

利用生活污水培养单针藻 (*Monoraphidium dybowskii* C29) 的条件优化研究

王 孟, 刘平怀

(海南大学 材料与化工学院, 海口 570228)

摘要:为了获得单针藻在生活污水中生长的最佳营养条件, 以及研究单针藻对生活污水的净化作用, 通过对污水中添加不同量 BG11 培养基、不同初始 pH 以及不同质量浓度葡萄糖进行单针藻生物量和油脂产量及对污水中氮、磷去除率的试验。结果表明: 当生活污水中 BG11 添加量为 50%、pH 为 7.0、终葡萄糖质量浓度为 0.5 g/L 时单针藻生长最佳, 生物量和油脂产量分别为 2.74 g/L 和 1.04 g/L, 同时对污水中氮、磷去除率分别为 86.09% 和 96.64%。因此, 利用生活污水培养单针藻, 可达到产油微藻培养与污水净化相结合的目的。

关键词:生活污水; 单针藻; 优化培养; 生物量; 油脂积累; 污水净化

中图分类号: X52; Q81

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)06-0112-04

Optimization of cultivation conditions of *Monoraphidium dybowskii* C29 in domestic sewage

WANG Meng, LIU Pinghuai

(College of Materials and Chemistry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to obtain the optimal nutritional conditions of *Monoraphidium dybowskii* C29 growth in domestic sewage, and study how *Monoraphidium dybowskii* C29 took an effect on sewage purification, the experiment was performed by adding different dosages of BG11 medium, adjusting different initial pH and adding different mass concentrations of glucose into sewage to test the biomass, oil production, and nitrogen and phosphorus removal rates. The results showed that under the conditions of dosage of BG11 medium 50% in sewage, pH 7 and final mass concentration of glucose 0.5 g/L, the growth of *Monoraphidium dybowskii* C29 was the best, and the biomass and oil production were 2.74 g/L and 1.04 g/L respectively, at the same time, the removal rates of nitrogen and phosphorus in sewage were 86.09% and 96.64% respectively. Therefore, using domestic sewage to cultivate *Monoraphidium dybowskii* C29 could simultaneously gain the oil-producing microalgae culture and purification of sewage.

Key words: domestic sewage; *Monoraphidium dybowskii* C29; optimization culture; biomass; oil accumulation; sewage purification

收稿日期: 2017-10-11; 修回日期: 2018-03-26

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD14B01); 国家科技型中小企业技术创新基金(13C26244604892); 海南省产学研一体化项目(CXY20150034); 海南省中药现代化科技专项(ZY201327); 海口市海藻生物资源研究与利用技术创新平台(20170440)

作者简介: 王 孟(1992), 女, 硕士研究生, 研究方向为药食同源植物/微藻及其代谢产物(E-mail) 18789060502@163.com。

通信作者: 刘平怀, 教授(E-mail) 605196509@qq.com。

随着社会经济的快速发展, 环境污染越来越严重, 水体富营养化导致的水环境污染是其中一个非常重要的方面^[1]。与此同时, 能源短缺也是人们急需解决的难题, 但化石能源不仅不可再生, 且会加速环境污染^[2]。微藻具有种类繁多、生长速度快、适应性强等特点, 在一定条件下能够大量积累微藻油脂^[3]。且与高等陆生油植物相比, 微藻的单位面积油产量是陆地植物的数十倍^[4]。

早在1957年Qswald^[5]提出利用藻细胞去除氮、磷的概念,以达到污水处理和微藻能源生产的双赢模式。现今越来越多的人试图探索一种既可净化污水,又可通过污水中物质繁殖富油微藻的方法,并提高其生物量和产油率^[6-7]。单针藻(*Monoraphidium dybowskii* C29)富含油脂,有着极大的开发应用潜能^[8]。微藻能够利用污水中的富营养成分生长,既能达到净化污水的目的,也可得到微藻的相关代谢产物,但微藻的生长受到很多外界因素的影响,如pH、温度、污水中氮磷浓度等^[9-11]。因此,本实验利用生活污水培养单针藻,通过逐步优化污水中对单针藻生长和油脂积累的影响因素,最终得到最佳的培养条件,以达到产油微藻单针藻的培养与污水净化相结合的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

单针藻(*Monoraphidium dybowskii* C29)和生活污水:海南大学。BG11培养基根据《生物工艺实验》配方配制。

过硫酸钾、抗坏血酸、钼酸钠、磷酸二氢钾、硝酸钾、葡萄糖均为分析纯,浓盐酸、浓硫酸。

紫外可见分光光度计;电感耦合等离子体质谱仪(美国赛默飞世尔公司);冷冻干燥机。

1.2 实验方法

1.2.1 污水水质测定

取污水经离心、过滤处理,放置冰箱备用。测定其中的氮、磷、pH、盐度。

1.2.2 单针藻培养

采用规格一致的玻璃管培养。用处理后的污水进行培养基的配制,添加BG11母液及葡萄糖,调节pH,光照时间为12 h光照和12 h黑暗,培养温度约为26℃。培养过程中从胶塞上的通气口通入空气,通气量为1.0 L/min。培养周期为12 d。

1.2.3 生长检测

培养过程每24 h取样1次,在680 nm下测定藻液的OD值。

1.2.4 生物量测定

将培养12 d后的藻液于8 000 r/min离心6 min,将所得藻泥用去离子水清洗3遍,真空冷冻干燥。生物量=冻干藻粉质量/培养液体积。

1.2.5 油脂含量测定

参照文献[12]氯仿-甲醇法对总脂进行提取和测定。油脂含量=油脂质量/冻干藻粉质量×100%,油脂产量=生物量×油脂含量。

1.2.6 氮、磷含量测定

总氮按照碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定,总磷按照钼酸铵分光光度法测定。当氮的含量在2~70 μg范围内,线性方程为 $y = 0.0124x - 0.0062$, $R^2 = 0.9998$ 。当磷的含量在0.5~15 μg范围内,线性方程为 $y = 0.1907x - 0.0951$, $R^2 = 0.9898$ 。

1.2.7 重金属的测定

采用电感耦合等离子体发射光谱-质谱(ICP-MS)方法测定重金属含量,通过电感耦合等离子体质谱定量分析。

1.2.8 数据处理

分别采用SPSS 20.0和Origin 8.0软件对数据进行分析 and 图形绘制。

2 结果与讨论

2.1 生活污水主要指标的测定(见表1)

表1 生活污水主要指标测定($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

总氮/(μg/mL)	总磷/(μg/mL)	盐度	pH
27.08 ± 1.23	1.5 ± 0.03	3.5 ± 0.32	9.32 ± 0.13

从表1可以看出,污水中营养成分不足,pH较高。因此,在纯生活污水培养条件下,单针藻不能正常生长,故需对生活污水培养基进行调整。

2.2 不同添加量BG11对单针藻生长和油脂积累的影响

在pH 7、葡萄糖质量浓度0.5 g/L的条件下,研究BG11添加量分别为0、25%、50%、75%、100%(实验吸取母液体积占常规吸取母液体积)对单针藻生长和油脂积累的影响,设3组平行,结果见表2。

表2 不同添加量BG11下单针藻生物量、油脂含量和油脂产量

BG11添加量/%	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0	0.44 ± 0.15 ^a	38.29 ± 1.58 ^a	0.17 ± 0.06 ^a
25	1.02 ± 0.04 ^b	35.08 ± 0.98 ^a	0.36 ± 0.02 ^b
50	2.04 ± 0.15 ^c	34.11 ± 2.58 ^a	0.73 ± 0.03 ^c
75	1.69 ± 0.09 ^c	34.33 ± 1.80 ^a	0.58 ± 0.01 ^d
100	1.73 ± 0.13 ^c	34.33 ± 1.08 ^a	0.64 ± 0.06 ^d

注:每列数字上标字母相同表示无显著性差异($P > 0.05$)。下同。

从表2可以看出,当BG11添加量为50%时生物量最大,与低添加量培养基中生物量有显著性差异,与高添加量组无显著性差异。不同BG11添加量对单针藻油脂含量无显著性差异,但在纯污水下油脂含量最高,而BG11添加量为50%时油脂产量

最高,与其他组均有显著性差异。因此,当 BG11 添加量为 50% 时单针藻的生物量和油脂产量均最大。BG11 添加量过高会造成盐毒害作用,不利于微藻的生长及油脂积累。BG11 添加量过低时营养成分不足,微藻生长受到抑制,但油脂含量会提高,油脂产量总体下降。

2.3 不同 pH 对单针藻生长和油脂积累的影响

在 BG11 添加量 50%、葡萄糖质量浓度 0.5 g/L 的条件下,研究 pH(5、6、7 和 8)对单针藻生长和油脂积累的影响,结果见表 3。

表 3 不同 pH 下单针藻生物量、油脂含量和油脂产量

pH	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
5	2.10 ± 0.04 ^a	26.84 ± 1.21 ^a	0.59 ± 0.01 ^a
6	2.38 ± 0.04 ^{ab}	27.84 ± 0.72 ^a	0.64 ± 0.02 ^a
7	2.58 ± 0.11 ^b	31.90 ± 0.16 ^b	0.83 ± 0.03 ^b
8	2.20 ± 0.10 ^a	29.42 ± 1.26 ^{ab}	0.64 ± 0.06 ^a

从表 3 可以看出,pH 为 7 时生物量最大,且与 pH 5 和 pH 8 相比有显著性差异。单针藻油脂含量随着 pH 的升高先增加后减少,在 pH 为 7 时达到最大,且与低 pH 的油脂含量有显著性差异。在 pH 为 7 时油脂产量最大,与其他组均有显著性差异。推测培养基的 pH 会影响光合作用中 CO₂的可用性,同时由于 pH 又会影响细胞膜的渗透性,影响微藻细胞对培养液中有效成分的吸收和利用,以及对代谢产物的再利用等,故 pH 为影响藻类生长代谢的重要因子之一。

表 5 单针藻对生活污水的处理结果

项目	Cr	Co	Ni	Cu	As	Cd	Sn	Pb	TN	TP
培养前含量/(μg/L)	18.76	14.78	43.2	34.85	7.02	10.35	12.62	19.61	123 227	6 820
培养后含量/(μg/L)	7.797	6.95	15.45	13.14	2.86	3.491	4.859	7.051	17 140	229
去除率/%	58.44	52.98	64.24	62.30	59.26	66.27	61.50	64.04	86.09	96.64

从表 5 可以看出,单针藻对污水培养基中的氮、磷去除率分别达到 86.09% 和 96.64%。同时单针藻对表中 8 种重金属都有去除作用,去除率均大于 50%,对镍、铜、镉、锡和铅的去除率都在 60% 以上。

综上,利用污水培养微藻不仅可以利用污水中的氮磷等营养物质,还可以缓解富营养化状态,且微藻对重金属离子也有一定的吸附作用,能够清除污水中有毒的重金属离子。已有研究报道^[13],微藻对重金属具有一定的耐受性,在一定的重金属浓度内,吸附的重金属具有提高油脂及叶绿素含量的作用。

3 结论

本实验利用生活污水培养单针藻,最优培养条件为 BG11 添加量 50%、pH 7 及终葡萄糖质量浓度

2.4 不同葡萄糖质量浓度对单针藻生长和油脂积累的影响

在 BG11 添加量 50%、pH 7 的条件下,在培养基中分别添加葡萄糖至终葡萄糖质量浓度为 0、0.5、1.0、1.5 g/L,研究葡萄糖质量浓度对单针藻生长和油脂积累的影响,结果见表 4。

表 4 不同质量浓度葡萄糖下单针藻生物量、油脂含量和油脂产量

葡萄糖质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0	2.09 ± 0.17 ^a	31.78 ± 0.79 ^a	0.67 ± 0.07 ^a
0.5	2.74 ± 0.15 ^{bc}	37.76 ± 1.85 ^{ac}	1.04 ± 0.11 ^{bc}
1.0	2.46 ± 0.10 ^{ab}	33.60 ± 1.45 ^{ab}	0.83 ± 0.01 ^{ab}
1.5	2.42 ± 0.14 ^d	32.04 ± 0.32 ^{cd}	0.78 ± 0.07 ^d

从表 4 可以看出,添加不同质量浓度葡萄糖的藻液生物量、油脂含量和油脂产量均高于不添加葡萄糖的自养组,同时在葡萄糖质量浓度为 0.5 g/L 时均达到最大,随着葡萄糖质量浓度的继续增加,单针藻生物量、油脂含量和油脂产量有所降低,故最适污水培养单针藻的葡萄糖质量浓度为 0.5 g/L。

2.5 污水培养单针藻对污水中金属离子及氮、磷的去除效果

在 BG11 添加量 50%、pH 7、终葡萄糖质量浓度 0.5 g/L 条件下培养单针藻 12 d,测定污水中氮、磷及重金属含量,结果见表 5。

0.5 g/L,此时单针藻生物量和油脂产量分别为 2.74、1.04 g/L。同时,单针藻对氮、磷离子的去除率分别为 86.09% 和 96.64%,对 8 种有毒的重金属离子的去除率都超过 50%。因此,可以利用单针藻去除污水中的氮磷元素及重金属离子,达到污水处理和微藻培养相结合的目的。

参考文献:

- [1] CHI Z Y, ZHENG Y B, JIANG A P, et al. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165 (2):442-453.
- [2] DEMIRBAS M F. Biofuels from algae for sustainable development [J]. Appl Energy, 2011, 88(10):3473-3480.

(下转第 131 页)

- compounds and the taste of astringency and bitterness in apple fruit[J]. *Acta Horti Sin*, 2005, 32(5): 778-782.
- [3] ESQUENAZI D, WIGG M D, MIRANDA M. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract [J]. *Res Microbiol*, 2002, 153(10): 647-652.
- [4] PARK J C, ITO H, YOSHIDA T. ¹H-NMR assignment of HIV protease inhibitor, procyanidin B3 isolated from *Rosa rugosa* [J]. *Nat Prod Sci*, 2003, 9(2): 49-51.
- [5] SHAHAT A A, COS P, DE BRUYNE T, et al. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(6): 539-541.
- [6] FAN J, DING X, GU W. Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1): 168-177.
- [7] JEREZ M, TOURINO S, SINEIRO J, et al. Procyanidins from pine bark: relationships between structure, composition and antiradical activity [J]. *Food Chem*, 2007, 104(2): 518-527.
- [8] MALDONADO P D, RIVERO-CRUZ I, MATA R, et al. Antioxidant activity of a-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6): 1996-2001.
- [9] SHI J, NAWAZ H, POHORLY J, et al. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology [J]. *Food Rev Int*, 2005, 21(1): 139-166.
- [10] 李斌, 孟宪军, 智红涛, 等. 葡萄籽中原花青素的稳定性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(10): 71-73.
- [11] 洪新, 唐克, 鞠广龙. 葡萄籽中原花青素稳定性研究 [J]. *粮油食品科技*, 2013, 21(4): 61-64.
- [12] 白欢欢, 刘睿杰, 王兴国, 等. 不同纯度花生红衣原花青素的制备工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2017, 42(7): 74-78.
- [13] LIU Z Q, YANG Q L, ZHANG C S, et al. Optimization of ultrasonic extraction technique of proanthocyanidin from peanut skin [J]. *Adv Mater Res*, 2010, 156-157: 778-784.
- [14] CANO-CHAUCA M, STRINGHETA P C, RAMOS A M, et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2005, 6(4): 420-428.
- [15] VERSTRAETEN S V, HAMMERSTONE J F, KEEN C L, et al. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(12): 5041-5048.
- [16] IWASHINA T. The structure and distribution of the flavonoids in plants [J]. *J Plant Res*, 2000, 113(3): 287-299.
- [17] KHANBABAEE K, VAN REE T. Classification and definition [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(6): 641-649.
- [18] KOSINSKA A, XIE Y, DIERING S, et al. Stability of phenolic compounds isolated from cocoa, green tea and strawberries in Hank's balanced salt solution under cell culture conditions [J]. *Polish J Food Nutr Sci*, 2012, 62(2): 91-96.
- [19] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.

(上接第 114 页)

- [3] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 294-306.
- [4] SINGH J G S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production [J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2010, 14(9): 2596-2610.
- [5] OSWALD W J. High rate ponds in waste disposal [J]. *Devel Ind Microb*, 1963, 4: 112-119.
- [6] 王翠红, 李日强, 辛晓芸. 钝顶螺旋藻处理氨氮废水的研究 [J]. *上海环境科学*, 2002(12): 728-731.
- [7] 杨静. 造纸废水培养富油微藻的研究 [J]. *生物质化学工程*, 2012, 46(4): 64-65.
- [8] 张森. 热带海洋富油微藻筛选、培养及采收初步研究 [D]. 海口: 海南大学, 2014.
- [9] 朱俊英, 荣峻峰, 宗保宁. 影响微藻规模化培养的因素 [J]. *催化学报*, 2013, 20(1): 80-100.
- [10] 王翠, 李环, 王钦琪, 等. pH 对沼液培养的小球藻生长及油含量积累的影响 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1074-1079.
- [11] 杨勋. 热带微藻产油性能的评价及油脂积累影响因素研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [12] MATA T M, MARTINS A A, CAETANO N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review [J]. *Renew Sust Energy Rev*, 2010, 14(1): 217-232.
- [13] 王珊珊. 栅藻对重金属离子的富集及其机理的研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2013.