

# 碱法絮凝采收聚球藻 7002 的研究

黄敏, 冯广鑫, 朱素芹, 吴浩浩\* (中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要** [目的]探究碱法絮凝采收聚球藻 7002 的效果和机制。[方法]通过研究不同 pH、沉降时间和藻细胞浓度对絮凝效果的影响, 确定碱法絮凝聚球藻 7002 的最佳条件, 通过检测藻体 Zeta 电位和藻体沉淀中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度, 分析碱法絮凝收集聚球藻 7002 的机制, 并根据采收的藻细胞的生长情况, 评估碱絮凝方法的安全性。[结果]碱法絮凝采收聚球藻 7002 的最佳 pH 和沉降时间分别为 10.5 和 120 min, 采收过程不受藻细胞浓度的影响。当絮凝 pH 为 10.5 时, 藻体 Zeta 电位(绝对值)最低,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  沉淀大量形成, 并通过正负电荷中和作用诱导藻细胞絮凝。此外, pH 10.5 的絮凝条件不会对藻细胞的生理活性产生明显影响。[结论]该试验得到了一种经济高效采收聚球藻 7002 的方法。

**关键词** 微藻; 聚球藻 7002; 采收; 碱法絮凝; 絮凝效率

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)18-0009-04

## Alkaline Flocculation for Harvesting *Synechococcus* sp. PCC 7002

HUANG Min, FENG Guang-xin, ZHU Su-qin et al (College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003)

**Abstract** [Objective] To study the effect and mechanism of alkaline flocculent of *Synechococcus* sp. PCC 7002. [Method] The effects of pH, settling time and biomass concentration on flocculent efficiency were studied to obtain the optimal flocculent condition. Zeta potential of algal and  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations in the sediment were determined to analyze the mechanism of alkaline flocculation of *Synechococcus* sp. PCC 7002. The growth of harvested cells were also examined to evaluate the safety of alkaline flocculation. [Result] The optimal pH and settling time were 10.5 and 120 min, respectively, and the alkaline flocculation was not affected by biomass concentration. When pH was 10.5, the Zeta potential of the algae was the lowest and the charge neutralization between  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  precipitate and algal cells was found to be the main mechanism of alkaline flocculation of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Additionally, the flocculation at pH 10.5 had no significant effect on the physiological activity of the harvested *Synechococcus* sp. PCC 7002. [Conclusion] The present study provided a cost-effective method to harvest *Synechococcus* sp. PCC 7002.

**Key words** Microalgae; *Synechococcus* sp. PCC 7002; Harvesting; Alkaline flocculation; Flocculent efficiency

微藻是一种光合自养微生物, 具有易于人工培养、光合作用效率高、生长周期短、单位时间内生物量高等优点。微藻富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸、色素等多种活性物质, 可用于生产高附加值产品<sup>[1]</sup>。另外, 其在环境保护领域也发挥了重要作用, 如生物修复废水、减排  $\text{CO}_2$  等<sup>[2-4]</sup>。因此, 有望用于缓解由人口增加、耕地面积减少、环境污染等因素造成的原料不足的问题<sup>[5]</sup>。微藻培养及采收成本高是制约其产业化的关键<sup>[6-7]</sup>。另外, 微藻细胞体积小、培养密度低、细胞表面带负电荷, 可均匀、稳定地分散于培养液中, 给集中采收带来许多困难<sup>[8]</sup>。建立高效的采收技术对降低微藻生产成本有重要意义。

目前采收方法主要有过滤法、气浮法、离心法及絮凝法等<sup>[9]</sup>。这些方法中, 絮凝法一直以设备投资少、分离过程简单、易于快速处理大量藻液而被广泛应用<sup>[10]</sup>。其原理是通过电中和减少藻细胞间的静电斥力, 使单个藻细胞形成较大的聚集物, 再通过重力沉淀与培养介质分离而采收。通过投加碱液, 调节藻液的 pH, 使藻细胞发生自絮凝称为碱法絮凝, 该方法具有低成本、能耗小和无化学污染等优点<sup>[11]</sup>。因此, 碱法絮凝是一种较理想的采收方法。

笔者以聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002) 为研究

对象, 探索了碱法絮凝收集该微藻的效果, 并探讨了相关机理, 为碱法絮凝的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

**1.1.1 材料。**聚球藻 7002 由北京大学生命科学学院赵进东院士惠赠。培养基采用 Medium A (pH 8.2), 培养于 100 mL 三角瓶中, 摇瓶培养 15 d, 条件为 150 r/min、30 °C、光强 8 000 lx,  $\text{OD}_{750}$  反映聚球藻 7002 的生物量<sup>[12]</sup>。氢氧化钠购于国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.2 仪器。**TS-211GZ 光照恒温摇床(上海仪纯实业有限公司); S210-K pH 计(METTLER TOLEDO); TGL-20B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Power Wave XS2 酶标仪(Gene Company Limited); Zetasizer Nano ZS 90 纳米粒度电位仪(Malvern Instruments); DigiBlock ED36 电热消解仪(北京莱伯泰科仪器股份有限公司); AA-6880F/AAC 原子吸收分光光度计(Shimadzu Corporation)。

**1.2 絮凝试验** 取 10 mL 聚球藻 7002 藻悬液置于 15 mL 离心管中, 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液将藻悬液 pH 分别调至 9.5、10.0、10.5、11.0、11.5 和 12.0, 室温静置 120 min 后取离液面深 1 cm 处的液体, 在 750 nm 处测定其吸光值。絮凝效率通过式(1)计算。取 10 mL 聚球藻 7002 藻悬液置于 15 mL 离心管中, 在 8 000 r/min 条件下离心 10 min 后, 取离液面深 1 cm 处的液体, 在 750 nm 处测定其吸光值作为对照。

$$\text{絮凝效率} = (1 - A/B) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A 为藻液絮凝结束后  $\text{OD}_{750}$ ; B 为藻液初始  $\text{OD}_{750}$ 。

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31601406); 山东省自然科学基金项目(ZR2016CB30); 青岛市应用基础研究计划项目(16-5-1-16-jch)。

**作者简介** 黄敏(1992—), 女, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 研究方向: 水产品高值化利用。\*通讯作者, 副教授, 从事水产品高值化利用研究。

**收稿日期** 2018-03-26

### 1.3 pH 10.5 絮凝聚球藻 7002 条件的确定

**1.3.1 沉降时间。**研究 pH 10.5 条件下,沉降时间对聚球藻 7002 絮凝效果的影响。用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节藻液 pH 为 10.5,连续 300 min 跟踪测定上清体积变化,以上清体积占藻液总体积的百分比为指标确定聚球藻 7002 在 pH 10.5 条件下完全絮凝的时间。

**1.3.2 藻细胞浓度。**研究 pH 10.5 条件下,藻细胞浓度对聚球藻 7002 絮凝效果的影响。用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节藻液 pH 为 10.5,藻液中湿藻含量分别为 4、8、12 和 16 g/L,静置 120 min 后记录絮凝效率。

**1.4 Zeta 电位测定** 取 1 mL 不同 pH 絮凝后藻液置于 U 型比色皿中,放入纳米粒度电位仪中进行检测。

**1.5  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度测定** 离心(8 000 r/min、10 min)后上清液以及 pH 10.5、11.0 和 11.5 絮凝后的上清液经过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤备用,藻体沉淀分别重悬于等体积的超纯水中,并在 550 r/min 条件下振动 60 min,使藻体分散均匀。量取 5 mL 重悬后的藻液于玻璃消解管中,加入 15 mL 消化液(高氯酸:硝酸=1:4),利用电热消解仪(DigiBlock ED36,北京莱伯泰科仪器股份有限公司)进行消化。取 Ca 和 Mg 标准储备液(1 mg/mL),用 1 mol/L  $\text{HNO}_3$  稀释成 1、2、3、4、5 mg/L 的 Ca 标准系列工作溶液和 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L 的 Mg 标准系列工作溶液。用原子吸收分光光度计(AA-6880F/AAC, Shimadzu Corporation)测量标准系列吸光度,绘制标准曲线。并在相同条件下测定和计算上清液、藻体消化液中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的含量。

**1.6 碱法絮凝收集聚球藻 7002 的安全性评估试验** 将 pH 10.5、11.0 和 11.5 絮凝 120 min 的聚球藻 7002 重新接种到新鲜的培养液中,离心(8 000 r/min、10 min)获得的聚球藻 7002

作为对照,连续 14 d 测定聚球藻 7002 在 750 nm 处的吸光值。采用修正 Gompertz 方程,对聚球藻 7002 的生长动态进行拟合,即一级模型。Gompertz 方程如下:

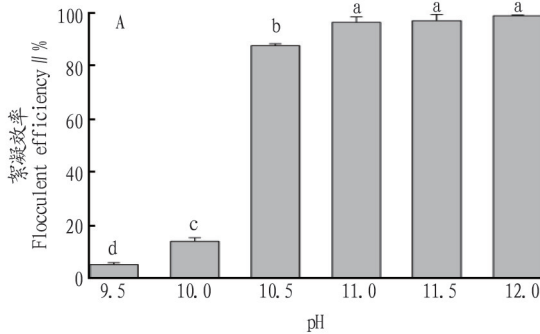
$$\lg N(t) = \lg N_0 + \lg \frac{N_{\max}}{N_0} \times \left\{ \exp \left[ \frac{\mu_{\max} \times 2.718}{\lg(N_{\max}/N_0)} \times (\text{Lag} - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

式中, $N(t)$  为培养时间为  $t$  时的聚球藻的密度 ( $\text{OD}_{750}$ );  $N_0$  和  $N_{\max}$  分别为初始和最大聚球藻 7002 的密度 ( $\text{OD}_{750}$ );  $\mu_{\max}$  为最大比生长速率 ( $\text{d}^{-1}$ ); Lag 为延滞时间 ( $\text{d}$ );  $t$  为培养时间 ( $\text{d}$ )。

**1.7 数据统计分析** 数据均以平均值  $\pm$  标准偏差 ( $n=3$ ) 来表示。采用最小显著差异法(the least significant difference, LSD),在 SPSS 19.0 统计软件中比较、分析均值的差异性,显著性水平为 0.05。

## 2 结果与分析

**2.1 碱法絮凝收集聚球藻 7002 条件的确定** 聚球藻 7002 在不同高 pH 条件下静置 120 min 的絮凝效率如图 1A 所示。培养基 pH 为 10.0 时,聚球藻 7002 的絮凝效率较低,为 13.8%;当 pH 升高至 10.5 时,絮凝效率得到显著提高 ( $P < 0.05$ ),达 87.8%;当培养基 pH 为 11.0 时,絮凝效率达 96.7%,继续提高培养基的 pH,絮凝效率无显著性变化。研究表明,离心方法可以有效采收微藻<sup>[13]</sup>,pH 10.5 絮凝后的上清在 750 nm 处的吸光值与 8 000 r/min 条件下离心 10 min 后上清的吸光值相同,说明 pH 10.5 可以有效地絮凝聚球藻 7002。当  $\text{pH} \geq 11.0$  时,絮凝效率提高可能是由于培养基中杂质也被絮凝沉淀。由图 1B 可知,pH 10.5 时絮凝速度最快;当  $\text{pH} \geq 11.0$  时,絮凝 120 min 后,藻体依然没有完全沉淀;pH 12.0 絮凝后藻体颜色变黄,说明藻细胞生理活性明显受到损伤。



注:小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ )

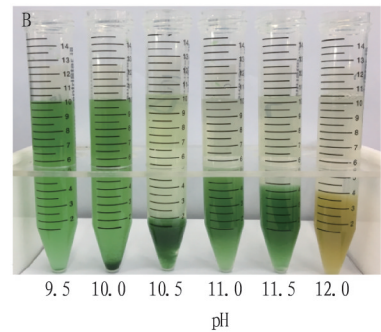


图 1 不同 pH 对聚球藻 7002 的絮凝效果

Fig.1 The flocculent effect of different pH on *Synechococcus* sp. PCC 7002

Blanchemain 等<sup>[14]</sup>分析,在高 pH 环境下,絮凝时间会影响藻细胞的生命活力。为了确定 pH 10.5 絮凝聚球藻 7002 的最佳沉降时间,连续 300 min 跟踪测定上清体积的变化。由图 2 可知,随着絮凝时间增加,上清体积逐渐增加,当絮凝至 120 min 时,上清体积占总体积的 60.3%,继续延长絮凝时间,上清体积增加不显著。

在摇瓶培养条件下,稳定期的聚球藻 7002 湿重达 4 g/L。

实际上,絮凝过程中会遇到不同浓度的藻液,为了评价藻细胞浓度对 pH 10.5 诱导聚球藻 7002 絮凝效果的影响,研究了 pH 10.5 对湿藻含量为 4、8、12、16 g/L 藻液的絮凝效果。由图 3 可知,藻细胞浓度对碱法絮凝聚球藻 7002 的效果无显著影响。

**2.2  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  在碱法絮凝中的变化** 由图 4 可知,碱法絮凝之前,99% 的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  存在于上清中。pH 10.5 絮凝

后,上清中  $\text{Ca}^{2+}$  以及藻体沉淀中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度几乎没有改变;而上清中  $\text{Mg}^{2+}$  大量减少,藻体沉淀中  $\text{Mg}^{2+}$  增加了 26%,且此时藻细胞几乎完全被絮凝(图 1)。当絮凝  $\text{pH} \geq 11.0$  时,随着  $\text{pH}$  增大,上清中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度逐渐降低,藻体沉淀中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度逐渐升高。

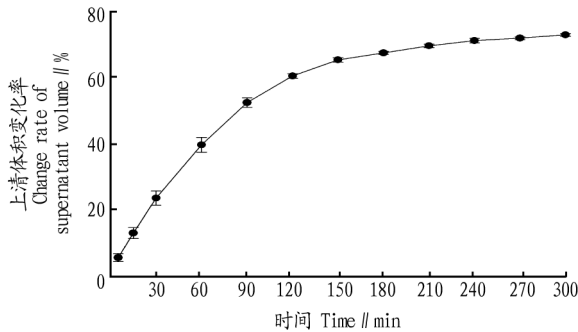


图 2 上清体积变化曲线

Fig.2 The change curve of supernatant volume

**2.3 pH 对藻体 Zeta 电位的影响** 从图 5 可以看出,碱法絮凝之前,藻体 Zeta 电位为  $-15.33 \text{ mV}$ ,说明聚球藻 7002 细胞

表面带负电荷;当培养基  $\text{pH} < 10.5$  时,随着培养基  $\text{pH}$  增加,藻体 Zeta 电位(绝对值)变化不显著;当培养基  $\text{pH}$  为 10.5 时,藻体 Zeta 电位(绝对值)迅速降低,达到最低值,说明藻细胞表面的负电荷被中和;当培养基  $\text{pH} > 10.5$  时,随着培养基  $\text{pH}$  继续增加,藻体 Zeta 电位(绝对值)有上升的趋势。

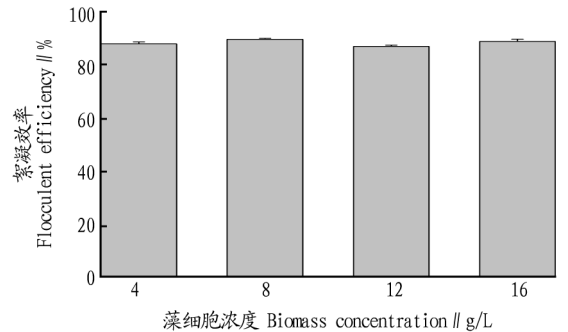
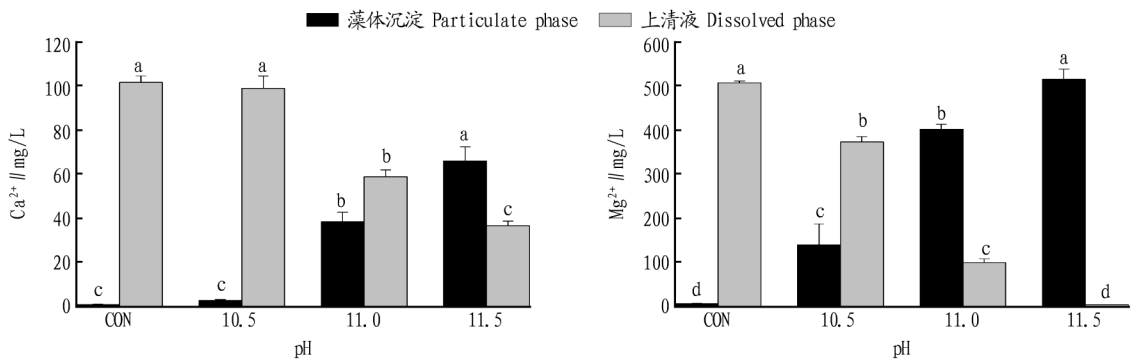


图 3 藻细胞浓度对絮凝效率的影响

Fig.3 The effect of biomass concentration on flocculent efficiency



注: CON. 碱法絮凝前;小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: CON. Before alkaline flocculation; different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ )

图 4  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度变化

Fig.4 The change of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentration

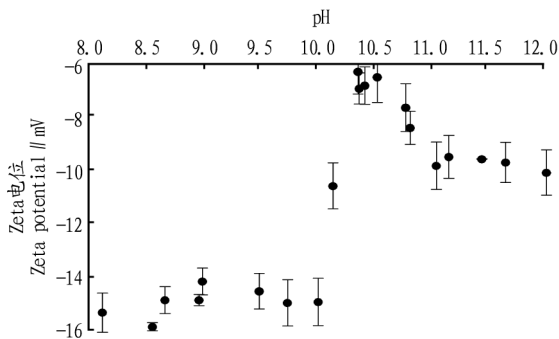
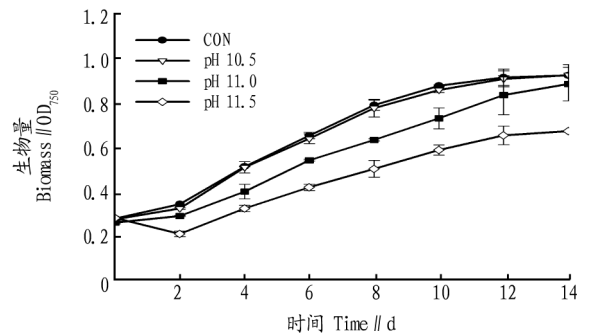


图 5 pH 对 Zeta 电位的影响

Fig.5 The effect of pH on zeta potential

**2.4 碱法絮凝收集聚球藻 7002 的安全性评估** 碱法絮凝和离心获得的聚球藻 7002 藻细胞的生长情况如图 6 所示,诱导藻细胞絮凝的  $\text{pH}$  越低,絮凝后藻细胞的生长状态越接近离心获得的藻细胞。用修正 Gompertz 方程拟合藻细胞生长曲线,求出藻细胞的动力学参数,对照组和  $\text{pH} 10.5$ 、 $11.0$  和



注: CON. 离心获得的藻细胞

Note: CON. Algae cells obtained by centrifugation

图 6 聚球藻 7002 生长曲线

Fig.6 The growth curve of *Synechococcus* sp. PCC 7002

11.5 曲线的相关系数分别为 0.998 8、0.997 9、0.997 3 和 0.981 8,证明曲线拟合有效(表 1)。在  $\text{pH} 10.5$  条件下,聚球藻 7002 生长,其延滞期、最大生长速率和最大藻体密度与对照相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ );在  $\text{pH} 11.0$  条件下,聚球藻



7002的延滞期与对照无显著差异,但是最大生长速率和最大藻体密度显著低于对照组( $P<0.05$ );在 pH 11.5 条件下,第 2 天的藻体密度反而比初始数值低,之后开始增长加快,其延滞期为 3.085 2 d,是对照组的 2.37 倍,最大藻体密度显著低于对照组( $P<0.05$ )。

表 1 聚球藻 7002 生长动力学参数

Table 1 The growth kinetic parameters of *Synechococcus* sp.PCC 7002

pH	Lag (d)	$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	$N_{\max}$ (OD <sub>750</sub> )	$R^2$
CON	1.300 1 b	0.085 9 a	0.92 a	0.998 8
10.5	1.287 1 b	0.084 2 a	0.92 a	0.997 9
11.0	1.344 1 b	0.061 7 b	0.88 b	0.997 3
11.5	3.085 2 a	0.054 9 c	0.67 c	0.981 8

注:CON.离心获得的藻细胞;同列小写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )

Note:CON. Algae cells obtained by centrifugation; different small letters within the same column mean significant differences( $P<0.05$ )

### 3 结论与讨论

该研究中,pH 10.5 可迅速实现微藻的絮凝。Pérez 等<sup>[15]</sup>认为,当培养基 pH 为 11.0、11.5 和 12.0 时,中肋骨条藻和纤细角毛藻的絮凝效率为 90%以上;Yang 等<sup>[16]</sup>认为,利用氢氧化钠增加培养基 pH,小球藻的絮凝效率达 90%。这说明碱法可有效实现微藻的絮凝,降低采收成本。在高 pH 条件诱导下,Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>等离子起重要作用<sup>[17]</sup>。pH 10.5 絮凝聚球藻 7002 后,上清中 Ca<sup>2+</sup>以及藻体沉淀中 Ca<sup>2+</sup>浓度几乎没有发生改变,而上清中 Mg<sup>2+</sup>浓度减少,藻体沉淀中 Mg<sup>2+</sup>浓度增加。另外,Vandamme 等<sup>[18]</sup>发现,在高 pH 诱导小球藻絮凝试验中,Mg<sup>2+</sup>( $\geq 0.15$  mmol/L)是必不可少的;Wu 等<sup>[19]</sup>研究了高 pH 诱导绿球藻等淡水微藻以及三角褐指藻等海洋微藻的絮凝效果,结果表明,微藻絮凝后培养基中 Mg<sup>2+</sup>浓度显著下降。以上研究说明 Mg<sup>2+</sup>在碱法絮凝收集微藻过程中起着重要作用。

当 pH 为 10.5 时,藻体 Zeta 电位(绝对值)迅速降到最低值,根据此时 Mg<sup>2+</sup>浓度变化情况分析其原因,应该是此时培养基中的 Mg<sup>2+</sup>形成了表面带正电荷、吸附面积较大的 Mg(OH)<sub>2</sub>沉淀,并吸附了表面带负电荷的藻细胞,使藻细胞间的静电斥力减小,藻体 Zeta 电位(绝对值)降低,从而致使藻液均匀、稳定的状态被打破,单个细胞发生聚集,在重力的作用下沉降达到絮凝效果<sup>[20]</sup>。另外,Mg(OH)<sub>2</sub>具有相当开放的结构,即使在低浓度的情况下,也可以有效诱导藻细胞的絮凝<sup>[19]</sup>,这也解释了 pH 10.5 絮凝聚球藻 7002 不受藻细胞浓度影响的结果。当絮凝 pH >10.5 时,藻体 Zeta 电位(绝对值)有上升的趋势,这表明微藻细胞表面的羧基团被解离,从而使絮凝体间的静电斥力增大,絮凝沉降的速度较 pH 10.5 时显著降低。

根据采收的藻细胞生长情况和生长动力学参数可以看出,采用 pH  $\geq 11.0$  的条件对聚球藻 7002 进行絮凝时,藻细胞的生理活性受到损伤,致使藻细胞适应环境的能力下降,严重影响了其后续的生长增殖,pH 10.5 时,对微藻细胞后续生长繁殖无显著影响。

该试验通过分析碱絮凝法,获得聚球藻 7002 的最佳絮凝条件为 pH 10.5,最佳沉降时间为 120 min,絮凝过程不受微藻浓度的影响。该结果可为聚球藻 7002 的规模化培养和采集提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 胡光荣,范勇,李福利.微藻中的高附加值天然产物与挖掘策略[J].氨基酸和生物资源,2015,37(4):1-6.
- [2] SUKA ČOVÁ K,TRTÍLEK M,RATAJ T.Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment[J].Water research,2015,71:55-63.
- [3] PIRES J C M,ALVIM-FERRAZ M C M,MARTINS F G,et al.Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept[J].Renewable & sustainable energy reviews,2012,16(5):3043-3053.
- [4] EL-SHELTAWY S T,EL-DIWANI G I,ATTIA N K,et al.Reactive extraction of microalgae for biodiesel production;an optimization study[J].Journal of solid waste technology & management,2015,41(4):10-21.
- [5] SUGANYA T,VARMAN M,MASJUKI H H,et al.Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production:A biorefinery approach[J].Renewable & sustainable energy reviews,2016,55:909-941.
- [6] MOLINA GRIMA E,BELARBI E H,ACIÉN FERNÁNDEZ F G,et al.Recovery of microalgal biomass and metabolites:Process options and economics[J].Biotechnology advances,2003,20(7/8):491-515.
- [7] 万春,张明月,赵心清,等.利用絮凝进行微藻采收的研究进展[J].生物工程学报,2015,31(2):161-171.
- [8] PAHL S L,LEE A K,KALAITZIDIS T,et al.Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass[M]//BOROWITZKA M A,MOHEIMANI N R.Algae for biofuels and energy.Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2013:165-185.
- [9] 郭锁莲,赵心清,白凤武.微藻采收方法的研究进展[J].微生物学通报,2015,42(4):721-728.
- [10] VANDAMME D,FOUBERT I,MUYLAERT K.Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production[J].Trends in biotechnology,2013,31(4):233-239.
- [11] PÉREZ L,SALGUEIRO J L,MACEIRAS R,et al.An effective method for harvesting of marine microalgae:pH induced flocculation[J].Biomass & bioenergy,2017,97:20-26.
- [12] MAKRIDIS P,VADSTEIN O.Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages[J].Journal of plankton research,1999,21(11):2191-2201.
- [13] UDUMAN N,QI Y,DANQUAH M K,et al.Dewatering of microalgal cultures:A major bottleneck to algae-based fuels[J].Journal of renewable & sustainable energy,2010,2(1):1-11.
- [14] BLANCHEMAIN A,GRIZEAU D,GUARY J C.Effect of different organic buffers on the growth of *Skeletonema costatum* cultures;further evidence for an autoinhibitory effect[J].Journal of plankton research,1994,16(10):1433-1440.
- [15] PÉREZ L,SALGUEIRO J L,MACEIRAS R,et al.An effective method for harvesting of marine microalgae:pH induced flocculation[J].Biomass & bioenergy,2017,97:20-26.
- [16] YANG F F,XIANG W Z,FAN J W,et al.High pH-induced flocculation of marine *Chlorella* sp.for biofuel production[J].Journal of applied phycology,2016,28(2):1-10.
- [17] SHELEF G S,SUKENIK A, GREEN M.Microalgae harvesting and processing:A literature review[J].Algae,1984,8(3):237-244.
- [18] VANDAMME D,FOUBERT I,FRAEYE I,et al.Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH:Role of magnesium and calcium and practical implications[J].Bioresource technology,2012,105(2):114-119.
- [19] WU Z C,ZHU Y,HUANG W Y,et al.Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium[J].Bioresource technology,2012,110(2):496-502.
- [20] SEMERJIAN L,AYOUB G M.High-pH-magnesium coagulation-flocculation in wastewater treatment[J].Advances in environmental research,2003,7(2):389-403.