

成油藻——布朗葡萄藻的研究

许常虹 俞敏娟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

Preliminary studies on the oil-forming algae—*Botryococcus braunii*

Xu Changhung and Yu Minjuan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词 葡萄藻, 氟化钠, 碳氢化合物, 石油

Key Words *Botryococcus braunii*, NaF, Hydrocarbon, oil

葡萄藻 (*Botryococcus braunii*) 是一种温带普遍性种类。主要分布于淡水水体中。藻体是由几十到几百个细胞组成的, 大小在 30—500 μm 左右。含有较丰富的油类物质^[4], 一般占藻体干重的 25—40%, 最高可达 85%^[10]。

葡萄藻可形成水华。据报道澳大利亚达尔文水库 (4 000 ha) 形成水华时可得 3000 吨葡萄藻干物质^[5, 10], 当地居民可直接用作燃料, 因此曾有人考虑人工大量培养葡萄藻以获得碳氢化合物。但实验证实葡萄藻藻体内形成的碳氢化合物的含量和类型与藻体的生理状态有关: 生长在自然水体中的藻体主要含不饱和的葡萄藻烯类, 而室内人工培养的藻体主要为二烯、三烯的直链碳氢化合物^[10]。因此在考虑大量培养葡萄藻用以生产碳氢化合物之前需对藻类的生理生态进行研究。同时葡萄藻虽能形成水华, 但水华成因不清楚, 而且在人工静置培养时生长速度较慢, 增代时间为 6 天, 虽经通气培养和添加葡萄糖可以明显提高其生长速度^[3], 但离工厂化生产所需求的速率仍相差较大。

据报道葡萄藻是古代地层油页岩类沉积和现

代沉积 (coorongite) 的主要生物来源之一^[4, 9]。近年来在开发石油资源的研究中也在多处发现了葡萄藻化石, 并且在某些地层中贮量相当丰富^[1, 2]。尤其重要的是在苏门答腊两个油田的原油中找到了来自葡萄藻的生物标记化合物——葡萄藻烷^[7]。这都显示了葡萄藻与石油形成有一定的关系。

根据以上情况我们对现代葡萄藻的生境进行了初步调查, 观察其生长发育过程, 找出促进其生长的因子以及不同培养条件对其形成碳氢化合物的影响, 为大量培养提供参考, 同时结合地层学、古生物学的研究进一步确证葡萄藻与石油形成的关系。

材料和方法

藻种: 葡萄藻 YNb-1 采自云南抚仙湖; 葡萄藻 HBb-2 采自本所; 葡萄藻 Ab-3 来自美国

本研究承蒙黎尚豪教授指导, 并得到胜利油田地质科学院周光甲总工程师等同志的大力支持, 在此特表谢意。

1987 年 9 月 25 日收到。

德州大学藻种库。

培养条件：温度 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。接种时光照为 2000lx , 后增至 5000lx 左右。光暗比, $16:8$ 。

生长测定：光密度法及干重法。

碳氢化合物测定：培养物于 $3000-3500\text{ rpm}$ 离心, 真空干燥后用己烷抽提, 过滤, 滤液进行真空干燥用 Finigan Mat 4021C 型四极质谱仪联用计算机分析系统测定。测定条件为 40EV SE 50 毛细管柱, 柱长 30M , 程序升温 $130-295^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{m}$ 。

扫描电镜：将活体进行临界点脱水后真空干燥, 镀金膜, 然后用 Cam Scan 3-30VCA 型扫描电镜观察。

结 果

(1) 现代葡萄藻与葡萄藻化石的形态比较：将云南抚仙湖采得的葡萄藻与我国胜利油田孤东油田可能生油层中得到的葡萄藻化石在扫描电镜下进行对比, 发现它们的群体组成和细胞排列形式很相似, 它们都是由几个小群体组成的复合群体, 细胞都为 $2-4$ 个一组, (图 1: A,B)。不同之处是现代葡萄藻的群体中均由活细胞充满, 而葡萄

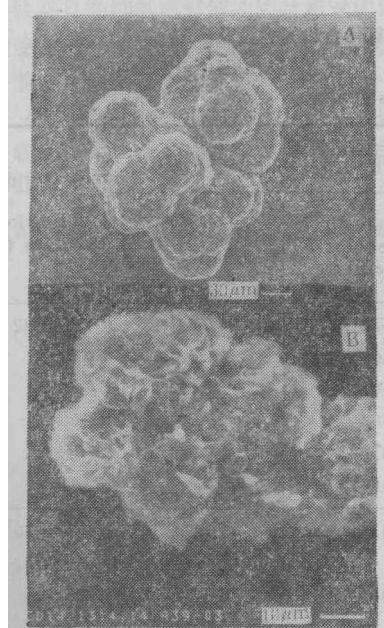


图 1 A. 现代葡萄藻；B. 葡萄藻化石

Fig. 1 A, *Botryococcus braunii*; B, The fossilform of *B. braunii*

藻化石则由于细胞解体只保留下孔穴状结构的群体。因此从形态上比较观察, 我们可进一步确定孤东油田的可能生油层中的藻类化石确系葡萄藻。

(2) 葡萄藻生长条件的研究：从调查经常发生葡萄藻水华的水体中, 我们观察到葡萄藻水华常发生于水温 $12-23^{\circ}\text{C}$, pH 左右的中型和贫营养型水体中。我们将我国贫营养型湖泊抚仙湖的营养物水平与澳大利亚两个常形成水华的水体进行比较, 发现两者氮、磷含量虽有较大差异 (抚仙湖: $\text{N}(-\text{NH}_4)$ —— $0.002-0.015(\text{mg/l})$, $\text{N}(\text{NO}_2/\text{NO}_3)$ —— 10 , $\text{P}_{\text{总}}$ —— $0.02-0.15(\text{mg/l})$; 达尔文和 Manton 水库含量较低, 分别为: 0.001mg/l , $1.2, 0.0004\text{mg/l}$; 0.00035mg/l , 3.35 和 0.0005mg/l), 但均能形成水华说明这两种元素的含量多寡尚不是影响水华形成的主要因素。值得注意的是抚仙湖水中氟化物含量可达 0.3mg/l 左右, 为了证实氟化物对葡萄藻生长的影响, 我们在室内人工培养基 $\text{Chu13} \times 4$ 中加入 0.3mg/l 的氟化钠, 获得了明显促进生长的效果, 其增代时间由原对照 $\text{Chu13} \times 4$ 的 1.14 天缩短为 0.89 天, (表 1、图 2)。同时不同浓度的氟化钠对葡萄藻的生长有不同的影响, 即加入 0.1mg/l 的 NaF 对生长的促进作用最为明显, 较高浓度氟化钠 $0.6-1.0\text{mg/l}$ 对葡萄藻的生长产生抑制作用(图 3)。

(3) 不同培养条件对葡萄藻形成碳氢化合物类型及含量的影响: $\text{Chu13} \times 4$ 培养基和 $\text{HB}-119 \times 4$ 培养基所形成的碳氢化合物的类型及含量有所不同。在 $\text{Chu13} \times 4$ 培养物中以 C31 占优势。加入 0.3mg/l NaF 并不影响其碳氢化合物的含量和类型。而 $\text{HB}-119 \times 4$ 培养物中虽然也能促进生长, 但是碳氢化合物含量较低并且以 C19 类碳氢化合物为主, 不具 C31 类 (表 2)。

表 1 葡萄藻 Ab-3 的生长状况

Tab. 1 The growth of *Botryococcus braunii* Ab-3

培养基类型 Culture media	$\text{Chu13} \times 4$	$\text{Chu13} \times 4$ (NaF)
最小增代时间(天) Minimum doubling time (d)	1.14	0.89
最大生长率 Maximum growth rate	0.89	1.14

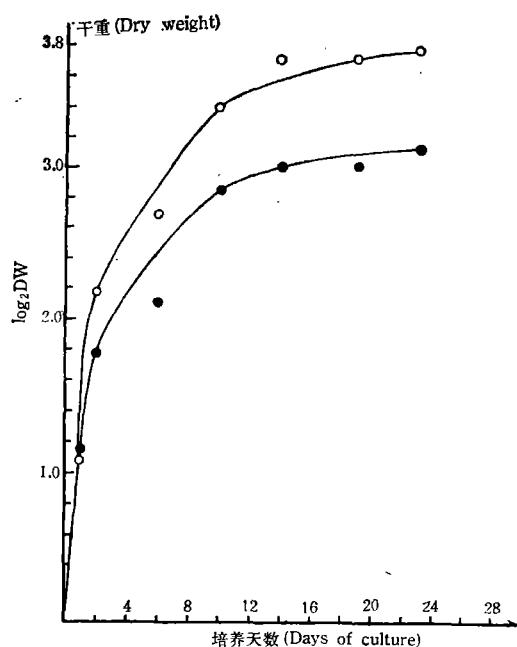


图2 葡萄藻Ab-3生长曲线

Fig. 2 The growth curves of *B. braunii* Ab-3 in batch culture

●—Chu13×4; ○—Chu13×4(NaF)

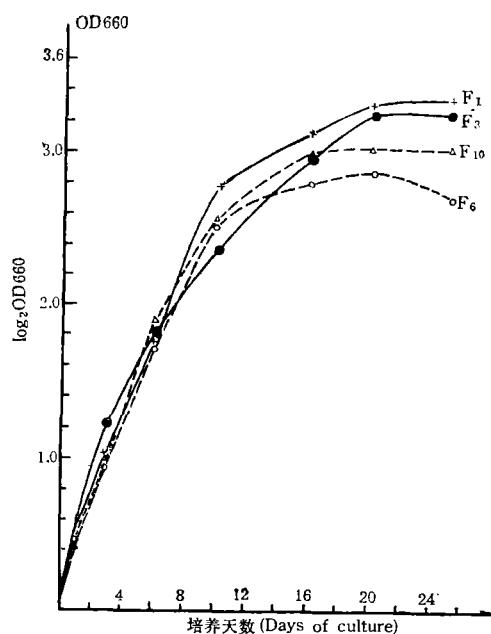


图3 不同氟化钠浓度对葡萄藻Ab-3生长的影响

Fig. 3 The influence of different NaF concentrations on the growth rate of *B. braunii*

×—0.1 mg/L; ●—0.3 mg/L
 ○—0.6 mg/L; △—1.0 mg/L

表2 葡萄藻Ab-3在不同培养条件下碳氢化合物的含量及类型

Tab. 2. The content and nature of hydrocarbon from *B. braunii* under different culture conditions

培养基 Culture media	碳氢化合物含量(%) Total hydrocarbon content (as % dry weight)	碳氢化合物的类型 Nature of hydrocarbons			培养时间(天) Duration of cultures (days)
		碳原子数目 Carbon number	分子量 Molecular weight	相对百分含量(%) Relative abundance of hydrocarbon	
Chu13×4	22.00	C31	432	47.11	42
		C19	264	10.08	
		C29	402	9.92	
		C29	404	4.43	
		C31	430	3.95	
		C33	460	7.35	
Chu13×4 (NaF)	32.50	C31	430	54.70	36
		C19	—	23.76	
		C33	460	14.33	
		C29	—	7.22	
HB-119×4	16.42	C19	264	36.99	45
		C29	404	29.15	

讨 论

据报道，在印度、匈牙利、比利时以及我国北部湾沿岸、渤海湾沿岸的第三系沉积的油页岩及藻煤中均发现葡萄藻化石^[1,2]，尤其是苏门答腊油田的原油中发现了葡萄藻生物标记化合物葡萄藻烷^[3]，这就更进一步证实了葡萄藻在某些特殊的环境下具有形成石油的可能性，而我国胜利油田孤东油田原油的形成是比较独特的^[2]，它埋深浅，氧化性高，贮量又较大，这与石油形成的干酪根降解学说不相吻合，而在这些储油层的夹层泥岩中发现大量的葡萄藻化石，说明孤东油田的石油形成可能和葡萄藻有关。同时葡萄藻是分布于淡水水体的种类，常常形成水华，因此它不仅可以考虑作为探矿的生物指示物，也可以为陆相生油提供新的证据。

葡萄藻在自然条件下常能形成水华，但人工培养时其生长缓慢。据报道目前 *B.braunii* 的最低增代时间为 2.3 天。我们改进了培养基即在 Chu13 × 4 中加入 0.1~0.3 mg/l NaF 使其生长速度提高了一倍，也即增代时间缩短到 0.89 天。这些结果在国内尚未见报道。至于氟化钠对葡萄藻生长影响的机制尚不清楚，可能是影响了有关代谢途径的酶的活性并且在抑制糖酵解的同时相对地增加磷酸戊糖途径的循环，而有利于脂肪酸的形成^[4]。

目前，有关葡萄藻的开发利用尚存在一些问题，即：葡萄藻水华的成因，促进其生长及增加碳氢化合物形成的适合条件以及葡萄藻与生油的关系的进一步论证等。解决了这些问题不仅可以为人工大量培养葡萄藻提供依据，并可为今后的石

油探矿及石油形成的理论提供参考。

参 考 文 献

- [1] 何承全, 1981. 北部湾沿岸地区第三纪盘星藻属和葡萄藻属, 古生物学报, 20(2): 115—125。
- [2] 周光甲、张教祥、李经荣、陈致林, 1986. 孤东油田上第三系地层中的葡萄藻类生油探讨. 胜利油田地质科学院刊, 177—190。
- [3] Casadeval, E., Dif, D., Largeau, C., Guden, C., Chaumont, D. & Desanti, O., 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* 27(3): 286—295.
- [4] Douglas, A. G., Douraghi-Zadehi, K. & Eglinton, G., 1969. The fatty acids of the alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 8: 285—293.
- [5] Hillen, L. W. & Wake, L. V., 1979. 'Solar oil'—liquid hydrocarbon fuels from solar energy via algae. Air national conference, Newcastle, 5—9 Feb. 18—25.
- [6] McCune, D. C. & Weinstein, L. H., 1971. Metabolic effects of atmospheric fluorides on plants. *Environ. Pollut.*, 1: 169—174.
- [7] Moldoean, J. M. & Seifert, W. K., 1980. First discovery of botryococcane in petroleum. J. C. S. Chem. Comm. 912—914.
- [8] Temperley, B. N., 1936. *Botryococcus* and the algal coals. *Trans. R. Soc. Edin.*, 58: 855—868.
- [9] Wake, J. V., 1984. *Botryococcus braunii*, the alga that initiated oil drilling in Australia. *Search*, 15(5—6): 158—161.
- [10] Wolf, F. R., 1983. *Botryococcus braunii*: an unusual hydrocarbon-producing alga. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 8(3): 249—260.