 10.3969/j.issn.1673-9159.2018.02.004.
- 李金穗, 汪莘, 董黎明. 2012. 小球藻高密度培养及油脂提取条件的优化[J]. 微生物学通报, 39(4): 486-494. [Li J S, Wang P, Dong L M. 2012. *Chlorella* high density training and lipid extraction condition optimizing[J]. Microbiology China, 39(4): 486-494.] doi: 10.13344/j.microbiol.china.2012.04.016.
- 李琦, 张达娟, 张树林, 王泽斌, 贾滢喧, 黄兰英, 梁鹏飞, 陈璇, 龙成凤. 2022. 响应面法优化小新月菱形藻培养基[J]. 广东海洋大学学报, 42(3): 133-138. [Li Q, Zhang D J, Zhang S L, Wang Z B, Jia Y X, Huang L Y, Liang P F, Chen X, Long C F. 2022. Optimization of culture medium of *Nitzschia closterium* by response surface methodology[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 42(3): 133-138.] doi: 10.3969/j.issn.1673-9159.2022.03.018.
- 罗晓霞, 刘锦上, 李长玲. 2018. 不同氮营养盐浓度对斜生栅藻生长及化学组成的影响[J]. 广东农业科学, 45(1): 64-69. [Luo X X, Liu J S, Li C L. 2018. Effects of different nitrogen nutrient concentrations on growth and chemical composition of a freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 45(1): 64-69.] doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2018.01.011.
- 曲孟, 李秀辰, 白晓磊, 杨福利, 孙彩玲. 2014. 用响应面法优化小球藻絮凝沉降工艺的研究[J]. 大连海洋大学学报, 29(1): 61-65. [Qu M, Li X C, Bai X L, Yang F L, Sun C L. 2014. Flocculation of *Chlorella vulgaris* by calcium hydroxide via response surface analysis (RSA) [J]. Journal of Dalian Ocean University, 29(1): 61-65.] doi: 10.3969/J.ISSN.2095-1388.2014.01.013.
- 如扎·哈布都拉, 王萍, 王阳, 聂继红. 2020. Box-Behnken响应面法优化阿里红总多糖水提醇沉工艺[J]. 化学与生物工程, 37(3): 29-36. [Habudula R, Wang P, Wang Y, Nie J H. 2020. Optimization of water extraction and alcohol precipitation process of *Fomes officinalis* Ames total polysaccharide with Box-behnken response surface methodology[J]. Chemistry & Bioengineering, 37(3): 29-36.] doi: 10.3969/j.issn.1672-5425.2020.03.006.
- 宋婵媛, 白芳, 李天丽, 宋立荣. 2022. 绿藻栅藻对微囊藻的抑制效应及评价[J]. 水生生物学报, 46(12): 1916-1923. [Song C Y, Bai F, Li T L, Song L R. 2022. Inhibitory effect of *Scenedesmus* sp. on *Microcystis aeruginosa* and its evaluation[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 46(12): 1916-1923.] doi: 10.7541/2023.2022.0042.
- 宋志伟, 王秋旭, 李立欣, 高云鹏, 赵红利. 2015. 斜生栅藻培养基优化及菌藻共生体系处理污水[J]. 黑龙江科技大学学报, 25(3): 274-279. [Song Z W, Wang Q X, Li L X, Gao Y P, Zhao H L. 2015. Optimization of *Scenedesmus obliquus* culture medium and treatment of sewage by bacteria and algae symbiosis system[J]. Journal of Heilongjiang University of Science and Technology, 25(3): 274-279.] doi: 10.3969/j.issn.2095-7262.2015.03.010.
- 王立原. 2018. 响应面法在结构优化应用上的研究[D]. 上海: 上海海洋大学. [Wang L Y. 2018. The response surface method in structural optimization study on the application[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University.]
- 王小冬, 车轩, 陈晓龙, 刘兴国, 顾兆俊, 朱林. 2022. 一种高浓度绿藻的培养方法[J]. 科学养鱼, (3): 70-71. [Wang X D, Che X, Chen X L, Liu X G, Gu Z J, Zhu L. 2022. A culture method for high concentration of *Chlorella* [J]. Scientific Fish Farming, (3): 70-71.] doi: 10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2022.03.017.
- 谢静, 程燕, 查燕, 汤婕, 束浩然. 2021. 氮磷营养盐对铜绿微囊藻和斜生栅藻生长及竞争的影响[J]. 江西农业大学学报, 43(3): 694-702. [Xie J, Cheng Y, Zha Y, Tang J, Shu

- H R. 2021. Effects of nitrogen and phosphorus nutrients on the growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 43(3): 694-702. doi: 10.13836/j.jj-au.2021076.
- 谢丽丹, 王素英. 2017. 响应面法优化螺旋藻培养基[J]. *浙江农业学报*, 29(2): 307-314. [Xie L D, Wang S Y. 2017. Optimization of *Spirulina* media by response surface methodology[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 29(2): 307-314.] doi: 10.3969/j.issn.1004-1524.2017.02.18.
- 许天阳, 董坤园, 宋凤媛, 钱圳, 熊金璐, 于澎. 2019. Box-Behnken响应面法优化炒芍药炮制工艺[J]. *中国药房*, 30(20): 2845-2850. [Xu T Y, Dong K Y, Song F Y, Qian Z, Xiong J L, Yu P. 2019. Optimization of processing technology of fried *Radix paeoniae* by Box-Behnken response surface method[J]. *China Pharmacy*, 30(20): 2845-2850.] doi: 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.21.
- 许莹芳. 2020. 三种有益藻类培养条件优化及种间竞争的初步研究[D]. 天津: 天津农学院. [Xu Y F. 2020. Optimization of three useful algae culture conditions and initial study of interspecific competition mechanisms[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University.]
- 姚冬梅, 张树林, 张达娟, 张迎. 2021. 氨基酸对铜绿微囊藻生长及叶绿素荧光参数的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 36(3): 446-453. [Yao D M, Zhang S L, Zhang D J, Zhang Y. 2021. Effect of amino acids on growth and chlorophyll fluorescence parameters of blue green alga *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 36(3): 446-453.] doi: 10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-177.
- 杨晶晶, 端允. 2018. 响应面法优化斜生栅藻处理高氨氮废水的光照条件[J]. *科学技术与工程*, 18(19): 329-334. [Yang J J, Duan Y. 2018. Light condition optimization for removal of high ammonia nitrogen in wastewater based on *Scenedesmus obliquus* using response surface methodology[J]. *Science Technology and Engineering*, 18(19): 329-334.] doi: 10.3969/j.issn.1671-1815.2018.19.053.
- 杨琪, 王科荣, 孔维宝, 杨红, 曹海, 张馨允. 2012. 响应面法优化普通小球藻混合营养培养基组成生产生物质[J]. *中国生物工程杂志*, 32(9): 70-75. [Yang Q, Wang K R, Kong W B, Yang H, Cao H, Zhang X Y. 2012. Optimization of the mixotrophic culture medium composition for biomass production by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology[J]. *China Biotechnology*, 32(9): 70-75.] doi: 10.13523/j.cb.20120911.
- 张达娟, 张树林, 王泽斌, 李鹏英. 2019. 氮补充对氮饥饿铜绿微囊藻生长的影响[J]. *南方农业学报*, 50(11): 2592-2598. [Zhang D J, Zhang S L, Wang Z B, Li P Y. 2019. Effects of nitrogen recovery on the growth of nitrogen starved *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 50(11): 2592-2598.] doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2019.11.29.
- Bittencourt-Oliveira M D C, Chia M A, Oliveira H S B, Araújo M K C, Molica R J R, Dias C T S. 2015. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: Implications for *Microcystins* production [J]. *Journal of Applied Phycology*, 27(1): 275-284. doi: 10.1007/s10811-014-0326-2.
- Mujtaba G, Lee K. 2017. Treatment of real wastewater using coculture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge [J]. *Water Research*, 120: 174-184. doi: 10.1016/j.watres.2017.04.078.
- Priyanka S, Kirubakaran R, Leema J T M. 2020. Optimization of algal culture medium for zeaxanthin production by *Dunaliella tertiolecta*: An RSM based approach [J]. *Current Science*, 119(12): 1997-2005. doi: 10.18520/CS/V119/I12/1997-2005.
- Qiu Y T, Wang Z, Liu F, Liu J X, Tan K T, Ji R B. 2019. Inhibition of *Scenedesmus quadricauda* on *Microcystis flosaquae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14): 5907-5916. doi: 10.1007/s00253-019-09809-9.

(责任编辑 思利华)