

# 混养模式和营养条件优化对斜生四链藻生物量积累和脂质含量的影响

李淑媛, 赵 丹, 王灿梅, 袁 婷, 马湘蒙\*, 魏 群

(广西大学 资源环境与材料学院, 广西 南宁 530004)

**摘要:** 微藻被认为是具有发展潜力的生物柴油原料,在光合效率、生长速率和脂质积累速率等方面具有优势,能够减轻化石能源带来的环境污染问题。为了提高微藻的生物量、脂质含量和高价值产物含量,需要优化其培养模式和营养条件。探究了在自养、混养和异养条件下培育斜生四链藻的最佳培养模式,并使用响应面法优化培育时的营养条件,以提高微藻的生物量和脂质含量。研究表明,混合营养培育是最适合斜生四链藻生长发育的培育模式。进入稳定期后,在混养 24 h 的培养条件下,微藻的生物量和脂质含量分别是自养培养条件的 3.82 倍和 2.49 倍,而在混养 8 h : 16 h 组合中,对数生长期产生的蛋白质含量最高,达到了  $554.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过响应面法优化营养物质,在混养条件下,最佳参数设置为碳氮比为 10,微量元素投加量为 0.1 mL,维生素投加量为 1.0 mL。实际测量的生物量和预测值分别为  $2.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。优化混养模式和营养条件可以提高微藻的生物量和利用效率。

**关键词:** 斜生四链藻; 混养培育; 营养物质; 响应面优化; 生物量

中图分类号: X703

文献标识码: A

## Effects of mixed cultivation mode and nutrient condition optimization on biomass accumulation and lipid content of *Tetradesmus obliquus*

LI Shuyuan, ZHAO Dan, WANG Canmei, YUAN Ting, MA Xiangmeng\*, WEI Qun  
(School of Resources, Environment and Materials, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** Microalgae are considered to be the most promising feedstock for biodiesel production due to their advantages in high photosynthetic efficiency, growth rate, and lipid accumulation rate, which can alleviate the environmental pollution caused by fossil fuels. To increase the biomass, lipid content, and high-value product yield of microalgae, it is necessary to optimize their cultivation modes and nutritional conditions. This study investigated the optimal cultivation mode for the growth of *Tetradesmus obliquus* under three conditions: autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic. Additionally, response surface methodology was employed to optimize the nutrient conditions for cultivation, with the goal of improving the biomass and lipid content of microalgae. The results showed that mixotrophic cultivation was the most suitable mode for the growth and development of *Tetradesmus obliquus*. Under mixotrophic cultivation conditions for 24 hours, the biomass and lipid content of microalgae were 3.82 times and 2.49 times higher, respectively, compared to autotrophic cultivation conditions. Moreover, the highest protein production during the logarithmic growth phase was the highest in the 8-hour mixotrophic and 16-hour autotrophic combination, reaching  $554.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . By optimizing the nutritional substances using response surface methodology, the optimal parameters under mixotrophic conditions were as follows: Carbon-to-nitrogen ratio of 10, trace element addition of 0.1 mL, and vitamin addition of

收稿日期: 2024-03-16

修回日期: 2024-04-12

DOI: 10.20078/j.eep.20240504

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (52360008)

作者简介: 李淑媛 (1998—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制。E-mail: 1010164205@qq.com

通讯作者: 马湘蒙 (1987—), 男, 湖南长沙人, 讲师, 主要研究方向为藻类微生物在污水中的应用与资源化。E-mail: maxiangmeng@gxu.edu.cn

1.0 mL. The measured biomass and predicted values were  $2.45\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $2.43\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The optimization of mixotrophic cultivation mode and nutritional conditions could enhance microalgae biomass and utilization efficiency.

**Keywords:** *Tetradesmus obliquus*; Mixed cultivation; Nutrients; Response surface optimization; Bio-mass

# 0 引 言

微藻是一种光合自养微生物,能够利用光合作用吸收废水中的  $\text{CO}_2$  和营养物质,并将其转化为脂质、色素、脂肪酸、多糖和小分子代谢物等高价值产物,同时实现废水净化<sup>[1-2]</sup>。微藻作为高附加值产物和生物燃料的潜在来源备受关注<sup>[3]</sup>,其高价值产物的含量和生长特性很大程度上取决于培养条件<sup>[4]</sup>。

微藻的主要培育模式包括光合自养、异养和混养营养培育,区别在于能源和碳源的利用方式。在光合自养条件下,微藻利用  $\text{CO}_2$  作为能量和碳源进行同化<sup>[5]</sup>。异养培育为微藻利用有机碳源和无机盐进行生长,以获得更高生物量、脂质或其他有价值的代谢产物<sup>[6]</sup>。混合营养培育结合了上述 2 种营养模式的优势,同时利用  $\text{CO}_2$  和有机碳,通过呼吸和光合作途径提升生物量和生成代谢物<sup>[7]</sup>。

藻类利用碳源作为营养物质进行有机物的合成和代谢产物的积累。在自养培养条件下,藻细胞主要吸收大气中的  $\text{CO}_2$  作为碳源。在异养和混养条件下,藻类利用外加碳源进行生长和发育,从而显著提升生物量和油脂产量<sup>[8]</sup>。氮是藻类生长必需的元素之一,是蛋白质和叶绿素等物质的重要组成部分,对藻类生长、繁殖等生理活动起着重要作用<sup>[9]</sup>。碳氮比也是一个关键因素,影响增值组分的固碳效率、生物量的积累以及生产力<sup>[10]</sup>。

微藻细胞的新陈代谢和生长需要大量营养素。微量元素磷、硫、铁等被认为是微藻培养基中有助于微藻持续生长的关键成分,缺乏这些微量元素会抑制光合作用过程<sup>[11]</sup>。维生素是对生物体生命至关重要但不能由其自身合成的有机化合物<sup>[12]</sup>,支持脂肪酸合成及其链延长,并促进碳水化合物、氨基酸和其他有价值产物的代谢<sup>[13]</sup>。FAZELI 等研究发现,添加维生素后,微藻细胞中脂质含量比对照实验高 1.7 倍<sup>[13]</sup>。

要实现微藻的高效利用,研究其在不同模式下所需的营养元素尤为重要。然而,优化培育时

的营养物质对微藻生长及脂质产率的影响研究鲜有报道。本研究选用斜生四链藻为研究对象,优选出最适合生物量积累和高价值产物积累的培育模式。通过响应面法优化影响微藻生长的营养物质投加量,提升微藻生物量积累和脂质产量,从而实现微藻资源的高效利用和高价值产物的生成。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种

实验藻种选用斜生四链藻 (*Tetradesmus obliquus*, FACHB-14),购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库,采用 BG11 培养基进行扩大培养至斜生四链藻生长对数增长期。培养条件为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照强度为  $3\,000\text{ Lux}$ ,不间断  $24\text{ h}$  光照。

### 1.2 营养物质

实验所用培养基以 BG11 中微量元素为基础,组成成分见表 1。

表 1 微量元素溶液配方

Table 1 Composition of trace metal solution	
组分	浓度/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86

维生素溶液包含  $0.001\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素 B12 (Vitamin B12)、 $0.200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素 B1 (Thiamine HCl) 及  $0.001\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  生物素 (Biotin)<sup>[14-15]</sup>。

### 1.3 实验设计

1.3.1 不同培育模式对斜生四链藻生物量及附属产物积累的影响

共设置 4 个培育模式的实验组,包括自养组、混养 24 h 组、混养 8 h : 16 h 组和异养组。实验室温度保持为  $25^\circ\text{C}$ ,溶解氧由锥形瓶外曝气头提供,进气量用流量计控制在  $0.5\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。实验使用体积为  $1\text{ L}$  锥形瓶为培养容器,其中有效液体

体积为 800 mL,统一采用 BG11 培养基。混养组和异养组每日补充 5 g · L<sup>-1</sup> 葡萄糖作为碳源。实验设置转子和转台,转速为 150 r/min。光照条件下使用了 5 W 白光 LED 灯,光照强度维持在 3 000~4 000 Lux。自养组和混养 24 h 组持续 24 h 光照。混养 8 h : 16 h 组的光照和黑暗的时间比例为 8 : 16(在黑暗处理时需停止曝气),异养组则 24 h 处于黑暗条件下培育。实验培育至斜生四链藻生长稳定期。

### 1.3.2 优化关键营养物质的单因素实验

以 BG11 培养基的微量元素溶液为基础,进行了单因素实验的设计。考虑 3 个营养物质因子,分别为碳氮比(2.5、5.0、7.5、10.0、12.5)、微量元素投加量(0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0 mL)及维生素溶液投加量(1、3、5、7、9 mL)。在混养培育模式中,通过添加 0.5 g · L<sup>-1</sup> 葡萄糖作为碳源,以维持混养条件。

### 1.3.3 响应面实验

为了优化营养物质以促进斜生四链藻的生长,利用 Design Expert 13 中提供的 Box-Behnken 设计方法和响应面方法(RSM)用于实验设计<sup>[16]</sup>。选择碳氮比(A)、微量元素投加量(B)及维生素投加量(C)作为影响斜生四链藻生物量和脂质积累的重要因素,并以生物量含量作为响应值  $R_1$ ,脂质含量为响应值  $R_2$ 。在 Box-Behnken 实验中设计了 17 组实验,每个因素的水平值根据前期单因子实验的结果确定,实验因素水平编码见表 2。

表 2 实验因素水平编码表

Table 2 Experimental factor level coding table for optimization of microalgae protein culture process

影响因素	水平编码		
	-1	0	1
A(碳氮比)	5.0	7.5	10.0
B(微量元素投加量)/mL	0.1	0.5	1.0
C(维生素投加量)/mL	1	3	5

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 生物量的测定与计算

以 4 000 r/min 离心 10 mL 藻液 10 min 获得藻泥,并用去离子水洗涤藻泥 2 次,将藻泥转移至干净的称量皿中,在 65 ℃ 下干燥样品至恒定重量,在干燥器中冷却后通过重量法测量斜生四链藻生物量( $DW$ ),通过式(1)计算,生物量生产力( $P_{DW}$ )通过式(2)计算:

$$DW=\frac{W_2-W_1}{V} \tag{1}$$

$$P_{DW}=\frac{DW_2-DW_1}{T_2-T_1} \tag{2}$$

式中, $W_1$ 和  $W_2$ 分别为称量皿烘干前后的重量(g); $V$ 为样品体积(L); $P_{DW}$ 为生物量生产力(g · L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>); $DW_1$ 和  $DW_2$ 分别为第  $T_1$ 天和第  $T_2$ 天获得的生物量浓度(g · L<sup>-1</sup>)。

### 1.4.2 叶绿素的测定与计算

叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量采用分光光度法测定。取 5 mL 藻液于离心管中,于 4 000 r/min 离心 10 min,使用无菌注射器弃去上清液,保留底部藻泥。添加 5 mL 90%丙酮至沉淀物中,置于冰浴中超声破碎 5 min。随后,置于 4 ℃ 黑暗环境中静置 5 h,以充分提取色素。将样品在 4 000 r/min 下离心 20 min,保留上清液。利用紫外分光光计分别在 450、647 和 664 nm 处测量上清液吸光度。参考 Jensen 公式计算类胡萝卜素的浓度,叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素浓度分别利用式(3)、(4)和(5)计算:

$$C_{\text{Chl a}}=11.93\times\lambda_{664}-1.93\times\lambda_{647} \tag{3}$$

$$C_{\text{Chl a}}=20.36\times\lambda_{647}-5.50\times\lambda_{664} \tag{4}$$

$$C_{\text{Carotenoids}}=\lambda_{450}\times\frac{10\ 000}{2\ 500} \tag{5}$$

式中, $C_{\text{Chl a}}$ 为叶绿素 a 浓度(mg · L<sup>-1</sup>), $C_{\text{Chl b}}$ 为叶绿素 b 浓度(mg · L<sup>-1</sup>); $C_{\text{Carotenoids}}$ 为类胡萝卜素浓度(mg · L<sup>-1</sup>); $\lambda_{450}$ 、 $\lambda_{647}$ 和  $\lambda_{664}$ 分别为在波长 450、647 和 664 nm 处测得的吸光度。

### 1.4.3 蛋白质的测定

移取 5 mL 待测藻液于 10 mL 离心管中,超声破碎 5 min 后于 4 000 r/min 条件下离心 5 min 后,取离心后上清液 1 mL 于新的 10 mL 离心管中。以 1 mL 蒸馏水作为空白对照,分别加入考马斯亮蓝试剂(G250) 5 mL 混合均匀后静置 2 min,以空白样为参考液。利用紫外分光光度计在 595 nm 处测量吸光度。

### 1.4.4 碳水化合物的测定

取 5 mg 冻干藻粉进行生物质的碳水化合物分析,用 5 mL 2 mol · L<sup>-1</sup>的盐酸在 100 ℃ 下水解 3 h,冷却后向混合物中加入 0.53 g 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,用蒸馏水稀释至 100 mL。所得物以 4 000 r/min 离心 10 min 后采用苯酚-硫酸法测定碳水化合物,即取 1 mL 混合物于试管中,加入 1 mL 5%苯酚溶液,快速加入 5 mL 浓硫酸后静置 10 min。充分混

匀后将试管放置于 30 ℃ 水浴中反应 30 min。冷却至室温后于 490 nm 处测量吸光度。

#### 1.4.5 脂质的测定与计算

利用重量法测定细胞脂质含量<sup>[17-18]</sup>。取藻液于 50 mL 离心管中,用蒸馏水离心洗 3 遍后保留藻泥,收集藻泥置于超低温冰箱中结冰后,于冷冻干燥机中冷冻干燥。取 0.1 g 冻干斜生四链藻反复研磨至粉末状,加入 15 mL 氯仿/甲醇 (1:2 v/v) 与粉末混合均匀。利用超声波破碎机 (13% 650 W) 处理混合物 40 min。随后将溶液于 10 000 r/min 离心 10 min,收集萃取所得下层油状物质于新的 50 mL 离心管中。取出的全部液体约 15 mL,向该 15 mL 液体中加入 5 mL 氯仿和 1% NaCl 溶液 10 mL,充分混匀后,10 000 r/min 离心 5 min,取下层氯仿相于锡纸盒,置于鼓风干燥箱中 65 ℃ 烘干后冷却称重。脂质含量和脂质生产力计算公式分别为式(6)、式(7):

$$C_{lipid} = \frac{Q_2 - Q_1}{DW} \quad (6)$$

$$P_{lipid} = \frac{DQ_2 \times C_2 - DQ_1 \times C_1}{T_2 - T_1} \quad (7)$$

式中,  $C_{lipid}$  为脂质含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ );  $P_{lipid}$  为脂质生产力 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ );  $Q_1$  和  $Q_2$  分别为锡纸盒提取脂质前后的重量 (g);  $DQ_1$  和  $DQ_2$  分别为  $T_1$  和  $T_2$  天的生物量 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $C_1$  和  $C_2$  分别为  $T_1$  和  $T_2$  天的脂质含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

#### 1.4.6 统计分析

使用 Origin 2021 和 Excel 软件对实验数据进行处理、统计计算和差异显著性分析,统计分析采用单因素方差分析 (ANOVA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同培育模式对斜生四链藻生物量及附属产物积累的影响

#### 2.1.1 斜生四链藻生长动力学参数的影响

采用自养、混合营养和异养 3 种方式对斜生四链藻进行培养,并在相同实验条件下对其生长过程中的动态变化进行检测,结果如图 1 所示。持续向培养基添加有机碳源可提前使藻细胞进入对数生长期和稳定期。混养模式和异养模式的斜生四链藻在第 4 天进入对数期,而自养模式的斜生四链藻在整个培养过程中缓慢增长。据 YAMANANE 等<sup>[19]</sup>的研究,自养和混养时微藻可以通过光化学反应产生腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP),加速

葡萄糖的合成代谢,并促进其生长发育,但自养缺乏碳源,ATP 不能有效用于细胞合成代谢。异养和混养组中,后者表现出一定的优势,尤其是在稳定期,混养 24 h 组和混养 8 h:16 h 组增长速度平缓且生物量基本保持稳定。异养组在完全黑暗或极弱光线条件下培养,斜生四链藻依赖于有机碳生长,持续提供充足的葡萄糖作为有机碳源,促进斜生四链藻快速生长,在稳定期第 9 天时异养组的细胞密度达到  $15.0 \times 10^7$  个,略高于同时期混养 24 h 组 ( $14.9 \times 10^7$  个) 和混养 8 h:16 h 组 ( $14.7 \times 10^7$  个) 的细胞密度。由于异养组斜生四链藻持续进行呼吸作用而无法进行光合作用,使其比 2 个混养组更早进入衰亡期。

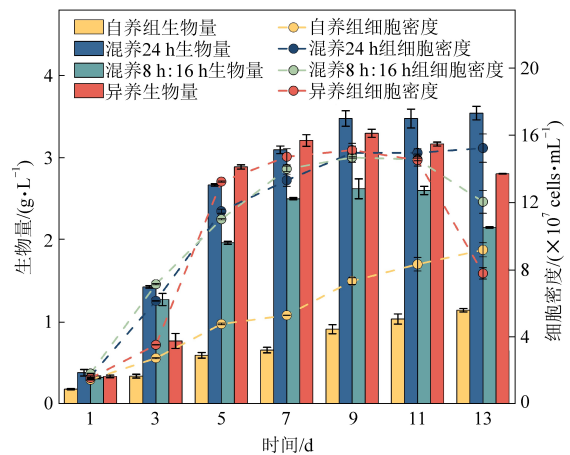


图 1 不同培育模式对斜生四链藻生物量和细胞密度的影响  
Fig. 1 Effects of different cultivation modes on biomass and cell density of *Tetrademus obliquus*

斜生四链藻培育至第 9 天时到达稳定期,此时各实验组的生物量排序为混养 24 h 组 ( $3.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 异养组 ( $3.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 混养 8 h:16 h 组 ( $2.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 自养组 ( $0.91 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。混养 24 h 组的生物量为自养组的 3.82 倍,且生物量生产力和比生长速率均高于其余组,分别达到了  $372.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $0.37 \text{ d}^{-1}$ ,为自养组的 4.26 倍和 1.68 倍。混养 24 h 条件下培养的斜生四链藻比异养组表现出更高的生产力,这是由于斜生四链藻能够同时快速利用无机碳和有机碳,并通过光照和氧化磷酸化满足能量需求,因此,代谢反应和其他生理特征均得到提升<sup>[20]</sup>。异养培养由于不受光的限制,培育至衰亡期时细胞密度降低速率较生物量大,这可能是因为异养组提前衰亡,已经死亡的斜生四链藻也被列入其中。

#### 2.1.2 对斜生四链藻光合色素积累的影响

叶绿素和类胡萝卜素是反映微藻生长状态的重



表 2 不同培育模式下斜生四链藻生物量生产力和比生长速率

Table 2 Biomass yield and specific growth rate of *Tetrademus obliquus* under different cultivation modes

培育模式	生物量生产力/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	比生长速率/ $\text{d}^{-1}$
自养	87.37	0.22
混养 24 h	372.47	0.37
混养 8 h : 16 h	275.03	0.34
异养	352.48	0.36

要物质。叶绿素 a (Chl a) 和叶绿素 b (Chl b) 是参与光合作用的主要色素,负责光能的吸收和传输。类胡萝卜素是一种与生物活性相关的脂质代谢产物,能够有效保护光合系统免受光氧化的损害<sup>[21]</sup>。

如图 2(a) 中,尽管自养组的生物量积累最低,但在光合作用不受影响的条件下,该组的叶绿素 a 含量 ( $19.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )、叶绿素 b 含量 ( $7.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 和类胡萝卜素含量 ( $7.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 均高于两个混养组和异养组。有研究表明,有机碳源

会抑制微藻生长时的光合速率<sup>[22]</sup>,这会影响到附着在类囊体上的捕光复合物的积累,减弱斜生四链藻生长繁殖时对光能的依赖性,从而增加了呼吸速率,减缓净光合释放速率,这是导致光合色素减少的重要因素之一<sup>[23]</sup>。由于混养 24 h 组的生物量和细胞密度较高,一定程度上遮蔽了光线,导致斜生四链藻合成的光合色素低于混养 8 h : 16 h 组。异养组由于额外添加了有机碳源葡萄糖,即使在黑暗条件下,斜生四链藻仍能利用碳源进行异养生长,但无法利用光能进行光合作用合成色素,因此其光合色素在 3 种培育模式中最低。叶绿素 a 含量和叶绿素 b 含量的比值反映了光系统 II (PS II) 的活性,同时也表现了光合色素对应激环境的保护作用<sup>[24]</sup>。本研究中,自养组的 Chl a/Chl b 同样高于其他组,为 2.45,说明斜生四链藻光合活性更优,更能利用光照进行光合作用。混养 24 h 和混养 8 h : 16 h 组的比值相似,分别为 1.73 和 1.82,说明其光合作用在一定程度上受到了抑制。

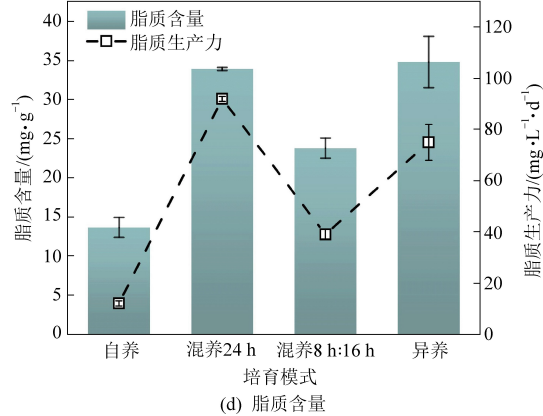
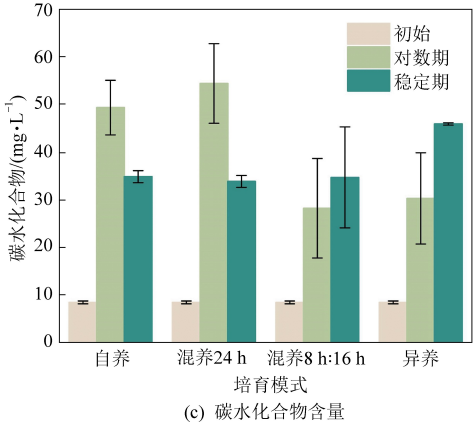
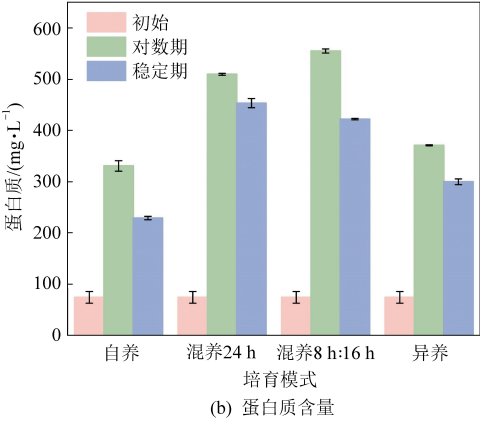
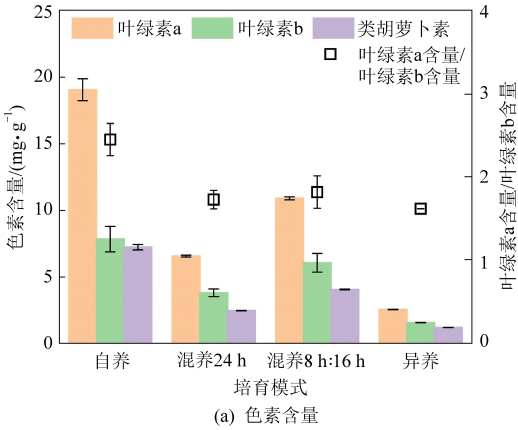


图 2 不同培育模式下斜生四链藻的色素、蛋白质、碳水化合物和脂质含量的积累

Fig. 2 Accumulation of pigment, protein, carbohydrate, and lipid content in *Tetrademus obliquus* under different cultivation modes

2.1.3 对斜生四链藻蛋白质积累的影响

如图 2(b) 所示,在不同培育模式下,斜生四链藻生长阶段从对数期到稳定期,各培育模式的蛋白质含量均表现出先增加后减少的趋势。混养 8 h : 16 h 组在对数期表现出最高的蛋白质含量,为  $554.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而自养组在相同时期的蛋白质含量最低,为  $330.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。值得注意的是,斜生四链藻蛋白质含量的升高与生物量的产量不呈线性关系,这可能与有机碳源添加后斜生四链藻体内脂质含量的大幅度提升有关<sup>[25]</sup>。在培养基中有充足的氮源时,添加外加碳源可以促进斜生四链藻的生长和代谢活动,因为更多的碳骨架可以用于合成蛋白质。然而,在稳定期后,各组蛋白质含量均下降。这是因为斜生四链藻通常需要足够的氮来合成蛋白质,但当碳源过剩时,可能会导致碳氮比例失衡,从而影响蛋白质合成。为了维持适当的碳氮比平衡,斜生四链藻可能会调整其蛋白质合成过程。

2.1.4 对斜生四链藻碳水化合物积累的影响

如图 2(c) 所示,在斜生四链藻处于对数期时,由于混养 24 h 组添加了外加碳源,营养物质相对充足,因此糖类的合成较脂类更显著,其对数期积累率先达到了  $54.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,是混养 8 h : 16 h 组的 1.93 倍。自养组含量略低于混养 24 h 组,达到了  $49.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。有相关研究表明<sup>[26]</sup>,到达稳定期后,自养组和混养 24 h 组的碳水化合物含量开始下降,可能是由于此时营养逐渐减少,导致糖类开始分解,为脂质积累提供碳骨架。然而,混养 8 h : 16 h 组和异养组的碳水化合物含量逐渐积累,其中异养组稳定期含量最高,为  $45.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这可能是因为异养组不进行光合作用,而是利用充足且持续的外加碳源进行营养物质的合成。这一结果与 HU 等<sup>[27]</sup>报道的细胞超

微结构的变化一致,他们认为这种修饰是光适应的特征,从而优化光捕获和光利用。

2.1.5 对斜生四链藻脂质积累的影响

图 2(d) 显示在不同培育模式下,斜生四链藻的脂质有效回收量。混养 24 h 组和异养组的斜生四链藻的脂质积累均优于自养组,分别达到了  $33.920 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $34.802 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,为自养组的 2.49 倍和 2.55 倍,这主要是由于斜生四链藻利用有机碳后能量供应增加,这一结论与 CAO 等<sup>[28]</sup>的研究结果相符,说明混养培育和异养培育可以显著促进藻细胞生长以及脂质和碳水化合物的积累。混养培养下,斜生四链藻的代谢反应和其他生理特征具有更高的生产力,这是由于斜生四链藻利用葡萄糖作为碳源时,增加了乙酰辅酶 A 和还原型辅酶 II (NADPH) 的供应,促进了脂质的积累<sup>[29]</sup>。值得注意的是,尽管混养 24 h 和异养组的脂质积累相差不大,但是混养 24 h 组的脂质生产率为  $92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,稍高于异养组的  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。这是因为斜生四链藻在利用光能和有机碳源进行光合作用时能够产生更多的 ATP 和 NADPH,利于脂质合成<sup>[6]</sup>。

2.2 影响生物量积累和脂质产率单因素优化

2.2.1 碳氮比

如图 3(a) 所示,从第 3 天开始,各组之间的生长状况出现了差异。当碳氮比为 7.5 时,斜生四链藻的生长速率最快,在第 7 天时细胞密度可达  $11.1 \times 10^7$  个。随后,随着碳氮比从 10 增加到 12.5,即碳源浓度增大,其细胞密度开始逐渐降低,这表明过高的碳氮比会对斜生四链藻的生长产生一定程度的抑制,这一结论与秦栋樛<sup>[30]</sup>的研究相一致。碳源和氮源对藻类生长、繁殖等生理活动起着重要的作用,并对其生物量积累和脂质产率产生一定影响。在不同碳氮比下,葡萄糖浓度也会有所不同,而葡

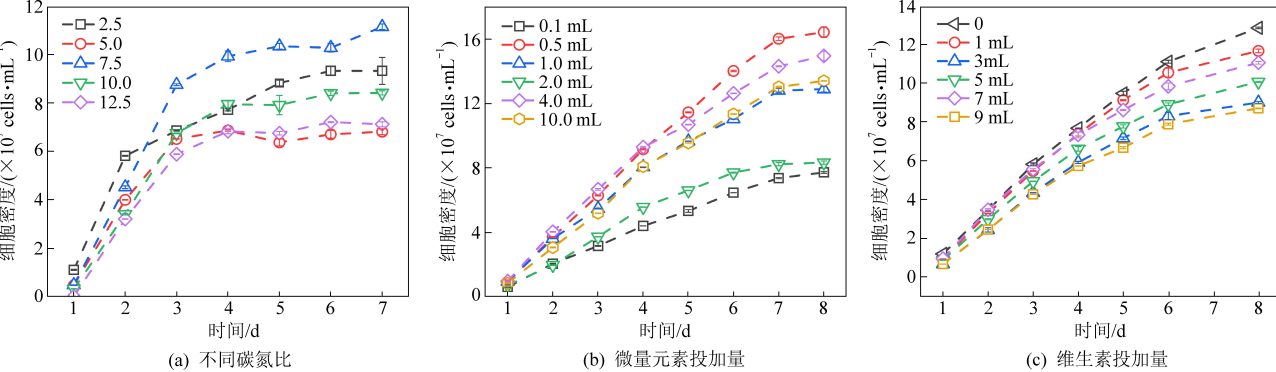


图 3 不同碳氮比、微量元素投加量、维生素投加量下斜生四链藻的生长情况

Fig. 3 Growth of *Tetrademus obliquus* at different C/N ratios, micronutrient addition, and vitamin addition

萄糖对微藻生长的影响因细胞对各浓度的葡萄糖吸收利用程度不同而产生差异<sup>[31]</sup>。

由图 4(a) 可知,随着碳氮比的增加,各组斜生四链藻的生物量随着碳浓度的增加而增加,总体呈现上升趋势,这是混养模式下斜生四链藻利用外加碳源葡萄糖进行自身物质合成的结果。当碳氮比 12.5 时,微藻生物量为  $2.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,生长速率为  $236.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,分别是碳氮比为 2.5 时的 2.24 倍和 2.67 倍。另外,结合脂质含量分

析,如图 4(d) 所示,随着碳源浓度增加,脂质含量也随之增加。然而,当碳氮比为 10.0 时,脂质为  $217.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,低于碳氮比为 7.5 时的  $222.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和碳氮比为 12.5 时的  $234.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这是由于碳氮比增加时,随着碳源的增加,在氮缺乏的条件下,藻细胞的生物碳流常被引导至脂质生物合成方向,从而促进油脂积累,因此,在缺氮情况下容易促进脂质的合成<sup>[32]</sup>。

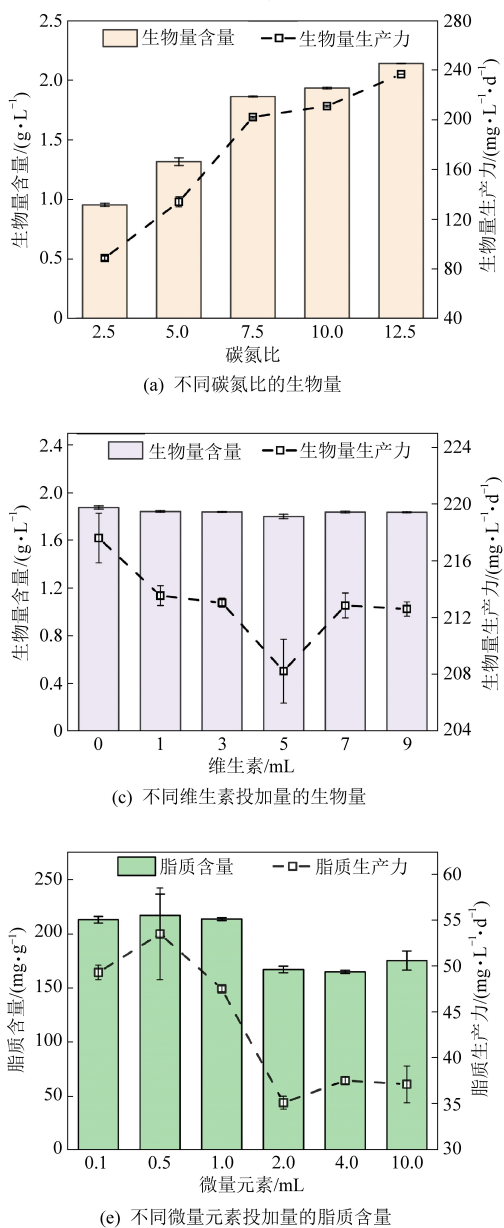


图 4 不同碳氮比、微量元素投加量和维生素投加量对斜生四链藻生物量和脂质的影响  
Fig. 4 Effects of different C/N ratios, micronutrient addition, and vitamin addition on the biomass and lipids of *Tetradesmus obliquus*

## 2.2.2 微量元素

如图 3(b) 所示,当微量元素投加量为 0.5 mL 时,随着培育时间增加,其细胞密度逐渐超过其他

组,在第 8 天时达到最高值  $16.44 \times 10^7$  个,远高于 0.1 mL 组的  $7.73 \times 10^7$  个。加入 4.0 mL 微量元素的斜生四链藻组,其细胞密度为  $14.97 \times 10^7$  个。随

着微量元素浓度的增加,对斜生四链藻的生长有不同程度的抑制作用。尽管斜生四链藻培养基中微量元素的提供至关重要,但相对高浓度时,大多数微量元素可能对斜生四链藻细胞有毒<sup>[33]</sup>。

如图 4(b) 所示,当微量元素为 0.5 mL 时斜生四链藻生物量和生物量生产力达到最高,分别为  $2.04\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $237.74\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。次之为 4.0 mL 组,分别为  $1.91\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $221.55\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。随着微量元素浓度的增加,斜生四链藻生物量积累有所降低,但在 4 mL 时有明显的增加,未超过 0.5 mL 时的含量。低浓度的微量元素能够使斜生四链藻积累更多的脂质含量,而高浓度微量元素一定程度上抑制了脂质积累。如图 4(e) 所示,脂质含量在 0.5 mL 微量元素时略高于 0.1 mL 组和 1.0 mL 组,达到  $216.0\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,而加入 4.0 mL 微量元素时脂质积累最低,为  $166.0\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。BG11 培养基中含有的微量元素能够为斜生四链藻细胞的新陈代谢和生长提供营养素,许多微量元素在调节代谢途径、酶以及信号分子的活性中起着关键作用<sup>[34]</sup>。

2.2.3 维生素

图 3(c) 生长曲线图显示,与对照组相比,添

加不同体积的维生素并未显著促进斜生四链藻的生长。在培育至第 7 天时,添加 9 mL 维生素组的细胞密度为  $8.87 \times 10^7$  个,而对照组的细胞密度达到  $12.86 \times 10^7$  个,是添加维生素 9 mL 组的 1.45 倍。随着维生素投加量的增加,斜生四链藻细胞密度下降,对其生长抑制程度增加,这表明斜生四链藻对维生素的需求不高。维生素的添加并未明显增加斜生四链藻的生物量,如图 4(c) 所示。当添加 5 mL 时,出现一定的生长抑制效果,与 VERMA 等<sup>[14]</sup>的实验结论类似。然而维生素的添加对脂质产率有一定的影响。如图 4(f) 所示,在添加 3 mL 的维生素溶液后,斜生四链藻的脂质含量和脂质生产力略有提升,分别为  $216.0\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $47.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,较对照组分别提升了 7.80% 和 3.96%。

2.3 提升微藻生物量积累和脂质产率的响应面实验

2.3.1 响应曲面实验方案设计

本研究根据文献和初步实验结果,以单因素实验结果为基础,选择碳氮比、微量元素和维生素为优化参数,分别以生物量和脂质含量作为响应值  $R_1$  和  $R_2$ ,建立响应面模型。根据表 1 中的实验条件进行实验后,响应曲面优化的实验方案及结果见表 4。

表 4 响应曲面优化实验方案及结果

Table 4 Response surface optimization experimental scheme and results

实验组	A:碳氮比	B:微量元素/mL	C:维生素/mL	$R_1$ :生物量/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$R_2$ :脂质/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	5.0	0.1	3	1.495 0	219.34
2	10.0	0.1	3	2.265 5	224.10
3	5.0	1.0	3	1.512 0	222.14
4	10.0	1.0	3	2.290 5	231.62
5	5.0	0.5	1	1.554 5	219.33
6	10.0	0.5	1	2.443 0	221.69
7	5.0	0.5	5	1.539 7	191.28
8	10.0	0.5	5	2.265 0	199.51
9	7.5	0.1	1	1.893 5	201.38
10	7.5	1.0	1	1.921 5	166.36
11	7.5	0.1	5	1.929 5	201.04
12	7.5	1.0	5	2.051 5	191.91
13	7.5	0.5	3	1.870 0	236.71
14	7.5	0.5	3	1.801 0	221.21
15	7.5	0.5	3	1.824 0	219.54
16	7.5	0.5	3	1.844 0	214.62
17	7.5	0.5	3	1.873 0	227.08

2.3.2 营养物质对生物量积累影响

根据方差分析方法得到的二次多项式回归拟

合模型为式(8)。响应面二次模型的方差分析(ANOVA)结果如下:



$$R_1 = 1.84 + 0.395 \text{ 3A} + 0.021 \text{ 5B} - 0.004 \text{ 9C} + \\ 0.001 \text{ 2AB} - 0.040 \text{ 8AC} + 0.031 \text{ 5BC} + \\ 0.024 \text{ 9A}^2 + 0.025 \text{ 9B}^2 + 0.083 \text{ 2C}^2 \quad (8)$$

式中,  $R_1$  是生物量作为响应值 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ); A 为碳氮比; B 为微量元素投加量 (mL); C 为维生素投加量 (mL)。

对所选生物量积累预测模型进行方差分析 (ANOVA)。结果表明, 拟合的模型  $P$  值小于 0.000 1, 表明回归模型在统计学上具有高度显著性和良好的合理性。 $R^2 = 0.984 \text{ 3}$  说明该模型拟合程度较好。失拟项的  $F$  值为 6.06,  $P$  值为 0.057 1 ( $P > 0.05$ ), 表明模型的缺失拟合不具有显著性, 残差是由随机误差引起的, 模型的拟合度较好, 能够反映斜生四链藻生物量积累与所考察因素之间的关系。变异系数 (CV) 代表模型的再现性, 表示为标准误差与观察到的响应平均值之间的百分比, 本模型中变异系数为 2.86%, 低于 10.00% 是合理的。精密度指示了预测响应的范围及其相关误差, 该模型精密度的 21.972 4, 该值大于 4, 表明该模型具有良好的信号强度。在优化斜生四链藻生物量的响应曲面实验中, 碳氮比的一次项因素显著性非常高, 而维生素浓度的二次项也具有显著性, 从而确定了提升斜生四链藻生物量的影响因素的主次关系为碳氮比 >> 微量元素 > 维生素。

为了检验模型预测的准确性, 进行 3 次重复实验, 采用确定的最优参数并根据实际情况进行了相应调整。具体选择的参数为碳氮比为 10, 微量元素投加量为 0.1 mL, 维生素投加量为 1 mL。取 3 次平行试验的平均值, 得到生物量积累量为  $2.451 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与模型预测值的  $2.426 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  较为接近, 证明了响应面法在优化参数方面的有效性。

### 2.3.3 营养物质对脂质积累影响

据方差分析方法, 得到的二次多项式回归拟合模型为式 (9)。响应面二次模型的方差分析 (ANOVA) 结果如下:

$$R_2 = 0.228 \text{ 8} + 0.007 \text{ 4A} - 0.003 \text{ 5B} - 0.004 \text{ 3C} + \\ 0.001 \text{ 8AB} + 0.002 \text{ 2AC} + 0.008 \text{ 7BC} + \\ 0.003 \text{ 1A}^2 - 0.012 \text{ 1B}^2 - 0.023 \text{ 4C}^2 \quad (9)$$

式中,  $R_2$  是脂质含量作为响应值 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ); A 为碳氮比; B 为微量元素投加量 (mL); C 为维生素投加量 (mL)。

对所选脂质含量预测模型的方差分析 (ANOVA) 结果表明, 拟合的模型  $R^2 = 0.743 \text{ 9}$ ,  $F$  值为 2.26,  $P$  值为 0.147 7, 大于 0.05, 模型不可靠的可

能性达到 14.77%, 说明该回归模型在统计学上不具有显著性和合理性。失拟项的  $F$  值为 4.78,  $P$  值为 0.082 5 ( $P > 0.05$ ), 表明模型的缺失拟合不具有显著性, 残差是由随机误差引起的, 能够一定程度上反映脂质含量与所考察因素之间的关系。变异系数为 6.45%, 代表模型的再现性良好。精密度的 4.694 3, 表明该模型具有较好的信号强度。在斜生四链藻脂质含量提升的响应面优化实验中, 各影响因素在一次项、二次项交互作用中都不具有较高的显著性, 仅在二次项的  $C^2$  中表现出较高的显著性, 说明在整体回归模型不显著的情况下,  $C^2$  是一个重要的模型项。

## 3 结 论

(1) 本文研究了不同培育模式对斜生四链藻生长、代谢及其生物量积累和脂质积累的影响。结果表明, 混合营养培育可以显著促进斜生四链藻细胞生长以及脂质和碳水化合物的积累。在混养 24 h 培育模式条件下, 生物量和脂质含量分别是自养组的 3.82 倍和 2.49 倍。

(2) 混养培育模式能够提升蛋白质和碳水化合物的积累量。在生长对数期, 混养 8 h : 16 h 组的蛋白质含量积累最高, 达到  $554.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是自养组的 1.68 倍。在此时期混养 24 h 组的碳水化合物含量也达到了最高值, 为  $54.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3) 通过响应面法分析优化了培育时的营养物质, 在混养条件下, 提升生物量的最佳参数条件为碳氮比为 10, 微量元素投加量为 0.1 mL、维生素投加量为 1 mL。实测的生物量积累量为  $2.451 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与预测值  $2.426 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  接近。

(4) 本研究的结果表明, 在混养条件下可以有效提高有效生物质的积累量。通过响应面法优化营养物质来进一步提高斜生四链藻的生物量。该研究有望实现微藻资源的高效利用和高价值产物的生产。

(5) 当前研究集中于提高微藻生物质产量、脂质含量以及降低生产成本。未来可以进一步研究基因编辑技术的应用、光合作用效率的提高、生物反应器工艺的优化等方面, 以实现微藻生产商业化, 为可再生能源发展做出贡献。

### 参考文献 (References):

- [1] MENEGAZZO Mariana Lara, FONSECA Gustavo Graciano. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review[J]. Renewable and Sustainable En-

- ergy Reviews, 2019, 107: 87–107.
- [2] POH Zhia Lerc, AMALINA KADIR Wan Nadiyah, LAM Man Kee, et al. The effect of stress environment towards lipid accumulation in microalgae after harvesting[J]. Renewable Energy, 2020, 154: 1083–1091.
- [3] BARIZĂ Ana Carolina De Lima, GOMES Luiz Eduardo De Oliveira, BRANDÃO Larissa Lamburghini, et al. Microalgae as tertiary wastewater treatment: Energy production, carbon neutrality, and high-value products[J]. Algal Research, 2023, 72: 103113–103120.
- [4] PITTMAN Jon K, DEAN Andrew P, OSUNDEKO Olumayowa. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources [J]. Bioresour Technology, 2011, 102(1): 17–25.
- [5] CHEN Chun Yen, YEH Kuei Ling, AISYAH Rifka, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review[J]. Bioresour Technology, 2011, 102(1): 71–81.
- [6] PEREZ GARCIA Octavio, ESCALANTE Froylan M E, DE BASHAN Luz E, et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products[J]. Water Research, 2011, 45(1): 11–36.
- [7] HU Jianjun, NAGARAJAN Dillirani, ZHANG Quanguo, et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 54–67.
- [8] 杨静, 蒋剑春, 张宁. 不同培养方式下微藻产油能力的研究[J]. 生物质化学工程, 2011, 45(2): 15–19.  
YANG Jing, JIANG Jianchun, ZHANG Ning. Oil productivity capabilities of several microalgae strains in different cultivation methods[J]. Biomass Chemical Engineering, 2011, 45(2): 15–19.
- [9] 蒋晓菲, 周红茹, 金青哲, 等. 微藻油脂制取技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 37(10): 62–66.  
JIANG Xiaofei, ZHOU Hongru, JIN Qingzhe, et al. Progress in extraction of microalgae oil[J]. China Oils and Fats, 2012, 37(10): 62–66.
- [10] 王艺, 陈丹青, 毛炜炜, 等. 以微藻固碳减轻碳排放及其强化策略[J/OL]. 能源环境保护, 1–8[2024–04–13]. <https://doi.org/10.20078/j.eep.20240301>.  
WANG Yi, CHEN Danqing, MAO Weiwei, et al. Carbon sequestration by microalgae to reduce carbon emission and strengthening strategy[J]. Energy Environmental Protection, 1–8[2024–04–13]. <https://doi.org/10.20078/j.eep.20240301>.
- [11] BRAR Amandeep, KUMAR Manish, SONI Twinkle, et al. Insights into the genetic and metabolic engineering approaches to enhance the competence of microalgae as biofuel resource: A review[J]. Bioresource Technology, 2021, 339: 125597–125607.
- [12] HELLIWELL Katherine E, WHEELER Glen L, SMITH Alison G. Widespread decay of vitamin-related pathways: Coincidence or consequence? [J]. Trends in Genetics, 2013, 29(8): 469–478.
- [13] DANESH Azadeh Fazeli, MOOIJ Peter, EBRAHIMI Sirous, et al. Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(5): 1152–1160.
- [14] VERMA Ritu, KUMARI K V L Kusuma, SRIVASTAVA Aradhana, et al. Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020, 8(5): 104149–104161.
- [15] VERMA Ritu, KUMAR Rahul, MEHAN Luv, et al. Modified conventional bioreactor for microalgae cultivation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(2): 224–230.
- [16] 罗龙皂, 曾凡健, 田光明. 藻-菌系统中微藻生长条件的响应面法优化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(1): 95–101.  
LUO Longzao, ZENG Fanjian, TIAN Guangming. Optimization of culture conditions of microalgae in an algal-bacterial system by response surface method[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science), 2019, 45(1): 95–101.
- [17] NAJAFABADI Hamed Abedini, MALEKZADEH Mohammad, JALILIAN Farhad, et al. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions [J]. Bioresource Technology, 2015, 180: 311–317.
- [18] BLIGH E G, BLIGH W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911–917.
- [19] YAMANE Y, UTSUNOMIYA T, WATANABE M, et al. Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(15): 1223–1228.
- [20] WANG Jinghan, YANG Haizhen, WANG Feng. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(7): 3307–3329.
- [21] D’ALESSANDRO Emmanuel B, ANTONIOSI FILHO Nelson R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 58: 832–841.
- [22] 曹云涛, 孔维宝, 蒺玉琴, 等. 不同营养方式对普通小球藻生长特性和细胞组成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 45–51.  
CAO Yuntao, KONG Weibao, XI Yunqin, et al. The effects of different nutrition modes on growth characteristic and cell components of *Chlorella vulgaris* [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(10): 45–51.
- [23] CORDOBA Javier, PEREZ Emilie, VAN Vlierberghe Mick, et al. *De novo* transcriptome meta-assembly of the mixotrophic freshwater microalga *Euglena gracilis* [J]. Genes, 2021, 12(6): 842–870.
- [24] XIE Zhen, PEI Haiyan, ZHANG Lijie, et al. Accelerating lipid production in freshwater alga *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 by seawater and ultrasound during the stationary phase [J]. Renewable Energy, 2020, 161: 448–456.

- [25] LI Zhuang, YUAN Ting, ZHAO Jinjin, et al. Unraveling non-linear dynamics of biomass, photosynthesis efficiency, and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation[J]. Journal of Cleaner Production, 2024, 448: 141692–141702.
- [26] SINGH Harshita, VARANASI Jhansi L, BANERJEE Srijoni, et al. Production of carbohydrate enrich microalgal biomass as a bioenergy feedstock[J]. Energy, 2019, 188: 116039–116052.
- [27] HU Q, KURANO N, KAWACHI M, et al. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(6): 655–662.
- [28] CAO Yueqin, YANG Shuling, WANG Juhua, et al. Metabolic exploration of the physiological regulatory mechanism of the growth and metabolism characteristics of *Chlorella vulgaris* under photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic cultivation conditions[J]. Biomass and Bioenergy, 2023, 173: 106775–106786.
- [29] LI Yuqin, QI Zhenhua, FAN Yiwen, et al. Boosting concurrent lipid accumulation and secretion by *Coccomyxa subellipsoidea* with glucose coupling glycerol as accelerator[J]. Algal Research, 2022, 67: 102838.
- [30] 秦栋樛. 外加碳源对微藻生长及油脂积累的影响[D]. 大连: 大连海事大学, 2022: 20–23.
- QIN Donglin. Effect of external carbon sources on the growth and lipid accumulation of microalgae[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2022: 20–23.
- [31] 罗霏. 粗甘油/葡萄糖碳源协同作用对胶球藻生长及油脂富集的影响[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2020: 20–21.
- LUO Fei. Effects of crude glycerol combining glucose on the growth and lipid accumulation in *Coccomyxa subellipsoidea* [D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2020: 20–21.
- [32] VAN Vooren G, LE Grand F, LEGRAND J, et al. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application[J]. Bioresource Technology, 2012, 124: 421–432.
- [33] AYYAMPERUMAL Ramamoorthy, MUTHUSAMY Balasubramanian, HUANG Xiaozhong, et al. Spatial distribution and seasonal variation of trace hazardous elements contamination in the coastal environment[J]. Environmental Research, 2024, 243: 117780–117794.
- [34] 王洁玉, 陈艳, 李杲光, 等. 3 种微量元素对小球藻和小环藻生长的影响[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(9): 55–60.
- WANG Jieyu, CHEN Yan, LI Gaoguang, et al. Effects of three kinds of trace element on growth of *Chlorella vulgaris* and *Cyclotella* sp.[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(9): 55–60.