

利用工业废水培养小球藻的水质净化研究

周连宁^{1,2}, 王波¹ (1. 深港产学研环保工程技术股份有限公司, 广东深圳 518057; 2. 深圳市海岸与大气研究重点实验室, 广东深圳 518057)

摘要 [目的]考察利用工业废水规模化培养高脂微藻生产生物柴油,同时净化废水。[方法]采用豆制品废水、啤酒废水、肉制品废水作为小球藻(*Chlorella vulgaris*)生长的培养液,比较不同废水营养因子及培养条件对小球藻生长与油脂累积的影响。[结果]豆制品废水与啤酒废水能较好的促进小球藻的生长,当废水中 Mg^{2+} 和无机磷的添加量分别为112.5 mg/L、60 mg/L时,小球藻的干重达到最大3.57 g/L、4.44 g/L,且小球藻适于生长在中性中温、5 000 lx光照条件下,培养过程中可适量通入空气以补充碳源;在最佳条件下培养结束后废水的CODcr、TN和TP去除率分别能达到72.9%~85.1%、37.9%~64.2%和30.1%~84.9%。[结论]小球藻具有典型的氮磷去除能力。

关键词 小球藻;工业废水;生物量;氮/磷去除

中图分类号 S271 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)34-13325-05

Water Purification Research on Cultivation of *Chlorella vulgaris* with Industrial Wastewater

ZHOU Lian-ning et al (Shenzhen-Hongkong Institution of Industry, Education&Research Environmental Technique Co. Ltd., Shenzhen, Guangdong 518057)

Abstract [Objective] The technical feasibility by industrial wastewater was used as culture media for large scale cultivation of oil-rich microalgae as biodiesel feedstock and treating the industrial wastewater simultaneously. [Method] With soybean wastewater, brewery wastewater and meat wastewater as growing culture medium of *Chlorella vulgaris*, compare the effect of different wastewater nutritional factors and culture conditions for chlorella growth and grease accumulation. [Result] The results showed that soybean wastewater and brewery wastewater can be better promoting the growth of Chlorella, when the optimal addition of Mg^{2+} and inorganic phosphorus in wastewater was 112.5 mg/L, 60 mg/L respectively, the maximum dry weight of chlorella can reach 3.57 g/L, 4.44 g/L; and Chlorella is suitable in neutral medium temperature, 5 000 lx lighting, ventilation conditions for grown; After the incubation period under optimum conditions, the CODcr, TN and TP removal rate of wastewater can reach 72.9% - 85.1%, 37.9% - 64.2%, 30.1% - 84.9%. [Conclusion] *Chlorella vulgaris* has typical nitrogen/phosphorus removal ability.

Key words *Chlorella vulgaris*; Industrial wastewater; Biomass; Nitrogen/phosphorus removal

近年来随着石油、煤炭等化石能源的日益枯竭,基于生物质的生物炼制引起了人们高度重视,微藻作为重要的可再生资源能够提供大量的生物质(油脂、淀粉、纤维素),在生物炼制领域具有广阔的应用前景^[1-2]。目前由于培养技术不成熟导致的生产成本高、效率低是限制微藻产业化培养的主要因素,因此降低培养成本、提高产量、开发规模化的微藻培养技术,是微藻研究迫切需要解决的问题^[3]。利用工业废水培养能源微藻,既可以节约大量水资源和营养盐,大大降低微藻的培养成本,又可以净化水质,实现废水的资源化^[4-5]。该试验利用小球藻抗污能力强、产油高的特性,利用不同种类的工业废水培养小球藻生产生物柴油的可行性进行研究,通过选择合适的营养盐对工业废水培养小球藻的营养因子进行优化,同时对系统的培养条件进行初步调控优化,从而达到降低培养成本、提高油脂产量及营养盐利用率目的,最终评价小球藻对废水的去污效果,为实现工业废水的再利

用、资源化处理和废水规模培养能源微藻奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 藻种。小球藻(*Chlorella vulgaris*)购自中科院(武汉)水生生物研究所淡水藻种库。

1.1.2 BG11(Blue-Green Medium)基础培养基配方(mg/L)。NaNO₃, 1 500; MgSO₄ · 7H₂O, 75; CaCl₂ · 2H₂O, 36; 柠檬酸, 6; Na₂EDTA, 1; 柠檬酸铁铵, 6; Na₂CO₃, 20; K₂HPO₄ · H₂O, 40; 微量元素(A5): ZnSO₄ · 7H₂O, 0.222; CuSO₄ · 7H₂O, 0.079; MnCl₄ · 4H₂O, 1.81; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 39; Co(NO₃)₂ · 6H₂O, 0.049; H₃BO₃, 2.86, 去离子水定容至1 000 ml。

1.1.3 工业废水来源。豆制品废水取自深圳维他(光明)食品饮料有限公司;啤酒废水取自深圳金威啤酒有限公司;肉制品废水取自深圳市伊泽实业有限公司康力食品厂。各类工业废水水质见表1。

表1 各类工业废水水质

废水类型	pH	CODcr	TP	磷酸盐	TN	氨-N	硝酸盐氮
豆制品废水	7.1	1.66 × 10 ³	6.43	4.60	64.1	9.41	2.0
肉制品废水	5.9	2.67 × 10 ³	38.2	23.9	150	146	6.0
啤酒废水	5.8	2.12 × 10 ³	4.34	2.19	46.4	20.2	1.0
BG11培养基	7.1	-	7.13	7.13	247.06	0	247.06

基金项目 深圳市战略新兴产业发展专项资金项目(CXZZ20120618111150009)。

作者简介 周连宁(1984-),男,湖北荆州人,硕士,从事环境生物技术研究工作。

收稿日期 2013-11-03

1.2 试验方法

1.2.1 小球藻预培养。无菌条件下,挑选保存在平板上且生长良好的单一藻株接入BG11液体培养基中,维持温度在25(±1)℃、2 000 lx持续光照条件进行扩大培养,获得足量

小球藻。将处于对数生长期的藻种在 4 000 r/min 下离心 5 min, 收集浓缩藻液备用。

1.2.2 不同工业废水对培养小球藻的影响。取若干支经过灭菌处理的 1 L 三角瓶, 装入 400 ml 豆制品废水、肉制品废水和啤酒废水, 加入一定量的浓缩藻液, 使每个试验条件下的初始藻细胞密度为 1×10^6 左右, 接种后维持温度在 $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ 、2 000 lx 持续光照条件下进行培养。考察不同废水对

小球藻生长的影响, 每个试验设置 2 个平行样, 取平均值作为最终试验结果。

1.2.3 废水中添加不同营养因子对培养小球藻的影响。选取上述适于小球藻生长的废水, 考察各废水中添加不同营养盐对小球藻生物量的影响。废水中添加不同营养盐组合对小球藻生物量的影响试验以 BG11 培养基营养条件为基础, 设置 8 组营养组合(表 2), 各组试验均设置两个平行样。

表 2 废水培养小球藻添加的不同营养盐组合

营养成分	1	2	3	4	5	6	7	8
NaNO ₃	+	-	+	+	+	+	+	+
MgSO ₄ · 7H ₂ O	+	+	-	+	+	+	+	+
CaCl ₂ · 2H ₂ O	+	+	+	-	+	+	+	+
Citric acid + Ferric ammonium citrate	+	+	+	+	-	+	+	+
Na ₂ EDTA	+	+	+	+	+	-	+	+
Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	+	+	+	+	+	+	-	+
Microelements (A5)	+	+	+	+	+	+	+	-

注: “+”和“-”分别表示添加和不添加。

1.2.4 不同培养条件对培养小球藻的影响。选择不同培养条件 pH(3.5、7、9、11)、温度(15、20、25、30、35 °C)、光照强度(2 500、5 000、7 500、10 000 lx)、通气与否, 考察小球藻在废水中添加最适营养盐后不同培养条件下的生长情况及小球藻对废水的净化效果, 各组试验均设置两个平行样。

1.2.5 分析检测方法。①藻细胞密度测定: 在全光谱扫描中通过测定 OD₆₈₀ 来定性测定藻细胞生长浊度。

②藻干重测定: 取 2 ml 小球藻培养液置于 2.5 ml 离心管中, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液。加入蒸馏水, 在振荡器上重新悬浮, 再次离心, 弃去上清液。以上过程重复 3 次。将离心管敞口放入烘箱中, 80 °C 烘至恒重, 测定干重。

③化学需氧量采用重铬酸钾法(GB 11914-89); 总氮采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894-89); 总磷采用过硫酸钾氧化-钼锑抗分光光度法测定(GB 11893-89)^[6]。

2 结果与分析

2.1 不同工业废水对小球藻生长的影响 该试验考察小球藻在豆制品废水、肉制品废水、啤酒废水和 BG11 培养基中的生长情况, 小球藻在不同废水中的生长情况如图 1 所示。小球藻在 BG11 培养基中生长第 7 天开始迅速增长, 之后进入稳定期, 分别在第 17、18 天达到最高光密度值 3.343、3.66, 测得细胞密度分别为 2.41×10^8 、 2.53×10^8 ind./ml; 小球藻在豆制品废水中的生长趋势与 BG11 培养基中相同, 在第 17 天达到最高, 测得细胞密度 1.87×10^8 ind./ml; 相对而言, 小球藻在啤酒纯废水和肉制品纯废水培养基中前 12 d 增长速度均比较缓慢, 随后几乎停止生长, 在啤酒废水中培养第 13 天达到最高细胞密度为 8.67×10^7 ind./ml。从试验结果可知, 小球藻在 3 种废水中培养效果最好的是豆制品废水, 其次是啤酒废水, 培养效果最不好是肉制品废水。

利用豆制品废水、啤酒废水和肉类食品废水培养小球藻, 一方面可以节约大量的水资源, 同时可以实现废水资源

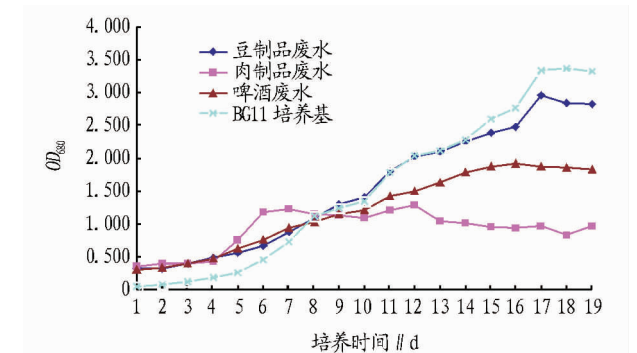


图 1 不同工业废水对小球藻生长的影响

化利用。从小球藻生长曲线来看, 小球藻在 BG11 培养基和豆制品废水中的生长情况差别不大, 表明豆制品废水可以替代自制基础培养基培养小球藻; 小球藻在豆制品纯废水中生长情况在后期相对较差, 由于豆制品废水中的 TN 和 TP 均低于 BG11 中的浓度, 氮磷等营养元素的缺乏可能是导致豆制品废水中小球藻在后期生长缓慢的主要原因, 向废水中添加一定量的营养元素有可能大大促进小球藻的生长^[7]。

2.2 废水中添加不同营养因子对小球藻生长的影响 上述试验验证了 3 种工业废水与基础培养基对小球藻生长的影响, 其中肉制品废水对小球藻的生长增殖变化不大, 因此该试验只考察豆制品废水和啤酒废水中不同营养因子对小球藻生长的影响, 结果见图 2~3。

2.2.1 豆制品废水中不同营养因子对小球藻生长的影响。从小球藻在豆制品废水中不同营养因子的生长曲线(图 2-A)来看, 在缺硝酸盐、Ca²⁺、柠檬酸铁铵、EDTA 与微量元素添加的条件下, 小球藻的生长同全营养元素组的条件相比差异不大; 而从缺 Mg²⁺ 组的生长曲线来看, 在无额外的 Mg²⁺ 补充的条件下小球藻的生长明显受到限制。因此从小球藻 OD₆₈₀ 生长变化情况分析, 利用豆制品废水培养小球藻, NO₃⁻、柠檬酸铁铵、EDTA 与微量元素可以不用添加, 而 Mg²⁺

则必须补充,无机磷需要适量补充。

为确定合适的 Mg^{2+} 和无机磷添加浓度,以 BG11 培养基中的 Mg^{2+} 和无机磷浓度为基准,向豆制品废水分别添加 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 倍 Mg^{2+} 和无机磷合成豆制品废水培养基,考察小球藻在不同 Mg^{2+} 和无机磷浓度下的生长情况,通过培养结束后小球藻的干重量来确定最佳添加浓度。图 2

-B、C 分别是小球藻在不同 Mg^{2+} 、无机磷浓度下培养的藻干重,从图 2-B 中不同 Mg^{2+} 添加浓度藻干重的变化情况可看出,浓度为 1.5 倍时即 Mg^{2+} 添加量为 112.5 mg/L ,培养获得的藻干重最大为 $3.57 (\pm 0.32) \text{ g/L}$;图 2-C 中不同浓度无机磷培养小球藻结果显示,无机磷添加浓度为 1.5 倍时培养获得的藻干重量最大为 $2.79 (\pm 0.26) \text{ g/L}$ 。

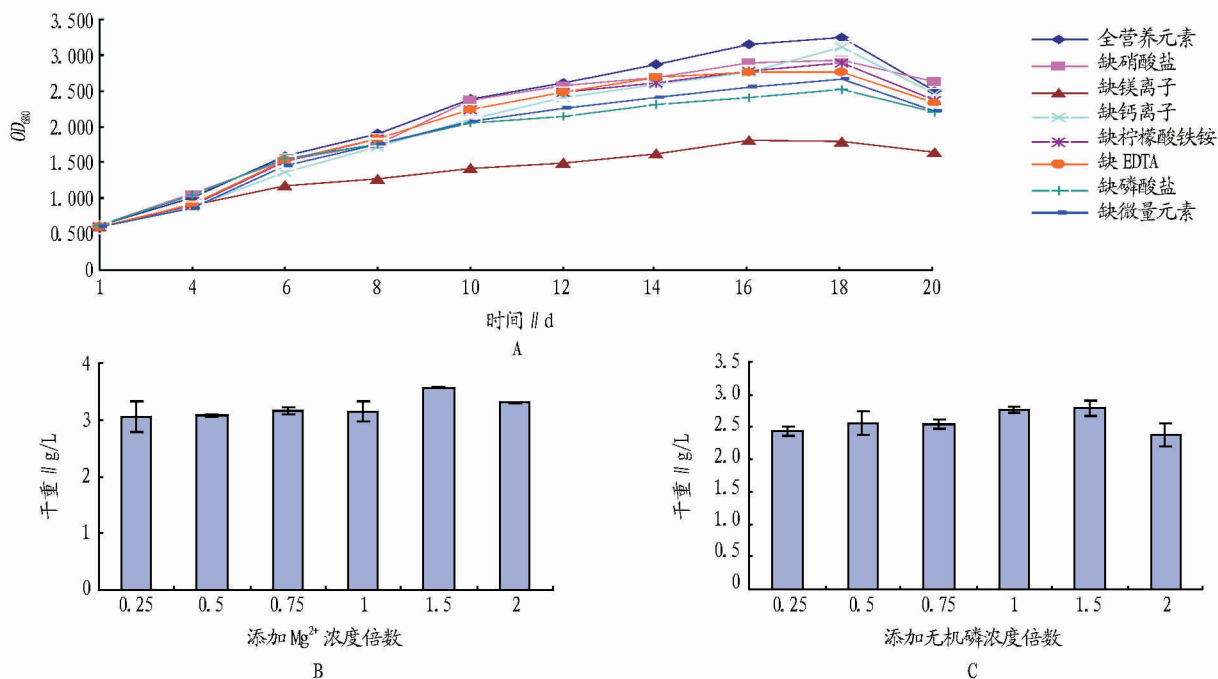


图 2 豆制品废水中不同营养因子对小球藻生长的影响

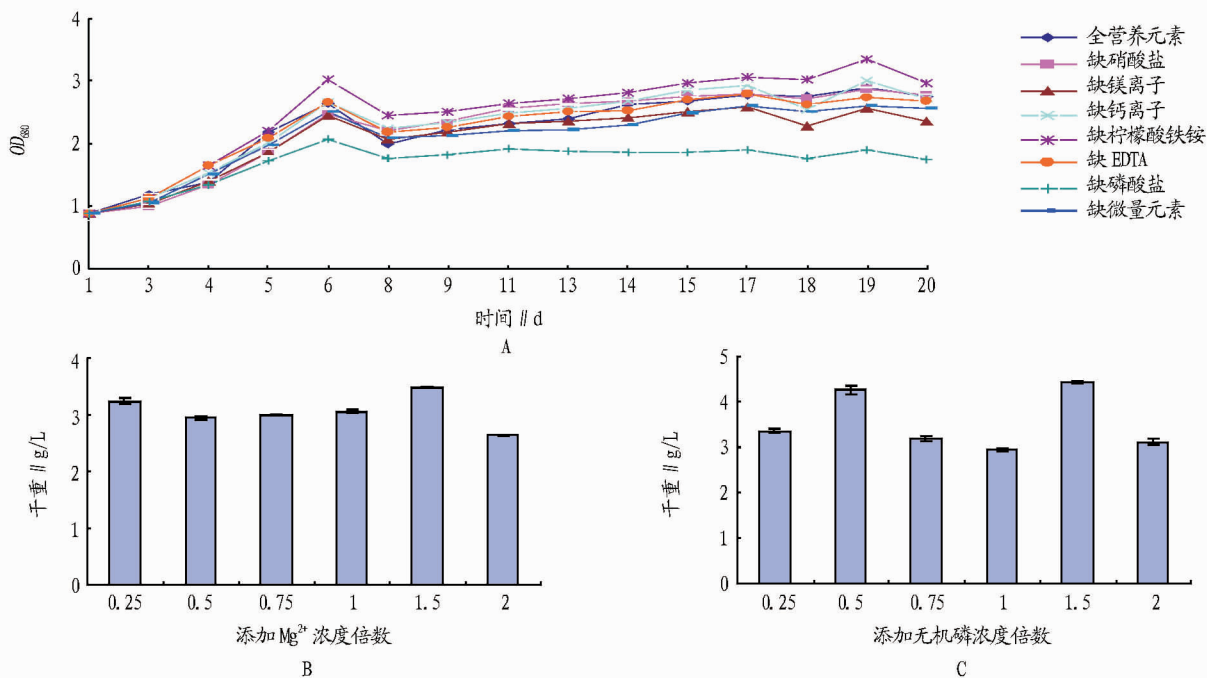


图 3 啤酒废水中不同营养因子对小球藻生长的影响

2.2.2 啤酒废水中添加不同营养因子对小球藻生长的影响。从图 3-A 中可以看出,小球藻在啤酒废水中缺乏不同营养因子条件下的 OD_{680} 生长曲线看,在缺硝酸盐、 Ca^{2+} 、柠檬酸铁铵、EDTA 与微量元素添加的条件下,小球藻的生长

同全营养元素组的条件相比无明显差异;而从缺磷酸盐组的生长曲线来看,在无额外的磷酸盐补充的条件下,相对于其他组条件小球藻的生长受到明显限制。图 3-A 中单纯从 OD_{680} 生长趋势来分析,利用啤酒废水培养小球藻, NO_3^- 、柠檬

酸铁铵、EDTA 与微量元素可以不用添加,而磷酸盐则必须补充, Mg^{2+} 需适量补充。

图 3-B、C 分别是啤酒废水中添加不同浓度倍数的 Mg^{2+} 和无机磷培养基组成下,小球藻细胞干重情况,结果显示:图 3-B 中反应添加 Mg^{2+} 浓度倍数为 1.5 时,小球藻的干重量最大为 $3.48(\pm 0.14)g/L$,浓度倍数为 2 时小球藻干重量最低为 $2.64(\pm 0.24)g/L$;图 3-C 中反应添加磷酸盐浓度倍数为 1.5 时,小球藻干重最大为 $4.44(\pm 0.15)g/L$,基础倍数 1 时藻干重最低为 $2.94(\pm 0.14)g/L$ 。

试验结果显示,小球藻在豆制品废水和啤酒废水中不同营养因子存在的条件下生长,当缺乏 Mg^{2+} 或磷酸盐存在的情况下小球藻生长受到明显抑制,说明 Mg^{2+} 和无机磷是小球藻在豆制品废水和啤酒废水中培养不可或缺的营养物质。 Mg^{2+} 是叶绿体的组成成分,过高或过低浓度的 Mg^{2+} 会延长藻细胞内的叶绿素合成,合适的 Mg^{2+} 浓度对小球藻的生长至关重要;无机磷在藻细胞进行光合碳代谢过程中发挥非常重要的作用,合适的无机磷浓度能有效提高藻细胞的光合速率。

2.3 废水中不同培养条件对小球藻生长的影响 为考察小球藻在豆制品废水中添加的最佳营养因子条件,选择不同培养条件进行培养,如图 4-A、B、C、D 分别是小球藻在不同

pH、温度、光照强度、通气与否条件下 OD_{680} 的变化情况。

从图 4-A 中可以看出,在 pH 为 3~11 范围内,小球藻在过高或过低 pH 条件下的生长都有一个明显的迟缓期,说明小球藻对环境的改变有一个适应过程,然而在较中性条件下小球藻的生长基本一致,从图中 OD_{680} 反应小球藻生长的最适 pH 为 7;从图 4-B 看出在温度 15~35 °C 范围内,温度过高(在 35 °C 培养条件下)小球藻的生长受到明显抑制,温度过低(在 15 °C 培养条件下)小球藻生物量有持续增长趋势但相对增长较缓慢,在其他中温条件下小球藻的生长趋势基本一致,且 25 °C 时生物量保持最大;从图 4-C 中可以看出,小球藻在光照强度为 2 500~10 000 lx 范围内培养,基本生长趋势一致,但在较强光线或较弱光线照射下小球藻生长缓慢,由于藻类对光强有一个饱和范围即饱和光照强度,超越了光饱和范围的光强度是藻生长的一个限制因素,从图中显示小球藻的最适光照强度为 5 000 lx;从图 4-D 中看出当系统通入空气(空气中的 CO_2 充当碳源)培养小球藻,通入空气与未通入空气的试验组均在培养 18 d 后 OD_{680} 达到最高值,分别为 2.672、2.332,但未通入空气的试验组存在不足,试验结束后大部分小球藻附着在三角瓶内壁,为提取小球藻带来不便,因此建议培养过程优先考虑通入空气进行培养。

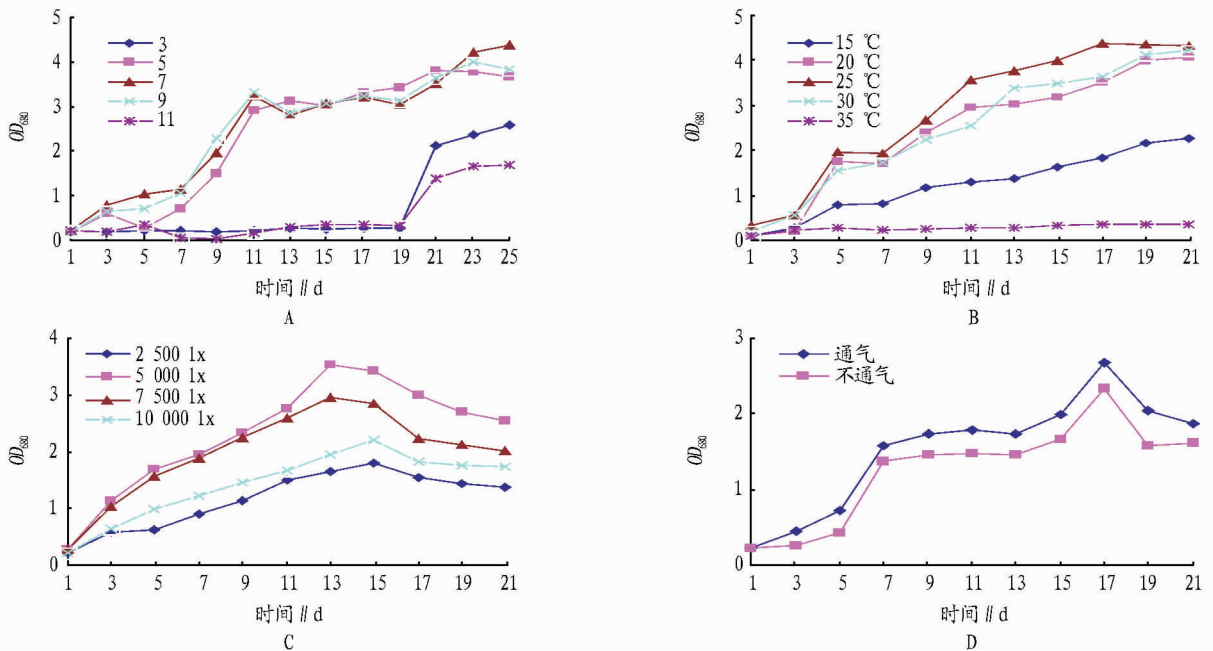


图 4 废水中不同培养条件对小球藻生长的影响

2.4 不同工业废水培养微藻后的水质净化情况 该试验将工业废水深度处理和能源微藻培养相耦合,采用豆制品废水、啤酒废水、肉制品废水添加上述营养因子且在最佳条件下培养小球藻,转移污水中的 N 和 P 而达到净化废水。培养结束后各废水水质净化效果如图 5-A、B、C 所示。

结果表明:豆制品废水、啤酒废水和肉类食品废水培养小球藻前的 COD_{Cr} 分别为 1 011、1 935 和 2 410 mg/L;TN 分别为 33.55、41.6 和 160 mg/L;TP 分别为 3.57、3.96 和 37.2 mg/L。培养小球藻后的 COD_{Cr} 分别为 274、442 和 358 mg/L,

COD_{Cr} 去除率分别为 72.9%、77.2%、85.1%;TN 分别为 12.0、25.85 和 92.1 mg/L,TN 去除率分别为 64.2%、37.9%、42.3%;TP 分别为 0.54、1.94 和 26.0 mg/L,TP 去除率分别为 84.9%、51.0%、30.1%。经统计学分析($P \leq 0.05$)均显著性降低,说明利用工业废水培养小球藻可以明显降低废水中的 COD_{Cr} 、TN、TP 含量。

3 结论与讨论

笔者考察了豆制品废水、啤酒废水、肉制品废水及 BG11 基础培养基培养小球藻的可行性。结果表明,豆制品废水及

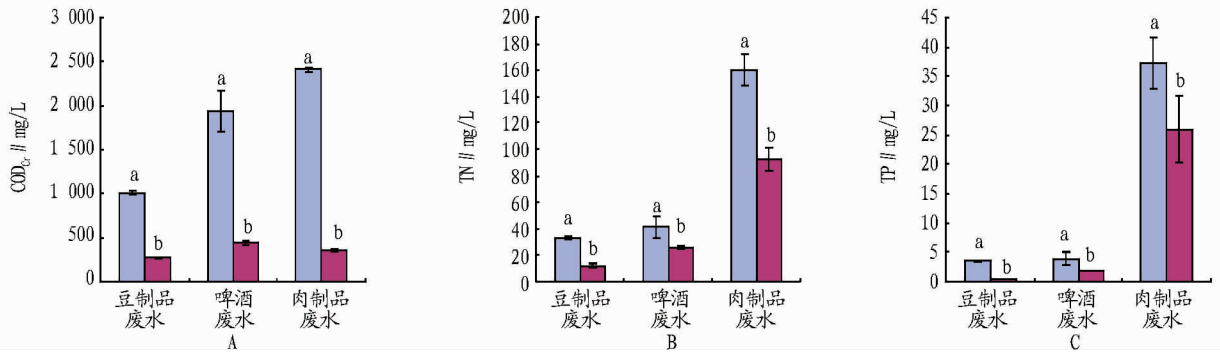


图5 小球藻对不同废水 COD_{cr}、TN、TP 净化效果

啤酒废水能较好地促进小球藻的生长,可以用于小球藻的培养。对这两种废水做了营养因子缺失试验,发现豆制品废水、啤酒废水在缺失 Mg^{2+} 和无机磷的条件下培养小球藻,小球藻的生物量明显下降;选择 Mg^{2+} 和无机磷因子在废水中不同添加量,当废水中 Mg^{2+} 和无机磷的添加量分别为 112.5、60 mg/L 时,小球藻的干重最大能达到 3.57 和 4.44 g/L。在添加合适营养因子的基础上,对工业废水培养小球藻的培养条件进行了优化,结果显示,小球藻适于生长在中性中温、5 000 lx 光照条件下,培养过程中适量通入空气以补充碳源。且利用工业废水培养小球藻,能够有效去除工业废水中的 COD、TN 和 TP。该试验根据不同类型废水培养小球藻,结果发现 COD_{cr}、TN 和 TP 去除率分别能达到 72.9% ~ 85.1%、37.9% ~ 64.2% 和 30.1% ~ 84.9%,由此说明小球藻具有较强的氮磷去除能力。

参考文献

[1] 郑洪立,齐张,马小琛,等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(3):110-116.

- [2] 姚茹,程丽华,徐新华,等. 微藻的高油脂化技术研究进展[J]. 化学进展,2010,22(6):1221-1232.
- [3] CHINNASAMY S, BHATTNAGAR A, HUNT R W, et al. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9):3097-3105.
- [4] 梅洪,张成武,殷大聪,等. 利用微藻生产可再生能源研究概况[J]. 武汉植物学杂志,2008,26(6):650-660.
- [5] 刘波,孙艳,刘永红,等. 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展[J]. 微生物学报,2005,45(1):153-156.
- [6] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,1989:280-285.
- [7] LIN Q, LIN J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102:1615-1621.
- [8] MATA T M, MARTINS A, CAETANO N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review [J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2010, 14(1):217-232.
- [9] TAM N F Y, WONG Y S. Effect of ammonia concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media [J]. *Bioresource Technology*, 1996, 57:45-50.
- [10] VASUDEVAN P T, BRIGGS M. Biodiesel production current state of the art and challenges [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(5):421-430.

(上接第 13241 页)

种类并不多,各种类型的抗植物病毒剂仍存在很大的局限性,当前还没有像防治真菌病害一样稳定有效的杀菌剂。随着分子生物学、病毒学、植物生理学、化学、生物化学、计算机等学科的进步,各种现代检测分析手段如物质谱、生物核磁技术等应用到该领域,给抗植物病毒剂的研究与开发带来新机遇^[9]。在目前缺乏单一高效的病毒抑制钝化剂、治疗剂、植物抗性诱导剂的情况下,将有可能属于不同抗性机制的 2 种或以上抗病毒制剂组合使用,探讨联合增效作用,不失为一种筛选高效防控植物病毒措施的重要途径。在该研究中,毒氟磷、维佳希、香菇多糖等几种相对抗病毒生物活性较高单剂的组合使用,产生了较明显的增效作用,对田间大白菜病毒病产生较好防效,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 史国立,李亚兰,张耀伟,等. 大白菜抗感品种间作提高感病品种抗病毒能力研究[J]. 植物保护,2006,32(5):38-40.
- [2] 李化银,李利斌,刘立锋,等. 秋播大白菜主要病害及其防治研究进展[J]. 天津农业科学,2010,16(3):75-78.
- [3] 陈莹,姜奇峰. 大白菜病毒病的发生与防治[J]. 吉林蔬菜,2008(6):32-33.
- [4] 王翠花,张焕家,洪榴丹,等. 山东大白菜病毒病原类群分布及防治措施[J]. 山东农业科学,1991(5):36-38.
- [5] 孙胜伟,宋丽敏,刘宇,等. 北方地区大白菜病毒病综合防治技术[J]. 农村实用科技信息,2009(5):47.
- [6] 任侃牢,刘锁宁. 大白菜病毒病的综合防治[J]. 西北园艺,2005(9):35.
- [7] 王守春. 大白菜病毒病综合防治技术[J]. 吉林蔬菜,2008(1):47.
- [8] 罗浚清. 关于植物病毒病的若干问题[J]. 农药通讯,2001(5):24-26.
- [9] 陈齐斌,沈嘉祥. 抗植物病毒剂研究进展和面临的挑战与机遇[J]. 云南农业大学学报,2005,20(4):505-510.