

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学号: 2201530125

**TiO₂ 纳米颗粒强化产氢发酵废液培养微藻产油
体系的构建及调控机制**

**Lipid production from microalgae cultured in
hydrogen-producing fermentation wastewater
enhanced by TiO₂ nanoparticles construction and
regulation mechanism of the system**

学 生 姓 名: 徐嘉璐

指 导 教 师: 李艳宾

专业学位类别: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：徐嘉璐
日期：2024年6月3日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：徐嘉璐
日期：2024年6月3日

指导教师签名：李艳兵
日期：2024年6月3日

TiO₂ 纳米颗粒强化产氢发酵废液培养微藻产油体系的 构建及调控机制

摘 要

利用暗发酵产氢废液培养产油微藻，既可实现能源的充分转化，又能降低生物氢发酵生产的成本，减少废液对环境的污染，是生物质能源开发领域的研究热点之一。研究证实纳米颗粒（NPs）能有效促进微藻生长并积累油脂等物质，对不同种类微藻来说，添加合适的 NPs 并探明其对促进微藻生长产油的作用机制，是 NPs 强化微藻培养体系高效稳定的重要保障。本研究针对暗发酵产氢废液的资源化处理，首先从实验室保藏的微藻中选择出可有效利用废液生长产油的藻种，在分析废液中主要有机酸组分及浓度的基础上探明了该藻种对不同有机酸的利用和耐受性差异。从 TiO₂ NPs 浓度和粒径出发进一步构建了添加 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻的体系，分析了添加 TiO₂ NPs 对微藻油脂产量、脂肪酸组成以及细胞形态与生理活性的影响，并探究了 NPs 强化体系中微藻生长及油脂合成的转录调控机制。主要研究结果如下：

首先，利用 24 孔板培养法对本实验室保藏藻种在暗发酵产氢废液中的生长产油情况进行了快速筛选，结果显示产氢废液胁迫下各

微藻的生长均受到不同程度抑制，但小球藻 *Chlorella* sp. DT025 在 25% 发酵废液中保持了相对良好的生长状态，流式细胞仪检测显示尼罗红染色后有 79.28% 的微藻细胞出现油脂荧光信号。经测定产氢废液中主要有乳酸、丁二酸、甲酸、乙酸、乙醇等有机酸组分，*Chlorella* sp. DT025 能有效利用乳酸、乙酸和乙醇，不能利用丁二酸与甲酸。其中 25% 产氢废液中含有 181.83 mg/L 丁二酸，超出了 *Chlorella* sp. DT025 的耐受浓度（100 mg/L），这可能是产氢废液抑制微藻生长的重要因素。

其次，在 25% 产氢废液的微藻培养体系中选择添加 TiO_2 NPs 进行强化，并对 TiO_2 NPs 的添加浓度和粒径进行了优化。结果表明，在 50 mg/L 浓度、20 nm 粒径的 TiO_2 NPs 添加条件下，培养液的 COD 去除率为 34.32%，总氮去除率为 68.88%。进一步分析该条件下 *Chlorella* sp. DT025 油脂脂肪酸相对含量、组成及生物柴油性能，结果显示 TiO_2 NPs 的添加提高了 *Chlorella* sp. DT025 积累的油脂中 C16-C18 组分的占比，新增脂肪酸 C20:2，含量达 7.63%。燃料特性指标分析报表明其提高了油脂作为生物柴油的燃料质量。

再次，分析了 TiO_2 NPs 对 *Chlorella* sp. DT025 生长产油及生理特性的影响。透射电子显微镜（TEM）观察显示 TiO_2 NPs 在微藻细胞内外均有分布，细胞周围观察到 TiO_2 NPs 附着，一部分通过胞吞作用进入细胞并在细胞内形成了空泡结构，使细胞出现质壁分离现象，说明该条件下 TiO_2 NPs 对微藻细胞造成一定的损伤。微藻细胞

叶绿素含量、抗氧化保护酶活性及丙二醛（MDA）等生理指标测定结果表明，添加 TiO_2 NPs 可一定程度促进叶绿素合成，叶绿素 a 和 b 相比未添加 TiO_2 的处理分别提高了 4.53、3.91 mg/L。受产氢废液与 TiO_2 NPs 胁迫的影响，细胞内 ROS 产生速率提高。 TiO_2 NPs 添加后 MDA 含量提高，SOD 和 CAT 酶活性降低，表明 TiO_2 加重细胞膜质过氧化胁迫，影响抗氧化保护酶活性。 TiO_2 NPs 的添加同时促进了微藻生长与叶绿素合成，说明其对微藻的胁迫在耐受范围内，并刺激微藻细胞积累油脂。

最后，探讨了 TiO_2 NPs 强化下微藻在产氢废液中代谢及油脂合成的转录调控机制。结果表明，在被注释的基因中差异基因数为 1866 个，加入 TiO_2 后上调基因 824 个，下调基因 1042 个，在细胞生长过程、细胞免疫应答过程、节律过程中上调的基因更多。分析 KEGG 通路后发现脂肪酸合成通路中乙酰 CoA 羧化酶基因上调，有利于细胞内脂肪酸的合成；丙酮酸代谢通路中乙酰 CoA 合成酶基因 2 上调，促进了乙酰 CoA 的合成；光合作用固碳通路中核酮糖二磷酸羧化/加氧酶、苹果酸脱氢酶基因上调，磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因下调，提高细胞内糖酵解效率。得出添加 TiO_2 NPs 后微藻细胞内酶系的调控朝着有利于油脂积累的方向进行。

关键词：*Chlorella* sp.，产氢发酵废液， TiO_2 纳米颗粒，耦合产油，调控机制

Lipid production from microalgae cultured in hydrogen-producing fermentation wastewater enhanced by TiO₂ nanoparticles construction and regulation mechanism of the system

ABSTRACT

Cultivation of oleaginous microalgae by dark fermentation hydrogen-producing wastewater can achieve full energy conversion, reduce production cost and environmental impact of bio-hydrogen fermentation, and is one of research focus areas in biomass energy development. Studies have confirmed that nanoparticles (NPs) have a variety of mechanisms that can effectively promote the growth of microalgae and accumulate lipids and other substances. For different types of microalgae, the choice of type, concentration and particle size of NPs added is particularly important. On this basis, fully understanding the mechanism of NPs on microalgae growth and lipid production is an important guarantee for establishing an efficient and stable NPs-enhanced microalgae culture system. This study was an investigation of the resource treatment of wastewater from the production of hydrogen by dark fermentation. The main organic acid components and concentrations in the wastewater were analyzed. The microalgae that could effectively utilize the wastewater for growth and lipid production were selected from the microalgae preserved, and the differences in the utilization and tolerance of different organic acids were demonstrated. The system of TiO₂ enhanced fermentation wastewater

hydrogen production was constructed and optimized based on the addition concentration and particle size of TiO₂ NPs. The effects of TiO₂ NPs on the lipid production, the fatty acid composition, the cell morphology, and the physiological activity of the microalgae were analyzed. On this basis, the transcriptional regulation mechanism of TiO₂ NPs to enhance the growth of microalgae and lipid synthesis in the wastewater of hydrogen production was further investigated. The main results are as follows:

Firstly, the microalgae with the highest lipid content after culture with hydrogen-producing fermentation wastewater was selected from the 11 strains in the laboratory. However, *Chlorella* sp. DT025 retained a relatively good growth state in 25% of the fermentation waste liquid, and 79.28% of the algae cells showed fluorescence signals stained by Nile red by flow cytometry. The ability of *Chlorella* sp. DT025 to utilize and tolerate several organic acids with high content in hydrogen production fermentation wastewater was determined. *Chlorella* sp. DT025 could utilize lactic acid, acetic acid and ethanol, and the acetic acid and ethanol could be completely removed. Succinic acid and formic acid could not be used. The effluent contained 181.83 mg/L succinic acid, but the maximum tolerance concentration of microalgae to succinic acid was 100 mg/L. Therefore, high concentration of succinic acid in the effluent of hydrogen production fermentation might be an important factor to inhibit the growth of microalgae.

Secondly, TiO₂ NPs were selected to improve the yield and quality of lipid from *Chlorella* sp. DT025. The optimum concentration and particle size of nanoparticles were determined according to the sugar consumption, removal of COD and TN, yield, and quality of lipid by *Chlorella* sp. DT025 after addition of TiO₂ NPs. With the addition of TiO₂ NPs of 20 nm particle size at a concentration of 50 mg/L, the COD removal rate reached 52.24%,

and the TN removal rate reached 68.84%. The relative content and composition of the fatty acids and the biodiesel performance of the lipid accumulated by *Chlorella* sp. DT025 under these conditions were further investigated. The results showed that the addition of TiO₂ NPs increased the proportion of C16-C18 components in the lipid accumulated by *Chlorella* sp. DT025, and the new fatty acid C20:2, the content reached 7.63%. The improvement of the fuel properties of the lipid as biodiesel is shown by the analysis of related fuel property indices.

Thirdly, the physiological response mechanism of TiO₂ NPs enhancement of lipid production by *Chlorella* sp. DT025 was analyzed. Transmission electron microscopy (TEM) observation showed that TiO₂ NPs were distributed inside and outside the microalgae cells, and TiO₂ NPs were observed around the cells. Some TiO₂ NPs entered the cells by endocytosis and formed a vacuole structure inside the cells, making the cells appear plasmolyzed. This phenomenon indicates that TiO₂ NPs cause some damage in microalgae cells under this state. The results of the changes of Chlorophyll and antioxidant enzyme activities in microalgae cells showed that Chlorophyll (a) and (b) was 4.53 and 3.91mg/L higher than the control group without TiO₂. Under the stress of hydrogen-producing wastewater and TiO₂ NPs, the intracellular ROS production rate increased. After the addition of TiO₂ NPs, the content of MDA increased and the activity of SOD and CAT decreased. This indicated that TiO₂ aggravated the peroxidative stress of the cell membrane and affected the activity of antioxidant protective enzymes. The addition of TiO₂ NPs also promoted the growth of microalgae, indicating that its stress on microalgae was within the tolerance range and stimulated the accumulation of lipid in microalgae cells.

Finally, the effects of TiO₂ NPs on the growth and lipid production of

Chlorella sp. DT025 cultured in hydrogen-producing fermentation wastewater were analyzed from the perspective of the transcriptome. The number of differentially expressed genes was 1866. After TiO₂ addition, 824 genes were up-regulated and 1042 genes were down-regulated. More genes were up-regulated in the process of cell growth, cellular immune response, and rhythm. After analyzing the KEGG pathway, it was found that the acetyl CoA carboxylase gene in the fatty acid synthesis pathway was up-regulated, which was beneficial for the synthesis of intracellular fatty acids. The acetyl-CoA synthase 2 gene in the pyruvate pathway was up-regulated, which promoted the synthesis of acetyl-CoA; in the photosynthetic carbon fixation pathway, the ribulose diphosphate carboxylase/oxygenase and malic dehydrogenase genes were up-regulated and the phosphoenolpyruvate carboxylase genes were down-regulated to improve the efficiency of intracellular glycolysis. It is concluded that the regulation of the enzyme system in the microalgae cells after the addition of nano-TiO₂ is in a direction conducive to lipid accumulation.

Xu Jialu (Biology and Medicine)

Supervised by Li Yanbin

KEY WORDS: *Chlorella* sp., hydrogen-producing wastewater, TiO₂ NPs, coupled lipid production, regulatory mechanism

目录

摘要	I
ABSTRACT	IV
第一章 绪论	1
1.1 微藻简述.....	1
1.2 微藻在废水资源化处理中的应用.....	1
1.2.1 微藻对废水中物质的利用与吸附.....	2
1.2.2 微藻资源化处理废水的机理.....	3
1.2.3 微藻处理产氢发酵废液研究进展.....	4
1.3 纳米颗粒强化微藻在产油与处理废水中的应用.....	5
1.3.1 纳米颗粒在微藻生长与产油中的应用.....	5
1.3.2 纳米颗粒在微藻处理废水中的应用.....	6
1.4 微藻油脂积累的影响条件与转录调控机制.....	7
1.4.1 微藻油脂合成的途径与影响条件.....	7
1.4.2 微藻油脂合成的转录调控机制.....	8
1.5 研究意义、内容与创新点.....	9
1.5.1 研究意义.....	9
1.5.2 研究内容.....	10
1.5.3 创新点.....	11
第二章 高耐受产氢发酵废液的微藻选择及各有机酸抑制浓度测定	12
2.1 引言.....	12
2.2 实验材料与仪器.....	12
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 微藻藻种活化.....	13
2.3.2 微藻种子液的制备与微藻生物量的测定.....	13
2.3.3 化学需氧量与总氮的测定.....	13

2.3.4 微藻细胞油脂含量的测定.....	14
2.3.5 产氢发酵废液中主要有机酸的测定.....	14
2.3.6 产氢发酵废液中葡萄糖与木糖的测定.....	14
2.4 结果与讨论.....	15
2.4.1 产氢发酵废液主要化学成分分析.....	15
2.4.2 高耐受发酵废液的微藻藻种的选择.....	16
2.4.3 发酵废液中各有机酸组分对微藻生长与产油的影响.....	17
2.5 本章小结.....	22
第三章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油体系的优化	23
3.1 引言.....	23
3.2 实验材料与仪器.....	23
3.3 实验方法.....	23
3.3.1 TiO ₂ NPs 的表征	24
3.3.2 脂肪酸质量分数的测定与组分含量的计算.....	24
3.3.2 生物柴油燃料特性的计算.....	24
3.4 结果与讨论.....	25
3.4.1 TiO ₂ NPs 的表征	25
3.4.2 TiO ₂ NPs 添加浓度条件的优化	25
3.4.3 TiO ₂ NPs 添加粒径条件的优化	29
3.5 本章小结.....	32
第四章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的生理响应机制	33
4.1 引言.....	33
4.2 实验材料与仪器.....	33
4.3 实验方法.....	33
4.3.1 微藻细胞透射电镜观察.....	34
4.3.2 叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的测定	34
4.3.3 抗氧化保护酶活的测定.....	34
4.4 结果与讨论.....	34

4.4.1 TiO ₂ NPs 在微藻细胞内分布情况	34
4.4.2 添加 TiO ₂ NPs 后微藻细胞内抗氧化酶活变化	36
4.5 本章小结.....	38
第五章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的转录组调控分析	40
5.1 引言.....	40
5.2 实验材料与仪器.....	40
5.3 实验方法.....	40
5.3.1 <i>Chlorella sp.</i> DT025 总 RNA 的提取检测与反转录	41
5.3.2 文库的构建, 质控与拼接.....	41
5.3.3 基因功能注释与差异基因表达分析.....	41
5.3.4 差异表达关键酶基因 RT-qPCR 验证	42
5.4 结果与讨论.....	42
5.4.1 <i>Chlorella sp.</i> DT025 总 RNA 的提取检测	42
5.4.2 原始测序数据的质控与拼接.....	43
5.4.3 基因功能注释.....	45
5.4.4 基因表达分析.....	47
5.4.5 差异表达的关键酶基因 RT-qPCR 验证	51
5.5 本章小结.....	53
第六章 结论与展望	54
6.1 结论.....	54
6.2 展望.....	55
参考文献	56
附录	65
攻读学位期间发表的学术论文目录	68
致谢	69

第一章 绪论

1.1 微藻简述

微藻是一类分布广泛、多样性高且个体微小的单细胞微生物或简单多细胞微生物群体，有光合利用效率高、生长速率快、营养丰富且油脂含量高的特点^[1]。由于其较强的环境适应能力和简单的生长过程，微藻在各种环境中都有广泛的分布，荒漠、海洋、空气甚至废水，并能大量繁殖^[2]。且微藻能够以个体或共生的生存方式广泛的在光照强度、温度、酸碱度下生长。常见的微藻包括蓝藻、绿藻、硅藻和金藻等，在生长过程中也产生大量高价值的天然产物如油脂、多糖、蛋白质、色素等，在燃料能源、环境治理、食品行业等方面都有重要的生产价值^[3]。

微藻的生长过程中有多种营养方式。在光照充足的条件下微藻利用太阳能进行光合作用自养生长，利用环境中的二氧化碳，最终在叶绿体基质中完成碳的固定。自养培养微藻时操作与培养成本低，但细胞生长与产物较少^[4]。微藻也能异养生长，利用外来环境中的有机碳用于自身生长与产出代谢产物。异养培养的微藻有更多的次级代谢产物，生物量更高，但在微藻培养时要添加较多的有机碳源，成本昂贵。混合培养模式是一种利用微藻自养/异养代谢模式转换的培养方式，混养结合了微藻自养与异养两种生长方式的优势，充分利用环境资源，更高效地利用有机碳源与氮源，获得了更高的藻细胞数量并使微藻积累更多的蛋白与油脂^[5]，是实现效益最大化的培养模式。

1.2 微藻在废水资源化处理中的应用

随着人民生活水平与质量的不断提高，环境污染问题也随之加剧。作为环境问题中重要的污染之一，水污染的治理刻不容缓。目前，微藻在废水处理与资源循环方面展现出巨大潜力。微藻净化废水是一种高效且低成本的环境友好型的技术，能实现资源循环利用，变废为宝。

1.2.1 微藻对废水中物质的利用与吸附

废水中含有大量的碳、氮和磷等元素，以及对人体有害的重金属等。微藻能消耗废水中的碳氮元素、吸附有害重金属。利用其用于自身生长并以此来达到净化污水的效果^[6]。微藻对养殖废水中的碳氮磷元素的去除率很高，杨坤等人利用普通小球藻 *Chlorella vulgaris* 处理养猪沼液废水，小球藻对总氮的去除率达到 84.53%，磷元素的去除率达到 98.54%^[7]。姜红菊等人利用小球藻 *Chlorella* sp. 处理规模化猪场废水后，氨氮的去除率高达 98.60%，COD 的去除率也达到 77.30%，同时细胞数比初始值增加了 5.6 倍^[8]。微藻对不同种类的重金属的吸附效果不同，Kothari 等人发现相同条件下，在 *Chlorella pyrenoidosa* 对 Mn 的去除率达到 77%，但对 Cr 元素的去除率仅有 47%^[9]，导致该结果的原因可能是在含有较高量的重金属废水中，微藻的细胞生长常常受到较高的胁迫致使生物量降低，而生物量与微藻对该重金属的吸附相关，且藻细胞利用或吸附重金属的过程较为复杂^[10]。

近年来微藻处理废水中的抗生素也受到了广泛的关注，但由于微藻对不同的抗生素的耐受程度不同，导致其对不同浓度与不同种类的抗生素去除效率差异较大。Wu 等人利用小球藻 *Chlorella sorokiniana* 处理土霉素（OTC）废水，发现含有高浓度（100 mg/L）时 OTC 显著抑制藻的生长；但在浓度较低（50 mg/L）时，OTC 反而会促进小球藻生长；且在含 10 mg/L OTC 时，微藻对其的去除率高达 99%^[11]。Pan 等人比较了 *Microcystis aeruginosa* 与 *Chlorella pyrenoidosa* 两种微藻对四环素的去除效果，结果得出：*M. aeruginosa* 有更高效且更持续的去除率，初始浓度在 10 mg/L 时，从第 2 d 开始达到 99% 的去除率，且保持至第 11 d；同样的，在高浓度四环素添加（100 mg/L）时，对两种微藻都有较高的生长与生物活性的抑制^[12]。

废水中还有其他常见的污染物，如激素、颗粒悬浮物等，研究者们发现不同的微藻对这些污染物有降解或是吸附的能力，加入微藻培养后能有效提高废水水质^[13-16]。总而言之，利用微藻去除废水中污染物是绿色环保且有利于可持续发展的道路。

1.2.2 微藻资源化处理废水的机理

微藻在处理废水方面应用广泛且作用强大，在处理废水过程中由于不同类型的废水中化学组成不同，对微藻的活性与代谢途径有不同的影响。

碳元素是微藻细胞组成的基本元素，约占微藻总重量的 50%^[17]。微藻能利用的碳源分为无机碳（ CO_2 与 HCO_3^- ）和有机碳（糖类，醇类以及有机酸）。其中，微藻通过光合作用固定 CO_2 。在光反应阶段会利用光能，转化为化学能 ATP 与还原力 NADPH；在暗反应阶段， CO_2 在 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）的作用下被细胞固定^[18]。在微藻密集生长过程中，水中的 CO_2 浓度对微藻来说较低，所以微藻细胞内有 CO_2 浓缩机制（CCMs），将 CO_2 与 HCO_3^- 集中到 Rubisco 酶附近，促进其固定 CO_2 ^[19,20]。由于 CCMs 启动需要能量，所以在一定范围内提高的 CO_2 浓度会促进微藻光合作用与生长^[21]。废水中往往含有较高的有机碳，在异养方式下，微藻可以利用废水中大量的有机碳化合物如葡萄糖，半乳糖、甘油、乙醇、乙酸盐等等作为自身异养生长的碳源，为细胞生长与生物量积累、细胞活性与合成脂肪酸提供能量与碳元素^[22-24]。在微藻细胞内葡萄糖通过两种途径被利用：在黑暗条件下经磷酸戊糖途径（PPP）代谢、在光照条件下经过糖酵解途径（EMP）代谢，EMP 过程后，产生的丙酮酸在有氧条件下经三羧酸循环（TCA）途径转化为乙酰 CoA^[25, 26]。在废水中同时有光合作用与异养有机物存在时，实现微藻的混合培养模式，能最大程度提高微藻活性与碳代谢效率。但在废水中培养的微藻，在自养条件下是无法去除有机碳的，异养对有机碳的去除贡献更大，所以需根据不同类型的培养模式提高微藻对废水的处理效率。

氮是微藻生长所必需的营养元素，参与微藻细胞中的多肽、叶绿素、酶、核糖核酸（RNA）、脱氧核糖核酸（DNA）、三磷酸腺苷（ATP）与其他物质的合成^[27, 28]。微藻生长与氮吸收间的机制非常复杂，与氮源的存在形式密切相关。微藻对氮源的利用优先顺序为 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、尿素，被利用的氮进一步合成蛋白质等^[25, 29]。在进一步合成之前，细胞中的 NO_3^- 会还原为 NO_2^- ，后进一步在叶绿体中进一步还原为 NH_4^+ ，限速酶是硝酸还原酶（NR）和亚硝酸还原酶（NiR）^[30]。氮胁迫可以促进微藻细胞中脂类与有机物积累，抑制蛋白质的合

成，所以废水中的氮元素含量是微藻在废水中生长与净化能力的关键^[31]。在微藻代谢过程中，磷也是非常重要的营养元素，对核酸（表达遗传信息）、ATP（提供能量）、磷脂和蛋白质（细胞膜主要成分）的合成非常重要^[27]。缺少磷元素，细胞会减少分裂，减少蛋白质合成、转录和碳氮的代谢过程。微藻对废水中的重金属有一定去除能力，重金属可作为微藻生长的微量元素，提高微藻细胞代谢中酶的活性，如硼、铜、铁、锌、钴等^[32]。首先微藻细胞壁与细胞膜上有丰富的金属离子结合位点，金属离子能通过静电作用吸附至细胞表面；而后金属离子穿过细胞膜进入细胞质，与细胞内蛋白质与多肽结合，在细胞内积累^[33-35]。

微藻去除抗生素的方式有很多，有生物吸附^[36]、生物积累^[37]、光降解^[38, 39]等。对于不同种类的抗生素，微藻有不同的去除机制。目前对微藻去除抗生素的技术还处于起步阶段，在实际废水中的潜力还有待探索。

1.2.3 微藻处理产氢发酵废液研究进展

木质纤维素物质在自然界中大量存在，如棉杆，稻草等。大部分木质纤维素都没能得到高效地利用，使大量可再生资源浪费，处理不当还会污染环境。充分利用木质纤维素开发清洁能源成为关注热点^[40]。而氢能是当前已知最清洁的可再生能源，其燃烧无污染产物且有较高的能效备受研究者关注。微生物利用木质纤维素水解液暗发酵产氢是高效利用木质纤维素的方法之一^[41, 42]。产氢细菌经暗发酵产氢后发酵液中会产生大量挥发性有机酸（VFAs）如甲酸、乳酸、乙醇等等，以及未被完全利用的残余还原糖^[43]。直接丢弃不仅会浪费很多资源，还会对环境造成一定污染。

微藻有处理各种类型的废水中污染物的能力，且有机酸作为异养碳源可直接被微藻利用并促进微藻产生更多油脂，这让微藻利用暗发酵产氢废液生长与油脂积累成为可能。Lin 等人利用产氢梭菌经暗发酵产氢后的发酵废液诱导 *Scenedesmus abundans* 产油，发现其对发酵废液中的多种有机酸如甲酸、乙酸、乳酸、丁酸等都有较高的去除效果，实现了发酵废液利用与生物能源生产的双重效果^[44]。Ghosh 等人使用 *Chlorella* sp. 处理嗜热菌产氢发酵后含有机酸的废液，添加适量葡萄糖与磷酸盐后微藻胞内油脂含量高达 58%，且对乙酸与丁酸有一

定的去除效率^[45]。结果证明微藻利用含高有机酸的发酵废液产油是可行的，能够实现产氢发酵的资源化处理。

1.3 纳米颗粒强化微藻在产油与处理废水中的应用

近年来，随着纳米颗粒在生活活动与生产工业等各个领域中日益广泛的应用，人们越来越关注纳米颗粒对生物代谢过程产生的影响。相比于较大的颗粒物，纳米颗粒有更高的比表面积，有更好的溶解效率与催化特性^[46]。在微藻培养过程中，纳米颗粒能够影响微藻生长代谢速率与细胞内化合物积累，表现为微藻对碳氮有机物的利用提高，微藻细胞数提高与油脂产量增多，达到提高微藻产油能力与处理废水效率的效果^[47, 48]。

1.3.1 纳米颗粒在微藻生长与产油中的应用

纳米颗粒的添加仅在合适的浓度范围内对微藻促进有优势，过多的纳米颗粒添加会对微藻造成较大的毒性^[49]。Chen 等人发现在低浓度 Co NPs（添加 20 mg/L）条件下，金属纳米颗粒对 *Platymonas subcordiformis* 细胞生长的抑制率小于 0%，即表现出促进微藻生长；但随着纳米粒子添加浓度的增加，抑制率随之增加，添加 100 mg/L Co NPs 时抑制率增加到约 19%^[50]。Pedroso 等人也发现纳米 CuO 在低浓度条件下对 *Chlamydomonas reinhardtii* 的生长有促进作用，且随着浓度的提高促进作用会降低；但在高浓度 CuO 添加条件下藻细胞密度有明显的降低^[51]。Henning 等人在 *Chlamydomonas reinhardtii* 培养基中添加 0.1 g/L 低浓度 Cr₂O₃ 纳米粒子时，观察到细胞密度的提高；但在 10 g/L 浓度 Cr₂O₃ 添加后发现细胞密度有明显地降低^[52]。综上，纳米颗粒的添加对微藻的影响是在较低浓度促进，在较高浓度抑制，但促进与抑制作用的“分界”无法确定，不同种类的纳米颗粒、纳米颗粒的粒径等等条件对微藻都有不同的影响。

在微藻的培养过程中添加纳米颗粒会对微藻产油的过程造成影响^[53]，但不同的金属纳米颗粒对微藻产生促进油脂积累的机理有所不同。Jeon 等人得到结果，添加纳米 SiO₂-CH₃ 后微藻细胞干重与油脂产率提升了 210%与 610%，测定培养液中 CO₂ 浓度后发现添加纳米 SiO₂-CH₃ 后油脂产率的提高是由于纳米颗粒提高了 CO₂ 的传质速率^[54]。Barreto 等人在培养 *Ankistrodesmus densus* 中加入少量 Cu NPs 后脂类化合物增加了 1.7 倍，可能是由于 Cu NPs 堵塞了细胞膜离子通

道, 导致营养缺乏, 引起脂质过氧化增加的细胞膜修复^[55]。Abdel-Kader 等人在培养 *Coccomyxa chodatii* 时添加不同浓度的纳米颗粒 CaO NPs 发现, 添加 60 $\mu\text{g/mL}$ CaO 后, 微藻的油脂产生、细胞代谢都有稳定提高, 但 CaO 不会损伤微藻的细胞膜, 提高微油脂产量是因为 Ca^{2+} 是常见的第二信使, Ca^{2+} 浓度的提高能激活环境变化的信号转导途径, 上调了油脂积累的相关基因^[56]。Dehghanipour 等人发现添加高浓度 Fe_2O_3 后微藻油脂产量与胞内蛋白含量都略有减少, 一些长链脂肪酸有显著下降, 可能是由于 Fe_2O_3 易在表面聚集, 形成大面积聚集遮蔽光影, 以此影响藻光合作用^[57]。

研究者们通过实验得出 TiO_2 NPs 可能有多种途径促进微藻产油。Shanmuganathan 等人发现, 在一定海水占比的培养液中培养 *Chlorella* sp., 添加 150 mg/L TiO_2 NPs 后, 油脂产率最高, 为 49.2 mg/L/d , 是因为纳米颗粒加入后提高了细胞内叶绿素 a 的含量, 从而提高了光合作用的效率与光的利用率^[58]。同样的, Sezer 等人也发现添加 100 mg/L TiO_2 NPs 能使藻 *Chlorella vulgaris* 脂肪酸产量从 1.267 g/L 提高至 1.285 g/L , 在油脂产量提高的同时发现藻类抗氧化酶活性有明显提高, 可以说明 TiO_2 以诱导微藻氧化应激来提高其油脂产量^[59]。Ji 等人认为 TiO_2 NPs 可能在培养基中吸附了微量元素锌与磷等, 对微藻形成缺少微量元素的胁迫, 进而促进微藻积累油脂^[60]。

1.3.2 纳米颗粒在微藻处理废水中的应用

纳米颗粒有较高的比表面积和快速的吸附性能, 能提高微藻生长代谢速率与细胞内化合物积累效率, 比单一微藻处理废水有更大的潜力^[61]。Vasistha 等人利用 *Chlorosarcinopsis* sp. 处理生活污水并在其中加入纳米 ZnO, 添加 10 mg/L 的 ZnO 后, 一次处理的生活污水中的 TOC (总有机碳)、总氮 (TN) 与总磷 (TP) 去除率高达 97.5%、82.21% 与 85%, 去除率远高于仅微藻处理污水, 可能是 ZnO 与微藻结合增强的 TOC、TN 与 TP 在藻细胞表面的吸附, 增强了微藻对营养有机物的吸收^[62]。Shen 等人使用了 Fe_2O_3 与微藻 *Synechocystis* sp. 制备的生物复合吸附材料 ($\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Microalgae}$) 去除废水中 Cr (VI)、Cu (II)、Pb (II) 和 Cd (II) 等重金属, 发现添加复合材料后对水中重金属粒子都有较好的去除效果, 去除率远高于单一的纳米颗粒或是单一藻, 原因是复合材料有更多的羧

基与羟基参与金属的吸附与转化^[63]。Guo 等人利用 TiO_2 与 *Tetradesmus obliquus* 共同处理废水中常见的有机物苯酚，观察到 TiO_2 进入到微藻细胞内发挥作用，含 TiO_2 的微藻细胞能将苯酚降解为低毒中间代谢产物，减轻苯酚对微藻的氧化应激及损伤，提高对苯酚的耐受性，最终纳米颗粒与微藻共同作用降解苯酚达到 98.95%，比仅微藻去除率提高了 2.27 倍^[64]。

1.4 微藻油脂积累的影响条件与转录调控机制

1.4.1 微藻油脂合成的途径与影响条件

（1）微藻油脂的合成途径

大多数微藻的野生株中就存在着高效的生物油脂合成途径。微藻脂肪酸合成有两种方式：从头合成途径与三酰甘油（TAG）合成途径。脂肪酸从头合成在叶绿体中完成，暗反应过程摄取 CO_2 并固定为 3-磷酸甘油酸，经糖酵解过程获得从头合成的主要底物乙酰 CoA。乙酰 CoA 羧化酶将乙酰 CoA 转化为丙二酰单酰 CoA，在丙二酰 CoA 酰基转移酶与转运蛋白的作用下形成乙二酰-ACP，最终由脂肪酸合酶（FAS）多次利用乙酰 CoA 加碳，形成终产物软脂酸（16:0）或是酯化后的亚油酸（18:1）。TAG 合成途径则无需乙酰 CoA 作底物，是将酰基转移至 3-磷酸甘油分子，由 3-磷酸甘油酰基转移酶（GPAT）与溶血磷脂酰基转移酶（LPAT）催化产生二酰基甘油（DAG），再由二酰基甘油酰基转移酶（DGAT）催化形成终产物 TAG^[65-67]。

（2）微藻油脂合成的影响条件

微藻培养条件对微藻油脂产率至关重要，氮磷营养元素条件、光照与温度等培养条件等都会影响微藻对油脂的积累^[68]。首先，营养元素在细胞生长与油脂积累方面都起着重要作用，如碳源与氮源的含量与化合物形态。碳源中常见的无机碳（ CO_2 、 NaHCO_3 ）或有机碳（葡萄糖、甘油等）都能影响微藻油脂积累。Tang 等人发现提高环境中的 CO_2 后 *Chlorella pyrenoidosa* 油脂含量也得到了提高，50% CO_2 条件下比 0.03% CO_2 条件下微藻的油脂含量高 28%^[69]。Laraib 等人利用甘蔗糖蜜作为额外碳源混合培养 *Chlorella vulgaris*，获得了 137.43 mg/L/d 的油脂产率与 39% 的胞内油脂含量，是光自养生长的 1.5 倍与 2 倍^[70]。Yang 等人培养 *Chlamydomonas reinhardtii* 时添加乙酸钠，形成营养缺乏并抑制生长，

比相同条件胞内油脂含量提高 93%^[71]。无论是光自养、异养或是混合培养均需要合适的碳源浓度才能最大程度上提高微藻对油脂的积累。氮源是最直接影响微藻油脂积累的营养物质之一，且在各种氮源添加条件下，氮胁迫是提高微藻油脂积累最有效的方法^[72]。Arguelles 和 Martinez-Goss 两人将氮源从 1.5 g/L 减少至 0.375 g/L，形成氮胁迫条件后，两种小球藻 *Chlorolobion* sp.和 *Chlorella* sp.的胞内油脂含量分别提高了 2.9 倍与 1.9 倍^[73]。由于氮胁迫条件，导致细胞增殖减少，油脂合成途径更偏向于在细胞内积累而不是用于合成细胞膜^[72]。所以高碳低氮可能是提高油脂合成的有效方式，氮胁迫同时提供高碳源供微藻合成脂肪酸。Bharte 与 Desai 两人发现在缺氮时添加额外碳源乙酸钠后两种小球藻 *Chlorella minutissima* 和 *Chlorella pyrenoidosa* 油脂产量比仅氮缺乏条件高 4.0%和 5.4%^[74]。

微藻生物量与油脂积累需要营养条件与培养条件共同作用。调节至合适的培养条件也能提高微藻产油的效率，降低培养成本。合适的温度在微藻生长过程中起到重要作用，最大限度提高油脂产量的前提是在油脂积累阶段前有足够的生物量。Wu 等人发现当温度由 25℃提高至 35℃后，*Monoraphidium* sp.的油脂含量从 32.9%下降至 29.6%^[75]。pH 值是微藻代谢活动的重要指标，影响培养体系中有有机碳源的存在形式与浓度，所以 pH 值也是影响微藻生长与油脂积累的重要因素之一^[76]。pH 能影响微藻产生油脂中脂肪酸占比，Qiu 等人测定了 pH 对 *Chlorella sorokiniana* 产油的影响，发现微藻积累油脂的最佳 pH 为 6.0，但 pH 为 6.5、7.0、与 7.5 时油脂作为生物柴油的质量更高^[77]。微藻在自养时以光驱动产生能量用于自身生长，所以光的波长、光照强度与光照时间对微藻的生长与产油至关重要。Sánchez-Saavedra 等人发现，指数生长期时，*Chlorella vulgaris* 在蓝光的照射下油脂含量最高，为 18.74%，显著高于白光，黄光和绿光^[78]。Ma 等人得出不同的光照强度能显著改变微藻的 CO₂ 固定率与蛋白含量^[79]。Lima 等人发现，与连续的光照相比，低频闪烁的光能将微藻的油脂产率提高三倍^[80]。

1.4.2 微藻油脂合成的转录调控机制

转录组学是一种重要的分子生物学方法，能分析出在不同条件下目标生物基因表达的变化，是基因组水平改造微藻代谢途径以提高微藻油脂产率的基础

[81]。在先前的研究中已经分析过微藻在不同培养条件下油脂合成的代谢调控，如不同 CO₂ 浓度、缺氮培养、添加废水等^[82-86]。在合成途径中发现有多种关键酶基因在油脂合成的过程中出现表达差异。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）是微藻光合作用固碳过程中 CO₂ 转化为草酰乙酸的重要酶之一。Deng 等人在缺氮条件下培养 *Chlamydomonas reinhardtii* 后，微藻的油脂产量显著提高（提高了 28%），同时发现酶 PEPC2 的转录水平急剧下降（降低 79%），表明 *pepc2* mRNA 表达丰度与油脂产量成负相关^[87]。1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（RuBisCO）是 CO₂ 同化与光合作用另一重要酶，参与 CO₂ 转化为 2,3-二磷酸甘油酸途径。Selvan 等人利用池塘废水培养 *Acutodesmus obliquus*，在优化碳源条件后，油脂产量与 CO₂ 的固定率均有提高，同时发现 RuBisCO 酶活性提高了 90%^[88]。乙酰 CoA 羧化酶（ACCase）负责将乙酰 CoA 转化为丙二酸单酰 CoA，进入油脂合成途径。所以 ACCase 上调能提高微藻油脂积累。Li 等人对 *Phaeodactylum tricornutum* 进行改造，在叶绿体中过表达 ACCase，发现酶活性提高了 3.3 倍，同时油脂含量提高了 1.77 倍，达到 40.8%^[89]。6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PD）在磷酸戊糖途径中参与 NADPH 的合成，为油脂合成提供所需还原力。Xue 等人在 *Phaeodactylum tricornutum* 中构建 G6PD 过表达，发现酶的 mRNA 丰度与酶活性均有增强，HADPH 提高，同时胞内油脂含量达到 55.7%，比野生型提高 2.7 倍^[90]。Avidan 和 Pick 研究得出，在 *Chlorella desiccata* 中大量合成油脂前，乙酰 CoA 合成酶（ACS）的转录水平有明显上调，此酶上调表示微藻对乙酸、乙醇等有机物利用效率提高，合成更多乙酰 CoA，为油脂合成提供大量底物^[91]。微藻细胞内油脂的合成还会引起丙二酸单酰 CoA、二酰基甘油酰基转移酶、苹果酸合成酶等关键酶基因表达的变化^[92-94]。

1.5 研究意义、内容与创新点

1.5.1 研究意义

近年来，对基于生物质的生物燃料研究与需求方面变得越来越重要。微藻细胞内富含脂质和碳水化合物，与植物相比，微藻所需营养需求更少、光合效率更高且生长速度相对更快，对于生物燃料的生产也越来越重要。在微藻的培

养阶段，多种有机底物都可以作为微藻生长和脂质积累的底物，乙酸、丁酸和乙醇可以很容易地被微藻利用和同化，并且可以通过三酰基甘油酯形成通道用于长链脂肪酸的生物合成。暗发酵过程中产生的废发酵液富含多种有机物，因而在治理环境污染和从有机酸中捕获能量并将其转化为生物燃料方面，使用发酵废液作为微藻生长与产油的培养基比其他培养基更值得尝试。含有重金属或微量金属离子的纳米颗粒如 TiO_2 ，对微藻的毒性与活性氧（ROS）的产生有关，诱导氧化应激、遮蔽光照影响光合作用。这种氧化应激效应与毒性能够减少藻类的生长速率并且作为胁迫条件使藻类油脂积累效率提高。

本研究分析了实验室产氢发酵废液中主要有机酸组分与浓度，从实验室现有藻种中选择出能够在产氢发酵废液中存活与细胞群体含油率最高的藻种。明确该藻种对废液中不同有机酸利用与耐受性。添加不同浓度与粒径的 TiO_2 NPs，从糖类消耗、TN、COD 去除等指标优化 TiO_2 强化产氢发酵液培养微藻产油体系。在最优添加条件下观察 TiO_2 NPs 对微藻细胞形态及生理生化代谢调控机制的影响，探明 TiO_2 NPs 强化小球藻利用产氢发酵液生长并产生油脂的关键酶基因表达水平的变化及代谢转录调控的机制，最终揭示 TiO_2 NPs 在分子水平上对微藻油脂积累的促进作用。

1.5.2 研究内容

（1）高耐受产氢发酵废液的微藻选择及各有机酸抑制浓度测定

收集 *Klebsiella* sp. 发酵产氢后的废液，分析产氢发酵废液的基本有机酸组成与浓度。从实验室现有的产油微藻藻种中进行选择，以不同浓度占比的废液为培养基，选择能够在产氢发酵液中较好生长的藻种以及培养微藻最佳的废液浓度。分析产氢废液各主要有机酸成分对微藻生长与油脂积累的影响。

（2）强化产氢发酵废液培养微藻产油的 TiO_2 NPs 条件优化

使用产氢发酵废液培养微藻，同时加入不同浓度、不同粒径的 TiO_2 NPs，测定微藻细胞数与油脂含量等指标，以此找出促进油脂积累最高的 TiO_2 NPs 添加浓度与粒径。分析微藻积累油脂的脂肪酸组成及各组分质量分数，计算油脂作为生物燃料的理化指标。

（3） TiO_2 NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的生理响应机制分析

在最优 TiO_2 添加条件下，对藻细胞进行形态、生理响应机制进行分析。采用透射电镜（TEM）观察 TiO_2 在微藻细胞表面及胞内的分布情况，并监测微藻生物量、细胞中叶绿素含量、ROS 产生速率、MDA 含量、抗氧化保护酶活 SOD、CAT 的动态变化，分析 TiO_2 纳米粒子添加对微藻生长和生理的影响。

（4） TiO_2 NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的转录组调控分析

在最优 TiO_2 添加条件下，找到经 TiO_2 强化处理后微藻转录组基因的差异表达。探究 TiO_2 NPs 强化微藻细胞的重要代谢途径中基因表达差异，并针对其中的关键酶基因进行 RT-qPCR 验证。以此提出 TiO_2 强化微藻细胞利用产氢发酵液生长以及油脂积累的代谢调控途径与光合作用调控机制。

1.5.3 创新点

（1）本研究用 *Klebsiella sp.* 产氢发酵后发酵液中剩余的残糖与高量有机酸培养藻种，发酵液中的残余糖能给藻种生长提供条件，藻种生长并在有机酸的添加下积累油脂。 TiO_2 NPs 能胁迫微藻生长，让藻种油脂产率提高。一是解决了 *Klebsiella sp.* 产氢发酵后的实验室发酵废液污染环境的问题，对废弃污染物再利用；二是利用污染物生产出高价值的油脂。

（2）纳米颗粒在近年已经成为生物质研究的热点话题，使用适当浓度的纳米颗粒有利于生物细胞的生长和目标产物的合成。目前，研究者对纳米颗粒促进细菌产氢、也能促进微藻产油有一定程度的研究。但是在利用实验室产氢发酵废液做培养基，再加入 TiO_2 强化微藻细胞油脂积累，耦合产氢与产油两个过程并针对 TiO_2 对微藻生理调控机制及转录组调控还研究不足。

第二章 高耐受产氢发酵废液的微藻选择及各有机酸抑制 浓度测定

2.1 引言

利用暗发酵产氢废液培养产油微藻，既可实现能源的充分转化，又能减少发酵废液对环境的影响，是生物质能源开发领域的研究热点之一。产氢细菌经暗发酵产氢后发酵液中会产生大量挥发性有机酸（VFAs）如甲酸、乳酸、乙醇等等，以及未被完全利用的残余还原糖。直接丢弃不仅会浪费很多资源，还会对环境造成一定污染。微藻有净化各种类型废水中污染物的能力，且有机酸作为异养碳源可直接被微藻利用并促进微藻积累更多油脂，这让微藻利用暗发酵产氢废液生长与产油成为可能。

本章对实验室保藏的小球藻进行孔板筛选，从中选择耐受产氢发酵废液并能在产氢发酵废液中快速生长并能快速积累油脂的小球藻。分析产氢发酵废液中的主要有机酸的成分与浓度，以及小球藻对于发酵废液中的各种有机酸利用与有机酸对小球藻的抑制情况。对微藻利用不同有机酸生长和油脂积累的特性进行探讨。

2.2 实验材料与仪器

选择保藏于安徽省工业微生物分子育种工程实验室的 11 株藻种，均分离于新疆塔里木盆地荒漠盐碱水域。

用于微藻活化与培养的培养基为改良的 BG-11 培养基，配方见附录表 1，使用药品纯度及生产厂家见附录表 2，115℃灭菌 20 min。实验中所用到的仪器设备见附录表 3。

产氢发酵废液是以稻草水解糖液为基质，经克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp. WL1316) 暗发酵产氢后的发酵液^[95]。发酵液经 4500 rpm 离心 20 min，取上清液 110℃灭菌 15 min 后，分装至塑料瓶中置于-20℃保存备用。每次使用前完全解冻混匀后按一定比例添加至改良的 BG-11 培养基中。

2.3 实验方法

将产氢发酵废液分别以 0%、25%、50%、75%、100%的体积百分比与改良 BG-11 培养基按比例混合，调整 pH 值为 7.5 后灭菌，得到不同浓度的产氢发酵培养基。各浓度培养基分装至无菌 24 孔板中，每孔 1.5 mL，各 3 个重复。按 10% 接种量接入微藻种子液进行培养，培养条件同种子制备。每天震荡孔板 1-2 次，6 d 后测定各处理藻细胞数与细胞荧光强度，从备选藻种中选择发酵废液中油脂积累最高的藻种，以及适宜微藻生长及产油的产氢发酵废液浓度。

配制添加不同梯度有机酸的改良的 BG-11 培养基，有机酸溶液在使用前 110℃ 20 min 灭菌，该培养基在 300 mL 培养罐中加入 50 mL，接种选择的耐受产氢发酵废液的微藻，接种量为 10% (v/v) 藻液，培养条件同活化，每 3 d 测定一次 COD、TN 与有机酸变化，测定最终的胞内油脂含量与油脂产量。培养周期为 12 d。

2.3.1 微藻藻种活化

在超净工作台上，用微藻专用接种环从实验室保藏藻种斜面中取适量微藻，在改良的 BG-11 固体培养基上进行平板三区划线，置于 25℃、光照强度为 5000 lx 的白光下光照培养箱中培养 7 d，光周期为 16 小时光照、8 小时黑暗。挑取长势较好的单藻落，再次在固体培养基上进行划线，培养 7 d。经两次活化后微藻细胞可达到较高的活性，可接入液体培养基培养种子液。

2.3.2 微藻种子液的制备与微藻生物量的测定

将三环活化好的微藻细胞接种到装有 50 mL 改良 BG-11 液体培养基的培养罐中，在 25℃ 下培养 5 d 后作为种子液。震荡混匀藻液每天 1-2 次。使用前，将种子液中的藻细胞数量调整为 10^8 cells/mL。

利用血细胞计数板对细胞计数。取适量藻液，用无菌水稀释适当的倍数后，每次取 10 μ L，在血细胞计数板计数重复三次。

2.3.3 化学需氧量与总氮的测定

使用重铬酸钾消解滴定法测定化学需氧量 (COD) [96]；

使用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮 (TN) [97]。

2.3.4 微藻细胞油脂含量的测定

(1) 利用流式细胞仪测定含油脂的微藻细胞占比：每次测定前将藻液用适量生理盐水稀释至 10^6 cells/mL，取 222 μ L 藻液，加 3 μ L 尼罗红染液与 75 μ L 二甲基亚砷，混匀后在 40°C 条件下恒温 10 min，6000 rpm 离心 10 min，再用无菌生理盐水漂洗细胞 3 次，重悬于 350 μ L 生理盐水中。过 300 目筛网后使用流式细胞仪在 488 nm 激发光条件下测定荧光强度，以未染色的微藻细胞为空白对照，荧光强度表示含油脂的微藻细胞的占比，即细胞群体的含油率，可以定性表示微藻自身细胞内的油脂含量^[98]。

(2) 微藻细胞油脂提取及胞内油脂含量的方法与计算^[99]：取 20 mL 藻液至 50 mL 离心管中，4000 rpm 离心 20 min，弃去上清液，用蒸馏水将湿藻体洗涤两次藻体后烘干，测得藻细胞干重；取同体积藻液离心洗涤后获得藻体，加入 4 mol/L 盐酸（1:10，m:V），沸水浴 3-5 min，立即冷却。冷却后加入盐酸等体积的甲醇与三氯甲烷（1:1，V:V），震荡混匀后离心，取下层用 0.15% NaCl 洗涤细胞，混匀离心后蒸发去氯仿后测得藻细胞油重。计算方法为：

$$\text{胞内油脂含量 (\%)} = \frac{\text{油重}}{\text{细胞干重}} \times 100\%$$

$$\text{油脂产量 (mg/L)} = \frac{\text{胞内油脂含量} \times \text{干重}}{\text{藻液体积}}$$

2.3.5 产氢发酵废液中主要有机酸的测定

使用高效液相色谱法测定产氢发酵废液中主要有机酸浓度，色谱柱选用 HPX-87H 有机酸柱（300×7.8 mm），检测器为二极管阵列（PDA）检测器，2D 通道吸光值为 254 nm，柱温为 60°C，流速 0.6 mL/min，进样体积 20 μ L，流动相为 5 mM H₂SO₄。根据有机酸标品制备标准曲线计算有机酸浓度。

2.3.6 产氢发酵废液中葡萄糖与木糖的测定

使用高效液相色谱法测定产氢发酵废液中葡萄糖与木糖浓度，色谱柱选用 HPX-87H 酸柱（300×7.8 mm），检测器为示差（RI）检测器，检测器温度为 40°C，柱温为 60°C，采样速率为 5 点/秒，流速 0.6 mL/min，进样体积 20 μ L，

流动相为 5 mM H₂SO₄。根据葡萄糖与木糖标品制备标准曲线计算糖浓度。

2.4 结果与讨论

2.4.1 产氢发酵废液主要化学成分分析

制备产氢发酵废液：使用木质纤维素水解液制成的培养液培养 *Klebsiella* sp. WL1316 并发酵产氢。图 2-1 表示 *Klebsiella* sp. WL1316 发酵产氢过程中氢气的日产量与积累产量。可以看出产氢菌在 5 d 的总产气量为 2997.29 mL/L，且在培养第 2 d 时日产气量最大。

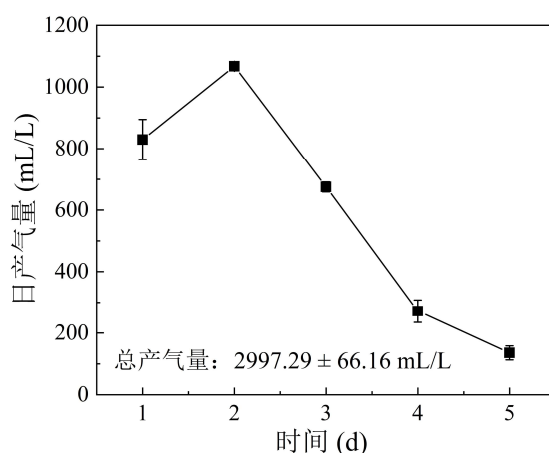


图 2-1: *Klebsiella* sp. WL1316 发酵产氢日产气量与积累产气量

Fig. 2-1: Daily and cumulative gas production for hydrogen production from fermentation of *Klebsiella* sp. WL1316

5 d 发酵产氢结束后，发酵废液经 4000 rpm 离心 20 min 取上清液，上清液抽滤并测定其中化学需氧量（COD）、总氮（TN）及主要有机酸组分的浓度，结果见表 2-1。从表中可以看出，产氢发酵废液中仍含有较高的有机物浓度，COD 高达 42459.3 mg/L，TN 浓度为 6038.4 mg/L。废液中主要的有机酸为甲酸、乙酸和乙醇，含量分别为 1198.81、5271.61、9279.12 mg/L，此外还有一定量的丁二酸和乳酸。在产氢发酵废液中还测得残余葡萄糖和木糖，分别为 203.79、4417.38 mg/L。废液 pH 值为 6.75。

表 2-1 *Klebsiella* sp. WL1316 产氢发酵废液中成分分析
Table 2-1 Analysis of constituents in the hydrogen-producing fermentation waste stream of *Klebsiella* sp. WL1316

测定指标	浓度 (mg/L)
化学需氧量 (COD)	42459.3 ± 147.1
总氮 (TN)	6038.4 ± 553.6
乳酸	159.06 ± 4.47
丁二酸	727.32 ± 4.04
甲酸	1198.81 ± 8.73
乙酸	5271.61 ± 7.04
乙醇	9279.12 ± 13.56
葡萄糖	203.79 ± 1.26
木糖	4417.38 ± 4.47
酸碱度 (pH)	6.75 ± 0.21

2.4.2 高耐受发酵废液的微藻藻种的选择

分别将 11 株藻种接入孔板中培养, 6 d 后测定藻种在不同比例产氢发酵废液中细胞生长情况与细胞荧光强度, 以此确定耐受产氢发酵废液且细胞群体含油率最高的藻种。图 2-2 (a) 为 *Chlorella* sp. DT025、DT0251、DT0253、DT0254 等 11 株藻在不同占比的产氢发酵废液中细胞数。从图中可以看出: 随着废液占比的升高, 细胞数逐渐减少, 这是由于发酵废液中含有大量的细菌产氢发酵后产生的有机酸, 过高的有机酸会对 *Chlorella* sp. 的生长形成胁迫条件, 从而抑制其的生长, 体现在微藻细胞数量减少^[100]。添加 25% 废液后, *Chlorella* sp. DT025 细胞数从 8.55×10^8 cells/mL 减少至 5.63×10^8 cells/mL, 比 DT0251、DT0254、DT0256 与 DT0261 细胞数少。

利用流式细胞仪定性检测微藻细胞群体的含油率, 图 2-2 (b) 为 11 株藻在不同废液占比条件下细胞群体含油率, 图中趋势可以看出: 与仅改良的 BG-11 培养基培养的微藻细胞相比, 加入 25% 占比的发酵废液后细胞群体的含油率更高, 是因为在一定胁迫条件下藻细胞会暂缓生长同时积累油脂以保证生存^[72]。DT025 有最高的含油率, 在改良 BG-11 培养基中含油率为 36.10%, 添加 25% 废液后提高至 79.28%。DT0256 (8.88×10^8 cells/mL) 与 DT0261 (7.19×10^8

cells/mL) 能够在 25%废液环境中更好的生长, 但两株藻的含油率比 DT025 低很多 (DT0256: 16.71%、DT0261: 13.49%)。综合可得: *Chlorella* sp. DT025 是能够在发酵废液中油脂积累最高的藻种。选择 *Chlorella* sp. DT025 作为后续测定其对有机酸的消耗与添加纳米颗粒条件优化的实验株。

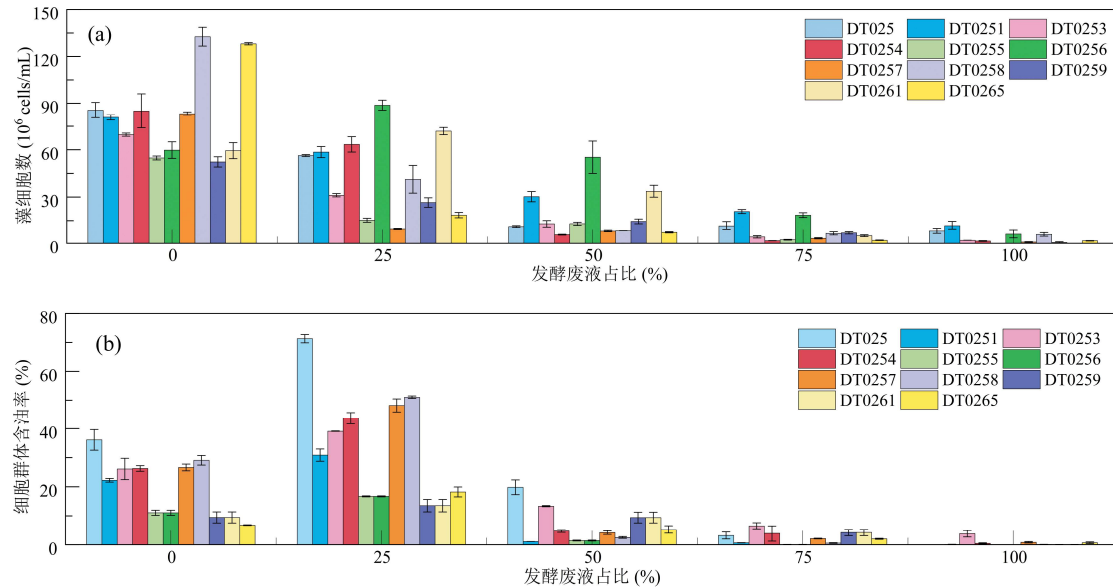


图 2-2 不同比例的发酵废液添加条件下藻种细胞数变化以及细胞群体含油率。(a) 为不同藻种在不同浓度发酵废液中在产氢发酵废液中藻细胞数; (b) 为不同藻种的细胞群体含油率
Fig. 2-2 Changes in cell number of microalgae and qualitative lipid content under different ratios of fermentation wastewater addition conditions. (a) The number of microalgae cells of different microalgal in different concentrations of fermentation wastewater in the hydrogen-producing fermentation wastewater; (b) Lipid content of cell populations of different microalgae

2.4.3 发酵废液中各有机酸组分对微藻生长与产油的影响

为探究产氢发酵废液中各有机酸组分对 *Chlorella* sp. DT025 生长与产油的影响, 在 BG-11 培养基中添加不同浓度的废液有机酸, 找出可被微藻利用或抑制微藻生长的有机酸成分以及的主要成分。根据表 2-1 分析的结果, 在改良 BG-11 培养基中添加不同浓度丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸和乙醇。

图 2-3 所示为乳酸对 *Chlorella* sp. DT025 的影响。添加不同浓度乳酸 (0、0.25、0.50、0.75、1.00 g/L) 后发现, 微藻细胞即生长被抑制, 当乳酸浓度达到 1.00 g/L 时, 培养前 9 d 细胞数几乎有没增长, 最终的细胞数也要远低于其余浓度处理, 说明此乳酸浓度已经超过微藻的耐受限度; 但 9 d 后细胞出现抑制效果减弱, 且细胞数有一定生长。结合细胞数、油脂产量及乳酸利用情况来看, 促进微藻产油的最佳乳酸添加浓度为 0.5 g/L, 抑制浓度为 0.75 g/L。在最低抑制浓

度添加条件下，最大藻细胞数为 8.58×10^8 cells/mL；COD 浓度从 7500.51 mg/L 降低至 4161.26 mg/L，去除率 44.52%；TN 浓度从 215.04 mg/L 降低至 81.52 mg/L，去除率 62.09%；胞内油脂含量为 14.03%，油脂产量为 356.67 mg/L。

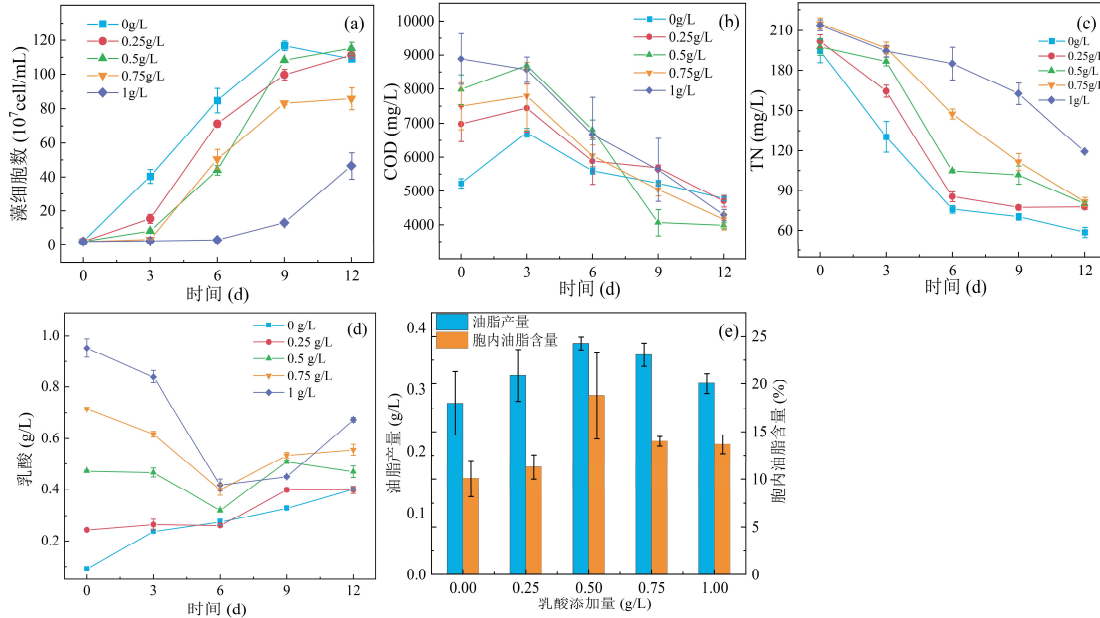


图 2-3 不同浓度的乳酸添加对 *Chlorella* sp. DT025 生长和产油的影响。藻细胞数变化(a)；

COD (b)；TN (c)；葡萄糖 (d)；木糖 (e)；油脂产量与胞内油脂含量 (f)

Fig. 2-3 Effect of different concentrations of lactic acid addition on growth and lipid production of the *Chlorella* sp. DT025. Changes in algal cell number (a); COD (b); TN (c); glucose (d); xylose (e); lipid production and intracellular lipid content (f)

图 2-4 为丁二酸对 *Chlorella* sp. DT025 生长与产油的影响。添加 0、50、100、150、200 mg/L 丁二酸后可以看出，丁二酸对微藻生长的抑制效果较强，在较低浓度即出现较大的抑制效果。在 100 mg/L 浓度范围内对微藻生长与油脂积累具有一定的促进效果，其中 50 mg/L 的浓度为添加最佳促进浓度。当丁二酸浓度超过 100 mg/L 时，开始对 *Chlorella* sp. DT025 产生抑制。在最低抑制浓度添加条件下，最大藻细胞数为 1.45×10^9 cells/mL；COD 浓度从 11123.54 mg/L 降低至 4913.48 mg/L，去除率为 55.83%；TN 浓度从 256.11 mg/L 降低至 82.65 mg/L，去除率为 67.73%。胞内油脂含量为 17.59%，油脂产量为 528.33 mg/L。

图 2-5 所示为甲酸对 *Chlorella* sp. DT025 的影响。添加 0、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 甲酸后，结果显示甲酸在 2.0 g/L 的浓度范围内对 *Chlorella* sp. DT025 的生长产油影响不大，但高浓度甲酸会影响微藻对 COD 与 TN 的去除。在培养基中添加 1.0 g/L 甲酸时，微藻的油脂积累比其他添加条件更高，为 628.33 mg/L。

添加 2.0 g/L 甲酸时，藻细胞数为 1.02×10^9 cells/mL；COD 浓度从 9994.06 mg/L 降低至 7204.33 mg/L，去除率 27.91%；TN 浓度从 438.51 mg/L 降低至 197.04 mg/L，去除率为 55.07%；胞内油脂含量与油脂产量为 24.60%、545.27 mg/L。

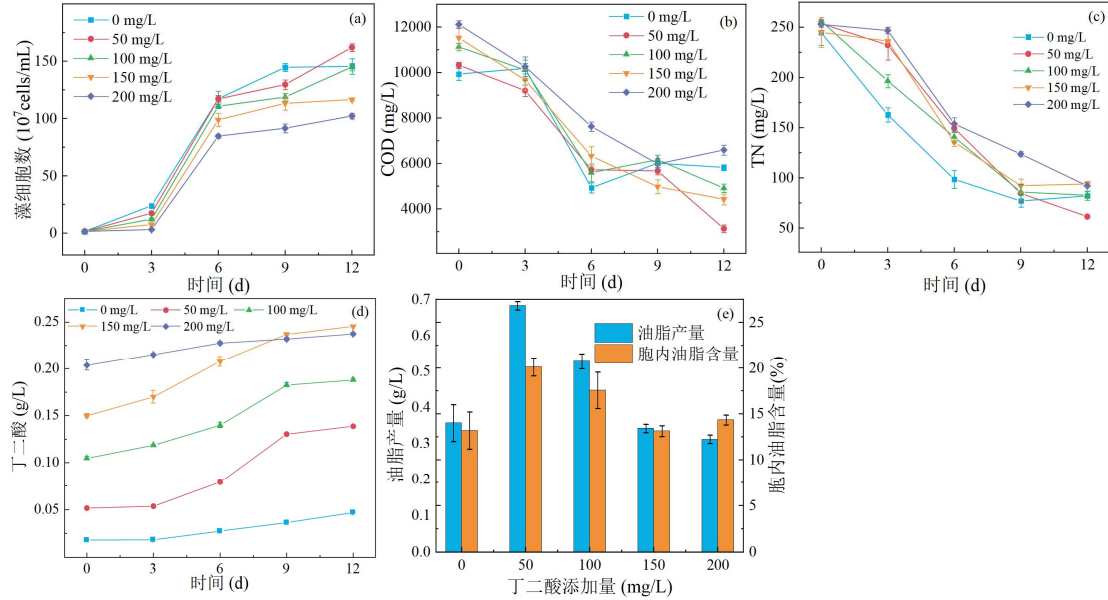


图 2-4 不同浓度的丁二酸添加对微藻 *Chlorella sp. DT025* 生长和产油的影响。藻细胞数变化 (a); COD (b); TN (c); 葡萄糖 (d); 木糖 (e); 油脂产量与胞内油脂含量 (f)

Fig. 2-4 Effect of different concentrations of succinic acid addition on growth and lipid production of the *Chlorella sp. DT025*. Changes in algal cell number (a); COD (b); TN (c); glucose (d); xylose (e); lipid production and intracellular lipid content (f)

图 2-6 所示为不同浓度的乙酸（0、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L）对 *Chlorella sp. DT025* 的影响。结果表明 1.0 g/L 浓度的乙酸对微藻生长产油具有较好的促进效果，且在 6 d 后较高浓度的乙酸（2.0 g/L）被几乎完全消耗。高于 1.5 g/L 的乙酸浓度下，藻细胞数有一定幅度的下降，最终的油脂积累显著降低。在 1.5 g/L 的乙酸添加浓度下，藻细胞数为 1.12×10^9 cells/mL；COD 浓度从 9258.23 mg/L 降低至 5179.92 mg/L，去除率 44.05%；TN 浓度从 375.57 mg/L 降低至 111.31 mg/L，去除率 70.36%；胞内油脂含量为 23.62%，油脂产量为 754.25 mg/L。

图 2-7 所示为乙醇对 *Chlorella sp. DT025* 的影响。结果显示，添加不同浓度乙醇（0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 g/L）培养 *Chlorella sp. DT025* 后发现 12.5 g/L 范围内的乙醇浓度对微藻生长产油不会带来过大的不利影响，且微藻对不同浓度添加的乙醇都有一定程度的利用能力。在 12.5 g/L 添加条件下，最大藻细胞数为 9.01×10^8 cells/mL；COD 浓度从 12352.86 mg/L 降低至 6509.19 mg/L，去除率 47.30%；TN 浓度从 405.17 mg/L 降低至 160.77 mg/L，去除率 60.32%；

胞内油脂含量为 757.82 mg/L，油脂产量为 23.31%。其中 5.0 g/L 的乙醇浓度下，微藻油脂产量与胞内油脂含量为最大，分别为 1.12 g/L 与 30.19%。

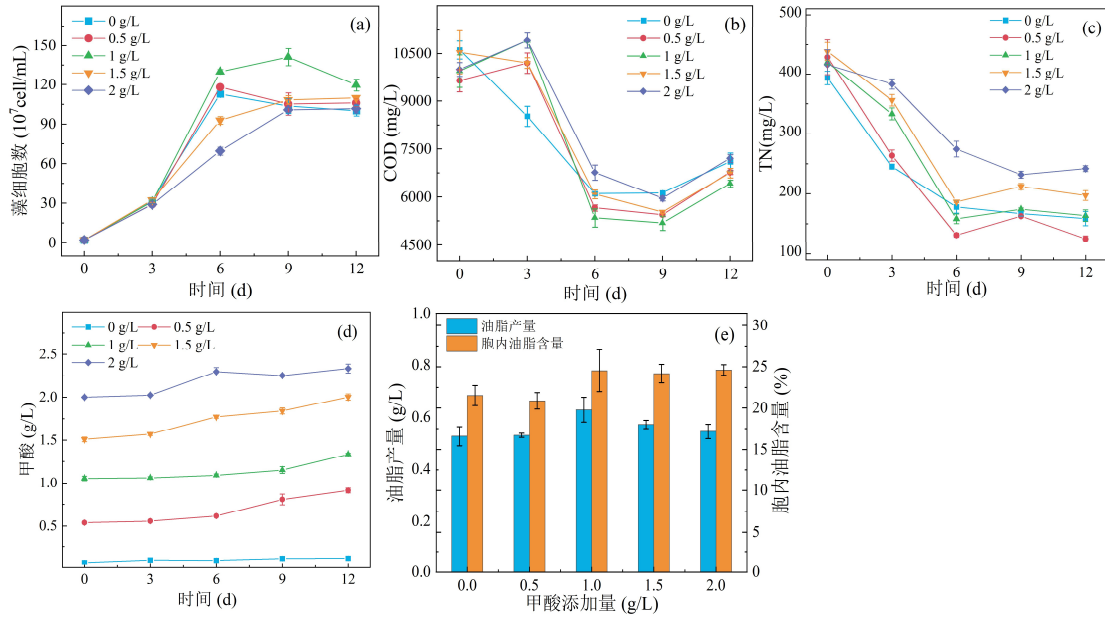


图 2-5 不同浓度的甲酸添加对 *Chlorella* sp. DT025 生长和产油的影响。藻细胞数变化(a); COD (b); TN (c); 葡萄糖 (d); 木糖 (e); 油脂产量与胞内油脂含量 (f)

Fig. 2-5 Effect of different concentrations of formic acid addition on growth and lipid production of the *Chlorella* sp. DT025. Changes in algal cell number (a); COD (b); TN (c); glucose (d); xylose (e); lipid production and intracellular lipid content (f)

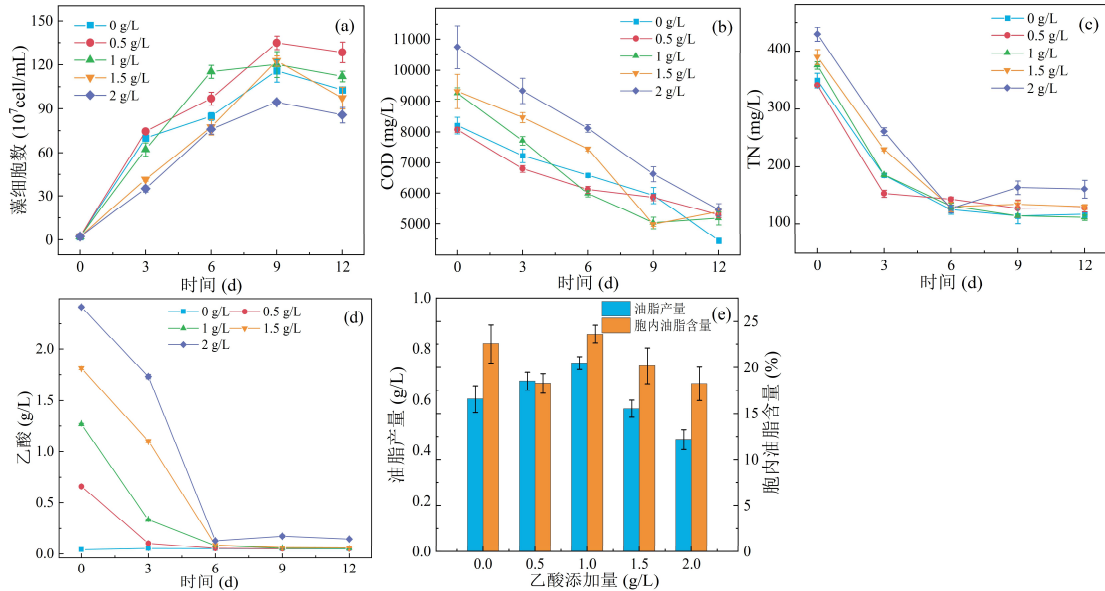


图 2-6 不同浓度的乙酸添加对微藻 *Chlorella* sp. DT025 生长和产油的影响。藻细胞数变化 (a); COD (b); TN (c); 葡萄糖 (d); 木糖 (e); 油脂产量与胞内油脂含量 (f)

Fig. 2-6 Effect of different concentrations of acetic acid addition on growth and lipid production of the *Chlorella* sp. DT025. Changes in algal cell number (a); COD (b); TN (c); glucose (d); xylose (e); lipid production and intracellular lipid content (f)

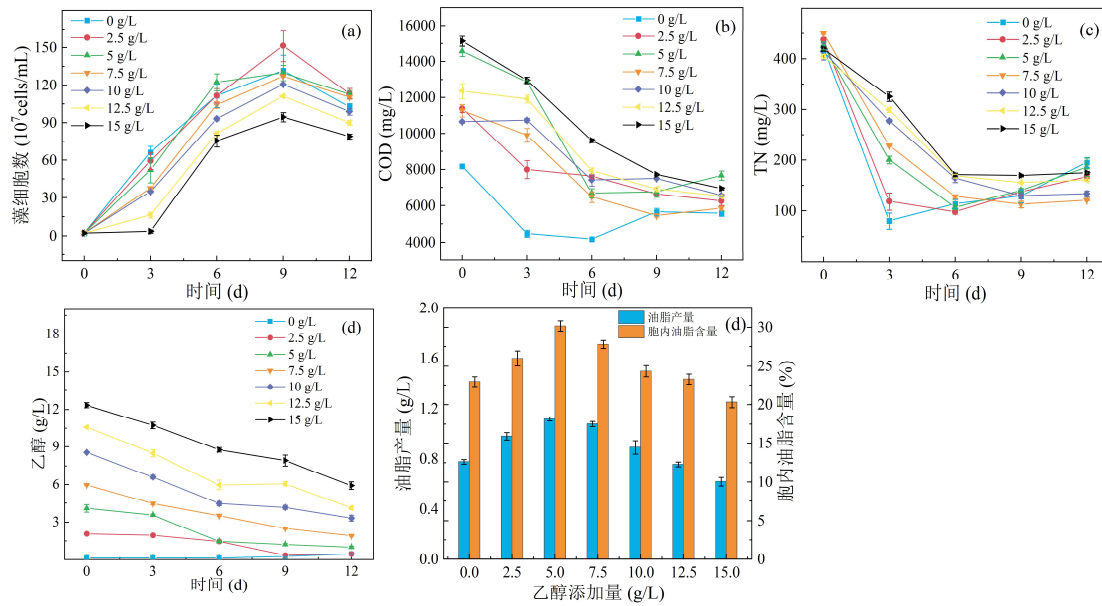


图 2-7 不同浓度的乙醇添加对微藻 *Chlorella sp. DT025* 生长和产油的影响。藻细胞数变化 (a); COD (b); TN (c); 葡萄糖 (d); 木糖 (e); 油脂产量与胞内油脂含量 (f)

Fig. 2-7 Effect of different concentrations of ethanol addition on growth and lipid production of the *Chlorella sp. DT025*. Changes in algal cell number (a); COD (b); TN (c); glucose (d); xylose (e); lipid production and intracellular lipid content (f)

结合图 2-3 至图 2-7 的结果可得, *Chlorella sp. DT025* 可有效利用乙酸, 在 6 d 可完全消耗, 对乳酸和乙醇也有一定的利用能力, 说明这三种酸是可以作为微藻的额外碳源用于微藻的生长与油脂积累, 有研究也曾证明微藻能够利用乙酸和乳酸作为碳源促进微藻油脂的积累^[101, 102], 但 *Chlorella sp. DT025* 不能利用丁二酸和甲酸。这是微藻能够在产氢发酵废液中生长与提高油脂积累的原因。表 2-2 对比了 *Chlorella sp. DT025* 对不同种类有机酸的最低抑制浓度以及各有机酸在 25% 产氢废液培养基中的浓度, 从表中可以看出, 培养基中的乳酸、甲酸、乙酸和乙醇四种有机酸含量均在其对微藻的促进范围内, 但不能被利用的丁二酸含量超出了微藻的耐受范围, 这可能是产氢废液对微藻生长产生抑制作用的重要因素, 降低产氢发酵废液中丁二酸浓度可以提高 *Chlorella sp. DT025* 在产氢发酵废液的生长与油脂积累能力。

测定产氢发酵废液中主要有机酸对微藻油脂积累与生长的影响后, 针对发酵废液中主要有机酸抑制浓度, 建议可以通过调控产氢细菌发酵产氢的代谢过程减少废液中丁二酸的浓度, 以期得到既能提高细菌产氢量又能被微藻利用提高油脂产量的调控方法。

表 2-2 *Chlorella* sp. DT025 对不同有机酸的耐受性比较Table 2-2 Comparison of the tolerance of *Chlorella* sp. DT025 to different organic acids

有机酸	最佳促进浓度	最低抑制浓度	25%废液培养基中浓度
乳酸	0.5 g/L	0.75 g/L	0.04 g/L
丁二酸	50 mg/L	100 mg/L	181.83 mg/L
甲酸	1 g/L	2 g/L	0.29 g/L
乙酸	1 g/L	1.5 g/L	1.32 g/L
乙醇	5 g/L	12.5 g/L	2.32 g/L

2.5 本章小结

利用 24 孔板筛选结合流式细胞仪检测的方法从实验室现有的 11 株藻种中选出高耐受产氢发酵废液的微藻，得出 *Chlorella* sp. DT025 能在 25% 发酵废液中正常生长并大量积累油脂，且细胞群体的含油率达到 79.28%。在改良 BG-11 培养基中添加不同浓度的有机酸后发现，乳酸、甲酸、乙酸和乙醇四种有机酸含量均在 *Chlorella* sp. DT025 的促进范围内，但丁二酸含量超出了 *Chlorella* sp. DT025 的耐受范围，这可能是产氢废液对其生长产生抑制作用的重要因素。建议可以通过调控产氢菌发酵产氢的代谢过程减少发酵废液中丁二酸的浓度，得到既能提高细菌产氢量又能被微藻利用提高油脂产量的调控方法。

第三章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油体系的优化

3.1 引言

在第二章中得出的结果发现, *Chlorella* sp. DT025 能高效利用产氢发酵废液中的乙酸与乙醇, 且能利用一定浓度的乳酸, 但不能利用甲酸与丁二酸, 且甲酸、乙酸、乳酸和乙醇四种有机酸含量均在 *Chlorella* sp. DT025 的促进范围内。但丁二酸含量超出了微藻的耐受范围, 这可能是产氢废液对微藻生长产生抑制作用的重要因素。可以利用纳米颗粒进一步强化微藻利用产氢发酵废液生长并积累油脂的过程。

溶解性有机物如有机酸容易吸附于纳米颗粒上, 吸附后改变纳米颗粒的物理化学性质^[103]。乳酸、丁二酸、尿素等等都能被纳米颗粒如 TiO₂ 吸附并聚集^[104]。TiO₂ 是已被证实可以降低培养液中有机酸浓度的纳米颗粒。在先前的研究中发现: 同时加入有机酸如乙醇与 TiO₂ 可以提高微藻产生的生物柴油的质量, 提高燃料的热值和粘性^[105]。同时 TiO₂ 对水生生物有毒害作用, 诱导氧化应激、遮蔽光照影响光合作用, 作为胁迫条件使藻类油脂产出效率提高^[49]。所以选择 TiO₂ NPs 添加至含高有机酸的产氢发酵废液培养微藻体系中, 以提高 *Chlorella* sp. DT025 的油脂产量与质量。

3.2 实验材料与仪器

实验用小球藻为实验室保藏 *Chlorella* sp. DT025, 改良的 BG-11 培养基、产氢发酵废液制备与同 2.2; 使用药品纯度及生产厂家见附录表 2; 实验中所用到的仪器设备见附录表 3。

3.3 实验方法

在 25%占比浓度的产氢发酵废液培养基中, 添加不同浓度 TiO₂ NPs (10、50、100、150、200 mg/L, 粒径 20 nm) 进行微藻培养, 周期 12 d, 每 3 d 测定微藻细胞数、培养基中 COD、TN、葡萄糖、木糖消耗以及各有机酸浓度等指标

确定 TiO_2 NPs 的最佳添加浓度。再以最佳添加浓度选出最佳的 TiO_2 添加粒径（粒径设置 5、20、50、100 nm）。根据微藻积累油脂的脂肪酸组成及含量，计算皂化值、碘值、十六烷值、不饱和度、长链饱和脂肪酸、冷过滤器堵塞点及高热值等生物柴油燃料特征值，评价其作为生物柴油的开发潜力。

3.3.1 TiO_2 NPs 的表征

在透射电子显微镜（TEM）下观察 TiO_2 NPs 表面形貌与分散性，电镜载网为普通铜网。

利用 X 射线衍射仪（XRD）确定 TiO_2 材料成分，扫描角度以 2θ 从 5° 到 95° 范围扫描，速率为 $10^\circ/\text{min}$ 。

3.3.2 脂肪酸质量分数的测定与组分含量的计算

微藻的藻种活化、种子液的制备、TN 与 COD 的测定、细胞油脂含量与产量，以及有机酸、葡萄糖与木糖测定具体方法见 2.3。

提取油脂后，取干燥后的油脂在硫酸催化下，将提取的脂质溶解于 2 mL 甲醇中，混匀并在 90°C 水浴中反应 2 h。冷却后，用正己烷洗涤反应混合物，并加入无水硫酸钠除水，加入 2 μL 内标（十五烷酸甲酯）。用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤，注入气相色谱仪进行分析。使用 HP-5 色谱柱（ $30\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.5\text{ }\mu\text{m}$ ）和 FID 检测器分析油脂中各组分脂肪酸占比。升温条件为 40°C 保持 10 min，然后以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 120°C ，再以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 190°C ， $3^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 240°C 保持 20 min。进样量 0.6 μL ，载气流速 0.8 mL/min，分流比 10:1，运行时间 80.167 min。计算方法为：

$$\text{脂肪酸质量分数}(\%) = \frac{\text{脂肪酸峰面积}}{\text{所有脂肪酸峰面积之和} - \text{十五烷酸甲酯峰面积}}$$

$$\text{组分含量}(\text{mg/L}) = \text{油脂产量} \times \text{脂肪酸质量分数}$$

3.3.2 生物柴油燃料特性的计算

皂化值（SN；mg KOH）、碘值（IN；g $\text{I}_2/100\text{ g}$ ）、十六烷值（CN）、不饱和度（DU；%）、长链饱和脂肪酸（LCSF；%）、冷过滤器堵塞点（CFPP； $^\circ\text{C}$ ）及高热值（HHV；MJ/Kg）等参考 Arora 等报道的方法进行计算^[106]。

3.4 结果与讨论

3.4.1 TiO₂ NPs 的表征

图 3-1 为 TiO₂ NPs 表征结果。TiO₂ NPs 是一种白色的无机化合物粉末，其有最佳的不透明性与较好的粘附力，不易起化学变化，对光照有较好的掩蔽作用。TEM 图（图 3-1 (b)）中可见 TiO₂ NPs 有良好的分散性，大小较为均一。XRD 衍射图谱（图 3-1 (c)）显示出了此 TiO₂ NPs 为锐钛矿型，有锐钛矿相特征峰（主峰为 25.4°、38.0°、48.0°与 54.7°）。锐钛矿型结构比一般 TiO₂ 有更大比表面积与孔径，更有利于化合物的表面吸附^[107]。

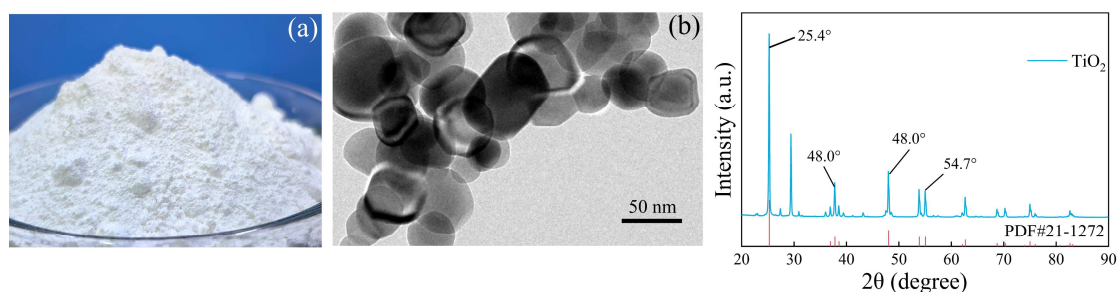


图 3-1 TiO₂ NPs 表征：形貌(a)、TEM 图(b)、XRD 衍射图(c)

Fig. 3-1 Characterization of TiO₂ NPs: morphology (a), TEM image (b), XRD diffractogram (c)

3.4.2 TiO₂ NPs 添加浓度条件的优化

在含有 25%占比的产氢发酵废液培养基加入不同浓度 TiO₂ NPs 培养 *Chlorella* sp. DT025 后发现，与未添加纳米颗粒相比，随着 TiO₂ 添加浓度提高，藻细胞数、COD 与 TN 的消耗、葡萄糖与木糖的消耗、油脂的产量与胞内油脂含量都出现了先升高后降低的趋势^[49]。添加少于 150 mg/L TiO₂ 都会对细胞的生长与糖分利用有促进作用，并均高于未添加 TiO₂ NPs 的条件。其中，添加 50 mg/L TiO₂ 时，藻细胞前期（0-6 d）生长速率提高明显，并在第 12 d 达到最大值（ 3.94×10^8 cells/mL）（图 3-2 (a)）；微藻对葡萄糖、木糖与 COD 的消耗也有了一定程度的提高（图 3-2 (b、d、e)），此时木糖利用率是各添加条件中最大值，从 3.32 g/L 降低至 1.31 g/L，利用率为 60.54%；COD 从 16481.34 mg/L 降低至 10825.78 mg/L，去除率达到 34.32%。总氮从 400.91 mg/L 降低至 124.91 mg/L，去除率达到 68.88%，是各添加条件中最大值（图 3-2 (c)）。同时添加 50 mg/L TiO₂ 后油脂产量与胞内油脂含量达到了各处理组的最大值（图 3-2 (f)），分别为

518.33 mg/L、25.25%。

当添加过高的量的 TiO_2 (200 mg/L) 时, 细胞数增长、*Chlorella* sp. DT025 对 TN 与木糖的利用均有明显的抑制, TiO_2 NPs 在添加过量时会影响微藻细胞对碳与氮的利用, 从而影响细胞生长与油脂积累^[50]。

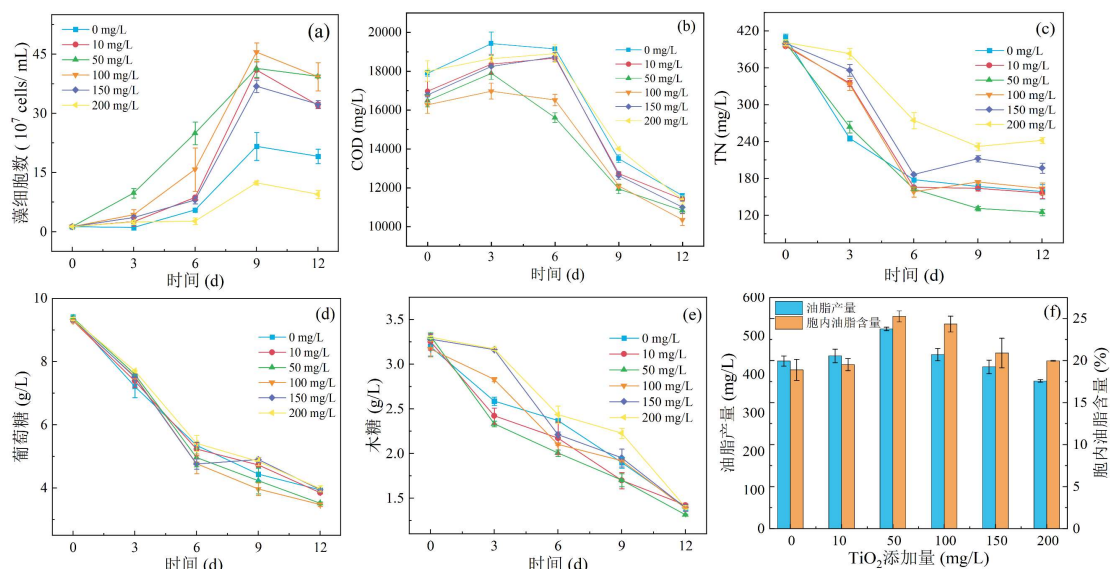


图 3-2 添加不同浓度的 TiO_2 NPs 对藻细胞数 (a)、COD (b)、TN (c)、葡萄糖 (d)、木糖 (e)、油脂产量与胞内油脂含量 (f) 的影响

Fig. 3-2 Effect of adding different concentrations of TiO_2 nanoparticles on microalgae cell number (a), COD (b), TN (c), glucose (d), xylose (e), lipid production and intracellular lipid content (f)

进一步测定了微藻培养过程中丁二酸、甲酸、乳酸、乙酸及乙醇等几种有机酸浓度的变化, 以及培养结束后的微藻油脂产量, 结果如图 3-3 所示。结果再次显示微藻 *Chlorella* sp. DT025 不能利用丁二酸和甲酸 (图 3-3 (a, c)), 且两种有机酸的浓度出现一定的升高。乳酸、乙酸与乙醇三种有机酸可被微藻迅速利用消耗 (图 3-3 (b, d, e)), 乳酸和乙酸在第 6 d、乙醇在第 3 d 时基本被消耗完。添加 TiO_2 NPs 后乳酸残余量相比未添加时降低, 其中 50 mg/L 添加量的剩余浓度为最低, 为 63.72 mg/L, 比未添加时降低 12.2 mg/L。以上说明添加适量的 TiO_2 会促进微藻对产氢发酵废液中的有机酸的利用, 降低发酵废液培养基中有机酸浓度。

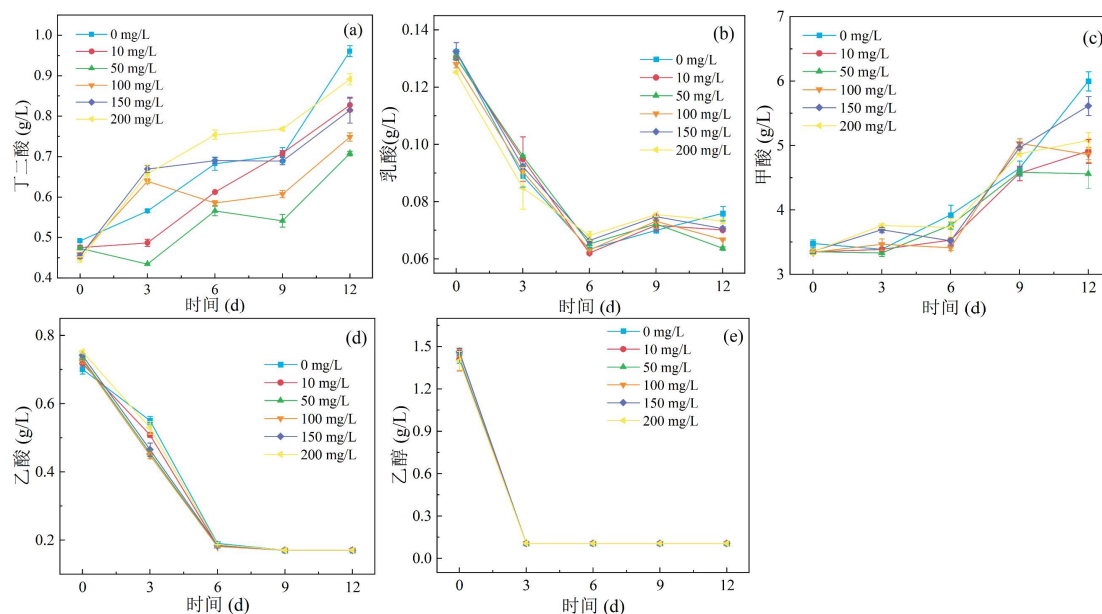


图 3-3 添加不同浓度的 TiO_2 NPs 对丁二酸 (a)、乳酸 (b)、甲酸 (c)、乙酸 (d)、乙醇 (e) 利用的影响

Fig. 3-3 Effect of addition of different concentrations of TiO_2 nanoparticles on the utilization of succinic acid (a), lactic acid (b), formic acid (c), acetic acid (d), and ethanol (e)

为探究不同浓度的 TiO_2 NPs 添加后 *Chlorella* sp. DT025 产生油脂的脂肪酸成分变化, 用气相色谱法测定甲酯化后的油脂, 结果如表 3-1 所示: 与未添加纳米颗粒的对照组相比, 添加了 50 mg/L TiO_2 NPs 后, C16-C18 的质量分数从 80.27% 提高至 83.05%。C16-C18 脂肪酸占比的增加能改善生物柴油的性能^[108]。C18:1 是生产生物柴油理想的单不饱和脂肪酸^[109], 添加了 50 mg/L TiO_2 后微藻积累的油脂中 C18:1 提高了 4.01%。此外, 添加 TiO_2 NPs 后, 在脂肪酸中检测到了不饱和脂肪酸 C20:2, 占总脂肪酸的 8.10%, C20:2 的增加有利于藻细胞的生存, 提高细胞的耐受性与细胞膜的修复^[110]。这些结果表明添加了 50 mg/L 的 TiO_2 NPs 后优化了脂肪酸成分并提高了 *Chlorella* sp. DT025 产生油脂作为生物燃料的特性。

在此基础上, 根据不同脂肪酸占比对各处理积累的油脂作为发动机柴油的燃料性能进行了分析, 评价微藻油脂作为生物柴油开发的潜力和特性。由表 3-2 可得出, 添加 50 mg/L TiO_2 后, *Chlorella* sp. DT025 产生的油脂中不饱和脂肪酸占比未添加纳米颗粒处理含量更高, 提高 9.57%, 是所有处理组的最大值, 因此热效率也更高; 十六烷值为 64.74, 高于我国石油产品国家标准规定的车用柴油标准 (不低于 49)^[111]。添加 50 mg/L TiO_2 的条件与对照组相比冷过滤器堵塞

点从 107.69℃提高至 122.60℃，更高的冷过滤器堵塞点更不易堵塞活塞环、发动机喷管和活塞环沟槽^[112]。综上，在产氢发酵废液培养 *Chlorella* sp. DT025 产油体系中，TiO₂的最佳添加浓度为 50 mg/L，此浓度下可有效促进微藻生长积累油脂，并改善油脂质量。

表 3-1 添加不同浓度的 TiO₂后废液培养 *Chlorella* sp. DT025 油脂脂肪酸质量分数 (%)

Table 3-1 Mass fraction (%) of each fatty acid of *Chlorella* sp. DT025 in the culture system of hydrogen-producing fermentation effluent after the addition of different concentrations of TiO₂

脂肪酸种类	TiO ₂ 添加浓度 (mg/L)					
	0	10	50	100	150	200
C11:0	2.76	0.27	1.17	1.71	1.29	7.28
C15:0	1.86	0.24	0.41	0.77	0.17	4.43
C15:1	2.53	1.20	0.52	1.14	1.35	7.11
C16:0	29.79	30.49	28.04	36.75	29.70	28.82
C16:1	6.49	6.26	5.95	4.54	6.07	3.46
C17:0	3.75	3.92	4.17	3.38	4.25	3.41
C18:0	23.72	21.24	24.36	16.71	23.40	17.60
C18:1	16.53	17.01	20.54	14.90	16.95	13.05
C20:0	12.59	11.11	6.76	15.65	11.17	10.71
C20:2	-	8.28	8.10	4.43	5.64	4.14

表 3-2 添加不同浓度 TiO₂后发酵废液培养体系中 *Chlorella* sp. DT025 油脂理化性质分析

Table 3-2 Physicochemical properties of *Chlorella* sp. DT025 lipid in the culture system of hydrogen-producing fermentation waste liquid after adding different concentrations of TiO₂

燃料性能指标	TiO ₂ 添加浓度 (mg/L)					
	0	10	50	100	150	200
SN (mg KOH)	207.26	202.92	204.04	205.24	204.20	212.59
IN (g I ₂ /100g)	23.02	35.08	36.91	25.43	30.82	28.06
CN	67.46	64.29	64.74	67.17	66.09	65.65
MUFA (%)	74.46	70.21	64.90	74.99	69.98	72.24
PUFA (%)	25.54	32.74	35.11	25.01	30.02	27.75
DU (%)	125.54	135.69	135.11	125.01	130.02	127.75
LCSF (%)	36.34	42.18	40.70	40.02	40.57	33.40
CFPP (°C)	107.69	127.65	122.60	120.27	122.15	97.65
HHV (MJ/Kg)	40.59	40.26	40.51	40.63	40.59	40.29
KV(mm ² /s)	1.85	1.85	1.84	1.84	1.84	1.84
ρ (g/cm ³)	0.88			0.91		

3.4.3 TiO₂ NPs 添加粒径条件的优化

选择 50 mg/L 的添加量，优化 TiO₂ 的不同粒径添加（5、20、50、100 nm）对 *Chlorella* sp. DT025 利用产氢发酵废液生长产油的影响。从图 3-4 可看出，随着 TiO₂ NPs 粒径的增加，对微藻生长及营养底物消耗的影响整体呈现先升高后降低的趋势。添加 TiO₂ NPs 粒径较小时，5 nm 和 20 nm 粒径对 *Chlorella* sp. DT025 生长具有显著的促进作用，同时提高了其对培养液中 COD、TN 的去除率，葡萄糖和木糖的利用率也得到一定程度的提高。其中 20 nm 粒径的效果为最好，20 nm 粒径 TiO₂ 添加后微藻细胞数最终达到所有处理组的最大值，为 9.05×10^8 cells/mL，此时葡萄糖与木糖利用率是各添加条件中最大值，葡萄糖从 9.11 g/L 降低至 2.09 g/L，利用率为 77.06%；木糖从 2.35 g/L 降低至 1.31 g/L，利用率为 44.26%；COD 从 20446.70 mg/L 降低至 14504.61 mg/L，去除率达到 29.06%；总氮从 541.84 mg/L 降低至 366.51 mg/L，去除率达到 32.36%；油脂产率与胞内油脂含量也达到其他粒径添加条件的最大值（620 mg/L 与 23.57%）。而 100 nm 粒径的 TiO₂ NPs 则对 *Chlorella* sp. DT025 生长和吸收利用营养物质产生了显著的抑制作用。

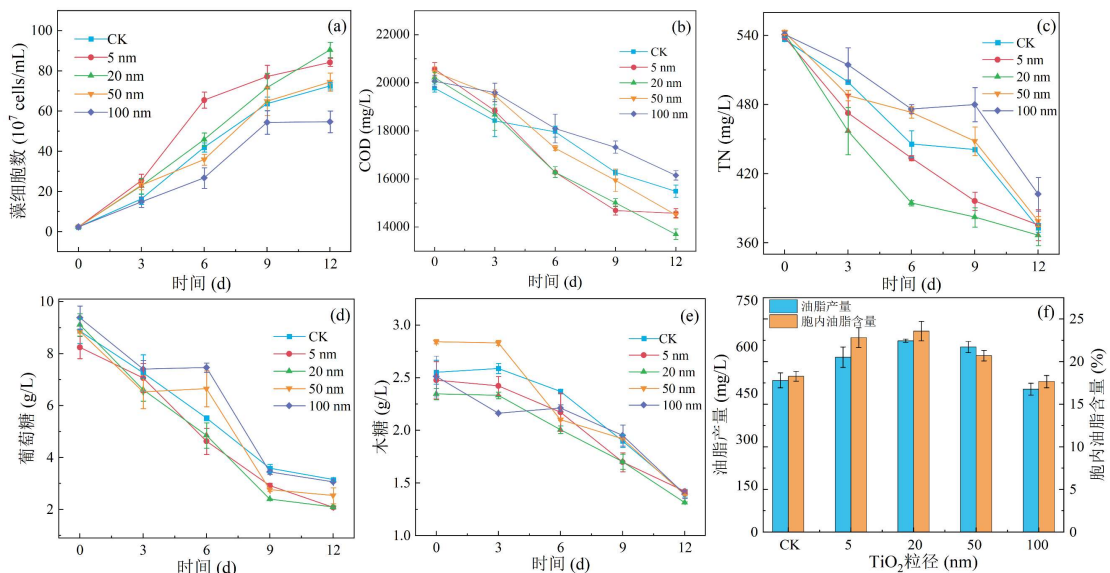


图 3-4 添加不同粒径的纳米 TiO₂ 对藻细胞数 (a)、COD (b)、TN (c)、葡萄糖 (d)、木糖 (e)、油脂产量与胞内油脂含量 (f) 的影响

Fig. 3-4 Effect of adding different particle size of TiO₂ nanoparticles on microalgae cell number (a), COD (b), TN (c), glucose (d), xylose (e), lipid production and intracellular lipid content (f)

图 3-5 为添加不同粒径 TiO_2 NPs 后丁二酸、甲酸、乳酸、乙酸、乙醇等有机酸浓度消耗结果。有机酸浓度整体变化趋势与图 3-2 相似，表明不同粒径 TiO_2 添加也会影响微藻对产氢废液中有机酸的消耗。添加 20 nm 粒径的 TiO_2 NPs 后废液中丁二酸在 12 d 时浓度最低。乙酸在 9 d 后被完全消耗；乙醇在 3 d 即被完全消耗，同时也提高了微藻在前 6 d 对乳酸的利用效率，但添加 100 nm 粒径的 TiO_2 后发现 *Chlorella* sp. DT025 对乳酸的利用有明显的抑制，此时乳酸剩余浓度为 141.93 mg/L，比未添加纳米颗粒处理组多 13.58 mg/L。所以粒径较大的 TiO_2 NPs 也会对微藻利用有机酸产生一定的抑制效果。

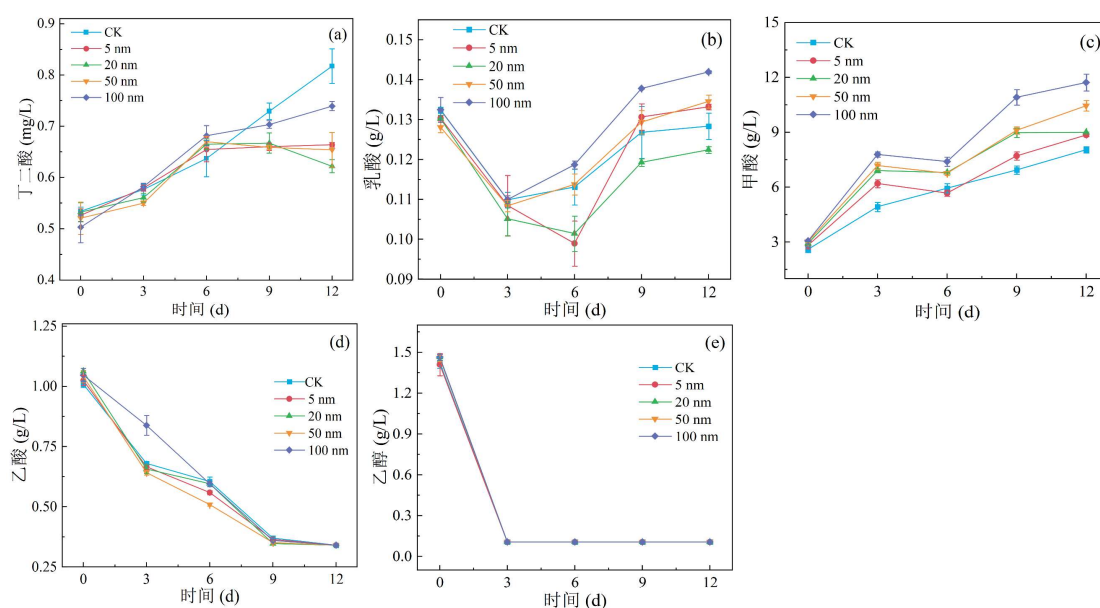


图 3-5 添加不同粒径的 TiO_2 NPs 对丁二酸 (a)、乳酸 (b) 甲酸 (c)、乙酸 (d)、乙醇 (e) 利用的影响

Fig. 3-5 Effect of addition of different particle size of TiO_2 nanoparticles on the utilization of succinic acid (a), lactic acid (b), formic acid (c), acetic acid (d), and ethanol (e)

添加不同粒径的 TiO_2 NPs 后 *Chlorella* sp. DT025 油脂的主要脂肪酸成分及相对含量、油脂的理化性能指标如表 3-3 与表 3-4 所示。从表中可以看出，20 nm TiO_2 的添加的 C18:0 和 C20:2 提高量较其他添加粒径条件最大，C18:0 从 31.85%提高至 33.85%；新增的 C20:2 的质量分数提高至 7.63%。相比其他粒径 TiO_2 添加处理组油脂的不饱和脂肪酸占比更高，为 16.12%。有更高的冷过滤器堵塞点，冷滤点从 61.90°C提高至 88.77°C。综上，认为 20 nm 粒径的 TiO_2 NPs 对微藻油脂产量与质量提高更大，所以优化后的 TiO_2 NPs 添加条件为：添加浓度 50 mg/L，粒径 20 nm。

表 3-3 添加不同粒径 TiO_2 后产氢发酵废液培养体系中 *Chlorella* sp. DT025 油脂脂肪酸质量分数 (%)

Table 3-3 Mass fraction (%) of each fatty acid of *Chlorella* sp. DT025 in the culture system of hydrogen-producing fermentation effluent after the addition of different particle size of TiO_2 NPs

脂肪酸种类	TiO_2 粒径 (nm)				
	0	5	20	50	100
C11:0	1.53	1.11	1.24	1.35	1.44
C15:0	1.40	5.48	4.76	2.48	6.84
C15:1	6.05	5.44	4.83	4.55	5.03
C16:0	46.43	42.69	37.19	38.54	38.65
C16:1	1.98	3.47	2.62	2.35	1.79
C17:0	7.69	6.18	4.90	6.04	5.03
C18:0	31.85	27.24	33.85	36.22	35.95
C18:1	1.79	1.60	1.42	1.33	1.37
C20:0	1.27	1.17	1.55	1.67	1.16
C20:2	-	5.61	7.63	5.46	2.74

表 3-4 添加不同粒径的 TiO_2 NPs 后产氢发酵废液培养体系中 *Chlorella* sp. DT025 油脂理化性质分析

Table 3-4 Physicochemical properties of *Chlorella* sp. DT025 lipid in the culture system of hydrogen-producing fermentation waste liquid after adding different particle size of TiO_2 NPs

燃料性能指标	TiO_2 粒径 (nm)				
	0	5	20	50	100
SN (mg KOH)	211.38	210.73	208.59	208.51	210.50
IN (g I_2 /100g)	9.29	18.89	20.53	16.47	12.11
CN	70.03	67.95	67.85	68.77	69.50
MUFA (%)	90.18	83.88	83.50	86.31	89.07
PUFA (%)	9.82	12.50	16.12	13.69	10.93
DU (%)	109.82	116.12	116.50	113.69	110.60
LCSF (%)	22.94	25.82	30.80	30.00	26.60
CFPP ($^{\circ}\text{C}$)	61.90	71.76	88.77	86.04	74.42
HHV (MJ/Kg)	40.62	40.51	40.57	40.63	40.62
KV (mm^2/s)	1.85			1.84	
ρ (g/cm^3)	0.88			0.91	

3.5 本章小结

本章在产氢发酵废液培养微藻产油体系中添加 TiO_2 NPs 强化 *Chlorella* sp. DT025 生长与油脂积累，并对纳米颗粒的添加条件进行优化。根据 *Chlorella* sp. DT025 对 COD 与 TN 的去除、糖与有机酸的利用、微藻油脂的产量与油脂燃料性能选择出 TiO_2 NPs 的最佳添加浓度与粒径。最优添加浓度为 50 mg/L，粒径 20 nm，此条件下 *Chlorella* sp. DT025 对糖的利用，总氮与 COD 的消耗都有一定的提高；油脂产量与胞内油脂含量分别达到 620 mg/L 与 23.57%；同时油脂脂肪酸中 C20:2 质量分数提高至 7.63%；其燃料特性也有所提高，有更高的冷过滤器堵塞点，冷滤点从 61.90℃提高至 88.77℃。综上可知一定浓度 TiO_2 NPs 的添加能有效促进微藻生长与油脂积累，并提高油脂作为生物柴油的质量。

第四章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的生理 响应机制

4.1 引言

在第三章中发现，添加 50 mg/L、粒径 20 nm 的 TiO₂ NPs 后 *Chlorella* sp. DT025 在产氢发酵废液中的细胞生长、对碳源的利用、油脂的产量与质量都有一定程度的提升。可能是细胞在受到 TiO₂ 胁迫后引起的抗氧化应激反应，提高细胞光合作用效率，改变细胞内油脂合成途径，不饱和脂肪酸含量更高的油脂产量更高^[113]，胁迫条件下的 *Chlorella* sp. DT025 细胞产生的油脂作为生物柴油的质量更高，有更好的燃料特性。为验证 TiO₂ NPs 添加后对 *Chlorella* sp. DT025 细胞内氧化应激与光合作用的影响，检测 *Chlorella* sp. DT025 细胞内叶绿素含量与抗氧化相关酶活性的变化。

本章在添加 TiO₂ NPs 的优化培养体系中，采用透射电镜（TEM）观察 TiO₂ 在 *Chlorella* sp. DT025 细胞表面及胞内的分布情况与细胞形态的变化，并测定微藻细胞中叶绿素含量变化，超氧化物歧化酶（SOD）与过氧化氢酶（CAT）抗氧化保护酶活的动态变化，活性氧（ROS）的产生速率与丙二醛（MDA）含量变化，分析 TiO₂ NPs 添加对 *Chlorella* sp. DT025 生长和生理的影响。

4.2 实验材料与仪器

实验用小球藻为实验室保藏 *Chlorella* sp. DT025，改良的 BG-11 培养基、产氢发酵废液制备与同 2.2；使用药品纯度及生产厂家见附录表 2；实验中所用到的仪器设备见附录表 3。

4.3 实验方法

设置处理组 CK 空白组：在改良 BG-11 培养基中培养 *Chlorella* sp. DT025；25%实验组：在 25%产氢发酵废液添加的 BG-11 培养基中培养 *Chlorella* sp. DT025；25%+NP 实验组：在 25%产氢发酵废液培养基中添加浓度 50 mg/L、粒径 20 nm TiO₂ NPs 培养 *Chlorella* sp. DT025。培养 6 d 后收集微藻细胞，在透射

电镜（TEM）下观察 TiO₂ NPs 在细胞表面及胞内的分布情况与细胞形态与大小变化。同时每 3 d 测定各处理组藻细胞数与叶绿素含量变化，SOD、CAT 抗氧化保护酶的活性变化，ROS 产生速率以及 MDA 含量的变化，周期 12 d。

4.3.1 微藻细胞透射电镜观察

取 10 mL 藻液 3500 rpm 离心 5 min，收集微藻细胞，使用无菌的 PBS 洗涤一次细胞，再次离心后，用 PBS 制备的 2.5%戊二醛固定微藻细胞，重悬细胞后为戊二醛的细胞悬液，转移至 1.5 mL 离心管中并在 4℃条件下固定 24 h，后续实验步骤交由江苏宁标科学技术有限责任公司进行包埋、染色与切片，并在透射电镜下观察观察 TiO₂ NPs 在 *Chlorella* sp. DT025 细胞表面及胞内的分布情况。

4.3.2 叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的测定

参考 Song 等人的方法^[114]，取 2 mL 藻液，在 4℃条件下 4500 rpm 离心 10 min，去除上清液后加入 2 mL 90%甲醇，震荡混匀 2 min 制成细胞悬液。悬液 60℃水浴 10 min，冷却后再次在 4℃条件下 4500 rpm 离心 10 min，取上清液 200 μL 加至 96 孔板中，在酶标仪中测定 665 nm 与 652 nm 的吸光值。计算叶绿素 a 与叶绿素 b 的公式为：

$$\text{叶绿素 a (mg/L)} = 16.82 A_{665} - 9.28 A_{652}$$

$$\text{叶绿素 b (mg/L)} = 36.92 A_{652} - 16.54 A_{665}$$

4.3.3 抗氧化保护酶活的测定

SOD 与 CAT 酶的活性使用超氧化物歧化酶试剂盒（NBT 法）与过氧化氢试剂盒（钼酸铵比色法）测定，ROS 产生速率使用线粒体活性氧产生速率试剂盒测定、MDA 含量使用丙二醛含量试剂盒测定。将每处理组细胞数调整至 10⁶ cells/mL 后移入 1.5 mL 离心管中，各加入 1 mL 酶提取液，在超声波细胞破碎仪中破碎细胞，并根据试剂盒说明书按顺序添加试剂后测定各酶活与含量。

4.4 结果与讨论

4.4.1 TiO₂ NPs 在微藻细胞内分布情况

在添加 50 mg/L、20 nm TiO₂ NPs 的优化条件下，对纳米颗粒在产氢发酵废液培养 *Chlorella* sp. DT025 细胞后 TiO₂ NPs 在细胞表面及细胞内的分布情况进

行透射电镜 (TEM) 观察, 结果如图 4-1 所示。在三组处理组条件下, 可以看到空白对照组 CK 为正常生长的微藻, 大小约为 $4.5 \times 5.1 \mu\text{m}$ 。藻细胞结构完整, 细胞膜与细胞壁结合紧密, 淀粉粒较多, 可以在细胞内看到油脂滴 (图 4-1 (a))。加入 25% 的产氢发酵废液后, 细胞明显变小, 大小约为 $4.3 \times 4.1 \mu\text{m}$, 且出现发育较差的细胞, 淀粉粒的数量也有明显的减少, 细胞器结构更加不清晰 (图 4-1 (b))。在含有 25% 产氢发酵废液的培养基中加入 50 mg/L、20 nm 的 TiO_2 NPs 后, 能观察到 TiO_2 NPs 出现在细胞外并附着于细胞周围, 且有一部分 TiO_2 NPs 进入到藻细胞的细胞壁中; 还观察到细胞壁的完整性受到破坏并有一定改变, 出现明显的质壁分离的现象, 说明 TiO_2 NPs 会对微藻细胞造成一定的损伤; 细胞大小与未添加纳米颗粒的 25% 处理组相差不大, 大小约为 $4.3 \times 4.3 \mu\text{m}$ (图 4-1 (c))。 TiO_2 NPs 在电镜图中体积大于 20 nm, 可能是由于 TiO_2 NPs 在培养基溶液中产生团聚。

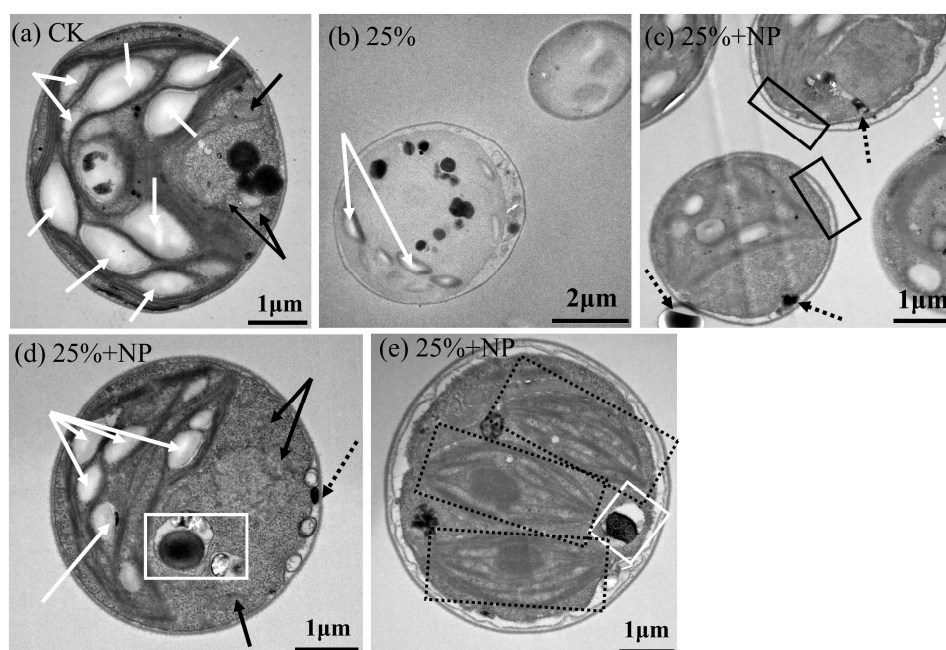


图 4-1 BG-11 培养基中培养 (CK)、25% 产氢发酵废液中培养 (25%) 与在 25% 产氢发酵废液中加入 50 mg/L 粒径 20 nm 的 TiO_2 NPs 培养 (25%+NP) 条件下, 培养 6 d 后 *Chlorella* sp. DT025 后 TEM 照片

Fig. 4-1 TEM photographs of *Chlorella* sp. DT025 after 6 d of incubation in BG-11 medium (CK), in 25% hydrogen-producing fermentation wastewater (25%) and in 25% hydrogen-producing fermentation wastewater with 50 mg/L TiO_2 of 20 nm particle size (25%+NP).

注: 图中细胞内白箭头为淀粉粒; 黑箭头为油脂滴; 白虚线箭头为细胞破损; 黑虚线箭头为纳米颗粒; 黑方框为质壁分离; 白方框为空泡结构; 虚线方框为纺锤体。

图 4-1 (d) 发现在加入 TiO_2 NPs 的处理组细胞内出现空泡结构，而在 CK 组与 25% 处理组中并未见到。因此可以判断出空泡结构主要由 TiO_2 NPs 造成。推测可能是微藻细胞对 TiO_2 NPs 的胞吞作用；或 TiO_2 NPs 进入细胞内后，被 TiO_2 NPs 伤害的细胞进行胞吐作用引起^[115]，但仍有较多淀粉粒与油脂滴的积累。图 4-1 (e) 是微藻细胞进行有丝分裂的时期，可见出现明显的多个纺锤体，说明添加 TiO_2 NPs 后仍然有较好的细胞活性。

4.4.2 添加 TiO_2 NPs 后微藻细胞内抗氧化酶活变化

图 4-2 比较了 *Chlorella* sp. DT025 在改良 BG-11 培养基中培养 (CK)、25% 产氢发酵废液中培养 (25%) 与在 25% 产氢发酵废液中加入 50 mg/L 粒径 20 nm 的 TiO_2 NPs 培养 (25%+NP) 三种培养体系条件下微藻细胞数变化 (图 4-2 (a))、细胞内的叶绿素 a (图 4-2 (b)) 与叶绿素 b (图 4-2 (c)) 含量变化，发现受产氢发酵废液胁迫，培养 6 d 前微藻的藻细胞数与叶绿素含量相比对照组 (CK) 有降低趋势。叶绿素含量在第 6 d 的抑制效果明显，9-12 d 则有较大程度的恢复，说明随时间的推移，产氢发酵废液对微藻的抑制效果减弱，但始终对微藻叶绿素的合成存在抑制作用。与未加入 TiO_2 NPs 并在发酵废液中培养的微藻 (25%) 相比，观察到添加 TiO_2 的处理组在生长后期藻细胞数与叶绿素含量的提升量比仅发酵废液培养微藻时更大，在 9-12 d 时叶绿素水平增加到与对照处理相接近水平，从 1.06 mg/L 提高至 28.34 mg/L，比未添加 TiO_2 的对照组提高了 4.53 mg/L，且在 12 d 时叶绿素 a 含量要高于对照组 (图 4-2 (b))；叶绿素 b 从 1.54 mg/L 提高至 11.25 mg/L，在后期 9-12 d 可发现添加 TiO_2 后叶绿素 b 有明显提高，比未添加 TiO_2 时提高 3.91 mg/L，达到与对照组接近的水平。说明 TiO_2 NPs 的添加一定程度促进了微藻叶绿素的合成，从而促进微藻细胞的生长与油脂积累。Morelli 等人在实验中也证实添加 TiO_2 NPs 后微藻叶绿素含量提高^[116]。

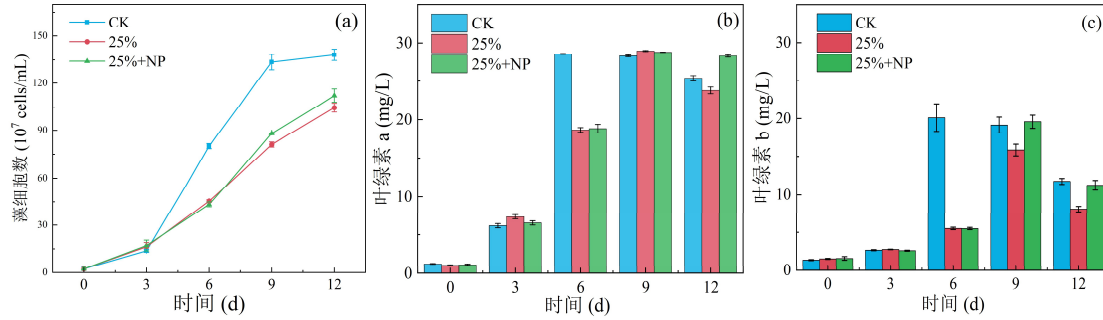


图 4-2 BG-11 培养基中培养 (CK)、25%产氢发酵废液中培养 (25%) 与在 25%产氢发酵废液中加入 50 mg/L 粒径 20 nm 的 TiO_2 NPs 培养 (25%+NP) 条件下微藻生理指标的变化：藻细胞数 (a)、叶绿素 a (b)、叶绿素 b (c)

Fig. 4-2 Changes of microalgae physiological indexes: microalgae cell number (a), chlorophyll a (b), chlorophyll b (c) under the conditions of incubation in BG-11 medium (CK), incubation in 25% hydrogen-producing fermentation wastewater (25%), and incubation in 25% hydrogen-producing fermentation wastewater with the addition of 50 mg/L TiO_2 NPs with a particle size of 20 nm (25%+NP)

图 4-3 中比较了 ROS 产生速率、MDA 含量、SOD 与 CAT 活性的变化差异，体现出 *Chlorella* sp. DT025 在不同处理条件下的氧化应激水平。在 25%产氢发酵废液培养条件下，受产氢废液胁迫的微藻细胞内 ROS 产生速率大幅增加，其中第 3 d 时在废液中的 ROS 产生速率达到 $9.63 \text{ u/s}/10^7 \text{ cells}$ 并在生长后期一直维持较高水平（图 4 (a)）。过多的 ROS 会引起膜质过氧化，藻细胞为避免损伤就会增强 SOD 活性。然而反应微藻细胞遭受胁迫伤害程度的 MDA 含量却相比不添加产氢废液的对照组更低，这是由于 SOD 活性的提高，减轻了产氢发酵废液对 *Chlorella* sp. DT025 的胁迫与损伤，对应在第 9 d 时含产氢发酵废液的处理组中 SOD 活性显著提高至 $8.53 \text{ U}/10^7 \text{ cells}$ （图 4 (c)）。SOD 酶活性提高导致产生的 H_2O_2 更多，引起酶 CAT 活性在 12 d 的提高（图 4 (d)）。同时添加废液与 TiO_2 培养微藻后，微藻细胞出现与仅发酵废液添加后相似的变化趋势。但 3-6 d 时 MDA 含量有较大的提高，说明 TiO_2 的添加在前期确实对 *Chlorella* sp. DT025 的造成损伤，Li 等人在添加 TiO_2 后也发现了微藻细胞的过氧化损伤^[117]，但在后期（9-12 d）MDA 含量降低，说明 TiO_2 的添加在后期减轻了细胞的过氧化损伤，细胞有一定程度的恢复。而 SOD 和 CAT 活性均有一定程度降低，是 TiO_2 在前期引起微藻细胞膜质过氧化胁迫，并影响到抗氧化保护酶活性。结合微藻细胞数变化与叶绿素含量变化可得出藻的生长并未受到强烈的抑制，说明 TiO_2 的胁迫在 *Chlorella* sp. DT025 耐受范围内。而正是因为有 TiO_2 NPs 增加的胁迫，刺

激了 *Chlorella* sp. DT025 胞内油脂的积累，最终产油量得到提高。

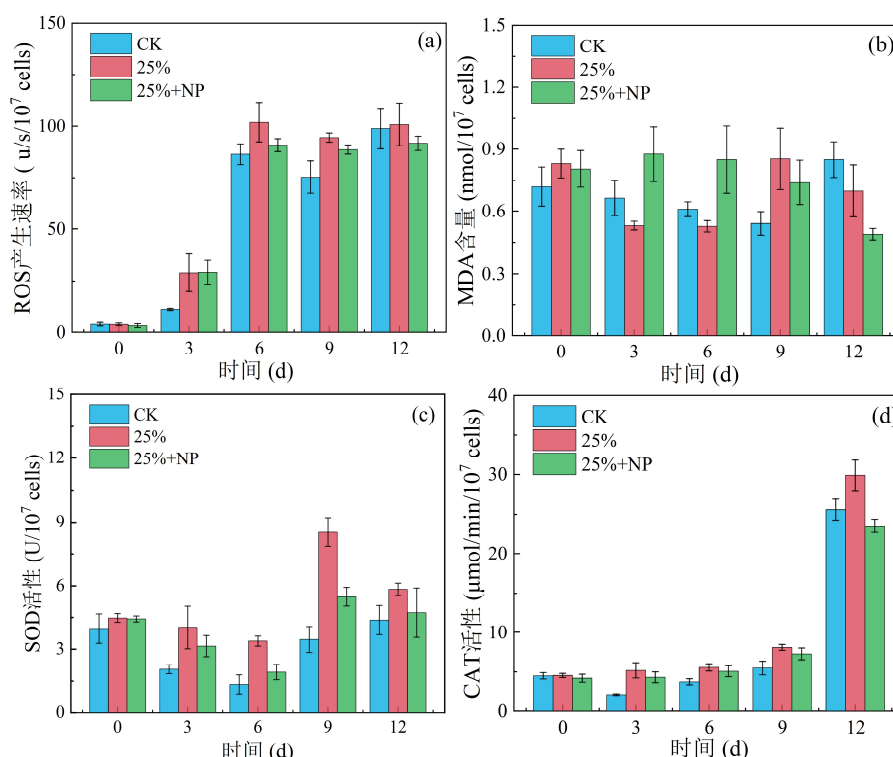


图 4-3 BG-11 培养基中培养 (CK)、25%产氢发酵废液中培养 (25%) 与在 25%产氢发酵废液中加入 50 mg/L 粒径 20 nm 的 TiO_2 培养 (25%+NP) 条件下微藻生理指标的变化：ROS 产生速率 (a)、MDA 含量 (b)、SOD 活性 (c)、CAT 活性 (d)

Fig. 4-3 Changes in physiological parameters of microalgae cultured in BG-11 medium (CK), 25% hydrogen production fermentation broth (25%), and 25% hydrogen-producing fermentation wastewater with 50 mg/L TiO_2 of 20 nm particle size (25%+NP): rate of ROS production (a), MDA content (b), SOD activity (c), and CAT activity (d)

4.5 本章小结

本章通过在含 25%产氢发酵废液中培养 *Chlorella* sp. DT025，添加 TiO_2 NPs 后其在细胞表面及细胞内的分布情况形态与微藻细胞大小变化的观察，以及对添加 TiO_2 NPs 后微藻细胞内抗氧化酶活的变化测定，揭示出 TiO_2 NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油体系的生理响应机制。结果发现产氢发酵废液的添加会影响细胞的大小，导致细胞发育较差。加入 TiO_2 NPs 后可见其附着于 *Chlorella* sp. DT025 细胞周围，细胞大小无明显变化，但出现质壁分离现象，且由于微藻对 TiO_2 胞吞作用， TiO_2 在细胞内形成了空泡结构，说明该条件下 TiO_2 NPs 对微藻细胞造成一定的损伤。

细胞内抗氧化酶活性变化的结果显示： TiO_2 NPs 的添加在一定程度上促进

了叶绿素的合成，叶绿素 a 比未添加 TiO_2 的对照组提高了 4.53 mg/L，且在 12 d 时叶绿素 a 含量要高于对照组；叶绿素 b 比未添加 TiO_2 时提高 3.91 mg/L，达到与对照组接近的水平，叶绿素的提高促进了微藻细胞的生长与光合作用。受 TiO_2 NPs 与产氢废液胁迫的影响，细胞内 ROS 产生速率提高。 TiO_2 NPs 使 MDA 含量在培养前期提高，而 SOD 和 CAT 酶活性均有一定程度降低，表明 TiO_2 加重藻细胞膜质过氧化胁迫，影响了抗氧化保护酶活性。 TiO_2 NPs 的添加同时促进了微藻生长，说明其对微藻的胁迫在耐受范围内， TiO_2 增加的胁迫刺激微藻积累油脂。以上结果为进一步分析 TiO_2 NPs 强化产氢发酵废液培养 *Chlorella* sp. DT025 产油的转录组调控提供表型结果。

第五章 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液培养微藻产油的转录组调控分析

5.1 引言

转录组学是探究微生物在某一特殊条件下特定时刻基因转录的高通量检测方法，在 RNA 水平分析基因的功能与表达能力，能真实地反应微生物复杂的动态代谢过程变化^[118]。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 准确性高、特异性强、灵敏度高、速度快，是目前应用最广泛的基因表达分析工具之一，利用 RT-qPCR 技术可以验证转录组基因表达结果的准确性与可靠性^[119]。第四章结果表明：添加 TiO₂ NPs 能提高 *Chlorella* sp. DT025 的细胞数、微藻细胞内氧化应激水平与胞内油脂含量。为进一步探究产氢发酵废液培养基中培养的 *Chlorella* sp. DT025 在添加 TiO₂ NPs 后光合作用与油脂合成的代谢机制变化，选择从转录水平研究小球藻细胞内的光合作用与油脂合成关键酶基因的表达差异。

本章利用 Illumina Hisq 2500 测序平台构建 cDNA 文库后进行高通量测序，基于 GO 数据库和 KEGG 数据库对匹配基因及其功能进行注释。根据注释结果选择出表达差异的基因，采用 RT-qPCR 方法对有较大差异的基因进行表达量差异验证分析，以进一步揭示 *Chlorella* sp. DT025 响应 TiO₂ NPs 并促进油脂积累的机理，为后续对该藻的基因工程与代谢工程改造提供参考。

5.2 实验材料与仪器

实验用小球藻为实验室保藏 *Chlorella* sp. DT025，改良的 BG-11 培养基、产氢发酵废液制备与同 2.2；使用药品纯度及生产厂家见附录表 2；实验中所用到的仪器设备见附录表 3。

5.3 实验方法

设置对照组为 25%产氢发酵废液添加的改良 BG-11 培养基（25%处理组），实验组为在含 25%发酵废液的培养基中再加入 20 nm 50 mg/L 的 TiO₂ NPs（25%+NP 处理组），接入 *Chlorella* sp. DT025 种子液培养条件同 2.3.1。培养至

第 6 d 对数生长期后提取总 RNA，反转录为 cDNA 进行原始测序数据的质控与拼接。对拼接的基因进行基因功能注释与基因表达分析，主要分析 GO 数据库与 KEGG 数据库的基因注释与表达的结果。根据 KEGG 通路绘制主要代谢途径示意图，分析上下调基因在固碳与产油代谢通路中的重要位置。

5.3.1 *Chlorella sp.* DT025 总 RNA 的提取检测与反转录

分别取 10 mL 实验组与对照组的藻液，经 9000 rpm 离心 2 min，弃去上清液得到湿藻体。向已灭菌并冷冻过的研钵中加入湿藻体，再加入适量液氮后快速充分研磨，得到粉末状藻体。用 EasyPure[®] Plant RNA Kit 试剂盒提取两组微藻的总 RNA，Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒反转录单链 cDNA。取 5 μ L 提取的 RNA 进行凝胶电泳检测，制备凝胶时使用 0.2 g 琼脂糖溶于 20 mL TAE 缓冲液中，加热使其完全溶解，静置冷却后使用。使用 5000 bp Marker 做长度参比验证提取 RNA 长度。

5.3.2 文库的构建，质控与拼接

将 3500 rpm 20 min 离心并快速冻干的两组藻细胞样品送至南京凌恩生物科技有限公司进行转录组测序。使用软件 trimmomatic 对原始测序数据进行过滤，得到高质量的测序数据：去除 reads 中的接头序列与未插入片段的 reads；修剪序列末端质量值小于 20 的碱基，整条剔除质量值小于 10 的碱基；去除含 N 比率超过 10% 的 reads；舍弃长度小于 75 bp 的序列。使用 Trinity 软件对质控后测序序列数据 (clean reads) 进行从头组装。组装后将得到的高质量序列与前面所得的拼接结果进行比对 (mapping)。

5.3.3 基因功能注释与差异基因表达分析

将组装的序列分别与 NCBI 蛋白序列数据库 (NR)、蛋白序列数据库 (Swiss-Prot)、真核生物直系同源数据库 (eggNOG)、KEGG 基因功能注释系统 (KEGG)、GO 基因功能分类系统 (GO) 进行比对，从而获得预测基因的注释信息。主要对 GO 数据库与 KEGG 数据库的基因功能注释。使用 egg-nog-mapper v5.0 软件分析 GO 数据库所得基因数据；使用 diamond 软件分析 KEGG 数据库所得基因数据。使用 edgeR 软件进行基因表达分析与差异分析，表达差

异基因筛选的阈值为 $|\log FC| \geq 1$ 与 $FDR \leq 0.05$ 。根据 GO 与 KEGG 数据库注释信息统计并分析上下调基因的主要功能与代谢通路。分析后使用 Origin 2019b 进行作图。

5.3.4 差异表达关键酶基因 RT-qPCR 验证

以 cDNA 作为模板，使用 PCR 试剂盒 $2 \times \text{San Taq PCR Mix}$ 对引物进行 PCR 扩增，通过琼脂糖凝胶电泳验证扩增引物的特异性。体系为： $2 \times \text{PCR Master}$ 12.5 μL ，上下游引物各 1.5 μL ，cDNA 1.5 μL ，ddH₂O 8 μL ，总体积为 25 μL 。PCR 扩增程序为：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，退火 60 s，72℃延伸 60 s，35 个循环；72℃反应 10 min。根据所设计引物中 GC 含量计算退火温度。取 5 μL 经 PCR 扩增的引物进行凝胶电泳检测，制备凝胶时使用 0.2 g 琼脂糖溶于 20 mL TBE 缓冲液中，加热使其完全溶解，静置冷却后使用。使用 5000 bp Marker 做长度参比验证扩增后 DNA 长度。

将 cDNA 稀释一定倍数，使用荧光定量 PCR 试剂盒 TB Green[®] Premix ExTaq[™] II 进行 RT-qPCR 分析。RT-qPCR 体系为： $2 \times \text{TB Green Premix ExTaq II}$ 12.5 μL ，上下游引物各 1 μL ，cDNA 2 μL ，ddH₂O 8.5 μL ，总体积为 25 μL 。RT-qPCR 两步法扩增程序为：Step 1：95℃预变性 30 s；Step 2：PCR 反应，95℃变性 5 s，退火 30 s，40 个循环；95℃反应 5 s，60℃反应 30 s。

差异基因表达倍数计算公式为：

$$\Delta\Delta C_t = (C_{q,\text{target}} - C_{q,\text{Action}})_{\text{目的基因}} - (C_{q,\text{target}} - C_{q,\text{Action}})_{\text{内参基因}}$$

$$\text{Fold} = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

其中： $C_{q,\text{target}}$ 和 $C_{q,\text{Action}}$ (目的基因) 指 25%+NP 处理组和 25%处理组中不同目的基因的 C_q 值， $C_{q,\text{target}}$ 和 $C_{q,\text{Action}}$ (内参基因) 指 25%+NP 处理组和 25%处理组内参基因 C_q 值。Fold 为目的基因在实验组中表达量相对对照组表达量的倍数。

5.4 结果与讨论

5.4.1 *Chlorella sp.* DT025 总 RNA 的提取检测

提取 *Chlorella sp.* DT025 总 RNA 后进行琼脂糖凝胶电泳验证，结果如图 5-1 所示：28 s 与 18 s 均出现较亮条带，两组处理组都成功提取出较为完整的 RNA。

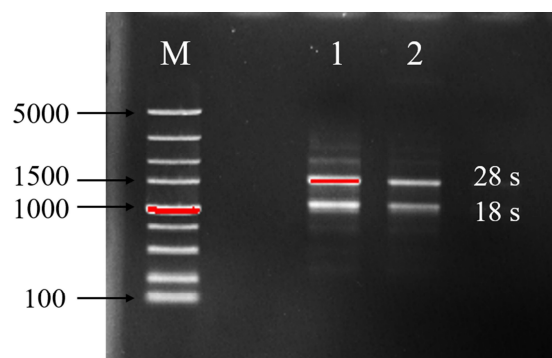


图 5-1 RNA 凝胶电泳图。结果显示出较为完整的 RNA (M 为 Marker, 1 为 25%处理组, 2 为 25%+NP 处理组)

Fig. 5-1 RNA gel electrophoresis. Results show the complete RNA (M is Marker, 1 is 25% treatment group, 2 is 25%+NP treatment group)

5.4.2 原始测序数据的质控与拼接

对 6 个处理组样品转录组测序的结果进行分析, 序列结果上传至 NCBI, 登录号为 PRJNA1096939。A-1、A-2、A-3 为 25%处理组的三个平行处理, B-1、B-2、B-3 为 25%+NP 处理组的三个平行处理。如表 5-1 所示, 过滤掉不合格的序列之后, 测序数据在 38961996 与 40652434 之间, 总碱基数在 5810100588 到 6061440452 之间; Q20 为 Phred 数值大于 20 的碱基百分比, 范围在 98.68%到 98.80%之间, Q30 为 Phred 数值大于 30 的碱基百分比, 范围在 96.04%到 96.40%之间。可得测序数据有质量较高, 可以进行后续建库与数据分析。

表 5-1 质控后数据量统计

Table 5-1 Data volume statistics after quality control

样品名	质控总测序数据	质控总碱基	Q20 (%)	Q30 (%)
A-1	38962842	5810239113	98.79	96.39
A-2	38961996	5810100588	98.80	96.40
A-3	39424578	5877872855	98.71	96.15
B-1	39944178	5955863031	98.73	96.21
B-2	39033518	5822321667	98.74	96.22
B-3	40652434	6061440452	98.68	96.04

所有样本中 clean data 进行从头组装, 组装结果如表 5-2 所示, 组装得到了共 15503 个 Unigenes, 平均长度 1416.64, N50 是总转录本的长度中位数, 为 1974 bp, 最大基因长度为 16740。统计组装序列的长度分布如图 5-2 所示, 序列长度主要分布在 401-600 bp。

表 5-2 拼接结果统计表

Table 5-2 Statistics of splicing results

拼接	数值
总 Unigenes 数量	15503
总 Unigenes 长度	21962241
总转录本数量	22836
总转录本长度	44489856
平均 Unigenes 长度	1416.64
最大 Unigene 长度	16740
N50	1974

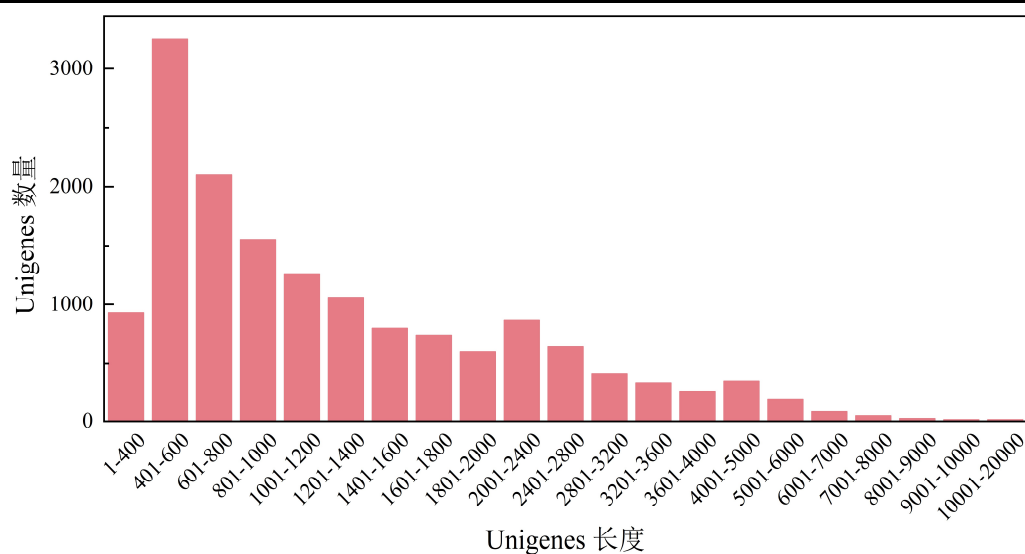


图 5-2 组装序列长度分布图

Fig. 5-2 Assembly Sequence Length Distribution

将每个样本中过滤后的高质量序列数与组装后获得的转录本序列数对比，结果如表 5-3，可得样本 mapping 对比率为 96.52%-97.17%。

表 5-3 Mapping 比率统计表

Table 5-3 Mapping Ratio Statistics

样品名	质控测序数据条数	转录本拼接数据条数	Mapping 对比率
A-1	38962842	37606596	0.9652
A-2	38961996	37606162	0.9652
A-3	39424578	38239256	0.9699
B-1	39944178	38751080	0.9701
B-2	39033518	37929886	0.9717
B-3	40652434	39460148	0.9707

5.4.3 基因功能注释

经拼接后得到的 Unigenes 分别在几个不同的功能数据库中进行基因功能注释，比对的数据库有 NR、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG、GO。结果如表 5-4 所示，其中 NR 数据库注释的 Unigenes 最多，共有 11819 个，占总蛋白的 76.24%。其次是 eggNOG、Swiss、KEGG 与 GO，分别为 8413、5908、4996 与 4622 个。

表 5-4 基因功能注释统计表

Table 5-4 Gene Function Annotation Statistics

名称	总蛋白	NR	eggNOG	Swiss	KEGG	GO
Unigene	15503	11819	8413	5908	4996	4622
占比 (%)	100	76.24	54.27	38.11	32.23	29.81

图 5-3 为不同数据库基因功能注释 Venn 统计图，不同颜色的圆圈代表该数据库注释到的基因数量，交叉区域代表同时注释到两个数据库中的基因数量。由图可得，共有 2254 个基因同时被 5 个数据库注释，其中仅由 NR 数据库注释到的基因有 2453 个。

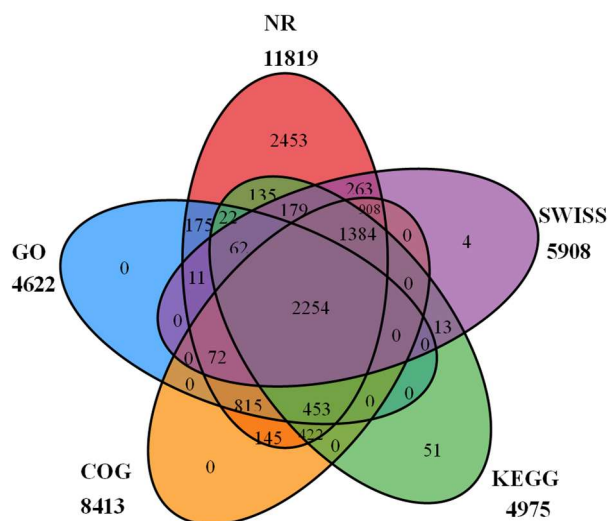


图 5-3 基因功能注释 Venn 图

Fig. 5-3 Annotated Venn Diagram of Gene Functions

5.4.3.1 GO 数据库功能注释

GO 数据库从生物过程 (BP, Biological process)、分子功能 (MF, Molecular function)、亚细胞定位 (CC, Cellular component) 三方面分析基因及基因产物。由图 5-4 所示, 拼接的 Unigenes 在生物过程方面得到较多的基因。其中, 细胞实体 (cellular anatomical entity) 基因占比最高, 共有 4171 个基因,

占比 90.24%；其次为胞内（intracellular）、细胞过程（cellular process）、代谢过程（metabolic process）等，由此可见微藻细胞整体生长与代谢能力较强。

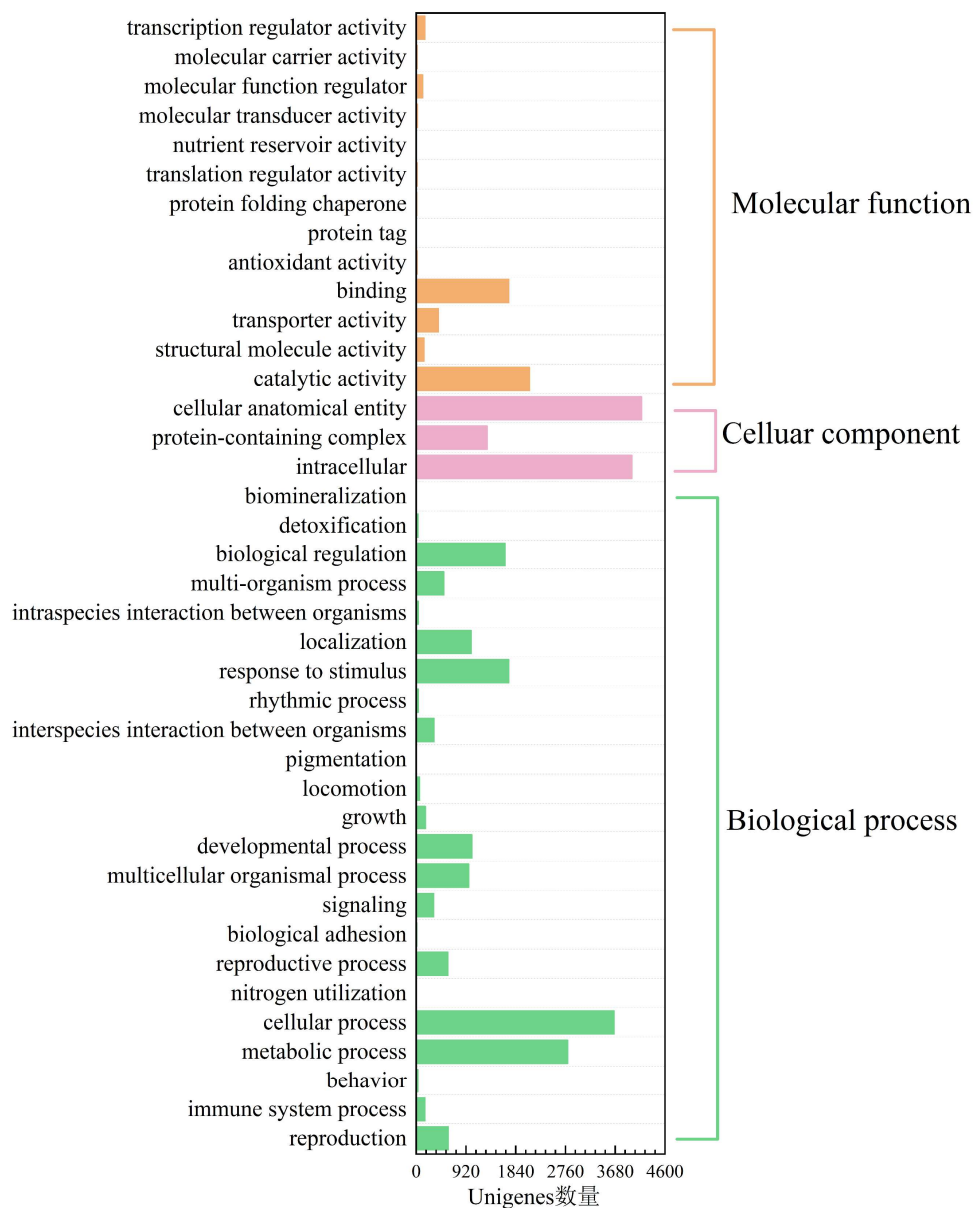


图 5-4 GO 注释统计图

Fig. 5-4 GO Annotation Statistics

5.4.3.2 KEGG 数据库功能注释

KEGG 数据库可用来分析基因功能，联系基因组信息和功能信息，从代谢途径、遗传信息传递以及细胞学过程等一些复杂的生物过程分析生物学功能。

图 5-5 所示 KEGG 的注释统计图，由此可见碳水化合物代谢（Carbohydrate metabolism）途径在细胞内活性最高，其次为翻译（Translation）、蛋白折叠分类与降解（Folding, sorting and degradation）、氨基酸代谢（Amino acid

metabolism) 等。此结果与 GO 功能注释结果相互验证, 同样可以说明细胞此时的较强的生长代谢能力。

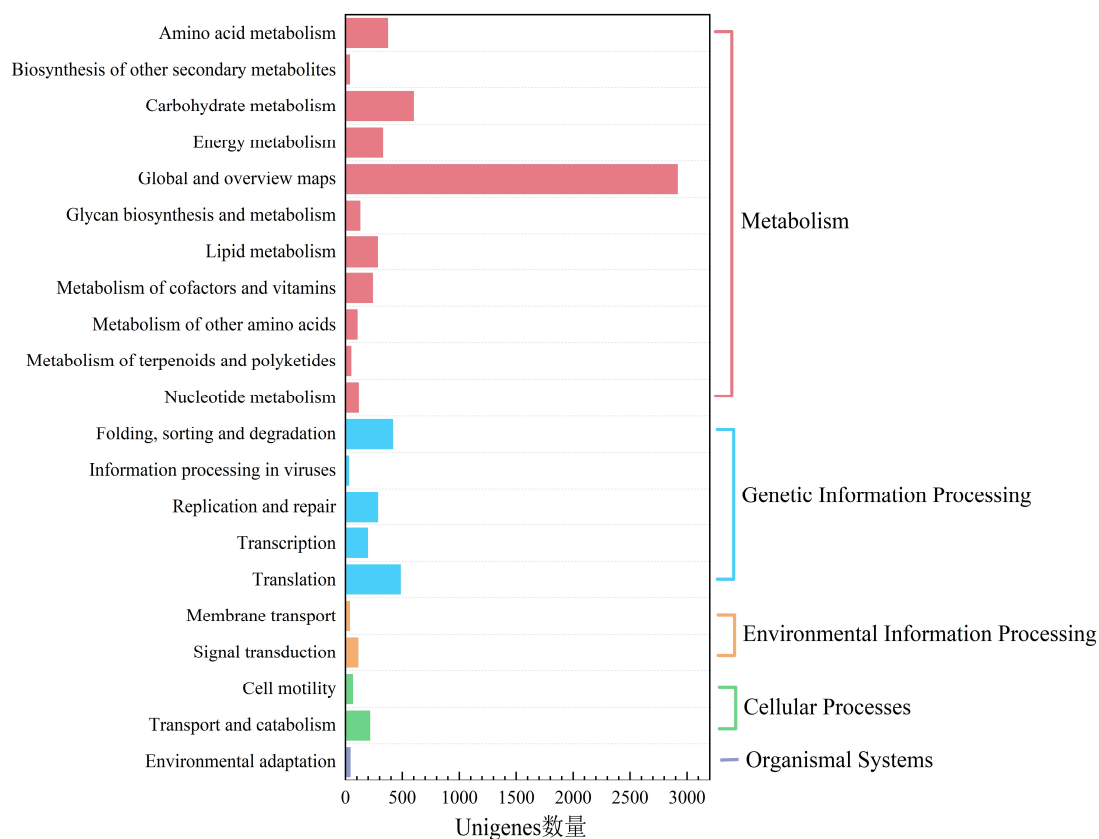


图 5-5 KEGG 注释统计图

Fig. 5-5 KEGG Annotated Statistical Chart

5.4.4 基因表达分析

5.4.4.1 基因表达差异分析

在基因注释与分析后, 以基因组注释作为参考, 统计每个转录本在每个样本中的 RPKM 值, 并作为转录本的表达量, 根据转录本丰度反应基因的表达水平。对每个转录本的表达量进行处理组间表达差异的显著性分析, 找到差异表达基因。如下表 5-5 所示, B 组 (25%+NP 处理组) 与 A 组 (25%处理组) 相比, 添加 50 mg/L 20 nm TiO₂ NPs 后, 微藻细胞内上调基因有 824 个, 下调基因有 1042 个, 总基因数为 1866 个。

表 5-5 差异基因统计表

Table 5-5 Differential Gene Statistics

对比组	表示方式	总差异基因数	上调基因	下调基因
B vs A	rpkm	1866	824	1042

5.4.4.2 差异基因注释

GO 数据库根据对基因功能的注释，从生物过程（BP，Biological process）、分子功能（MF，Molecular function）、亚细胞定位（CC，Cellular component）三方面分析两样本差异基因的功能分类情况，如下图 5-6 所示：可知在 B 组（25%+NP 处理组）比 A 组（25%处理组）生物过程分类中细胞生长（growth）、细胞免疫应答过程（immune system process）、节律过程（rhythmic process）中明显上调的基因更多，此结果与实验结果中 25%+NP 处理组细胞体积更大，且细胞受纳米颗粒损伤胁迫的结果相对应。而在分子功能分类中分子功能调控因子（molecular function regulator）、结构单元活性（structural molecule activity）、转录调节因子（transcription regulator activity）中下调基因比上调基因更多，可见一定浓度的 TiO_2 NPs 添加后对分子功能有负面影响。

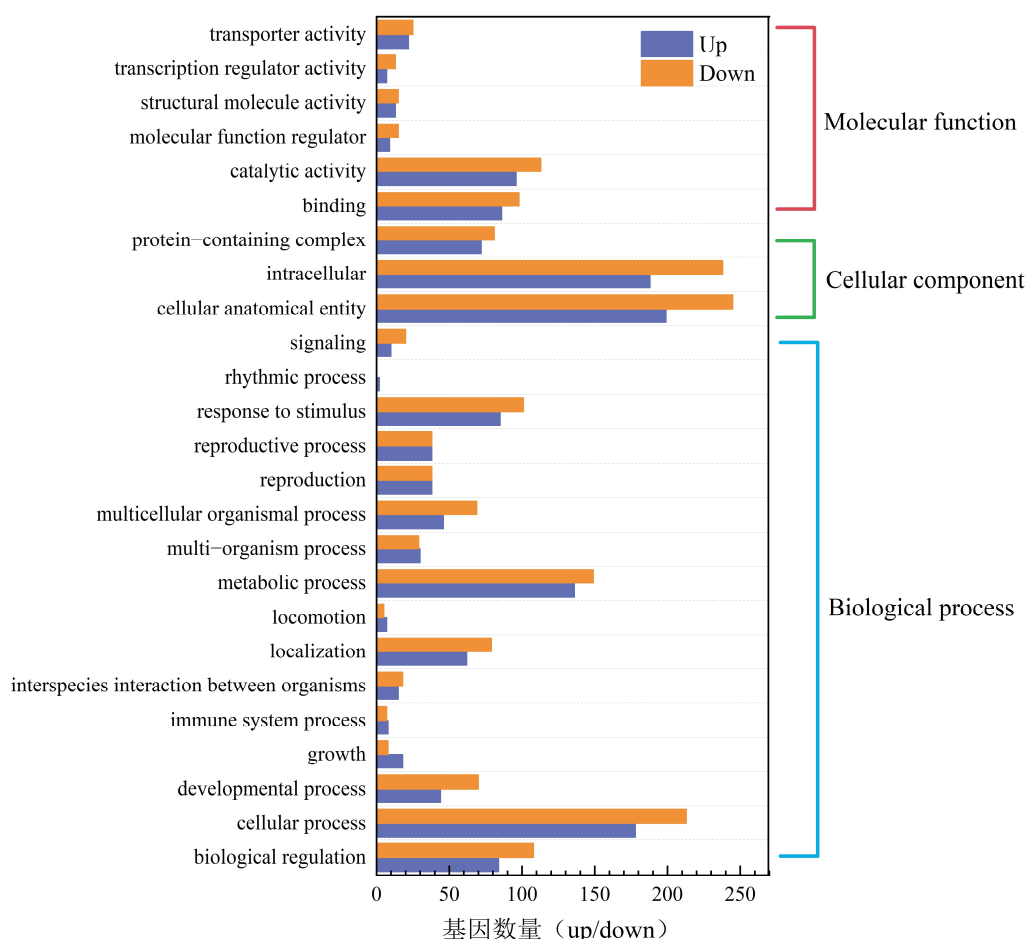


图 5-6 B (25%+NP 处理组) vs A (25%处理组) 上下调差异基因 GO 注释图

Fig. 5-6 GO annotation plot of up- and down-regulated differential genes in B (25%+NP treatment group) vs A (25% treatment group)

KEGG 数据库可以将基因按照参与代谢通路的功能分类，利用 KEGG 注释通路图表示基因表达的差异情况。图 5-7、5-8、5-9 为根据 KEGG 注释通路绘制的脂肪酸合成、丙酮酸代谢、光合作用 CO_2 固定的代谢途径示意图，其中标红色为基因表达上调，标绿色为基因表达下调。

图 5-7 所示脂肪酸合成代谢途径示意图，由图可知，添加 TiO_2 NPs 后上调的基因为乙酰 CoA 羧化酶（ACCase, EC 6.4.1.2）基因，下调的基因为丙二酰转移酶基因。在第一章已经提到乙酰 CoA 是脂肪酸合成的前体物质，乙酰 CoA 羧化酶是将乙酰 CoA 转化为丙二酸单酰 CoA，促进脂肪酸的合成，乙酰 CoA 羧化酶基因的上调能够促进脂肪酸的合成，提高油脂产量。由于丙二酸乙酯 CoA 浓度的提高，对下游基因的表达产生抑制，所以丙二酰转移酶基因表现为基因下调。

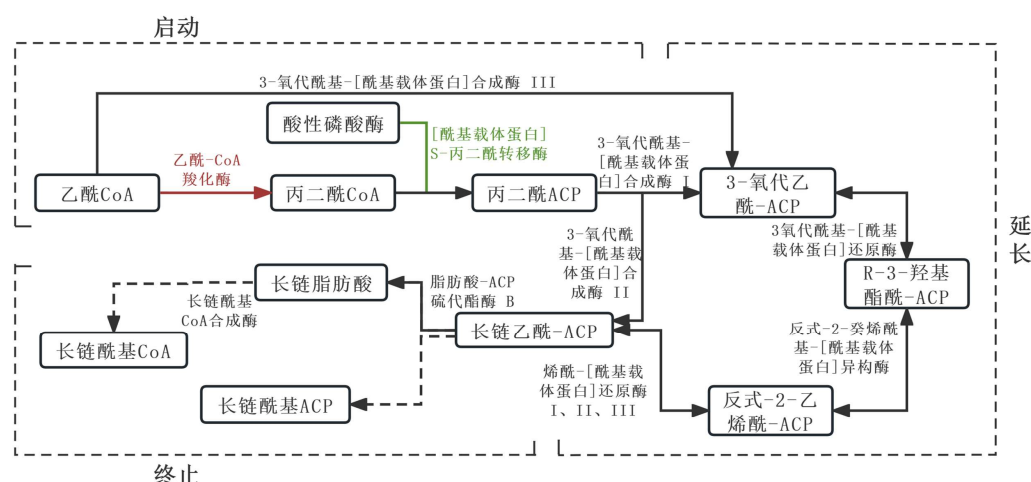


图 5-7 B (25%+NP 处理组) vs A (25%处理组) 脂肪酸合成代谢途径示意图

Fig. 5-7 B (25%+NP-treated group) vs A (25%-treated group) Fatty acid synthesis metabolic pathway

图 5-8 为丙酮酸代谢的代谢途径示意图, 由图可得, 添加 TiO_2 NPs 后, 乙酰 CoA 合成酶 2 基因 (ACS2, EC 6.2.1.1) 上调, 丙酮酸脱羧酶与醛脱氢酶基因下调。乙酰 CoA 合成酶 2 能够促进有机碳源乙酸合成乙酰 CoA, 酶基因上调后, 乙酰 CoA 含量增加, 同样以脂肪酸合成途径合成脂肪酸。所以 TiO_2 NPs 通过提高乙酰 CoA 合成酶的表达促进 *Chlorella* sp. DT025 对乙酸的利用。受乙酰 CoA 含量的影响, 丙酮酸脱羧酶表达下调, 丙酮酸转变为乙酰 CoA 的过程受到抑制。醛脱氢酶基因表达下调可能是由于含产氢发酵废液的培养基中含有乙酸, 抑制了醛脱氢酶将乙醛转化为乙酸的过程。

Fig. 5-8B (25%+NP-treated group) vs A (25%-treated group) Pyruvate metabolic pathway

50

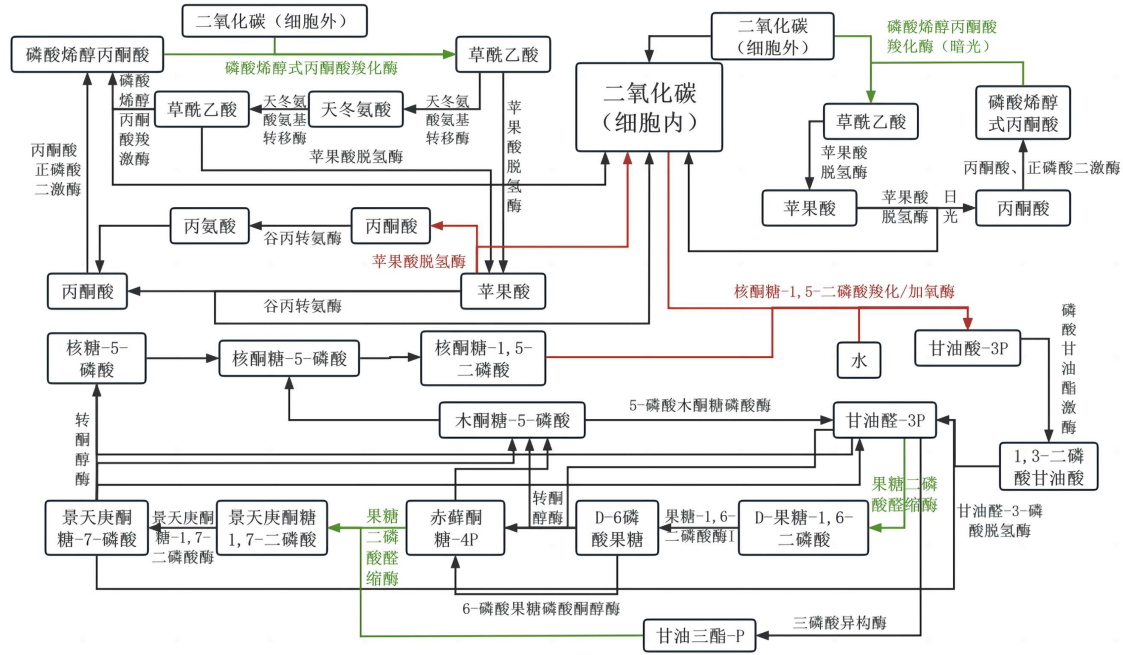


图 5-9 B(25%+NP 处理组) vs A (25%处理组) CO₂ 固定代谢途径示意图

Fig. 5-9 B (25%+NP - treatment group) vs A (25% - treatment group) CO₂ fixation of metabolic pathway

5.4.5 差异表达的关键酶基因 RT-qPCR 验证

5.4.5.1 引物设计与特异性检测

为验证转录组 RNA 分析中差异基因的准确性，从两组处理组中选择 5 个差异基因进行 RT-qPCR 分析。以 *Chlorella* sp. DT025 的 18S rRNA 为内参基因，利用 Primer 5 软件设计引物，引物序列（表 5-6）由上海生工生物工程公司合成。

表 5-6 目的基因的引物设计

Table 5-6 Primer design for target genes

目的基因	序列 5'-3'
18S rRNA	F - CGCGCAAATTACCCAATCCTG R - GCCCTCCAATTGATCCTCGTT
乙酰 CoA 羧化酶 (ACC) α 亚基基因	F - GCCGAGGATGCAGTCTACTC R - ACACGGAACCTGCCCTTGAT
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPC) 基因	F - GCTTTGTGAACTTCTTCCAGTCC R - AACACCATTTCAGCATGTCAAG
1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶 (RuBisCO) 大亚基基因	F - CCCCAACAGAGACTAAAGCAAGT R - TGTACCAGTAGAAGATTCCGCAG
苹果酸脱氢酶 (MDH) 基因	F - AAATCATCGTCCATCATTAGCGC R - GTCTGAGTAGTTCCTGGCGATC
乙酰 CoA 合成酶 2 (ACS2) 基因	F - GCCTCTGCCAAAGGTGATCT R - GGTGAGTGCAAAGGAGACGA

以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，退火温度设为 54.5℃，通过琼脂糖凝胶电泳验证引物的特异性如图 5-10 所示：

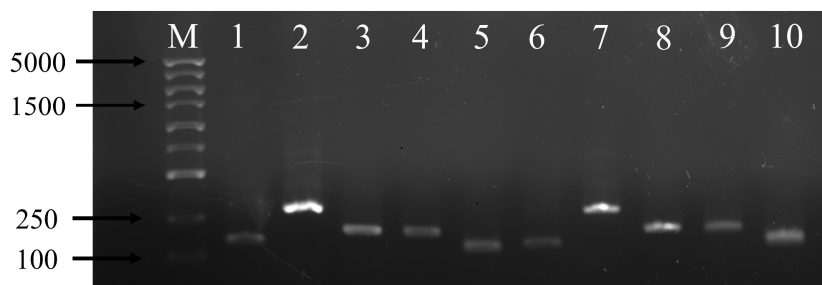


图 5-10 目的基因引物特异性扩增凝胶电泳图（M 为 DNA Marker，1-5 为 25%处理组经不同目的基因引物 PCR 扩增后特异性条带，6-10 为 25%+NP 处理组经不同目的基因引物 PCR 扩增后特异性条带。其中 1、6 为乙酰 CoA 合成酶 2 基因；2、7 为磷酸烯醇丙酮酸羧化酶基因；3、8 为苹果酸脱氢酶基因；4、9 为乙酰 CoA 羧化酶 α 亚基基因；5、10 为 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因）

Fig. 5-10 Gel electrophoresis of primer-specific amplification of target genes (M is Marker, 1-5 are bands specific to the 25% treatment group amplified by PCR with primers for different target genes, and 6-10 are bands specific to the 25%+NP treatment group amplified by PCR with primers for different target genes. 1,6: ACS2; 2,7: PEPC; 3,8: MDH; 4,9: ACC; 5,10: RuBisCO)

结合设计引物的大小，从图中可以看出所选基因约 100-200 bp，且均扩增出单一且较亮的条带，说明引物特异性较好。

5.4.5.2 差异表达的关键酶基因表达量变化

根据 Fold 值作目的基因在实验组（25%+NP 处理组）中的表达量相对于对照组（25%处理组）中的表达量差异统计图，其中 Fold 值表示目的基因相对表达量变化倍数，每个基因中左为对照组，右为实验组。由图 5-11 可得：乙酰 CoA 羧化酶基因上调，上调 3.77 倍；乙酰 CoA 合成酶 2 基因上调，上调 4.11 倍；光合作用固碳途径中核酮糖二磷酸羧化/加氧酶、苹果酸脱氢酶基因上调，分别上调 6.21 与 8.87 倍；磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因下调，下调 9.45 倍。RT-qPCR 得出的结果与转录组的结果相互验证，得出的结果趋势一致。

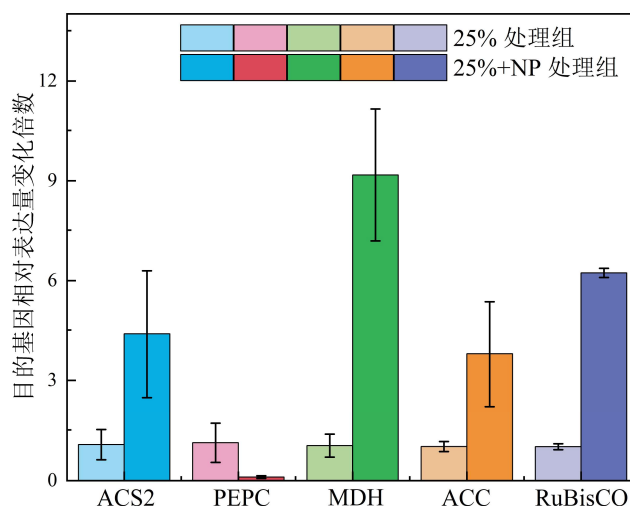


图 5-11 目的基因相对表达量变化

Fig. 5-11 Fold change in target gene expression

注：ACS2：乙酰 CoA 合成酶 2、PEPC：磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、MDH：苹果酸脱氢酶、ACC：乙酰 CoA 羧化酶、RuBisCO：1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶。

5.5 本章小结

本章从转录组角度分析添加 TiO_2 NPs 对在产氢发酵废液中培养的 *Chlorella* sp. DT025 生长与产油的影响。提取 *Chlorella* sp. DT025 的总 RNA 并构建 cDNA 文库，基于 GO 数据库与 KEGG 数据库对匹配到的基因进行功能注释并筛选表达差异基因，最后用 RT-qPCR 对差异表达基因进行验证分析。在被注释的基因中测得差异基因数为 1866 个，加入 TiO_2 NPs 后上调基因 824 个，下调基因 1042 个，在细胞生长过程、细胞免疫应答过程、节律过程中上调的基因更多。分析 KEGG 通路后发现脂肪酸合成通路中乙酰 CoA 羧化酶基因上调，有利于细胞内脂肪酸的合成；丙酮酸代谢通路中乙酰 CoA 合成酶 2 基因上调，促进了乙酰 CoA 的合成；光合作用固碳途径中核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶、苹果酸脱氢酶基因上调；磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因下调，提高细胞内糖酵解效率。RT-qPCR 验证后得到相同结果，其中上调最为明显的基因为苹果酸脱氢酶基因，上调 8.87 倍；磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因下调 9.45 倍。可以得出添加 TiO_2 NPs 后细胞内酶系的调控朝着有利于油脂积累的方向进行。

第六章 结论与展望

6.1 结论

本研究针对暗发酵产氢废液的资源化处理，在 25%产氢发酵废液中培养 *Chlorella* sp. DT025 时添加 TiO_2 NPs 以提高微藻油脂的产量与质量。从实验室保藏的藻种中选择出可有效利用废液生长产油的藻种，分析藻种对废液中不同有机酸的利用和耐受性，选择添加合适条件的 TiO_2 NPs 促进其生长与积累更高质量的油脂，构建添加 TiO_2 NPs 强化产氢发酵废液培养微藻体系，最后从生理响应机制与转录组分析添加 TiO_2 NPs 后微藻的生理特性与调控机制。结论如下：

（1）利用 24 孔板培养法从实验室 11 株微藻中选择出耐受产氢发酵废液且含油率最高的 *Chlorella* sp. DT025。分析废液中主要有机酸成分，并测定各有机酸对 *Chlorella* sp. DT025 生长、产油及对 COD、TN 去除的影响。在添加 25%的产氢发酵废液后，*Chlorella* sp. DT025 在流式细胞仪中显示的油脂荧光信号从 36.10%提高至 79.28%。添加不同浓度的发酵废液中主要有机酸后可得 *Chlorella* sp. DT025 能利用乙酸、乳酸与乙醇，但不能利用丁二酸与甲酸，废液中丁二酸含量超过了微藻细胞的耐受浓度。

（2）在产氢发酵废液培养 *Chlorella* sp. DT025 产油体系中添加 TiO_2 NPs 强化微藻生长与产油，并对 TiO_2 NPs 的添加浓度与粒径条件进行优化。添加 50 mg/L 20 nm 的 TiO_2 NPs 后，*Chlorella* sp. DT025 对糖的利用、TN 与 COD 的消耗以及油脂质量都有一定的提高，油脂中主要的脂肪酸成分及相对含量也发生变化，C20:2 含量提高至 7.63%；油脂的不饱和度与冷过滤器堵塞点提高，最终提高了油脂作为生物柴油的性能。

（3）分析 TiO_2 NPs 对 *Chlorella* sp. DT025 生长产油及生理特性的影响，观察添加产氢发酵废液与 TiO_2 NPs 后 *Chlorella* sp. DT025 细胞形态变化并分析细胞内抗氧化体系的变化。发现产氢发酵废液的添加使细胞明显变小，导致细胞发育较差，淀粉粒数量明显减少。添加 TiO_2 NPs 后 TiO_2 附着于细胞周围，一部分能够进入微藻细胞内，细胞出现质壁分离现象，对细胞造成一定损伤。受

TiO₂ NPs 与产氢废液胁迫的影响, 细胞内 ROS 产生速率提高。TiO₂ NPs 使 MDA 含量在培养前期提高, 而 SOD 和 CAT 酶活性均有一定程度降低, 表明 TiO₂ 加重藻细胞膜质过氧化胁迫, 影响了抗氧化保护酶活性。TiO₂ NPs 的添加同时促进了微藻生长与叶绿素的合成, 说明其对微藻的胁迫在耐受范围内, TiO₂ 增加的胁迫刺激微藻积累油脂。

(4) 从转录组角度分析添加 TiO₂ NPs 对在产氢发酵废液中培养的 *Chlorella* sp. DT025 生长与产油的影响。发现加入 TiO₂ NPs 后上调基因 824 个, 下调基因 1042 个, 在细胞生长过程、细胞免疫应答过程、节律过程中上调的基因更多。结合分析 KEGG 通路后发现脂肪酸合成代谢途径中乙酰 CoA 羧化酶基因上调, 有利于细胞内脂肪酸的合成; 丙酮酸代谢途径中乙酰 CoA 合成酶 2 基因上调, 促进了乙酰 CoA 的合成; 光合作用固碳途径中核酮糖二磷酸羧化/加氧酶、苹果酸脱氢酶基因上调; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因下调, 提高细胞内糖酵解效率。RT-qPCR 验证后得出与转录组分析一致的结果。

6.2 展望

本研究从转录水平探究了 TiO₂ NPs 强化产氢发酵废液中培养 *Chlorella* sp. DT025 生长与油脂体系, 对 *Chlorella* sp. DT025 的后续基因工程与代谢工程的改造提供参考。但是研究还存在一些不足, 需要后续继续研究与完善。

(1) *Chlorella* sp. DT025 是直接从环境中经筛选后培养的野生藻株, 发现其不仅有较高的油脂产量, 且有较快的细胞生长速率, 从电镜结果看出微藻在细胞内能快速积累较多淀粉粒, 后续实验中可以通过检测细胞内其他积累物质如淀粉产量提高小球藻的生产价值。

(2) 本文对纳米颗粒的研究仅针对 TiO₂ 进行, 优化了 TiO₂ 的添加浓度与粒径。近年来报道可知还有更多纳米颗粒能够有更高效促进微藻生长与合成代谢物, 后续实验可选择更多不同种类的纳米颗粒对微藻进行胁迫, 研究其对微藻的生理生化响应机制。

(3) 由于小球藻基因功能注释信息不完全, 检测到大量未知功能的基因, 本研究采用了无核转录组分析的方法, 无法完整解析胁迫条件下的转录机理。后续实验可对 *Chlorella* sp. DT025 进行全基因组测序, 完善基因功能注释。

参考文献

- [1] REN H-Y, DAI Y-Q, KONG F, et al. Enhanced microalgal growth and lipid accumulation by addition of different nanoparticles under xenon lamp illumination [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122409-122414.
- [2] 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.
- [3] MOBIN S, ALAM F. Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review [J]. *Energy Procedia*, 2017, 110: 510-517.
- [4] ZHOU W, WANG J, CHEN P, et al. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 76: 1163-1175.
- [5] 于殿江, 施定基, 何培民, 等. 微藻规模化培养研究进展 [J]. *微生物学报*, 2021, 61(2): 333-345.
- [6] 曹宇昂, 王涵, KHIN P, 等. 微藻对养殖废水中污染物的净化效果综述 [J]. *农业资源与环境学报*, 2023. 1-26.
- [7] 杨坤, 李静, 赵秀侠, 等. 栅藻和小球藻在 4 种养殖废水中的生长及净化效果对比研究 [J]. *环境工程学报*, 2017, 11(7): 4411-4418.
- [8] 姜红菊, 李步社, 韩雪峻, 等. 猪场污水微藻处理方法在华东地区的试验 [J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2021, 41(1): 20-25.
- [9] KOTHARI R, PANDEY A, AHMAD S, et al. Utilization of *Chlorella pyrenoidosa* for Remediation of Common Effluent Treatment Plant Wastewater in Coupling with Co-relational Study: An Experimental Approach [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 108(3): 507-517.
- [10] 刘璠. 微藻处理单一及混合重金属废水的实验研究 [D]. 南宁; 广西大学, 2022.
- [11] WU S, ZHANG J, XIA A, et al. Microalgae cultivation for antibiotic oxytetracycline wastewater treatment [J]. *Environmental Research*, 2022, 214: 113850-113861.
- [12] PAN M, LYU T, ZHAN L, et al. Mitigating antibiotic pollution using cyanobacteria: Removal efficiency, pathways and metabolism [J]. *Water Research*, 2021, 190: 116735-116745.
- [13] CHENG D, NGO H H, GUO W, et al. A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 121682-121694.
- [14] GUERRERO-GUALAN D, VALDEZ-CASTILLO E, CRISANTO-PERRAZO T, et al. Methods of Removal of Hormones in Wastewater [J]. *Water*, 2023, 15(2): 353-369.
- [15] 朱鸿璐. 纳米塑料环境迁移行为及其与重金属联合暴露对水生生物的毒性效应 [D]. 无锡; 江南大学, 2023.
- [16] 孟凡宇. 轮胎微塑料对微藻及滨海沉积物的生态毒性机制研究 [D]. 烟台; 烟台大学, 2023.

- [17] MARKOU G, VANDAMME D, MUYLAERT K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients [J]. *Water Reserach*, 2014, 65: 186-202.
- [18] SINGH V, MISHRA V. Bioremediation of Nutrients and Heavy Metals from Wastewater by Microalgal Cells: Mechanism and Kinetics [J]. *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems*, 2019: 319-357.
- [19] SU Y. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment [J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 762: 144590-144601.
- [20] MALLIKARJUNA K, NARENDRA K, RAGALATHA R, et al. Elucidation and genetic intervention of CO₂ concentration mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* for increased plant primary productivity [J]. *Journal of Biosciences*, 2020, 45(115): 1-18.
- [21] BURLACOT A, PELTIER G. Energy crosstalk between photosynthesis and the algal CO₂-concentrating mechanisms [J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(7): 795-807.
- [22] SCOTT S A, DAVEY M P, DENNIS J S, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 277-286.
- [23] SCOTT S D, ARMENTA R E, BERRYMAN K T, et al. Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 48(3): 267-272.
- [24] WANG H, WANG C, GUO F, et al. Enhancement of biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) from Taihu blue algae by adding by-product acetic acid [J]. *Journal of Biotechnology*, 2023, 363: 32-39.
- [25] PEREZ-GARCIA O, ESCALANTE F M E, DE-BASHAN L E, et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products [J]. *Water Research*, 2011, 45(1): 11-36.
- [26] PERETó J. Embden-Meyerhof-Parnas Pathway [J]. *Encyclopedia of Astrobiology*, 2011, Springer, Berlin, Heidelberg: 485.
- [27] JUNEJA A, CEBALLOS R, MURTHY G. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review [J]. *Energies*, 2013, 6(9): 4607-4638.
- [28] GHOSH A, KHANRA S, MONDAL M, et al. Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034) [J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 149: 39-51.
- [29] SNIFFEN K D, SALES C M, OLSON M S. The fate of nitrogen through algal treatment of landfill leachate [J]. *Algal Research*, 2018, 30: 50-58.
- [30] SANZ-LUQUE E, CHAMIZO-AMPUDIA A, LLAMAS A, et al. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(899): 1-17.
- [31] MAO B, LI G, WANG M, et al. Using nitrogen starvation and excess phosphorus for two-stage algae cultivation to improve butanol production of lipid-extracted algae [J]. *Renewable Energy*, 2024, 220: 119652-119661.

- [32] CHENG J, SUN J, HUANG Y, et al. Fractal microstructure characterization of wet microalgal cells disrupted with ultrasonic cavitation for lipid extraction [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 138-143.
- [33] MONTEIRO C M, CASTRO P M L, MALCATA F X. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications [J]. *Biotechnology Progress*, 2012, 28(2): 299-311.
- [34] LEONG Y K, CHANG J-S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 303: 122886-122897.
- [35] SINGH D V, BHAT R A, UPADHYAY A K, et al. Microalgae in aquatic environs: A sustainable approach for remediation of heavy metals and emerging contaminants [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21: 101340-101359.
- [36] SANTAUFEMIA S, TORRES E, MERA R, et al. Bioremediation of oxytetracycline in seawater by living and dead biomass of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 320: 315-325.
- [37] XIONG J-Q, KURADE M B, JEON B-H. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris* [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 313: 1251-1257.
- [38] DE GODOS I, MUÑOZ R, GUIEYSSE B. Tetracycline removal during wastewater treatment in high-rate algal ponds [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 229-230: 446-449.
- [39] CHEN J, XIE S. Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms [J]. *Science of The Total Environment*, 2018, 640-641: 1465-1477.
- [40] TIAN H, LI J, YAN M, et al. Organic waste to biohydrogen: A critical review from technological development and environmental impact analysis perspective [J]. *Applied Energy*, 2019, 256: 113961-114000.
- [41] KUMAR G, MATHIMANI T, RENE E R, et al. Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(26): 13106-13113.
- [42] LI Y, ZHANG Q, LIU Z, et al. Genome mining discovery of hydrogen production pathway of *Klebsiella* sp. WL1316 fermenting cotton stalk hydrolysate [J]. *International Microbiology*, 2022, 25(3): 503-513.
- [43] LI Y, ZHU Q, DING P, et al. Effects of Fe⁰ and Ni⁰ nanoparticles on hydrogen production from cotton stalk hydrolysate using *Klebsiella* sp. WL1316: Evaluation of size and concentration of the nanoparticles [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020, 45(11): 6243-6253.
- [44] LIN Y-S, YUWONO W, WANG H-Y. Lipid induction in *Scenedesmus abundans* GH-D11 by reusing the volatile fatty acids in the effluent of dark anaerobic fermentation of biohydrogen [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(1): 258-272.
- [45] GHOSH S, ROY S, DAS D. Enhancement in lipid content of *Chlorella* sp. MJ 11/11 from the spent medium of thermophilic biohydrogen production process [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 219-226.

- [46] MORA-GODíNEZ S, ABRIL-MARTíNEZ F, PACHECO A. Green synthesis of silver nanoparticles using microalgae acclimated to high CO₂ [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2022, 48: 5-9.
- [47] VARGAS-ESTRADA L, TORRES-ARELLANO S, LONGORIA A, et al. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review [J]. *Fuel*, 2020, 280: 118598-118601.
- [48] SUMATHI Y, DONG C-D, SINGHANIA R R, et al. Advancements in nano-enhanced microalgae bioprocessing [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 401: 130749-130764.
- [49] METZLER D, ERDEM A, HUANG C. Influence of algae age and population on the response to TiO₂ nanoparticles [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(4): 585-601.
- [50] CHEN X, ZHANG C, TAN L, et al. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 454-461.
- [51] MELEGARI S P, PERREAULT F, COSTA R H R, et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142-143: 431-440.
- [52] COSTA C H D, PERREAULT F, OUKARROUM A, et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Science of The Total Environment*, 2016, 565: 951-960.
- [53] RAWAT J, GUPTA P K, PANDIT S, et al. Current perspectives on integrated approaches to enhance lipid accumulation in microalgae [J]. *3 Biotech*, 2021, 11(33): 1-27.
- [54] JEON H-S, PARK S E, AHN B, et al. Enhancement of biodiesel production in *Chlorella vulgaris* cultivation using silica nanoparticles [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(2): 136-141.
- [55] BARRETO D M, TONIETTO A E, LOMBARDI A T. Environmental concentrations of copper nanoparticles affect vital functions in *Ankistrodesmus densus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 231: 105720-105730.
- [56] A. A. ABDEL-KADER H, YOUSEF N, ANWAR HOSSAIN M, et al. Lipid production, oxidative status, antioxidant enzymes and photosynthetic efficiency of *Coccomyxa chodatii* SAG 216-2 in response to calcium oxide nanoparticles [J]. *Phyton*, 2023, 92(7): 1955-1974.
- [57] DEHGHANIPOUR A, ZAMANI H. Interaction of Fe₂O₃ nanoparticles with marine microalga *Chlorella sorokiniana*: Analysis of growth, morphological changes and biochemical composition [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 207: 108385-108398.
- [58] SHANMUGANATHAN R, LE Q H, ALOUFI A S, et al. High efficiency lipid production, biochar yield and chlorophyll a content of *Chlorella* sp. microalgae exposed on sea water and TiO₂ nanoparticles [J]. *Environmental Research*, 2023, 232: 116263-116270.
- [59] SEZER M, TANATTI N P, ŞENGİL İ A. Interaction of TiO₂ nanoparticles with the *C. vulgaris*: oxidative stress, lipid peroxidation and lipid amount [J]. *Water Science and Technology*, 2022,

- 86(8): 2020-2031.
- [60] JI J, LONG Z, LIN D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. [J]. Chemical Engineering Journal, 2011, 170(2-3): 525-530.
- [61] 王美琦, 平文祥, 葛菁萍, 等. 微藻在废水处理和生物质回收再利用方面的研究进展 [J]. 微生物学报, 2022, 62(12): 4756-4768.
- [62] VASISTHA S, KHANRA A, RAI M P. Influence of microalgae-ZnO nanoparticle association on sewage wastewater towards efficient nutrient removal and improved biodiesel application: An integrated approach [J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 39: 101711-101724.
- [63] SHEN L, WANG J, LI Z, et al. A high-efficiency Fe₂O₃@Microalgae composite for heavy metal removal from aqueous solution [J]. Journal of Water Process Engineering, 2020, 33: 101026-101038.
- [64] GUO J, GUO X, YANG H, et al. Construction of bio-TiO₂/algae complex and synergetic mechanism of the acceleration of phenol biodegradation [J]. Materials, 2023, 16(10): 3882-3896.
- [65] CHEN J E, SMITH A G. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae [J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162(1): 28-39.
- [66] 何思思, 王元丽, 高保燕, 等. 微藻三酰甘油合成途径及其最新研究进展 [J]. 生命科学, 2014, 26(9): 979-990.
- [67] ZHU Z, SUN J, FA Y, et al. Enhancing microalgal lipid accumulation for biofuel production [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1-11.
- [68] 赵丹月, 李璐, 陈林, 等. 培养条件对丝状微藻克里藻生长和油脂与亚油酸合成的影响 [J]. 中国油脂, 2023, 1-13.
- [69] TANG D, HAN W, LI P, et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3071-3076.
- [70] LARAIB N, MANZOOR M, JAVID A, et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in sugarcane molasses preceding nitrogen starvation: Biomass productivity, lipid content, and fatty acid analyses [J]. Environmental Progress & Sustainable Energy, 2021, 40(4): 1-8.
- [71] YANG L, CHEN J, QIN S, et al. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 40-52.
- [72] FENG P, XU Z, QIN L, et al. Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors [J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122762-122771.
- [73] ARGUELLES E D L R, MARTINEZ-GOSS M R. Lipid accumulation and profiling in microalgae *Chlorolobion* sp. (BIOTECH 4031) and *Chlorella* sp. (BIOTECH 4026) during nitrogen starvation for biodiesel production [J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 33(1): 1-11.
- [74] BHARTE S, DESAI K. The enhanced lipid productivity of *Chlorella minutissima* and *Chlorella*

- pyrenoidosa* by carbon coupling nitrogen manipulation for biodiesel production [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 26(4): 3492-3500.
- [75] WU L F, CHEN P C, LEE C M. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 85: 506-510.
- [76] AZOV Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43: 1300-1306.
- [77] QIU R, GAO S, LOPEZ P A, et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana* [J]. Algal Research, 2017, 28: 192-199.
- [78] SÁNCHEZ-SAAVEDRA M D P, SAUCEDA-CARVAJAL D, CASTRO-OCHOA F Y, et al. The use of light spectra to improve the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* for biofuels production [J]. BioEnergy Research, 2020, 13(2): 487-498.
- [79] MA J, XU T, BAO M, et al. Response of the red algae *Pyropia yezoensis* grown at different light intensities to CO₂-induced seawater acidification at different life cycle stages [J]. Algal Research, 2020, 49: 101950-101959.
- [80] LIMA S, SCHULZE P S C, SCHÜLER L M, et al. Flashing light emitting diodes (LEDs) induce proteins, polyunsaturated fatty acids and pigments in three microalgae [J]. Journal of Biotechnology, 2021, 325: 15-24.
- [81] 李林, 王钦宏, 杨海麟, 等. 微藻(*Chlorella sorokiniana*)的转录组分析: 油脂生物合成相关的途径解析和基因挖掘 [J]. 微生物学报, 2014, 54(9): 1010-1021.
- [82] SIRIKHACHORNKIT A, SUTTANGKAKUL A, VUTTIPONGCHAIKIJ S, et al. De novo transcriptome analysis and gene expression profiling of an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus* TISTR8540 during nitrogen deprivation-induced lipid accumulation [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 3668-3680.
- [83] 陈爱玲. 氮、磷、硫及光对类波氏真眼点藻油脂积累的调控和转录组学分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- [84] LI J, PAN K, TANG X, et al. The molecular mechanisms of *Chlorella* sp. responding to high CO₂: A study based on comparative transcriptome analysis between strains with high- and low-CO₂ tolerance [J]. Science of The Total Environment, 2021, 763: 144185-144194.
- [85] 位文倩, 孙昕, 黄峰, 等. 转录组揭示自养和混合培养栅藻油脂代谢途径差异 [J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(1): 130-137.
- [86] WANG J, WANG Y, GU Z, et al. Stimulating carbon and nitrogen metabolism of *Chlorella pyrenoidosa* to treat aquaculture wastewater and produce high-quality protein in plate photobioreactors [J]. Science of The Total Environment, 2023, 878: 163061-163071.
- [87] DENG X, LI Y, FEI X. The mRNA abundance of *pepc2* gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1811-1817.
- [88] SELVAN S T, GOVINDASAMY B, MUTHUSAMY S, et al. Exploration of green integrated approach for effluent treatment through mass culture and biofuel production from unicellular

- alga, *Acutodesmus obliquus* RDS01 [J]. International Journal of Phytoremediation, 2019, 21(13): 1305-1322.
- [89] LI D-W, XIE W-H, HAO T-B, et al. Constitutive and chloroplast targeted expression of acetyl-CoA carboxylase in oleaginous microalgae elevates fatty acid biosynthesis [J]. Marine Biotechnology, 2018, 20(5): 566-572.
- [90] XUE J, BALAMURUGAN S, LI D-W, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply [J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 212-221.
- [91] AVIDAN O, PICK U. Acetyl-CoA synthetase is activated as part of the PDH-bypass in the oleaginous green alga *Chlorella desiccata* [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(22): 7287-7298.
- [92] NAWKARKAR P, KAPASE V U, CHAUDHARY S, et al. Heterogeneous diacylglycerol acyltransferase expression enhances lipids and PUFA in *Chlorella* species [J]. GCB Bioenergy, 2023, 15(10): 1240-1254.
- [93] LI Z, MENG T, LING X, et al. Overexpression of malonyl-CoA: ACP transacylase in *Schizochytrium* sp. to improve polyunsaturated fatty acid production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(21): 5382-5391.
- [94] ZHU B-H, ZHANG R-H, LV N-N, et al. The role of malic enzyme on promoting total lipid and fatty acid production in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9(826): 1-8.
- [95] 周柱, 查凡, 张琴, 等. *Klebsiella* sp. WL1316 乙醇脱氢酶基因过表达提高乙醇生产效率 [J]. 化学工程, 2022, 50(10): 1-7.
- [96] HJ 828-2017, 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法 [S]. 北京: 环境保护部, 2017.
- [97] HJ 636-2012, 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 [S]. 北京: 环境保护部, 2012.
- [98] 王海英, 符茹, 黄宝祥. 基于尼罗红荧光染色的小球藻脂质快速检测方法研究 [J]. 中国油脂, 2012, 37(3): 78-81.
- [99] 戴文娜. 耐盐小球藻的筛选及对盐胁迫下油脂合成的转录调控机制研究 [D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2020.
- [100] 侯新星, 田如男. 有机酸对铜绿微囊藻生长及光合色素的影响 [J]. 生物学杂志, 2021, 38(4): 65-70.
- [101] ZHU L, HILTUNEN E, SHU Q, et al. Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid [J]. Applied Energy, 2014, 128: 103-110.
- [102] ZHANG C, WU D-J, ZHONG C-Q. Cultivating *Scenedesmus dimorphus* in lactic acid wastewater for cost-effective biodiesel production [J]. Science of The Total Environment, 2021, 792: 148428-148438.
- [103] ZHANG R, ZHANG H, TU C, et al. The limited facilitating effect of dissolved organic matter

- p>extracted from organic wastes on the transport of titanium dioxide nanoparticles in acidic saturated porous media [J].
- Chemosphere*
- , 2019, 237: 124529-124539.
- [104] LI J, DONG J, HUANG Y, et al. Aggregation kinetics of TiO₂ nanoparticles in human and artificial sweat solutions: Effects of particle properties and sweat constituents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(23): 17153-17165.
- [105] VERMA S, UPADHYAY R, SHANKAR R, et al. Performance and emission characteristics of micro-algae biodiesel with butanol and TiO₂ nano-additive over diesel engine [J]. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 2023, 55: 102975-102982.
- [106] ARORA N, PATEL A, PRUTHI P A, et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 213: 79-87.
- [107] WANG J, YU J, ZHU X, et al. Preparation of hollow TiO₂ nanoparticles through TiO₂ deposition on polystyrene latex particles and characterizations of their structure and photocatalytic activity [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7: 646-654.
- [108] PATEL A, KARAGEORGOU D, ROVA E, et al. An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 434-473.
- [109] LEE C-G, KANG D-H, LEE D-B, et al. Pretreatment for simultaneous production of total lipids and fermentable sugars from marine alga, *Chlorella* sp [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171(5): 1143-1158.
- [110] BARNATHAN G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties [J]. *Biochimie*, 2009, 91(6): 671-678.
- [111] GB 19147-2016, 车用柴油 [S]. 北京: 中国国家标准化管理委员会, 2016.
- [112] JACOB A, ASHOK B, ALAGUMALAI A, et al. Critical review on third generation micro algae biodiesel production and its feasibility as future bioenergy for IC engine applications [J]. *Energy Conversion and Management*, 2021, 228: 113655-113690.
- [113] FAZELIAN N, YOUSEFZADI M, MOVAFEGHI A. Algal response to metal oxide nanoparticles: Analysis of growth, protein content, and fatty acid composition [J]. *BioEnergy Research*, 2020, 13(3): 944-954.
- [114] SONG C, LIU Z, WANG C, et al. Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bio-elimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025 [J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 723: 138146-138156.
- [115] 李青, 张帅, 王济. 天然有机质对 TiO₂ 纳米颗粒与 PCB-77 藻类毒性影响及致毒机理 [J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(6): 244-255.
- [116] MORELLI E, GABELLIERI E, BONOMINI A, et al. TiO₂ nanoparticles in seawater: Aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 148: 184-193.
- [117] LI F, LIANG Z, ZHENG X, et al. Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive

- oxygen species production [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 1-18.
- [118] 武彩霞, 魏薇, 刘进军, 等. 组学技术及其在微藻研究中的应用 [J]. *河北北方学院学报 (自然科学版)*, 2019, 35(7): 57-64.
- [119] LEE M-A, GUO R, EBENEZER V, et al. Evaluation and selection of reference genes for ecotoxicogenomic study of the green alga *Closterium ehrenbergii* using quantitative real-time PCR [J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(4): 863-872.

附录

表 1 改良的 BG-11 培养基

成分	含量 (g/L)
无水葡萄糖	10
硝酸钾	1.25
磷酸二氢钾	1.25
七水合硫酸镁	1
七水合硫酸亚铁	0.05
二水合氯化钙	0.11
EDTA·2Na	0.50
四水合氯化锰	0.0142
硼酸	0.1142
二水合钼酸钠	0.0083
五水合硫酸铜	0.0137
七水合硫酸钴	0.0018
碳酸氢钠	0.80

表 2 实验试剂表

试剂名称	纯度	生产厂家
无水葡萄糖	AR	生工生物工程股份有限公司
硝酸钾	AR	生工生物工程股份有限公司
磷酸二氢钾	AR	生工生物工程股份有限公司
七水合硫酸镁	AR	生工生物工程股份有限公司
七水合硫酸亚铁	AR	生工生物工程股份有限公司
二水合氯化钙	AR	生工生物工程股份有限公司
EDTA·2Na	AR	阿拉丁试剂（上海）有限公司
四水合氯化锰	AR	生工生物工程股份有限公司
硼酸	AR	上海麦克林生化科技有限公司
二水合钼酸钠	AR	上海麦克林生化科技有限公司
五水合硫酸铜	AR	生工生物工程股份有限公司
七水合硫酸钴	AR	生工生物工程股份有限公司
碳酸氢钠	AR	生工生物工程股份有限公司
琼脂粉	AR	生工生物工程股份有限公司
尼罗红	AR	生工生物工程股份有限公司

试剂名称	纯度	生产厂家
二甲基亚砷	AR	上海晶纯生化科技股份有限公司
氢氧化钠	AR	上海麦克林生化科技有限公司
甲醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	AR	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
重铬酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸亚铁铵	AR	国药集团化学试剂有限公司
试亚铁灵	AR	上海麦克林生化科技有限公司
过硫酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
TiO ₂ 纳米颗粒	EP	清河县兴荣源金属材料有限公司
葡萄糖、木糖标品	EP	生工生物工程股份有限公司
丁二酸、甲酸、乙酸、乙醇标品	EP	生工生物工程股份有限公司
乳酸标品	EP	上海源叶生物科技有限公司
无水硫酸钠	AR	上海麦克林生化科技有限公司
正己烷	AR	国药集团化学试剂有限公司
十五烷酸甲酯标品	EP	广州硕普生物技术有限公司
脂肪酸甲酯混和标品	EP	广州硕普生物技术有限公司
戊二醛（50%）电镜专用	-	上海麦克林生化科技有限公司
活性氧产生速率试剂盒	-	苏州科铭生物技术公司
丙二醛含量试剂盒	-	苏州科铭生物技术公司
超氧化物歧化酶试剂盒	-	苏州科铭生物技术公司
过氧化氢酶试剂盒	-	苏州科铭生物技术公司
EasyPure® Plant RNA Kit 试剂盒	-	北京全式金生物技术股份有限公司
Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒	-	生工生物工程股份有限公司
50×TAE Buffer	-	生工生物工程股份有限公司
10×TBE Buffer	-	生工生物工程股份有限公司
琼脂糖	AR	生工生物工程股份有限公司
6×Loading Buffer	-	宝日医生生物技术有限公司
2×San Taq PCR Mix 试剂盒	-	宝日医生生物技术有限公司
TB Green® Premix Ex Taq™ II	-	宝日医生生物技术有限公司

表 3 仪器设备表

实验仪器	生产厂家
电子天平	奥克斯国际贸易（上海）有限公司
恒温培养箱	上海力辰仪器科技有限公司
光照培养箱	宁波普朗特仪器有限公司
立式高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
超净工作台	浙江孚夏医疗科技有限公司
高速离心机	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
流式细胞仪	美国贝克曼
数显恒温水浴锅	金坛市医疗仪器厂
冰箱	海尔集团公司
电热鼓风干燥箱	上海力辰仪器科技有限公司
光学显微镜	上海蔡康光学仪器有限公司
电磁炉	九阳股份有限公司
微波炉	九阳股份有限公司
紫外可见分光光度计	上海美普达仪器有限公司
COD/TP/TN 快速消解仪	山东格林凯瑞精密仪器有限公司
高效液相色谱仪	美国沃特世 (Waters)
气相色谱仪	美国安捷伦 (Agilent)
X 射线衍射仪	日本理学 (SmartLab)
透射电子显微镜	日本 JEOL
超声波细胞破碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
制冰机	常熟市福王制冷器材有限公司
全波长酶标仪	瑞士 TECAN
荧光分光光度计	日本日立 (HITACHI)
冷冻高速离心机	大龙兴创实验仪器股份有限公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
电泳仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
凝胶成像仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
荧光定量 RCR 仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司

攻读学位期间发表的学术论文目录

徐嘉璐, 谈昕, 张琴, 等. 利用微藻连续纯化沼气同步提升微藻油脂产量和品质技术研究[J]. 安徽工程大学学报(已录用)

致谢

三年前，我怀着对生物学科深造的理想和对研究生生活的憧憬，来到了安徽工程大学生物与食品工程学院。从接种培养等简单实验操作到熟练使用色谱仪和其他高精仪器，从每一步实验需要老师手把手指导到学着解决实验中遇到的各种问题，进而提高了自己对解决问题的思维方式。三年转瞬而过，有欣喜，有期待，有时坚定信念；也有懊恼，有焦虑，有过想要放弃。但唯独不变的是这三年来课题组的老师们和师兄师姐，师弟师妹组成的大家庭，有大家的陪伴，一切困难也显得那么不堪一击。如今，又到了要离开家庭，踏上新征程的时刻，这三年所有的回忆，将会是我未来突破一切障碍的武器。

我最感谢的就是我尊敬的导师李艳宾教授，我每每有课题实验与论文写作上遇到各种各样的问题，李老师总会不厌其烦地解答我的疑惑，帮我梳理逻辑，提供检测各种数据的资金。同课题组的张琴教授也对我的实验方面有很多帮助，她总能耐心回答我实验中遇到的各种问题。两位老师渊博的学识、严谨的治学态度、阳光的人生态度，指点迷津的教学风格，激励我在日后的学习与工作中不畏困难，奋力前行。谨向两位老师致以诚挚的敬意和祝福。

感谢课题组的唐松老师、王远丽老师、何帮翔老师、盛烨泉老师、谈昕老师、田淑芳老师和赵杰老师。唐松老师用了一年的时间才教会了我这愚笨的学生熟练使用液相色谱仪；王远丽老师指导我学会了分析转录组，还常关心我的科研与生活；何帮翔老师是研究微藻的专家，让我在微藻培养方面更进一步；盛烨泉老师和谈昕老师修改我的论文很多很多遍，狠狠地提高了我英文阅读与写作的能力。感谢各位老师，每一位老师都是我人生中的贵人。

感谢大家庭中的师兄师姐对我的帮助：汪慧玲、许思远、周香群、曹娟娟、赵沛师姐，张永贵、张双双、张呈彦师兄，是你们开朗随和的个性让萌新时期的我体会到大家庭的温暖。同门兄弟姐妹：叶景、施正晟、钱程，谢谢这三年来对我的鼓励与关心，我会一直记得你们给我过的生日，那是我最开心的一天。以及每一个可爱的娃：王翠翠、杨勇、韩维召、高梦蝶、杨新宇、喻艳玲、吴晓龙、辛玉、程千子、吴波、吴萱、李娜、周飞，你们都非常优秀，加油！还有两位外国友人 Khadija 和 Precious，我和你们学到了很多，祝你们前程似锦。

我会记得我们一起在实验室努力完成各自的实验任务，彼此鼓励；记得我们大家庭一起聚餐，一起讨论实验；记得我们一起在操场打球。和大家一起的日子是我一生不会忘记的宝贵财富。

感谢我的家人，虽然远隔千里，但你们对我的关爱没有因为距离减少一分。我时常忙碌没时间联系你们，你们总是打电话给我，关心我的实验、我的感情与生活，我有时有些冷漠，但对你们的爱没有变，你们永远是我的精神支柱，希望你们可以永远健康。我还想感谢一个人，名字无法透露，谢谢你五年来对我的照顾与爱护，虽然没能有一个好的结局，但我们都比从前的自己更好这就足够了，祝好。

即将离开学校，告别学生的身份，但这不是终点，是新的起点。未来还有太多不确定，外面是更大的浩瀚的星空。我会一直坚定地走下去，并期待着未来的人生中的每一天。

徐嘉璐

2024年5月